



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
- ROLUL DOMENIILOR STRUCTURALE ALE
EDEM3 ÎN ERAD -

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:
DR. ȘTEFANA MARIA PETRESCU

DOCTORAND:
LAURA-GEORGIANA MĂNICA

BUCUREȘTI

2021

CUPRINS (teza in extenso)

MULȚUMIRI.....	2
SCOPUL TEZEI.....	3
LISTĂ DE PUBLICAȚII.....	19

MULȚUMIRI

În primul rând, aș dori să-i mulțumesc coordonatorului meu științific, Dr. Ștefana Petrescu, pentru tot sprijinul acordat. Apreciez foarte mult oportunitatea pe care mi-a oferit-o și anume, aceea de a-mi desfășura studiile doctorale în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române. Îi sunt recunoscătoare pentru încrederea, profesionalismul și răbdarea de care a dat dovadă pe parcursul acestor ani de studiu.

În al doilea rând, vreau să îi adresez mulțumiri speciale Dr. Gabriela Chirițoiu pentru că mi-a ghidat primii pași într-un laborator de cercetare. Fără ajutorul ei, nu aș fi reușit să-mi însușesc toate tehnicile experimentale care au contribuit la realizarea acestei teze.

Aș dori să mulțumesc și tuturor colegilor mei din Departamentele de Biologia Moleculară a Celulei și Bioinformatică pentru toate sfaturile, discuțiile științifice și încurajările primite. În special, îi mulțumesc Dr. Simona Ghenea pentru experimentele de biologie moleculară și microscopie, Dr. Mărioara Chirițoiu-Butnaru pentru experimentele de imunofluorescență și Dr. Cristian Munteanu pentru experimentele de spectrometrie de masă.

Mulțumiri speciale și colegelor mele Ioana Militaru și Alina Rus pentru optimismul și determinarea lor. Apreciez toate momentele în care am reușit să transformăm munca în laborator în cel mai plăcut moment al zilei.

Nu în ultimul rând, toată recunoștința mea merge către familia și prietenii mei. Mulțumesc pentru susținerea necondiționată pe care mi-au acordat-o.

SCOPUL TEZEI

În această lucrare mi-am propus să elucidez contribuția proteinei EDEM3 (**ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein 3**) în degradarea proteinelor asociată reticulului endoplasmatic (ERAD) pornind de la studierea domeniilor sale structurale.

Descrisă de cele mai multe ori prin prisma activității sale manozidazice, EDEM3 a fost considerată o proteină redundantă în cadrul familiei glicozil hidrolazelor 47 (GH47). Însă, câteva studii recente îi atribuie roluri fiziologice importante, precum semnalizarea celulară dependentă de androgeni sau modularea profilului trigliceridelor sanguine. La baza acestor observații ar putea sta tocmai structura sa unică, ce înglobează trei domenii funcționale: un domeniu manozidazic GH47, un domeniu asociat proteazelor și un domeniu intrinsec dezordonat.

Pentru a verifica relația existentă dintre structură și funcție, am folosit o serie de proteine truncate obținute prin deleția succesivă a domeniilor proteinei EDEM3. Principalele obiective ale acestei teze au fost atât investigarea efectului lor asupra unor substraturi ERAD cunoscute, cât și determinarea implicării lor în stabilirea de complexe funcționale cu alte proteine ERAD. Un al treilea obiectiv a fost testarea ipotezei conform căreia EDEM3 posedă și implicații în alte funcții celulare. Ultimul obiectiv a fost reprezentat de dezvoltarea unei metode cromatografice de schimb anionic de identificare și cuantificare a N-glicanilor atașați proteinelor. Astfel, am utilizat diverse tehnici experimentale de culturi celulare, biologie moleculară, spectrometrie de masă și cromatografie de schimb anionic.

Teza este structurată sub forma a patru capitole distincte. În **INTRODUCERE** am detaliat mecanismele de control al calității ce intervin asupra plierii proteinelor în reticulul

endoplasmatic: evaluarea activității șaperonilor clasici, evaluarea activității oxidoreductazelor și evaluarea procesului de N-glicozilare. Ulterior, am descris principalele etape ale ERAD, de la recunoașterea proteinelor incorect pliate până la degradarea lor proteazomală. Am evidențiat rolul manozidazelor implicate în acest proces, subliniind proprietățile unice ale EDEM3.

