



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Analiza interacțiilor proteomice funcționale din
degradarea asociată reticulului endoplasmic
(ERAD) și prezentării antigenelor în melanom
prin spectrometrie de masă**

COORDONATORI ȘTIINȚIFICI:
DR. ANDREI-JOSE PETRESCU
DR. NICULINA MITREA

DOCTORAND:
CRISTIAN V.A. MUNTEANU

BUCUREȘTI

2016

CUPRINS (TEZA DE DOCTORAT IN EXTENSO)

CUPRINS.....	IV
LISTĂ DE FIGURI.....	VI
LISTĂ DE TABELE.....	IX
SCOPUL ACESTOR STUDII.....	10
INTRODUCERE	12
Capitolul 1. ERAD un sistem complex de proteine reglatoare.....	12
1.1. Introducere: de la biosinteza și până la degradarea proteinelor în ER.....	12
1.2. Trimmingul manozelor în ERAD – “gustul dulce” al degradării	14
1.3. Evenimente post-trimming: ce urmează ?.....	16
1.4. Problema retrotranslocării.....	17
1.5. O posibilă degradare asociată ER glican independentă	18
1.6. EDEM 2 – Oare activitatea manozidazică spune întreaga poveste ?.....	19
1.7. Proteine incomplet pliate ca substrat ERAD.....	21
Capitolul 2. Generarea epitopilor și prezentarea acestora în melanom	24
2.1. Melanomul – o boală devastatoare	24
2.2. Răspunsul molecular imun în melanom.....	24
2.3. Imunoterapia în melanom	26
2.4. Tirozinaza – substrat ERAD și sursă de peptide HLA	27
Capitolul 3. Spectrometria de masă (MS) în analiza interacțiilor proteomice.....	30
3.1. Tehnologii MS utilizate în analiza interacțiilor proteomice	30
3.2. Analiza datelor din MS în studiul interacțiilor proteomice	33
MATERIALE ȘI METODE	37
Capitolul 1. Materiale	37
1.1. Culturi celulare.....	37
1.2. Biochimie și spectrometrie de masă	38
Capitolul 2. Metode	44
2.1. Biologie moleculară	44
2.2. Culturi celulare.....	44
2.3. Metode biochimice.....	46
2.4. HPLC și spectrometrie de masă.....	51
REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	69
Capitolul 1. Determinarea relațiilor interacție-funcție a EDEM 2 prin MS	69
1.1. Interacțiile proteomice ale EDEM 2 în linia de melanom A375	69
1.2. Evaluarea funcțională a EDEM 2 și domeniului său manozidazic în ERAD .	89
1.3. Concluzii	105
Capitolul 2. Caracterizarea glicozilării tirozinazei și a peptidelor sale asociate HLA I prin MS.....	107
2.1. Analiza glicozilării și degradării tirozinazei în linia de melanom A375	107
2.2. Identificarea unor peptide drivate tirozinazei, asociate MHC-I, prin MS	119
2.3. Concluzii	148
CONCLUZII FINALE.....	149

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....	152
MULȚUMIRI	157
REFERINȚE	158
LISTA ABREVIERILOR.....	184
ANEXĂ.....	191

SCOPUL STUDIILOR

Melanomul, cancerul melanocitelor (celulele care conțin pigmentul ce dă culoarea pielii) a atins proporții epidemice și este asociat cu o rată crescută a mortalității (Radovic-Kovacevic și colab., 1997). Imunoterapia reprezintă o alternativă promițătoare la această problemă, deoarece celulele tumorale sunt capabile să prezinte la suprafața lor peptide prin intermediul complexului major de histocompatibilitate I - MHC I (Major histocompatibility complex I), care să activeze sistemul imun, iar acesta, la rândul său, să distrugă tumora. Odată cu avansarea studiilor ce sugerează această cale ca fiind una promițătoare pentru tratamentul melanomului (Cheever și colab., 2009), căutarea de noi secvențe cu potențial imunogen și înțelegerea mecanismului prin care acestea sunt obținute au devenit obiective de un interes major atât din punct de vedere al biologiei tumorale cât și al perspectivei clinice.

O sursă importantă de peptide o reprezintă proteinele destinate căii secretorii, care atunci când nu se pliază corect în reticulul endoplasmic sunt trimise spre degradare pe calea pe calea ubiquitin proteazomală în degradarea asociată reticulului endoplasmic - ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) degradare ce rezultă în peptide care sunt preluate de mecanismele de prezentare MHC I/ MHC II.

Scopul acestei lucrări este înțelegerea mecanismului molecular al degradării asociate reticulului endoplasmic prin studierea interacțiilor funcționale din această cale, care duc la degradarea proteinelor, cu accent pe EDEM 2 (Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 2), o proteină rezidentă în ER presupusă a declanșa degradarea proteinelor incomplete pliate printr-un mecanism încă incomplet elucidat.

Specific, obiectivele pe această linie de cercetare au fost:

- Identificarea proteinelor asociate EDEM 2 în melanom
- Caracterizarea complexelor proteice funcționale în ERAD ale EDEM 2
- Analiza comparativă a EDEM 2 și a tirozinazei folosind inhibitori de trafic și procesare

În studiile menționate am folosit celule umane de melanom și celule embrionare de rinichi în care am studiat proteinele asociate cu EDEM 2, dar și degradarea unor substraturi ERAD. Printre aceste substraturi a fost selectată și tirozinaza, o glicoproteină

folosită în laboratorul nostru ca model în studiul mecanismelor căii secretorii. Plierea și traficul subsecvent al tirozinazei este strâns legat de interacțiile sale cu sistemele de control și verificare din reticulul endoplasmic. Astfel în funcție de prezența și procesarea corectă a glicanilor tirozinazei în reticulul endoplasmic, aceasta este fie trimisă mai departe pe calea secretorie, către melanozomi, fie spre degradare pe calea ERAD.

În acest context, în partea a doua a acestei lucrări m-am axat pe folosirea tirozinazei ca model pentru studiul glicozilării în celulele de melanom și pentru caracterizarea peptidelor derivate de la aceasta cu potențiale aplicații în imunoterapie. În acest sens obiectivele au fost următoarele:

- Analiza N-glicozilării tirozinazei în melanom
- Caracterizarea epitopului 369-377 al tirozinazei în melanom folosind cromatografia de lichide și spectrometria de masă
- Identificarea unor potențiale noi secvențe imunogene ale tirozinazei

Din punct de vedere tehnic am folosit spectrometria de masă și cromatografia de lichide, combinate cu o gamă largă de metode biochimice, precum și tehnici de bază ale biologiei moleculare și celulare. Pentru analiza unor rezultate MS prezentate în această lucrare am folosit și script-uri realizate în R.

INTRODUCERE

Introducere: de la biosinteza și până la degradarea proteinelor în reticulul endoplasmic (ER)

Se estimează că aproximativ o treime din proteinele biosintetizate la nivelul unei celule eucariote mamaliene sunt trimise la degradare (Schubert și colab., 2000). Proteinele destinate exportului pe calea secretorie sunt biosintetizate pe ribozomii regăsiți la nivelul reticulului endoplasmic (Walter și Blobel, 1980). În același timp, co-translațional, proteinele sunt N-glicozilate prin transferul în bloc a secvenței $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ (G_3M_9) pe resturile de asparagină aflate în secvența consens Asn-X-Ser/Thr (unde X poate substitui orice aminoacid cu excepția Pro) (Aebi, 2013). Două dintre unitățile de glucoză periferice sunt ulterior eliminate de către Glucozidaza I (Glc I) și Glucozidaza II (Glc II), lăsând un singur rest de glucoză (G_1M_9) ce constituie un semnal de recunoaștere a glicoproteinei de către chaperonii calnexină și calreticulină (CNX/CRT) (Thomson și Williams, 2005, Kapoor și colab., 2004, Zapun și colab., 1997, Hubbard și Ivatt, 1981). Această recunoaștere inițiază procesul de pliere asistată de către chaperoni moleculari ai proteinei nou sintetizate. La acest nivel acționează un sistem de verificare a calității plierii proteinelor - ERQC (ER quality control), prin transferul proteinelor pliate către export pe calea secretorie și sortarea proteinelor incomplet pliate fie pentru o nouă rundă de pliere asistată de chaperoni moleculari prin monoregluozilarea UGGT dependentă a glicanului proteinei, fie trimiterea acestuia către degradare pe calea ERAD (Ellgaard și Helenius, 2003).

EDEM 2 – Oare activitatea manozidazică spune întreaga poveste ?

Similar cu procesul plierii și în cazul degradării proteinelor incomplet pliate a fost propus un mecanism glican-dependent, rezultând astfel conceptul glicoprotein ERAD (gpERAD). O atenție deosebită în acest sens a fost axată asupra proteinelor capabile să transforme G_0M_9 în G_0M_8 , prin îndepărtarea unui rest de manoză, posibilitatea regluozilării G_0M_8 nefiind demonstrată, fapt ce sugerează că această reacție duce la selectarea definitivă a substratului pentru degradare (Tannous și colab., 2015, Hirao și colab., 2006, Olivari și Molinari, 2007). Inițial ER Man I a fost propusă ca manozidază

ce acționează ca inițiator în gpERAD, prin hidroliza îndepărtării unei manoze în secvența G_0M_9 (Gonzalez și colab., 1999, Tremblay și Herscovics, 1999), dar studii ulterioare au relevat faptul că specificitatea enzimatică este dependentă de timp și concentrație, rezultând și secvențe tip G_0M_5 - G_0M_6 (Herscovics și colab., 2002). Date recente au atribuit acest rol proteinei EDEM 2, unul din membrii familiei de proteine EDEM (Ninagawa și colab., 2014). Astfel, a fost propus un mecanism prin care EDEM 2 îndepărtează unul dintre resturile de manoză de pe catena B a glicanilor, inițiind degradarea gpERAD a substratului.

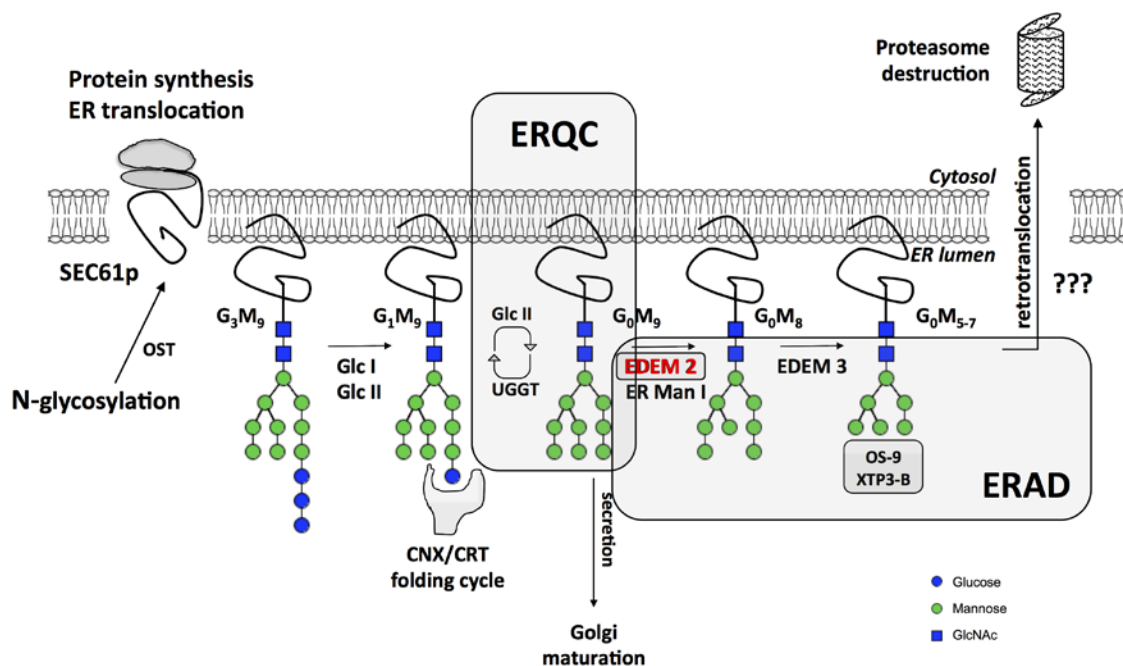


Figura 1. Reprezentarea schematică a proceselor de pliere, ERQC și ERAD glican-dependente.