Capitolul **MATERIALE ȘI METODE** cuprinde două părți distincte, așa cum indică și numele acestuia. În subcapitolul Materiale am enumerat aparatura, consumabilele de laborator, reactivii chimici și toate ustensilele utilizate pentru realizarea studiilor prezentate. În subcapitolul Metode am descris pe larg metodologia de lucru pentru fiecare tehnică în parte. Toate experimentele au fost efectuate respectând principiile de bună practică în laborator.

Am structurat capitolul **REZULTATE** conform scopului acestei lucrări. Pentru a elucida rolul domeniilor funcționale ale EDEM3 în ERAD, studiul debutează cu o caracterizare amănunțită a mutantelor proteinei EDEM3 în sistemul celular dezvoltat. Mai apoi, am adresat efectul acestor proteine truncate asupra substratelor ERAD. Am evaluat demanozilarea și degradarea a trei substraturi ST, NHK și pCiL utilizând diverse tehnici biochimice. În continuare am investigat și asocierea mutantelor EDEM3 cu substraturile ERAD pentru a completa observațiile referitoare la rolul individual al fiecărui domeniu structural. Am analizat mutantele EDEM3 în contextul mai larg al ERAD, prin colaborarea lor cu alte manozidaze sau asocierea cu alți membri ai ERAD. Suplimentar, am descris implicarea EDEM3 la nivelul altor funcții celulare, precum migrarea și viabilitatea celulară. În final, am pus bazele unei metode de cromatografie de înaltă performanță de schimb anionic (HPAE-PAD) pentru identificarea și cuantificarea N-glicanilor. Aceasta poate fi folosită în evaluarea activității manozidazice în sisteme *in vivo* sau *in vitro*.

Ultimul capitol, **CONCLUZII**, rezumă principalele observații ale acestui studiu și încadrează proteina EDEM3 între membrii esențiali ai ERAD.

INTRODUCERE

Controlul calității proteinelor la nivelul RE poate fi împărțit în trei categorii, în funcție de proprietatea care este evaluată: (1) evaluarea caracterului hidrofob al lanțului proteic; (2) evaluarea activității oxidoreductazelor; (3) evaluarea conformației N-glicanilor. Deși prezintă caracteristici diferite, cele 3 procese acționează simultan în vederea plierii și traficului eficient al proteinelor încă din momentul inserției polipeptidelor în RE.

N-glicozilarea este cea mai întâlnită formă de glicozilare și are loc în RE. Aceasta conferă moleculei proteice o solubilitate crescută și o cinetică de pliere îmbunătățită [42,43]. N-glicanii pot determina și funcția proteinei [44–46]. Mai mult, pe măsură ce procesul de pliere avansează, glicanul este procesat de diferite enzime și poate interacționa cu lectinele rezidente ale RE. Evaluarea conformației nou-dobândite la fiecare etapă devine astfel mecanismul central al controlului calității glicoproteinelor în RE.

În momentul inserției proteinei în lumenul RE la nivelul transloconului Sec61, complexul oligozaharid-transferazei (OST) recunoaște secvența asparagină-X-serină/treonină, unde X poate fi orice aminoacid, mai puțin prolină. La acest nivel, complexul OST realizează transferul *en bloc* al N-glicanului [49]. Procesul poate decurge atât co- cât și post-translațional prin intermediul subunităților catalitice STT3A, respectiv STT3B.

La scurt timp după finalizarea N-glicozilării, glicanul este supus unei serii de reacții enzimatică cu rol în traficul proteinei (Figura 1). Forma triglucozilată are un timp de înjumătățire de câteva secunde, glucozidaza I (GI) îndepărtând restul de glucoză terminal. Forma diglucozilată (G2M9) rezultată este ligandul pentru malectină [50], o lectină cu nivel celular

crescut în urma stresului RE. Cel de-al doilea rest glucidic este procesat mai lent de către glucozidaza II. Forma monoglucozilată a glicanului (G1M9) este ulterior recunoscută de cuplul de lectine calnexină-calreticulină (CNX-CRT) [53,54]. Asocierea cu acestea mărește eficiența de împachetare prin împiedicarea agregării, oligomerizării sau degradării premature a intermediarilor de pliere.