Ca urmare a translocării proteinelor sintetizate la nivelul ribozomilor atașați reticulului endoplasmic, lanțul polipeptidic este glicozilat prin transferul glicanilor de pe dolicol-pirofosfat de către oligozahariltransferază -OST (Oligosaccharyltransferase). Glucozidaza I și Glucoziadaza II (Glc I și Glc II) îndepărtează două din cele trei resturi de glucoză din secvența glicanilor atașați, ceea ce rezultă în inițierea procesului de pliere al proteinei în ciclul CNX/CRT. Un sistem de control al calității plierii proteinelor (ERQC) sortează apoi polipeptidele în funcție de statusul plierii acestora.

EDEM 2 a fost descoperit simultan de către două grupuri independente, pe baza analizei bioinformatică a bazelor de date cu secvențe nucleotidice (Mast și colab., 2005, Olivari și colab., 2005). Secvența umană EDEM 2 este o proteină cu 578 de aminoacizi (~ 65 kDa) cu o secvență semnal localizată în capătul N-terminal al proteinei, care ulterior biosintezei este îndepărtată. Analiza bazei de date UniProt (UniProt, 2015) a relevat prezența a două izoforme, raportate ca fiind obținute prin splicing alternativ, în cazul

izoformei 2 lipsind aminoacizii între pozițiile 36 și 72. La om, EDEM 2 este descris ca o proteină solubilă cu 4 potențiale situsuri de N-glicozilare (N90, N112, N289 și N450), care aparent sunt ocupate, estimare bazată pe analiza digestiilor Endo H ale proteinei supraexprimate în celulele HEK293, care au relevat o schimbare a mobilității electroforetice (Olivari și colab., 2005). Totuși, până acum nu au fost realizate studii privind ocupanța situsurilor de N-glicozilare și un eventual posibil rol al acestora în funcționalitatea proteinei în ERAD. Analiza comparativă a celorlalți doi membri ai subfamiliei de proteine EDEM (EDEM 1 și EDEM 3) a relevat o similitudine a secvenței restrânsă doar la nivelul domeniului manozidazic. Prin tehnica northern blot, Mast și colab., au arătat că EDEM 2 este exprimat în majoritatea țesuturilor, cu un nivel mai ridicat la nivelul intestinului și în leucocitele din sângele periferic (Mast și colab., 2005). Similar cu ceilalți omologi ai acestei subfamilii, nivelul proteinei crește în celulă ca urmare a stresului indus de tunicamicină (Olivari și colab., 2005). Prin microscopie de fluorescență, a fost arătat faptul că EDEM 2 este o proteină rezidentă în reticulul endoplasmic iar prin îndepărtarea capătului C-terminal localizat imediat după domeniul manozidazic, proteina a fost identificată și extracelular, sugerând un posibil rol al acestor aminoacizi în localizarea la nivelul reticulului endoplasmic a proteinei (Mast și colab., 2005), deși proteina nu conține o secvență convențională de retenție la nivelul reticulului endoplasmic (KDEL). Experimentele inițiale realizate cu substrat marcat tip G_0M_9 - G_0M_5 nu au relevat o activitate manozidazică a proteinei, dar autorii au arătat că EDEM 2 supraexprimat în celulele HEK293, interacționează cu câteva dintre proteinele incomplet pliate ce sunt substrat ERAD (Mast și colab., 2005). Mai mult decât atât, ambele grupuri au arătat că EDEM 2 poate induce degradarea unor astfel de proteine, dar nu și a unor proteine asemănătoare neglicozilate (Mast și colab., 2005, Olivari și colab., 2005). De remarcat, că varianta truncată a EDEM 2 - obținută prin îndepărtarea aminoacizilor din porțiunea C-terminală, localizată în afara domeniului manozidazic - nu a arătat același efect asupra proteinelor incomplet pliate din reticulul endoplasmic (Mast și colab., 2005). Unii autori au arătat că EDEM 2 este implicat într-un mecanism tip SEC61p independent de retrotranslocare a ricinului, o glicoproteină toxică endocitată, care este parțial transportată în Golgi și ulterior retrograd în reticulul endoplasmic (Slominska-Wojewodzka și colab., 2014). Autorii au sugerat că EDEM 2 poate recunoaște substrat diferite, comparativ cu EDEM 1, prin observația că o cantitate mult mai mare glicoproteinei toxice interacționează cu EDEM 2 față de EDEM 1. Într-o

abordare ușor diferită Tang și colaboratorii au arătat că EDEM 2 este implicat în degradarea atât a variantei glicozilate a proteinei sonic hedgehog (SHH) cât și a celei neglicozilate (Tang și colab., 2014). SHH este o proteină implicată în organogeneză (Lewis și Eisen, 2001), care se autoclivează în reticulul endoplasmic, rezultând un fragment C-terminal care este substrat ERAD (Tang și colab., 2014). Acest studiu a arătat în plus, interacția EDEM 2 supraexprimat cu alte componente ale ERQC și ERAD, precum calnexină și SEL1L (Tang și colab., 2014). Un studiu semnificativ privind rolul EDEM 2 în ERAD este reprezentat de către experimentele realizate de către Ninagawa și colab., care au observat o acumulare a structurilor de tip G₀M₉, în urma separării prin HPLC a glicanilor totali marcați fluorescenți, extrași dintr-o linie cu gena EDEM 2 deletată (Ninagawa și colab., 2014). Autorii au arătat că EDEM 2 nu interacționează cu SEL1L atunci când este supraexprimat stabil în HCT116, o linie de carcinom colorectal uman (Ninagawa și colab., 2014, Hosokawa și colab., 2006). Tot în privința interacțiilor cu alte componente ERQC sau ERAD Jansen și colab., au arătat prin experimente de pull-down că secvența omoloagă de șoarece a EDEM 2 poate interacționa cu proteine implicate în pliere precum PDIA3, PDIA4, PDIA6 sau Thioredoxin domain-containing protein 5 (Jansen și colab., 2012). Totuși până la această dată nu există publicații privind interacțiile acestei proteine cu alți membrii ai ERAD, iar având în vedere că la ora actuală EDEM 2 este propus ca fiind proteina ce inițiază degradarea în ERAD, obținerea unor date privind posibilitatea existenței unor astfel de interacții este de mare interes.

Imunoterapia în melanom

Melanomul malign cutanat se află pe locul șase ca frecvență în diagnosticul cancerului în SUA (Erdei și Torres, 2010, Jemal și colab., 2006). Un aspect important al melanomului malign este numărul mare de decese, cauzate de apariția tumorilor la nivelul pielii (Radovic-Kovacevic și colab., 1997), evaluările actuale estimând decesul unui pacient la fiecare șase ore în SUA (Erdei și Torres, 2010). Studiile realizate pe culturi celulare, folosind anticorpi monoclonali au dus la identificarea unui număr mare de antigene prezente la suprafața celulelor din melanom (Herlyn și Koprowski, 1988, Kath și Herlyn, 1989). În mod similar infecțiilor patogenice, celulele tumorale sunt capabile să semnalizeze sistemului imun prin intermediul antigenelor tumorale de

suprafață (TAAs), transformarea malignă, conducând ulterior la activarea sistemului imun, ceea ce dă posibilitatea organismului să distrugă tumora. Observația că șoarecii imunodeprimați dezvoltă un număr mai mare de tumori corelată cu faptul că tumorile pot evita sistemul imun prin scăderea nivelului complexului major de histocompatibilitate (MHC), au pus bazele a ceea ce astăzi reprezintă imunoterapia (Dunn și colab., 2002, Ahmad și colab., 2004). La om, MHC codează antigenul leucocitar uman-HLA (human leucocyte antigen), care se găsește sub forma a două clase, în funcție de tipul antigenelor pe care le prezintă: complexe HLA clasa I și complexe HLA clasa II. HLA clasa I prezintă antigene rezultate prin degradarea unor proteine intracelulare, în timp ce HLA clasa II prezintă antigene rezultate în urma degradării unor proteine extracelulare (Krensky, 1997). În general antigenele prezentate prin complexe HLA clasa I sunt obținute în urma degradării proteazomale a proteinelor intracelulare. Observația că prevalența melanomului este mai mare în cazul indivizilor cu un ten mai alb (Erdei și Torres, 2010), indică faptul că ar putea exista o corelație între pigmentația pielii și acest tip de cancer. La om, ca urmare a expunerii la razele ultraviolete, este produsă melanina, pigmentul responsabil de colorația pielii, sintetizată la nivelul melanozomilor, structuri de lineaj lizozomal ce se regăsesc în melanocite (Lin și Fisher, 2007).

Tirozinaza - sursă de peptide pentru HLA clasa I

Biosinteza melaninei este catalizată de către o serie de enzime, printre care tirozinaza și proteinele înrudite cu aceasta (TRP1 și TRP2) (Slominski și colab., 2004, Jimenez-Cervantes și colab., 1994). Tirozinaza este o enzimă cupru-dependentă care catalizează reacția de hidroxilare a tirozinei la dihidroxifenilalanină (DOPA) și oxidarea DOPA la DOPA chinonă, prima reacție fiind determinantă de viteză în biosinteza melaninei (Figura 2). Biosinteza tirozinazei are loc în reticulul endoplasmic la nivelul căruia proteina este N-glicozilată într-o reacție catalizată de către N-oligozahariltransferaza în care glicanii sunt transferați de pe dolicol-pirofosfat pe lanțul polipeptidic (Branza-Nichita și colab., 2000b, Aebi, 2013) (Figura 2). Ulterior tirozinaza este supusă unui proces de pliere în cadrul ciclului calnexină/calreticulină (ciclul CNX/CRT), iar apoi moleculele polipeptidice sunt sortate de către sistemul ERQC (Branza-Nichita și colab., 1999). La acest nivel fracția de molecule incomplet pliate, este trimisă către ERAD, în

timp ce moleculele care ating conformația stabilă sunt trimise mai departe pe calea secretorie, via Golgi cu destinația finală în melanozomi (Petrescu și colab., 2000, Ostankovitch și colab., 2005, Jimbow și colab., 2000). Studiile au arătat că în diverse tipuri de melanom, tirozinaza este deseori incomplet pliată fiind trimisă către degradare pe calea ERAD, sugerând faptul că proteina ar putea constitui o bogată sursă de peptide HLA I (Ostankovitch și colab., 2005, Slingsluff, 1996). Acest lucru a fost confirmat prin experimente ulterioare, iar într-un studiu de prioritizare a antigenelor tumorale, tirozinaza a fost clasată în top 20 privind potențiala eficiență clinică în imunoterapie, dintr-o listă cu peste 75 de antigene analizate (Cheever și colab., 2009).

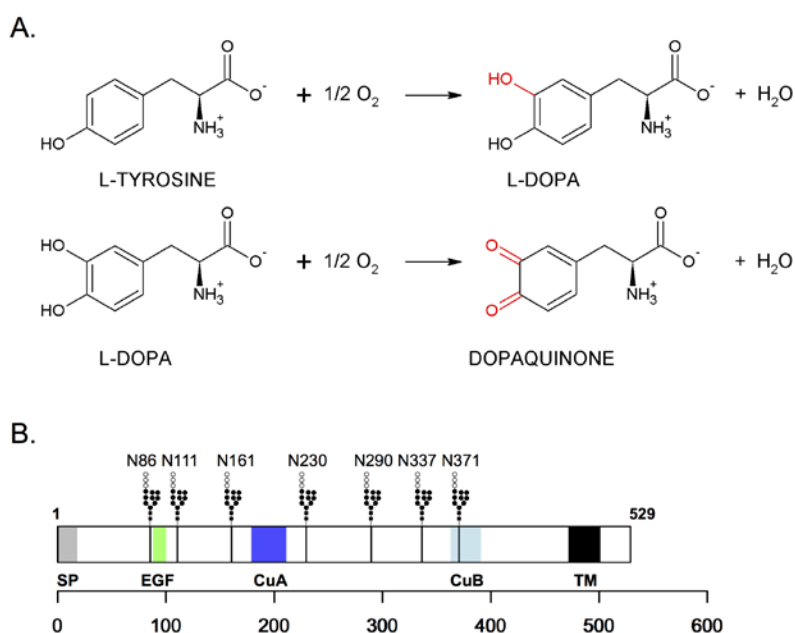


Figura 2. Reprezentarea schematică a reacțiilor catalizate de către tirozinază (A) și principalele elemente structurale ale acesteia (B).

A. Tirozinaza catalizează transformarea L-tirozinei la L-DOPA și oxidarea produsului de reacție la dopachinonă. B. Tirozinaza umană conține un domeniu transmembrantar, o porțiune C-terminală citosolică precum și doi centrii de legare a cuprului.

Una dintre cele mai abundente secvențe antigenice asociate HLA I, derivate de la tirozinază este reprezentată de către epitopul restricționat HLA-A*02 YMDGTMSQV (peptidul YMD), care a fost găsit ca fiind prezentat de ordinul a mii de copii pe celulă, în unele tipuri de melanom (Michaeli și colab., 2009). Peptidul a fost descoperit prin analiza MS (spectrometrie de masă) a unor secvențe peptidice extrase din celule de melanom (Cox și colab., 1994, Engelhard și colab., 1993) și a fost descris printre primele secvențe care se prezintă la suprafață sub o formă modificată, față de secvența genomică, care corespundea secvenței de aminoacizi YMNGTMSQV (Skipper și

colab., 1996). Ulterior a fost demonstrat faptul că transformarea asparaginei din poziția 373 are loc prin îndepărtarea glicanului de către Peptidil:N-Glicozidaza F citosolică (PNGase F) (Mosse și colab., 1998). Pe lângă acest lucru, au fost descoperiți pacienți cu melanom ce prezintă limfocite T citotoxice capabile să recunoască complexul HLA I-peptid YMD, ceea ce a deschis calea utilizării acestuia în imunoterapie (Mosse și colab., 1998).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

EDEM 2 este asociat cu membrii sistemului de pliere, ERQC și ERAD

Secvența umană EDEM 2 căreia i s-a adăugat la capătul C-terminal aminoacizii corespunzători hemaglutininei virusului gripal uman a fost supraexprimată stabil în celulele de melanom A375, care au fost lizate și purificate folosind cromatografia de afinitate, cuplată cu spectrometria de masă pentru detecția proteinelor coimunoprecipitate. Protocolul a fost optimizat în ceea ce privește metoda de extracție a proteinelor din materialul biologic, anticorpul folosit în cadrul îmbogățirii probei, soluția folosită la eluția proteinelor coimunoprecipitate etc. Pe lângă etapele din cadrul purificării prin afinitate a proteinei EDEM 2, au fost optimizate și etape din cadrul pregătirii probei pentru analiza prin spectrometria de masă, rezultând un protocol GeLC-MS/MS optimizat, ce combină separarea electroforetică a proteinelor în gel de poliacrilamidă cu separarea cromatografică a peptidelor rezultate în urma digestiei proteinelor separate în etapa anterioară și detecția acestora prin spectrometrie de masă (Figura 3). Deoarece toate experimentele cu detecție prin spectrometrie de masă au fost realizate folosind un instrument de înaltă rezoluție Orbitrap Velos Pro echipat cu fragmentare tip disociere prin transfer de electroni-ETD (Thermo Fisher Scientific), protocolul GeLC-MS/MS optimizat a fost verificat în privința acurateții maselor peptidelor măsurate și în privința eficienței fracționării acestora. Figura 4 redă schematic o ierarhizare clusterizată a peptidelor identificate într-o probă, folosind protocolul GeLC-MS/MS. Se poate observa că fiecare peptidă poate fi atribuită unei singure fracții, subliniind eficiența fracționării. Există totuși câteva secvențe care sunt regăsite în mai multe fracții, ceea ce indică faptul că acestea ar putea fi contaminanți, sau peptide cros-contaminante între fracții ale aceleiași probe, protocolul asumând o comparație doar între probe. Din acest motiv peptide care aparțin unor proteine de o anumită masă moleculară, pot fi totuși identificate în fracții corespunzătoare unei alte mase moleculare. Probele au fost pregătite și analizate în triplicate biologice alături de un control negativ (celule transfectate cu vector) folosind o metodă de achiziție automată tip data-dependent, în care peptidele separate folosind cromatografia de înaltă performanță au fost detectate printr-o scanare în trapa orbitală (rezoluția 60 000 la m/z

400), urmată de o scanare în trapa liniară a fragmentelor rezultate în urma fragmentării de tip disociere indusă prin coliziune cu un gaz inert - CID (Collision Induced Dissociation). Datele achiziționate au fost analizate folosind algoritmul SEQUEST pentru identificarea peptidelor și asamblarea acestora în proteine. Prin această metodă au fost identificate 3283 proteine.

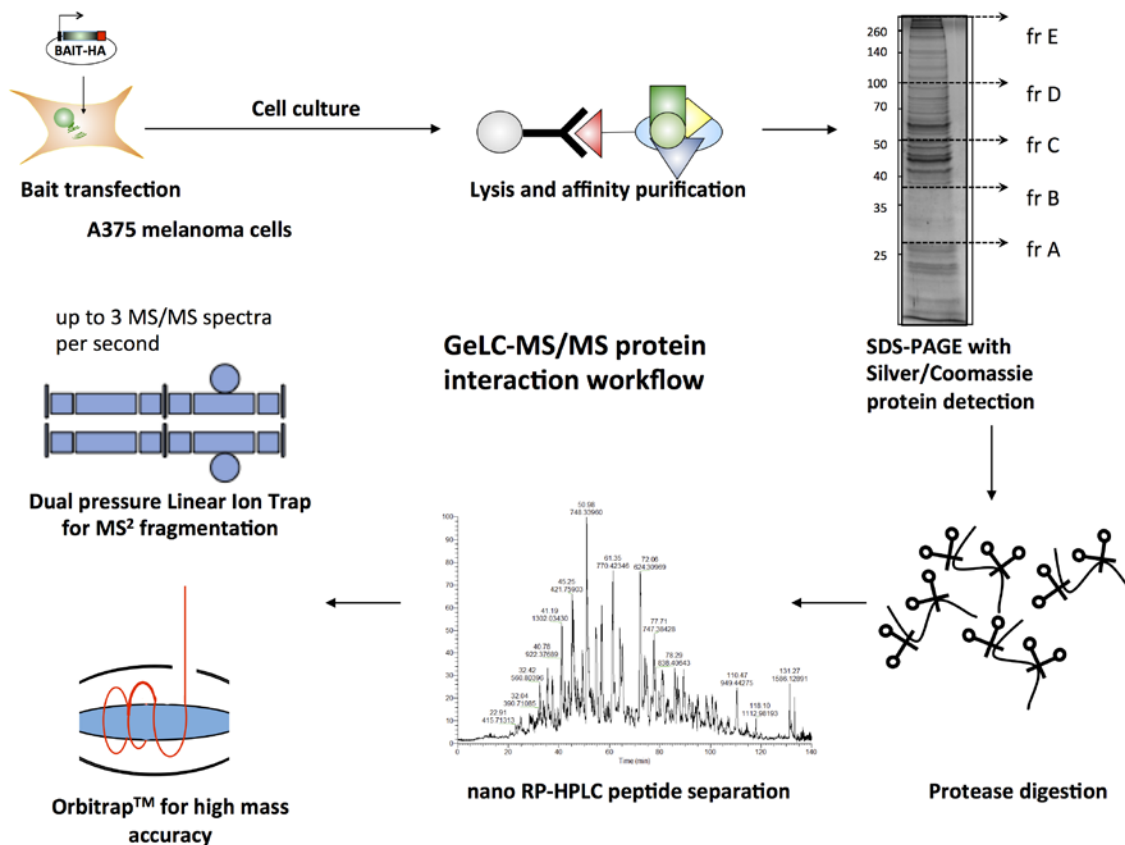


Figura 3. Reprezentarea schematică a protocolului GeLC-MS/MS utilizat pentru analiza interacțiilor proteinei EDEM 2.

După transfecția proteinei de interes, celulele au fost crescute până la o confluență de peste 90 % într-un flask tip T75 (~ 10×10^6 celule/replicat). Au fost optimizate etapa de liză a celulelor, de cromatografie de afinitate precum și pregătirea probei pentru analiza prin spectrometrie de masă. Proteinele separate prin electroforeză monodimensională în gel de poliacrilamidă au fost detectate prin colorație cu azotat de argint sau Coomassie. Ulterior gelul rezultat a fost fracționat, iar fiecare fracție a fost supusă digestiei în gel a proteinelor cu tripsină. Peptidele rezultate au fost extrase și separate prin cromatografie de lichide în fază inversă cuplată cu detecție prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție și fragmentare cu detecție în trapa liniară a ionilor fragment rezultați. Protocolul a fost optimizat empiric și pe baza publicațiilor în domeniu (Kalli și colab., 2013, Piersma și colab., 2013, Shevchenko și colab., 2006).