Îndepărtarea ultimului rest de glucoză de către GII conduce la disocierea substratului de complexul CNX-CRT, acestea având afinități scăzute pentru forma neglucozilată (M9). Statusul plierii este interogat de către UDP-glucoză glicoprotein-glucozil transferaza (exprimată ca două izoforme: UGGT1 și UGGT2) [57,58]: dacă proteina este corect pliată, aceasta poate fi transportată anterograd către aparatul Golgi; dacă proteina este incorect pliată, UGGT reatașează un rest de α 1-3Glc ramurii A a glicanului.

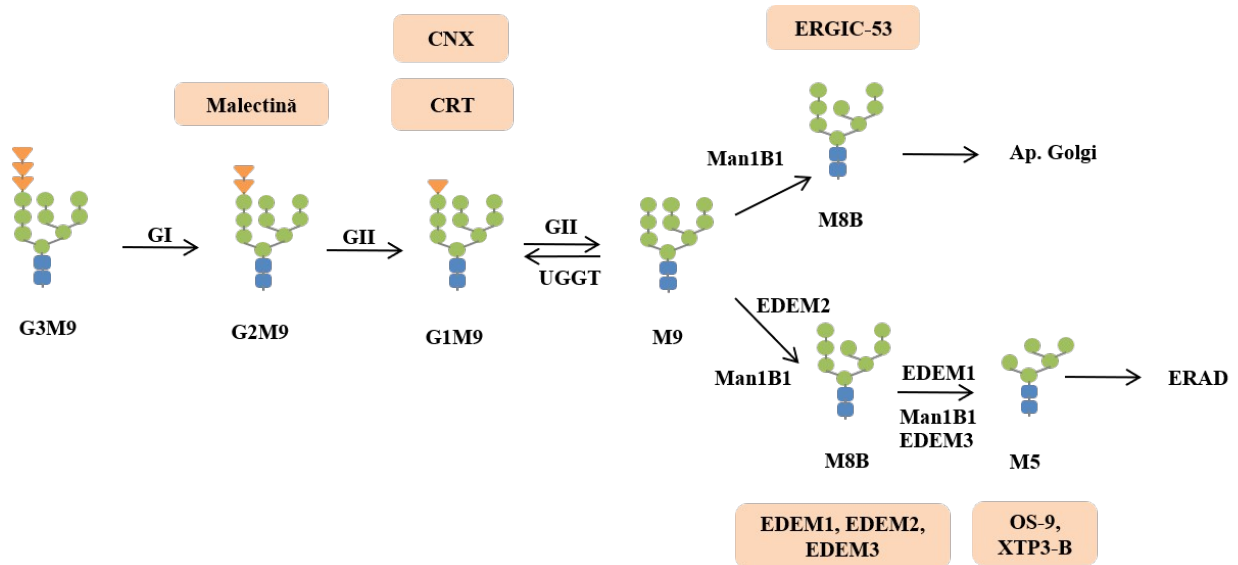


Figura 1. Rolul lectinelor în traficul proteinelor de la nivelul RE. Glucozidaza I (GI) îndepărtează primul rest de glucoză la câteva secunde de la transferarea N-glicanului pe suprafața proteinei. Forma diglucozilată poate interacționa cu malectina. Glicozidaza II (GII) înlătură cel de-al doilea rest de glucoză și forma monoglucozilată intră în ciclul calnexina-calreticulină (CNX-CRT). GII îndepărtează și ultimul rest de glucoză ceea ce conduce la disocierea substratului de CNX-CRT și evaluarea conformației proteinei de care este atașat de către UGGT. Dacă proteina este corect pliată, Man1B1 procesează ramura B prin tăierea unui rest manozic. Proteina în cauză interacționează în continuare cu ERGIC-53 și este transportată mai departe către aparatul Golgi. Dacă proteina este incorect pliată, UGGT îi adaugă o moleculă de glucoză și ciclul CNX-CRT poate reîncepe. În momentul în care substratul este marcat definitiv ca fiind incorect pliat, proteinele EDEM prelucrează polizaharidul și predau substratul

altor lectine, OS-9 și XTP3-B. Acestea din urmă trimit proteina către degradare prin ERAD. Pentru simplitate, în denumirea glicanilor s-au omis resturile de NAcGlc.

Odată reglucozilat, substratul poate reintra în ciclul CNX-CRT, procesul repetându-se până la obținerea formei native sau până la marcarea definitivă a proteinei ca fiind incorect pliată [61]. Este neclar însă cum anume evenimentele de reglucozilare-deglucozilare iau final. Se consideră că pentru fiecare glicoproteină se alocă o perioadă de timp în care aceasta se poate plia. Această ipoteză este susținută și de acțiunea lentă a manozidazelor, comparativ cu cea a glucozidazelor.