Rezultatele au fost exportate și reformatate folosind un script R dezvoltat de către autor, pentru o analiză ulterioară folosind algoritmul SAINTexpress. Ca urmare a acestei

analize, 45 de proteine au fost considerate ca fiind potențial asociate cu EDEM 2 în celulele de melanom A375. Pentru a crește confidența listei proteinelor, aceleași date achiziționate au fost reanalizate folosind o strategie alternativă, bazată pe utilizarea algoritmului Andromeda, integrat în MaxQuant (Cox și Mann, 2008) pentru identificarea peptidelor și asamblarea acestora în proteine. Pentru analiza ulterioară a rezultatelor a fost utilizat și modulul maxLFQ (Cox și colab., 2014), pentru calcularea valorilor LFQ.

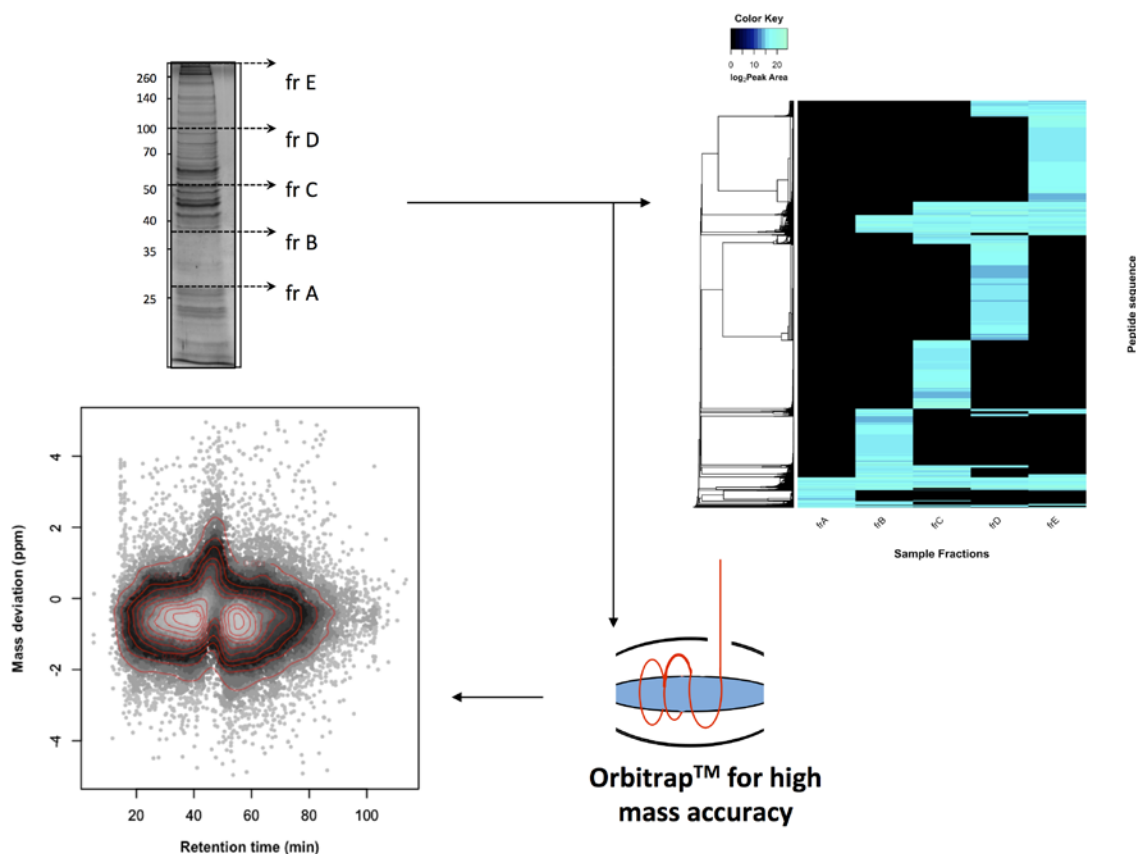


Figura 4. Eficiența fracționării și acurateții masei peptidelor în cadrul protocolului optimizat GeLC-MS/MS.

Valorile curentului de ioni asociate fiecărei peptide identificate într-o probă au fost ierarhizate și reprezentate sub forma unui cod de culori (negru - 0 și verde - valoarea maximă în logaritm). În secțiunea inferioară este reprezentat un grafic cu densități de puncte privind acuratețea maselor peptidelor identificate măsurate.

Acestea au fost utilizate ulterior pentru analiza acestui set de date, în care doar proteinele cu valori în fiecare replicat-grup au fost păstrate pentru analiza statistică. În acest scop, a fost folosit testul t cu două probe cu o corecție a rezultatelor fals pozitive prin permutări. 97 de proteine au fost găsite ca fiind potențial asociate cu EDEM 2, folosind această strategie. Este de remarcat că 28 de proteine au fost regăsite în lista

finală folosind ambele strategii de analiză a datelor. Printre acestea au fost regăsite proteine implicate în pliere sau în sistemul de control al calității plierii de la nivelul reticulului endoplasmic, care nu au fost arătate până acum ca fiind asociate cu EDEM 2. Totuși experimentul a confirmat și existența unor interacții demonstrate anterior ca interactori ai proteinei EDEM 2, precum calnexina sau PDIA4 (Jansen și colab., 2012, Tang și colab., 2014). O parte dintre aceste interacții au fost confirmate folosind metode biochimice.

În afara investigării proteinelor asociate EDEM 2, funcționalitatea proteinei supraexprimate a fost testată prin co-transfecția EDEM 2 și a unor proteine incomplet pliate folosite ca substrate ERAD, în celulele de melanom A375 și cellule embrionare de rinichi HEK293T. Nivelul acestor proteine, substrate ERAD, a fost urmărit prin separarea conținutului proteic în gel de poliacrilamidă urmat de detecție prin tehnica Western Blot. Experimentele au demonstrat că nivelul unor substrate ERAD precum NHK sau BACE476 este mai scăzut în aceste celule, ca urmare a supraexpresiei EDEM 2, confirmând astfel rezultate anterioare (Mast și colab., 2005, Olivari și colab., 2005). Acest lucru a confirmat în același timp faptul că EDEM 2 formează complexe funcționale în aceste celule, iar interacțiile identificate în aceste experimente sunt explicate prin rolul proteinei în ERAD.

Analiza ocupanței situsurilor de glicozilare ale tirozinazei în linia de melanom A375

Pentru această analiză, celulele de melanom A375 care exprimă stabil secvența tirozinazei umane au fost lizate, iar produsul rezultat a fost supus unei îmbogățiri prin cromatografie de afinitate folosind un anticorp monoclonal ce recunoaște secvența recombinantă a tirozinazei (Chen și colab., 1995). Pentru a analiza cele 7 situsuri de glicozilare au fost folosite două strategii: eluția rezultată în urma cromatografiei de afinitate a fost supusă digestiei cu PNGase F sau cu Endoglicozidaza H (Endo H). Aceasta din urmă, scindează secvența N-glicanilor, lăsând un rest de HexNAc la nivelul lanțului polipeptidic (Maley și colab., 1989, Robbins și colab., 1984), care poate indica poziția exactă a glicozilării. Digestia cu PNGase F îndepărtează întreaga secvență a glicanului atașat, prin hidroliza legăturii N-glicozidice cu transformarea asparaginei în acid aspartic (Maley și colab., 1989). Ca urmare PNGase F este o amidază, care transformă situsurile asparaginelor ocupate în acid aspartic, rezultând o creștere a masei

lanțului polipeptidic cu 0.98 Da față de secvența genomică. Această diferență de masă se poate utiliza pentru a recunoaște situsurile glicozilate, prin identificarea secvențelor care conțin această modificare. Proteinele rezultate în urma digestiei cu Endo H au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, iar apoi supuse proteolizei cu tripsină. Similar, proteinele tratate cu PNGase F au fost separate folosind electroforeza în gel de poliacrilamidă, iar apoi supuse proteolizei cu chimotripsină. Peptidele din ambele probe au fost extrase și analizate prin cromatografie de lichide cuplată cu detecție prin spectrometrie de masă. Analiza instrumentală a urmărit utilizarea unor tehnici multiple de fragmentare a peptidelor, astfel încât să poată fi identificate și caracterizate toate situsurile de glicozilare ale tirozinazei. Probele supuse digestiei cu Endo H, care ar trebui să conțină un rest HexNAc la fiecare asparagină glicozilată au fost analizate utilizând o metodă cu fragmentare ETD declanșată ca urmare a detecției în spectrul de fragmentare al peptidei, a ionului oxonium la m/z 204.09 sau a ionilor de fragmentare ai acestuia la m/z 138.06, 168.07 sau 186.08 (Singh și colab., 2012).

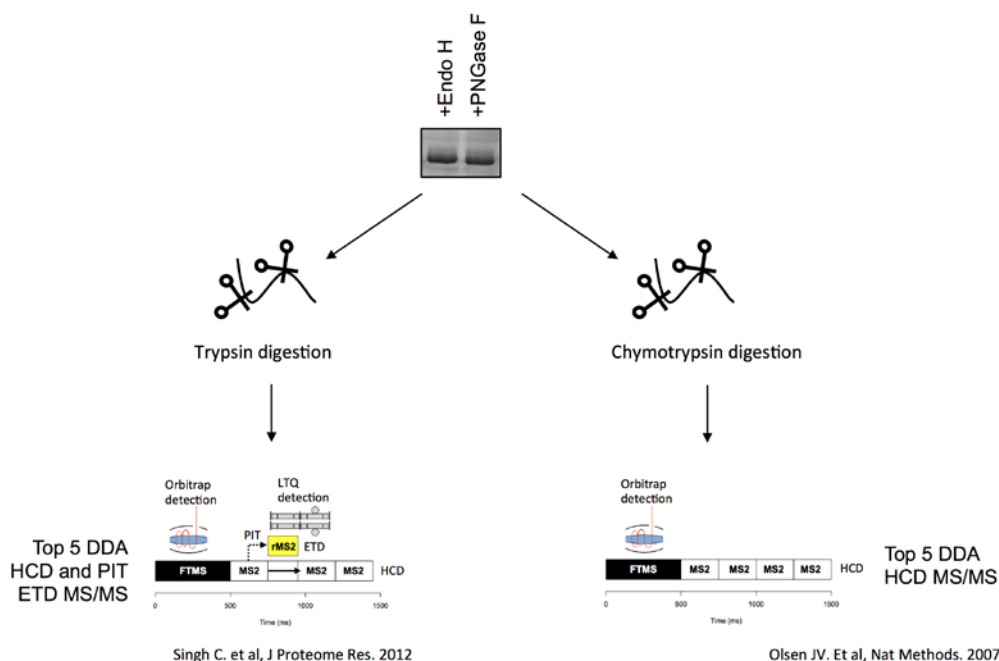


Figura 5. Strategia de achiziție a datelor MS pentru analiza glicozilării tirozinazei.

Tirozinaza umană a fost purificată folosind cromatografia de afinitate din conținutul proteic al celulelor A375 ce exprimă stabil tirozinaza. Proba purificată a fost împărțită în două și tratată fie cu Endo H fie cu PNGase F pentru îndepărtarea glicanilor. Probele tratate cu Endo H au fost supuse digestiei în gel cu tripsină, iar probele tratate cu PNGase F au fost supuse proteolizei în gel cu chimotripsină pentru caracterizarea situsurilor N161 și N371. În funcție de probă, a fost folosită fie fragmentarea bazată pe disocierea prin coliziune cu energie înaltă HCD (higher collisional dissociation) a peptidelor (pentru probele supuse digestiei cu PNGase F), fie fragmentarea HCD și condițional ETD (pentru probele supuse digestiei cu Endo H).

Metoda de achiziție a presupus fragmentarea fiecărui ion detectat cu sarcina +2 sau mai mare folosind HCD (Olsen și colab., 2007). A fost aleasă fragmentarea HCD, deoarece în fragmentarea tip CID cu detecție în trapa liniară a fragmentelor rezultate, ionii oxonium nu sunt detectați de cele mai multe ori ca urmare a limitării domeniului de scanare m/z în funcție valoarea m/z a precursorului (Schwartz și colab., 2002, Yang și colab., 2009). Totuși a fost realizată o a doua injecție, replicat în care au fost utilizate tehnicile de fragmentare CID și ETD. Peptidele chimotriptice au fost analizate folosind atât fragmentarea HCD cât și fragmentarea CID, nefiind necesară fragmentarea ETD deoarece a fost urmărită identificarea unei modificări de masă a situsurilor de glicozilare, care este detectabilă prin ambele metode. Pe lângă identificarea situsurilor de glicozilare, analiza datelor a presupus și determinarea ocupanței fiecărui situs, prin utilizarea curentului de ioni extras pentru fiecare secvență modificată. În acest sens au fost considerate peptidele rezultate în urma digestiei cu Endo H identificate ca asparagină neglicozilată, asparagină glicozilată (modificată cu HexNAc) sau asparagină deamidată (transformată în acid aspartic). Pentru probele supuse digestiei cu PNGase F au fost considerate doar formele asparaginei nemodificate sau deamidate. Controlul identificărilor fals pozitive a fost menținut prin acceptarea a maximum 5 % identificări posibil fals pozitive în setul final. Totuși pentru a caracteriza cele 7 situsuri de glicozilare identificate au fost păstrate 2 spectre MS/MS ce corespund unor peptide derivate de la tirozinază care conțin două situsuri de glicozilare, dar care au avut un scor de identificare sub pragul de 5 %. Spectrul de fragmentare corespunzător secvenței AAN*FSFR (unde * și caracterul bold indică asparagina glicozilată) a fost analizat și validat manual (Figura 6). Pentru această secvență aproape toți ionii seriei y au fost identificați. Pe lângă acest lucru și acuratețea masei peptidei identificate a fost la nivelul de părți per milion (ppm). De remarcat este identificarea ionului oxonium al HexNAc la m/z 208, ion specific peptidelor glicozilate. O posibilă explicație pentru scorul mai mic obținut de către acest spectru de fragmentare este legat de lungimea secvenței peptidice, fiind cunoscut faptul că peptidele scurte sunt penalizate la calcularea scorului în SEQUEST (Eng și colab., 1994). Acest lucru ar putea explica și identificarea ionului oxonium în fragmentarea CID, deoarece în mod normal acești ioni sunt mai greu de identificat în astfel de fragmentări (Yang și colab., 2009).

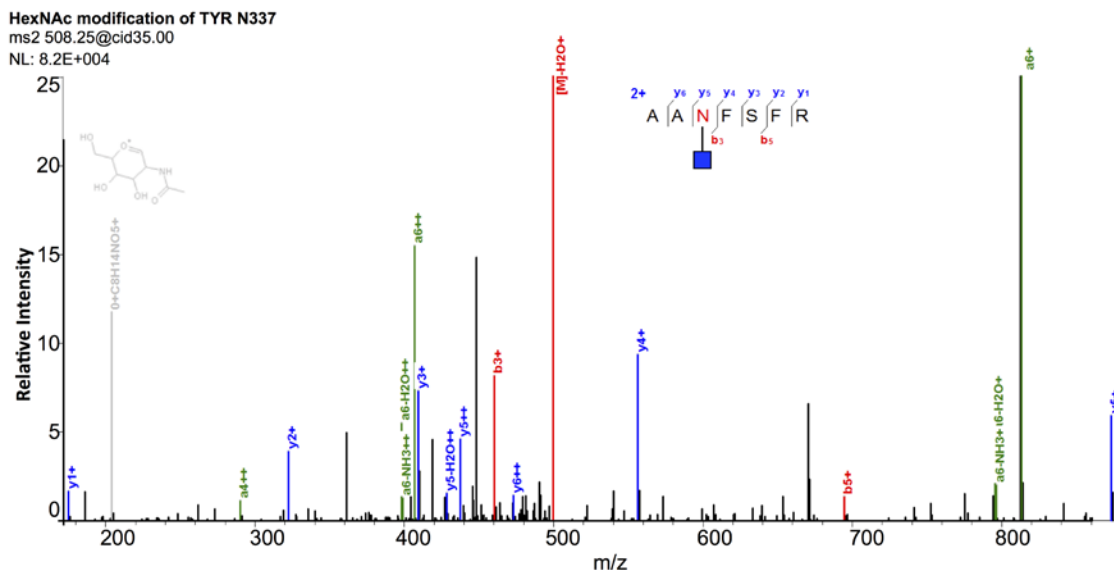


Figura 6. Spectrul de fragmentare CID al peptidei AANFSFR HexNAc modificată corespunzătoare situsului N337 din tirozinaza umană.

Se poate observa că aproape toți ionii y^+/y^{++} sunt detectați, precum și ioni b^+ . Ionul diagnostic de la m/z 208, care corespunde ionului oxonium al HexNAc, confirmă modificarea acestei secvențe.

Toate aceste observații au condus la includerea acestui spectru de fragmentare în setul de date analizat. Un alt spectru de fragmentare cu scor mai mic față de cel corespunzător pragului de 5 % este cel al secvenței ESWPSVFYN*R (unde * și caracterul bold indică asparagina modificată). Similar secvenței precedente acuratețea masei a fost de ordinul ppm, iar aproape toți ionii seriei y și cinci ioni consecutivi ai seriei b au fost identificați (Figura 7).

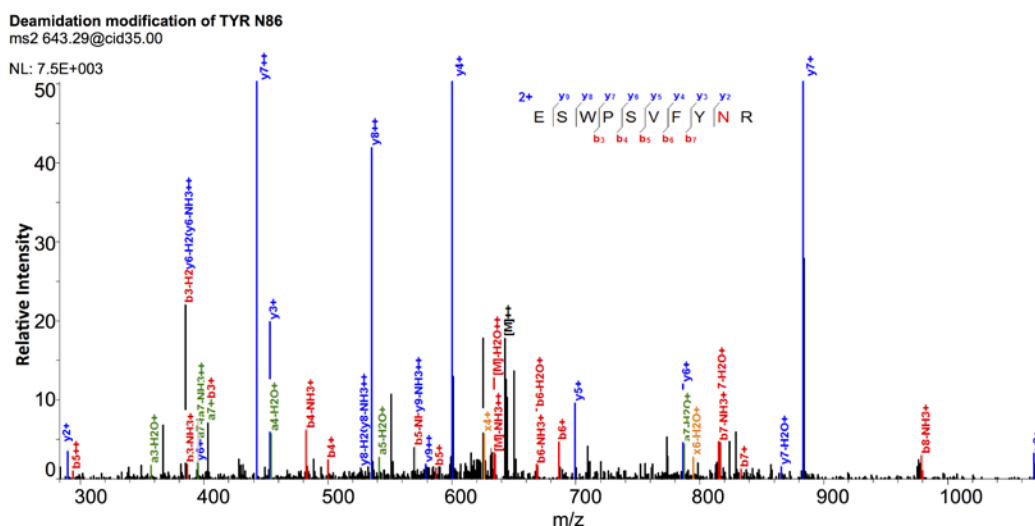


Figura 7. Spectrul de fragmentare CID al secvenței deamidate ESWPSVFYNR, corespunzătoare primului situs de glicozilare al tirozinazei umane.

Se poate observa că aproape toți ionii seriei y sunt identificați precum și cinci ioni consecutivi ai seriei b .

Ambele secvențe au fost identificate folosind fragmentarea tip CID cu detecție în regiunea trapei liniare a instrumentului.

Analiza probei digerată cu Endo H, conținând peptidele triptice ale tirozinazei, a dus la confirmarea situsurilor N86, N111, N230, N290 și N337 (Figura 8) ca fiind glicozilate.

Nu au fost identificate peptide triptice conținând situsurile N161 și N371. Totuși, evaluarea probelor tratate cu PNGase F a condus la identificarea peptidelor chimotriptice conținând aceste situsuri, sub formă deamidată, indicând faptul că acestea sunt glicozilate (Figura 8).

Analiza tuturor probelor a condus la identificarea tirozinazei cu o secvență de acoperire de aproximativ 64 %, fiind identificate peptide acoperind aproape toată secvența proteinei.

Peptidele din secvența N-terminală clivabilă și din domeniul transmembranar nu au fost identificate. Distribuția spectrelor de fragmentare identificate ca fiind secvențe asociate tirozinazei nu a relevat diferențe majore între peptide și glicopeptide Figura 8.

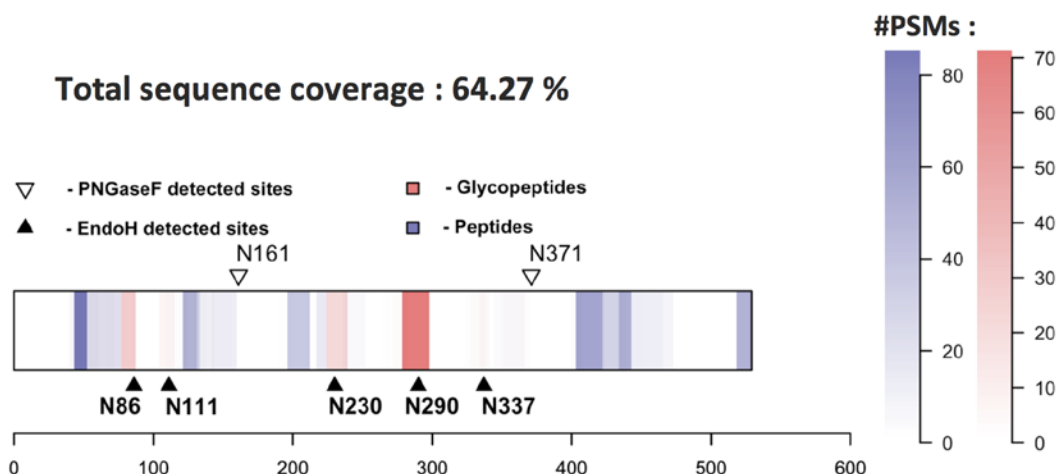


Figura 8. Analiza glicozilării tirozinazei umane în celulele de melanom A375 folosind spectrometria de masă.