În cazul în care proteina este corect pliată, manozidaza I a RE (ERManI/Man1B1) îndepărtează un rest de manoză situat pe ramura B, luând naștere forma M8B. Substratul poate interacționa acum cu un receptor lectinic de sortare a proteinelor, ERGIC-53, situat la interfața dintre RE și aparatul Golgi [62,63]. În final, proteinele sunt împachetate în vezicule cu ajutorul mașinării COPII și sunt traficate către aparatul Golgi [64]. În schimb, proteinele incorect pliate generează stres și declanșează mecanismul de răspuns la proteinele nepliate (UPR), ceea ce conduce la degradarea proteinelor asociată reticulului endoplasmatic (ERAD).

Degradarea substratelor ERAD începe cu recunoașterea și marcarea acestora ca fiind proteine incorect pliate [68]. Inițial, îndepărtarea unui singur rest de manoză din structura N-glicanului a fost considerată suficientă pentru a trimite un substrat la degradare [69]. Recent s-a demonstrat că este nevoie de expunerea α 1,6 manozei j de pe ramura C [70] și că procesul de demanozilare poate continua până la îndepărtarea a 4 reziduuri manozice [71]. În acest proces intervin o serie de șaperoni (BiP), lectine (OS9, XTP3-B), manozidaze (Man1B1, EDEM), complexe proteice transmembranare (Derlin1) și ubiquitin-ligaze (HRD1).

Dogma centrală s-a modificat de-a lungul timpului, astăzi EDEM2 (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein 2) fiind considerată inițiatora degradării enzimatice a substratelor ERAD. Ninagawa et al. [117] au demonstrat că EDEM2 îndepărtează primul rest manozic de pe ramura B, iar EDEM3 și EDEM1 procesează N-glicanul până la forma M5. Autorii recunosc cele două etape ca fiind reacții limitante de viteză, debutul ERAD depinzând de activitatea manozidazelor. Activitatea celor trei proteine EDEM a fost demonstrată atât *in vivo*, cât și *in vitro* [118,119].

Descrisă pentru prima dată în anul 2006, proteina EDEM3 a reprezentat pentru mult timp modelul manozidazei clasice. Aceasta este alcătuită din 931 de aminoacizi (Figura 2), conservând domeniul manozidazic GH47 și prezentând un domeniul KDEL pentru retenția la nivelul RE. Supraexpresia EDEM3 accelerează degradarea substratelor ERAD, NHK și a TCR α . Yu et al. [118] au identificat proteina ERp46 ca fiind determinantul acțiunii EDEM3. Cele două proteine interacționează printr-o legătură disulfidică, ceea ce conduce la modificarea conformației domeniului manozidazic al EDEM3 și declanșarea activității sale.

Pentru EDEM3 au fost descrise și câteva implicații fiziologice surprinzătoare. În structura EDEM3 se regăsește un domeniu asociat proteazelor (PA), cuprins între aminoacizii 674-779 (Figure 2). În general, domeniile PA sunt implicate în stabilirea de interacții proteină-proteină [141]. Xu et al. [142] au atribuit însă domeniului PA un rol în controlul lipoproteinelor. O mutație genetică în poziția P746S conduce la scăderea concentrațiilor sanguine de trigliceride, ca urmare a creșterii expresiei receptorului LRP1 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1).



Figura 2. Structura comparativă a proteinelor EDEM. Prescurtările indică: MLD, domeniul manozidazic GH47; PA, domeniul asociat proteazelor. Dreptunghiul galben este domeniul transmembranar al EDEM1, dreptunghiul negru reprezintă secvența semnal al EDEM2 și EDEM3 iar triunghiurile albastre denotă domeniile intrinsec dezordonate ale EDEM1.

În celulele de adenocarcinom prostatic LNCaP, reglarea expresiei EDEM3 este modulată de nivelul hormonilor androgeni [143]. Tratamentul cu androgeni crește atât cantitatea totală de proteine glicozilate, cât și expresia EDEM3. Această observație are implicații directe în progresia cancerului de prostată, cunoscându-se faptul că adeziunea celulară, migrarea, semnalizarea și

metabolismul celulelor canceroase reprezintă procese dependente de glicozilarea proteică. Silențierea EDEM3 afectează la rândul său viabilitatea celulelor studiate.