Celulele de melanom A375, care exprimă stabil întreaga secvență a tirozinazei umane, au fost lizate iar proba rezultată a fost supusă purificării folosind cromatografia de afinitate. Eluția a fost împărțită și supusă digestiei folosind două glicozidaze separat, iar proteinele rezultate au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Digestia proteinelor în gel a fost realizată folosind tripsină sau chimotripsină (în funcție de glicozidaza utilizată) pentru a caracteriza toate situsurile de glicozilare. Se poate observa că majoritatea situsurilor au fost caracterizate folosind digestia cu Endo H și tripsină.

Utilizând valorile curentului de ioni extras pentru toate formele peptidelor tirozinazei, care conțin situsurile de glicozilare, predicțiile bazate pe secvența de aminoacizi a proteinei precum și rezultatele publicate anterior în literatura de specialitate, a fost

estimată ocupanța celor 7 situsuri de glicozilare Tabelul 1. Rezultatele au arătat că situsul trei și situsul cinci sunt parțial ocupate în cazul tirozinazei umane exprimate în celulele de melanom A375. Acest lucru a fost sugerat și de predicțiile realizate folosind NetNGlyc. Rezultatele sunt în acord cu experimente realizate anterior, care sugerau ocupanța parțială sau chiar lipsa glicozilării pentru situsul trei și glicozilare pentru N86, N111, N230, N337 și N371. Deși în tirozinaza de șoarece situsul din poziția 111 nu este ocupat (Branza-Nichita și colab., 2000a), studii recente au indicat că în secvența umană acest situs este ocupat (Cioaca și colab., 2011).

Tabelul 1. Analiza LC-MS a ocupanței situsurilor de glicozilare aparținând tirozinazei umane în celulele de melanom A375.

Tirozinaza purificată prin cromatografie de afinitate a fost supusă digestiei cu Endo H, separată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, iar apoi supusă proteolizei cu tripsină. Peptidele rezultate au fost extrase și analizate folosind LC-MS/MS. Curentul de ioni corespunzător formelor peptidelor modificate cu HexNAc, demidate sau nemodificate a fost folosit la determinarea ocupanței. Pentru situsurile N161 și N371, tirozinaza purificată prin cromatografie de afinitate a fost supusă digestiei cu PNGase F, separată prin SDS-PAGE și supusă proteolizei în gel folosind chimotripsina. Ocupanța acestor situsuri a fost estimată folosind curentul de ioni extras pentru formele deamidate și cele nemodificate ale situsurilor de glicozilare. Pe lângă acest lucru au fost luate în considerare și predicțiile NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>). Două dintre situsuri au fost găsite ca fiind parțial ocupate. Cu roșu sunt marcate asparaginele identificate ca fiind glicozilate.

Poziția	Predicție	Experimental	Secvența peptidei	Secvență
N86	++	Glicozilat	ESWPSV F YNR	Triptică
N111	++	Glicozilat	FGFWGPN C TER	Triptică
N161	-	Parțial	GQMKN G STPMFNDINIY	Chimotriptică
N230	++	Glicozilat	LTGDEN F TIPYWDWR	Triptică
N290	---	Parțial	LEEYNSHQSLC N GTPEGPLR	Triptică
N337	+	Glicozilat	AAN F SFR	Triptică
N371	++	Glicozilat	M N GTMSQVQGSANDPIF	Chimotriptică

Legendă:

Situsuri glicozilate:

+ Potențial > 0.5

++ Potențial > 0.5

+++ Potențial > 0.75

++++ Potențial > 0.90

Situsuri neglicozilate:

- Potențial < 0.5

-- Potențial < 0.5

--- Potențial < 0.32

Identificarea tirozinazei recombinante și a unor secvențe derivate ale acesteia cu potențiale aplicații în imunoterapie

Identificarea tirozinazei recombinante prin analiza MS a unor fracții purificate prin cromatografie de afinitate

Tirozinaza de șoarece a fost exprimată în *E. Coli* și purificată folosind cromatografia de afinitate. Frațiile colectate au fost analizate prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometria de masă, pentru confirmarea secvenței proteinei și estimarea purității fracțiilor, în vederea unei posibile utilizări ulterioare ca antigen în melanom. Frațiile au fost analizate folosind o metodă automatizată tip data-dependent, iar spectrele achiziționate au fost analizate folosind algoritmul SEQUEST. Rezultatele au relevat copurificarea chaperonului GroEL alături de tirozinază, care a fost identificată în cinci din cele șase fracții analizate cu o secvență de acoperire între 40.78 % și 70.00 %. Metoda de purificare și rezultatele acestei analize au fost publicate (Chiritoiu și colab., 2015).

Identificarea unor potențiali noi epitopi ai tirozinazei în melanom prin spectrometrie de masă

Analiza MS a eluțiilor acide din celulele de melanom A375 care supraexprimă tirozinaza umană, a condus la identificarea peptidului EEYNSHQSL, corespunzător secvenței de aminoacizi 280-288 a tirozinazei. Pentru confirmarea identificării a fost analizat, în condiții similare, peptidul sintetizat chimic. În vederea validării identificării au fost luate în considerare caracteristici precum timpul de retenție, masa și valoarea m/z , sarcina ionilor precursori precum și spectrul de fragmentare CID al peptidului standard și al ionului regăsit în proba analizată. Analiza unei probe obținută similar din eluția celulelor A375, tirozinazo-negative nu a relevat existența unui ion cu aceleași caracteristici. Secvența a fost identificată și în probele obținute prin imunoprecipitarea HLA I și a peptidelor asociate acestuia cu anticorpul W6/32. Același experiment a condus la identificarea secvențelor LEEYNSHQSL și LLMEKEDYHSL, derivate de la tirozinază. Toate aceste secvențe au fost recent descrise într-un studiu ce a urmărit analiza peptidelor asociate HLA I în melanom (Gloger și colab., 2016). Studii ulterioare urmează să stabilească dacă aceste secvențe derivate de la tirozinază se pot folosi în imunoterapie.

CONCLUZII

Această lucrare își propune, în prima parte, identificarea și caracterizarea unor complexe proteice cu funcționalitate în ERAD și implicații în controlul calității plierii proteinelor.

În partea a doua m-am concentrat asupra investigării tirozinazei – un model clasic al glicoproteinelor, folosită în laboratorul în care am lucrat pentru investigarea evenimentelor din reticulul endoplasmic – prin analiza glicozilării acestuia în melanom și identificarea unor potențiale noi secvențe antigenice, derivate de la aceasta.

Implementare metodologică și dezvoltare

Pentru a atinge obiectivele principale menționate mai sus am depus un efort semnificativ în dezvoltarea și implementarea unor protocoale axate pe analiza prin spectrometrie de masă, care includ și tehnici complementare din biochimie analitică și preparativă, biologie moleculară, analiză computațională și statistică etc.

O parte din rezultatele obținute în această lucrare au fost publicate sau se află încă sub review, cu aplicații ale spectrometriei de masă precum: identificarea unor compuși de sinteză sau a unor oligozaharide, (P5-P11), identificarea proteinelor în analiză tip bottom-up din fracții purificate prin cromatografie de afinitate (P2, P4), analiza glicozilării proteinelor, a peptidelor asociate HLA I și a interacțiilor tip proteină-proteină (P1, P3).

Rezultate obținute privind complexele funcționale ERAD

Principalele rezultate obținute asupra acestei teme investigate sunt descrise pe scurt astfel:

- Pentru identificarea proteinelor asociate cu EDEM 2 în ERAD, am optimizat câteva aspecte-cheie ale protocolului AP-MS. Mai mult, pentru a crește confidența rezultatelor obținute am folosit două metode de analiză a datelor: SAINTexpress care folosește distribuția numărului de spectre în tandem asociate unei proteine și QUBIC care folosește o metodă bazată pe curentul de ioni asociat unei proteine.

- Rezultatele obținute arată că EDEM 2 este asociat cu o serie de proteine rezidente în reticulul endoplasmic, implicate în pliere, ERQC dar și ERAD, ceea ce poziționează EDEM 2 la intersecția sortării proteinelor în reticulul endoplasmic.
- O parte dintre aceste proteine asociate au fost validate folosind metode biochimice, alături de controale pozitive și negative iar pentru prima dată este propus un draft al hărții de interacții pentru EDEM 2, în melanom.
- Asocierea EDEM 2 cu alți membrii ERAD are ca rezultat formarea unor complexe proteice funcționale care trimit spre degradare proteinele incomplet pliate, lucru arătat prin experimentele funcționale, experimente care indică și o posibilă reglare între componentele ERAD.
- EDEM 2 se poate degrada folosind aceeași cale, observație bazată pe experimentele folosind inhibitori de proteazom, care au arătat o creștere a nivelului intracelular al acestei proteine.

Rezultate privind glicozilarea tirozinazei și analiza epitopilor acesteia

Principalele concluzii privind partea a doua a acestei lucrări sunt sintetizate în continuare:

- În linia A375, tirozinaza umană este neuniform N-glicozilată. Cinci din cele 7 situsuri de glicozilare sunt ocupate, în timp ce situsurile 3 și 5 sunt doar parțial ocupate. Rezultate au fost confirmate și în experimentele cu MG132 în care PNGase F intracelular transformă Asn glicozilate în Asp. Aceste rezultate arată pentru prima dată ocupanța situsurilor de glicozilare a tirozinazei umane în melanom.
- Experimentele de spectrometrie de masă au arătat că ambele methionine (M₃₇₁ și M₃₇₄) ale epitopului Tyr₃₆₉₋₃₇₇ sunt oxidate, iar acest lucru poate avea un impact major asupra recunoșterii epitopului de către sistemul imunitar.

- Analiza cinetică prin HPLC a arătat că cele mai stabile forme ale epitopului Tyr₃₆₉₋₃₇₇ sunt formele sulfoxid. Această observație a fost concretizată într-o metodă specifică pentru analiza cantitativă a acestui epitop în diverse linii celulare derivate de la pacienți cu melanom.

- În această lucrare este descrisă analiza MS a unei secvențe peptidice derivate de la tirozinaza umană, secvență identificată în câteva linii celulare de melanom. Secvența este asociată HLA I, lucru ce sugerează posibilitatea utilizării acesteia în imunoterapie. Este descrisă identificarea prin spectrometrie de masă și a altor secvențe derivate de la tirozinază, inclusiv identificarea tirozinazei recombinante purificate prin cromatografie de afinitate, toate acestea având potențiale aplicații în tratamentul melanomului.

LISTA PUBLICAȚIILOR

ARTICOLE PUBLICATE ÎN JURNALE TIP PEER-REVIEW (P):

P1:

Chirițoiu GN*, Jandus C*, **Munteanu CVA***, Ghenea S, Gannon PO, Romero P, Petrescu SM, “*Epitope located N-glycans impair the MHC-I epitope generation and presentation.*” *Electrophoresis* 37(11):1448-60 (2016)

DOI: 10.1002/elps.201500449

AI = 1.7 ; IF = 3.028, Citări WoS = 0

* autori cu contribuție egală

P2:

Chirițoiu GN*, **Munteanu CVA***, Mitrea N, “*Combining heterologous bacterial expression system with affinity chromatography purification to obtain native mouse tyrosinase.*” *Farmacia* 63(2):254-61 (2015)

AI < 0.1 ; IF = 1.003, Citări WoS = 0

* autori cu contribuție egală

P3:

Popa IL, Milac AL, Sima LE, Alexandru PR, Pastrama F, Munteanu CVA, Negroiu G, “*Cross-talk between DopaChromTautomerase and Caveolin-1 is Melanoma Cell Phenotype Specific and Potentially Involved in Tumor Progression.*” *Journal of Biological Chemistry* 291(24):12481-500 (2016)

DOI: 10.1074/jbc.M116.714733

AI = 1.7 ; IF = 4.573, Citări WoS = 0

P4:

Petrareanu G1, Balasu MC, Vacaru AM, **Munteanu CVA**, Ionescu AE, Matei I, Szedlacsek SE, “*Phosphoketolases from Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides and Pseudomonas aeruginosa Dissimilar sequences, similar substrates but distinct enzymatic characteristics.*” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(18):7855-67 (2014)

AI = 1.0 ; IF = 3.337, Citări WoS = 3

DOI: 10.1007/s00253-014-5723-6

P5:

Sârbu M, **Munteanu CVA**, Dehelean L, Petrescu AJ, Peter-Katalinic J, Zamfir AD, “*Identification and structural characterization of novel O- and N-glycoforms in the urine of a Schindler disease patient by Orbitrap mass spectrometry*”. **Journal of Mass Spectrometry** 50(9): 1044-56 (2015)

AI = 0.8 ; IF = 2.379, Citări WoS = 0

DOI: 10.1002/jms.3616

P6:

Robu AC, Popescu L, **Munteanu CVA**, Seidler DG, Zamfir AD, “*Orbitrap mass spectrometry characterization of hybrid chondroitin/dermatan sulfate hexasaccharide domains expressed in brain.*” **Analytical Biochemistry** 485:122-31 (2015)

AI = 0.7 ; IF = 2.219, Citări WoS = 0

DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.028

P7:

Flangea C, Petrescu AJ, Seidler DG, **Munteanu CVA**, Zamfir AD, “*Identification of an unusually sulfated tetrasaccharide chondroitin/dermatan motif in mouse brain by combining chip-nanoelectrospray multistage MS2 -MS4 and high resolution MS.*” **Electrophoresis** 34(11):1581-92 (2013)

AI = 0.7 ; IF = 3.028, Citări WoS = 5

DOI: 10.1002/elps.201200704

P8:

Tănase CI, Draghici C, Shova S, Cojocaru A, Maganu M, **Munteanu CVA**, Cocu F, “*Regioselective reactions on a 1,3-disubstituted dihydroxymethyl or dicarboxyl hexahydropentalene skeleton.*” **Tetrahedron** 71(38):6852-59 (2015)

AI = 0.6 ; IF = 2.641, Citări WoS = 0

DOI: 10.1016/j.tet.2015.07.021

P9:

Tănase CI, Draghici C, Caproiu, MT, Shova, S, Cojocaru A, **Munteanu CVA**, “MCPB treatment of (\pm)-(1 α ,3 α ,3 $\alpha\beta$,6 $\alpha\beta$)-1,2,3,3 α ,4,6 α -hexahydro-1,3-pentalenedimethanol and its O-acyl-protected derivatives; X-ray crystallography.” **Tetrahedron** 71(24):4154-62 (2015)

AI = 0.6 ; IF = 2.641, Citări WoS = 1

DOI: 10.1016/j.tet.2015.04.096

P10:

Tănase C, Neguț CC, Udeanu DI, Ungureanu EM, Hrubaru M, **Munteanu CVA**, Voicu, SP, Cocu F, Ioniță AC, “New Oleamide Analogues with Potential Foodintake Regulator Effect.” **Revista de Chimie** -Bucharest- Original Edition 65(7):768-73 (2014)

AI <0.1 ; IF = 0.810, Citări WoS = 5

DOI: 10.13140/2.1.3270.2085

P11:

Tănase C, Neguț CC, Udeanu DI, Ungureanu EM, Hrubaru M, **Munteanu CVA**, Cocu F, Van Staden RIS, “New Oleamide Analogues with Potential Food - intake Regulator Effect. II.” **Revista de Chimie** -Bucharest- Original Edition 67(2):282-88 (2016)

AI <0.1 ; IF = 0.810, Citări WoS = 0

P12:

Pastramă F, **Munteanu CVA**, Chirițoiu GN, Petrescu SM, Petrescu AJ, “Interaction of tyrosinase and its soluble mutant with biological partners in melanoma cells.” **Rom. J. Biochem.**, 52(1):51–60 (2015).

AI <0.1 ; IF = 0, Citări WoS = 0

P13:

Butnaru CM, **Munteanu CVA**, Chirițoiu GN, Ghenea S, Petrescu AJ, Petrescu SM, “Comparison of protein extraction conditions for EDEM3 interactors in melanoma cells.” **Rom. J. Biochem.**, 52(1):31-38 (2015).

AI <0.1 ; IF = 0, Citări WoS = 0

P14:

Mentel M, Iancu I, Kibédi-Szabó CZ, **Munteanu CVA**, Szedlacsek SE, “Co-expression of human Wdr1 gene with a chaperone increases its protein solubility.” *Rom. J. Biochem.*, 50(1):39–51 (2013)

Biochem., 50(1):39–51 (2013)

AI <0.1 ; IF = 0, Citări = 1

AI – Scorul de influență (EIGENFACTOR.org)

IF – Factorul de impact (JCR 2014)

WoS – Web of Science

PATENT (PA):

Munteanu CVA, Chirițoiu GN, Petrescu SM, Jandus C, Ghenea S, Romero P, “*Novel tyrosinase antigenic peptides and uses thereof*”, Patent Internațional spre depunere (07/2016)

PREZENTĂRI ORALE (OP):

Munteanu CVA, Chirițoiu GN, Petrescu SM, Petrescu AJ, “*Mass Spectrometry interaction proteomics of EDEM2 in a melanoma cell line.*” International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 17-18 Septembrie 2015, București, România

POSTERE SELECTATE (SP):

SP1:

Munteanu CVA, Chirițoiu GN, Petrescu SM, “*Mass spectrometry evaluation of a T cell presented epitope of tyrosinase.*” The Annual International Conference of the SRBBM & Workshop “Viral hepatitis from cell culture to clinic”, 5-6 Iunie 2014, Băile Felix, Oradea, România (SP1) – *desemnat cel mai bun poster*

SP2:

Chirițoiu GN, **Munteanu CVA**, Jandus C, Ghenea S, Romero P, Petrescu SM, “*Antigen glycosylation and cytotoxic T cells activation: case study of tyrosinase*

*mutants expressing HLA-A*02 restricted YMD epitope.*” Annual International Symposium N. Cajal, 1-4 Aprilie 2015, București, România (SP2)

SP3:

Pastramă F*, **Munteanu CVA***, Popa IL, Negroiu G, “*Identification of interacting proteins with melanoma antigen dopachrome tautomerase by mass spectrometry analysis.*” International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 17-18 Septembrie 2015, București, România (SP3)

* autori cu contribuție egală

MULȚUMIRI

Aș dori să îmi exprim recunoștința față de Dr. Andrei-Jose Petrescu și Dr. Ștefana Petrescu pentru sprijinul acordat în evoluția științifică personală și pentru încrederea acordată prin implicarea mea în numeroase proiecte de cercetare științifică.

Doresc să mulțumesc și d-nei profesor universitar Dr. Niculina Mitrea din cadrul Facultății de Farmacie a UMF Carol Davila din București pentru sprijinul acordat în acești ani.

Aș dori să mulțumesc dl. Dr. Manfredo Quadroni și personalului din cadrul Departamentului de proteomică din Lausanne Dr. Jachen Barblan and Dr. Alexandra Potts-Xenarios pentru oportunitatea oferită de a-mi îmbogăți și extinde cunoștințele în domeniul proteomicii bazate pe spectrometrie de masă. Pe lângă acest lucru aș dori să adresez mulțumiri speciale dl. Dr. Manfredo Quadroni și celorlalți membrii ai comisiei de doctorat pentru timpul acordat în vederea evaluării acestei teze.

Doresc să-mi exprim recunoștința și față de prof. Dr. Pedro Romero și Dr. Camilla Jandus de la Ludwig Cancer Research Center din cadrul Facultății de Medicină și Biologie a Universității din Lausanne University of Lausanne pentru îndrumare și discuțiile interesante purtate în privința imunologiei.

Mulțumiri speciale adresez și colegii mele Gabriela Chirițoiu, care mi-a oferit ajutor în multe dintre experimentele dificile pe care le-am realizat în acești ani, dar și pentru sprijinul moral și îndrumare pe care mi le-a oferit încă de la început.

Aș dori să adresez pe această cale mulțumiri colegilor Cristian Butnaru, Florin Pastramă și Aura E. Ionescu pentru sprijinul lor organizatoric privind laboratorul de proteomică bazat pe spectrometrie de masă precum și Dr. Simona Ghenea, Dr. Mari Chirițoiu pentru încurajări și sugestii privind unele experimente. Datoroz mulțumiri și personalului de la Pro Analysis Systems și Thermo Fisher Scientific pentru suportul lor privind problemele legate de instrumentele folosite la realizarea experimentelor din această teză, precum și colegilor mei din departament.

Nu în ultimul rând adresez mulțumiri speciale familiei mele, mai ales mamei mele care mi-a oferit sprijin moral, înțelegere și suport pe parcursul întregii acestei perioade.

Această lucrare a beneficiat de suport financiar prin proiectul “ CERO – PROFIL DE CARIERĂ:
CERCETĂTOR ROMÂN”, contract nr. POSDRU/159/1.5/S/135760, proiect cofinanțat din Fondul
Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.



Investește în oameni!

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin POSDRU 2007-2013,

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

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

CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN

Contract de finanțare: POSDRU/159/1.5/S/135760

REFERINȚE

- AEBI, M. 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2430-7.
- AHMAD, M., REES, R. C. & ALI, S. A. 2004. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 844-54.
- BRANZA-NICHITA, N., NEGROIU, G., PETRESCU, A. J., GARMAN, E. F., PLATT, F. M., WORMALD, M. R., DWEK, R. A. & PETRESCU, S. M. 2000a. Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem*, 275, 8169-75.
- BRANZA-NICHITA, N., PETRESCU, A. J., DWEK, R. A., WORMALD, M. R., PLATT, F. M. & PETRESCU, S. M. 1999. Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 720-5.
- BRANZA-NICHITA, N., PETRESCU, A. J., NEGROIU, G., DWEK, R. A. & PETRESCU, S. M. 2000b. N-glycosylation processing and glycoprotein folding-lessons from the tyrosinase-related proteins. *Chem Rev*, 100, 4697-712.
- CHEEVER, M. A., ALLISON, J. P., FERRIS, A. S., FINN, O. J., HASTINGS, B. M., HECHT, T. T., MELLMAN, I., PRINDIVILLE, S. A., VINER, J. L., WEINER, L. M. & MATRISIAN, L. M. 2009. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*, 15, 5323-37.
- CHEN, Y. T., STOCKERT, E., TSANG, S., COPLAN, K. A. & OLD, L. J. 1995. IMMUNOPHENOTYPING OF MELANOMAS FOR TYROSINASE - IMPLICATIONS FOR VACCINE DEVELOPMENT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8125-8129.
- CHIRITOIU, G. N., MUNTEANU, C. V. A. & MITREA, N. 2015. COMBINING HETEROLOGOUS BACTERIAL EXPRESSION SYSTEM WITH AFFINITY CHROMATOGRAPHY PURIFICATION TO OBTAIN NATIVE MOUSE TYROSINASE. *Farmacia*, 63, 254-261.
- CIOACA, D., GHENEA, S., SPIRIDON, L. N., MARIN, M., PETRESCU, A. J. & PETRESCU, S. M. 2011. C-terminus glycans with critical functional role in the maturation of secretory glycoproteins. *PLoS One*, 6, e19979.
- COX, A. L., SKIPPER, J., CHEN, Y., HENDERSON, R. A., DARROW, T. L., SHABANOWITZ, J., ENGELHARD, V. H., HUNT, D. F. & SLINGLUFF, C. L., JR. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264, 716-9.
- COX, J., HEIN, M. Y., LUBER, C. A., PARON, I., NAGARAJ, N. & MANN, M. 2014. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*, 13, 2513-26.
- COX, J. & MANN, M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26, 1367-72.

- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.
- ELLGAARD, L. & HELENIUS, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-91.
- ENG, J. K., MCCORMACK, A. L. & YATES, J. R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*, 5, 976-89.
- ENGELHARD, V. H., APPELLA, E., BENJAMIN, D. C., BODNAR, W. M., COX, A. L., CHEN, Y., HENDERSON, R. A., HUCZKO, E. L., MICHEL, H. & SAKAGUCHI, K. 1993. Mass spectrometric analysis of peptides associated with the human class I MHC molecules HLA-A2.1 and HLA-B7 and identification of structural features that determine binding. *Chemical immunology*, 57, 39-62.
- ERDEI, E. & TORRES, S. M. 2010. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10, 1811-23.
- GLOGER, A., RITZ, D., FUGMANN, T. & NERI, D. 2016. Mass spectrometric analysis of the HLA class I peptidome of melanoma cell lines as a promising tool for the identification of putative tumor-associated HLA epitopes. *Cancer Immunol Immunother*.
- GONZALEZ, D. S., KARAVEG, K., VANDERSALL-NAIRN, A. S., LAL, A. & MOREMEN, K. W. 1999. Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis. *J Biol Chem*, 274, 21375-86.
- HERLYN, M. & KOPROWSKI, H. 1988. Melanoma antigens: immunological and biological characterization and clinical significance. *Annu Rev Immunol*, 6, 283-308.
- HERSCOVICS, A., ROMERO, P. A. & TREMBLAY, L. O. 2002. The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict previously reported. *Glycobiology*, 12, 14G-15G.
- HIRAO, K., NATSUKA, Y., TAMURA, T., WADA, I., MORITO, D., NATSUKA, S., ROMERO, P., SLENO, B., TREMBLAY, L. O., HERSCOVICS, A., NAGATA, K. & HOSOKAWA, N. 2006. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem*, 281, 9650-8.
- HOSOKAWA, N., WADA, I., NATSUKA, Y. & NAGATA, K. 2006. EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin. *Genes Cells*, 11, 465-76.
- HUBBARD, S. C. & IVATT, R. J. 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 50, 555-83.
- JANSEN, G., MAATTANEN, P., DENISOV, A. Y., SCARFFE, L., SCHADE, B., BALGHI, H., DEJGAARD, K., CHEN, L. Y., MULLER, W. J., GEHRING, K. & THOMAS, D. Y. 2012. An interaction map of endoplasmic reticulum chaperones and foldases. *Mol Cell Proteomics*, 11, 710-23.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J., SMIGAL, C. & THUN, M. J. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, 56, 106-30.
- JIMBOW, K., PARK, J. S., KATO, F., HIROSAKI, K., TOYOFUKU, K., HUA, C. & YAMASHITA, T. 2000. Assembly, target-signaling and intracellular transport

- of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res*, 13, 222-9.
- JIMENEZ-CERVANTES, C., SOLANO, F., KOBAYASHI, T., URABE, K., HEARING, V. J., LOZANO, J. A. & GARCIA-BORRON, J. C. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem*, 269, 17993-8000.
- KALLI, A., SMITH, G. T., SWEREDOSKI, M. J. & HESS, S. 2013. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *J Proteome Res*, 12, 3071-86.
- KAPOOR, M., ELLGAARD, L., GOPALAKRISHNAPAI, J., SCHIRRA, C., GEMMA, E., OSCARSON, S., HELENIUS, A. & SUROLIA, A. 2004. Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition. *Biochemistry*, 43, 97-106.
- KATH, R. & HERLYN, M. 1989. Molecular biology of tumor antigens. *Current Opinion in Immunology*, 1, 863-866.
- KRENSKY, A. M. 1997. The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int Suppl*, 58, S2-7.
- LEWIS, K. E. & EISEN, J. S. 2001. Hedgehog signaling is required for primary motoneuron induction in zebrafish. *Development*, 128, 3485-95.
- LIN, J. Y. & FISHER, D. E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445, 843-50.
- MALEY, F., TRIMBLE, R. B., TARENTINO, A. L. & PLUMMER, T. H., JR. 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, 180, 195-204.
- MAST, S. W., DIEKMAN, K., KARAVEG, K., DAVIS, A., SIFERS, R. N. & MOREMEN, K. W. 2005. Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology*, 15, 421-36.
- MICHAELI, Y., DENKBERG, G., SINIK, K., LANTZY, L., CHIH-SHENG, C., BEAUVERD, C., ZIV, T., ROMERO, P. & REITER, Y. 2009. Expression hierarchy of T cell epitopes from melanoma differentiation antigens: unexpected high level presentation of tyrosinase-HLA-A2 Complexes revealed by peptide-specific, MHC-restricted, TCR-like antibodies. *J Immunol*, 182, 6328-41.
- MOSSE, C. A., MEADOWS, L., LUCKEY, C. J., KITTLESEN, D. J., HUCZKO, E. L., SLINGLUFF, C. L., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. & ENGELHARD, V. H. 1998. The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J Exp Med*, 187, 37-48.
- NINAGAWA, S., OKADA, T., SUMITOMO, Y., KAMIYA, Y., KATO, K., HORIMOTO, S., ISHIKAWA, T., TAKEDA, S., SAKUMA, T., YAMAMOTO, T. & MORI, K. 2014. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J Cell Biol*, 206, 347-56.
- OLIVARI, S., GALLI, C., ALANEN, H., RUDDOCK, L. & MOLINARI, M. 2005. A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem*, 280, 2424-8.

- OLIVARI, S. & MOLINARI, M. 2007. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett*, 581, 3658-64.
- OLSEN, J. V., MACEK, B., LANGE, O., MAKAROV, A., HORNING, S. & MANN, M. 2007. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*, 4, 709-12.
- OSTANKOVITCH, M., ROBILA, V. & ENGELHARD, V. H. 2005. Regulated folding of tyrosinase in the endoplasmic reticulum demonstrates that misfolded full-length proteins are efficient substrates for class I processing and presentation. *J Immunol*, 174, 2544-51.
- PETRESCU, S. M., BRANZA-NICHITA, N., NEGROIU, G., PETRESCU, A. J. & DWEK, R. A. 2000. Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry*, 39, 5229-37.
- PIERSMA, S. R., WARMOES, M. O., DE WIT, M., DE REUS, I., KNOL, J. C. & JIMENEZ, C. R. 2013. Whole gel processing procedure for GeLC-MS/MS based proteomics. *Proteome Sci*, 11, 17.
- RADOVIC-KOVACEVIC, V., PEKMEZOVIC, T., ADANJA, B., JAREBINSKI, M., MARINKOVIC, J. & TOMIN, R. 1997. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. *Srp Arh Celok Lek*, 125, 132-7.
- ROBBINS, P. W., TRIMBLE, R. B., WIRTH, D. F., HERING, C., MALEY, F., MALEY, G. F., DAS, R., GIBSON, B. W., ROYAL, N. & BIEMANN, K. 1984. Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem*, 259, 7577-83.
- SCHUBERT, U., ANTON, L. C., GIBBS, J., NORBURY, C. C., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770-4.
- SCHWARTZ, J. C., SENKO, M. W. & SYKA, J. E. 2002. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*, 13, 659-69.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V. & MANN, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1, 2856-60.
- SINGH, C., ZAMPRONIO, C. G., CREESE, A. J. & COOPER, H. J. 2012. Higher energy collision dissociation (HCD) product ion-triggered electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry for the analysis of N-linked glycoproteins. *J Proteome Res*, 11, 4517-25.
- SKIPPER, J. C., HENDRICKSON, R. C., GULDEN, P. H., BRICHARD, V., VAN PEL, A., CHEN, Y., SHABANOWITZ, J., WOLFEL, T., SLINGLUFF, C. L., JR., BOON, T., HUNT, D. F. & ENGELHARD, V. H. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*, 183, 527-34.
- SLINGLUFF, C. L., JR. 1996. Tumor antigens and tumor vaccines: peptides as immunogens. *Semin Surg Oncol*, 12, 446-53.
- SLOMINSKA-WOJEWODZKA, M., PAWLIK, A., SOKOLOWSKA, I., ANTONIEWICZ, J., WEGRZYN, G. & SANDVIG, K. 2014. The role of EDEM2 compared with EDEM1 in ricin transport from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J*, 457, 485-96.

- SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J., SHIBAHARA, S. & WORTSMAN, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 84, 1155-228.
- TANG, H. Y., HUANG, C. H., ZHUANG, Y. H., CHRISTIANSON, J. C. & CHEN, X. 2014. EDEM2 and OS-9 are required for ER-associated degradation of non-glycosylated sonic hedgehog. *PLoS One*, 9, e92164.
- TANNOUS, A., PISONI, G. B., HEBERT, D. N. & MOLINARI, M. 2015. N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin Cell Dev Biol*, 41, 79-89.
- THOMSON, S. P. & WILLIAMS, D. B. 2005. Delineation of the lectin site of the molecular chaperone calreticulin. *Cell Stress Chaperones*, 10, 242-51.
- TREMBLAY, L. O. & HERSCOVICS, A. 1999. Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology*, 9, 1073-8.
- UNIPROT, C. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*, 43, D204-12.
- WALTER, P. & BLOBEL, G. 1980. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7112-6.
- YANG, Y. H., LEE, K., JANG, K. S., KIM, Y. G., PARK, S. H., LEE, C. S. & KIM, B. G. 2009. Low mass cutoff evasion with q(z) value optimization in ion trap. *Anal Biochem*, 387, 133-5.
- ZAPUN, A., PETRESCU, S. M., RUDD, P. M., DWEK, R. A., THOMAS, D. Y. & BERGERON, J. J. 1997. Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell*, 88, 29-38.