Kofanova et al. [144] propun pentru gena EDEM3 o altă utilizare inedită și anume, cea de biomarker al evaluării calității celulelor sangvine mononucleare periferice (PBMC). Aceste celule sunt folosite în diagnosticul patologiilor inflamatorii și infecțioase. Pentru a oferi un răspuns corect investigatorului, ele trebuie să fie menținute în condiții optime înaintea manipulării experimentale. Astfel, autorii indică sistemul EDEM3-interleukina 8 (IL8) ca posibil biomarker în aprecierea calității PBMC menținute timp îndelungat la temperatura camerei în diverse sisteme anticoagulante.

Se înțelege astfel că EDEM3 ocupă un loc unic în ERAD, fiind atât o manozidază activă cât și un modulator al stresului RE. Structura EDEM3 ghidează accelerarea degradării proteinelor incorect pliate și contribuie la implicațiile fiziologice descrise recent. Din această cauză, în acest studiu am adresat rolul EDEM3 în ERAD prin investigarea efectelor domeniilor sale funcționale.

REZULTATE

Principalul obiectiv al acestei lucrări a fost acela de a descifra relația dintre domeniile funcționale ale proteinei EDEM3 și rolul fiziologic al acesteia în contextul ERAD. În acest scop, am studiat o serie de proteine truncate ale EDEM3 obținute anterior în cadrul laboratorului. Prin deleția succesivă a domeniilor structurale ale EDEM3 s-au obținut următoarele proteine: Δ PA, ce nu exprimă domeniul PA; Δ IDD, ce nu exprimă domeniul IDD; Δ MAN, ce nu exprimă domeniul MAN și MAN, ce nu posedă PA și IDD, exprimând selectiv domeniul manozidazic. În cazul tuturor, s-a menținut secvența semnal și domeniul KDEL. Suplimentar, s-a introdus și un tag (HA) cu scopul facilitării identificării proteinelor prin diverse metode biochimice.

CARACTERIZAREA MUTANTELOR PROTEINEI EDEM3

Pentru început, am caracterizat mutantele EDEM3 ca fiind proteine cu o expresie stabilă la nivelul a două linii celulare, la masa moleculară precisă. De asemenea, acestea prezintă

modificări post translaționale caracteristice RE, precum N-glicozilarea și formarea de punți disulfidice. Mai mult, toate mutantele EDEM3 co-localizează cu proteine rezidente ale RE, calnexina și SeL1L.

EFECTELE MUTANTELOR EDEM3 ASUPRA DEGRADĂRII SUBSTRATELOR ERAD

În continuare am studiat efectul mutantelor EDEM3 asupra procesării a 3 substrat ERAD. Primul substrat investigat a fost tirozinaza solubilă (ST), astfel că la nivelul liniei EDEM3-KO am co-transfectat proteinele de interes pentru 48h. În urma analizelor Western blot sau pulse chase (Figura 3), am reușit să identific domeniul manozidazic ca fiind principalul responsabil în demanozilarea și degradarea substratului ST. În mod surprinzător, deleția secvențială a domeniilor PA și IDD nu a fost vitală funcției proteinei. Se observă totuși o creștere a timpului de înjumătățire a ST în prezența Δ PA, comparativ cu proteina WT. Expresia singulară a domeniului manozidazic a condus la un fenomen neașteptat: o mutantă capabilă să degradeze un substrat ERAD chiar și în lipsa unei activități manozidazice evidente.

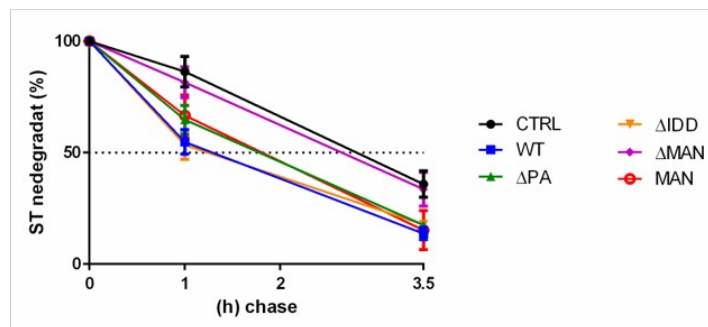
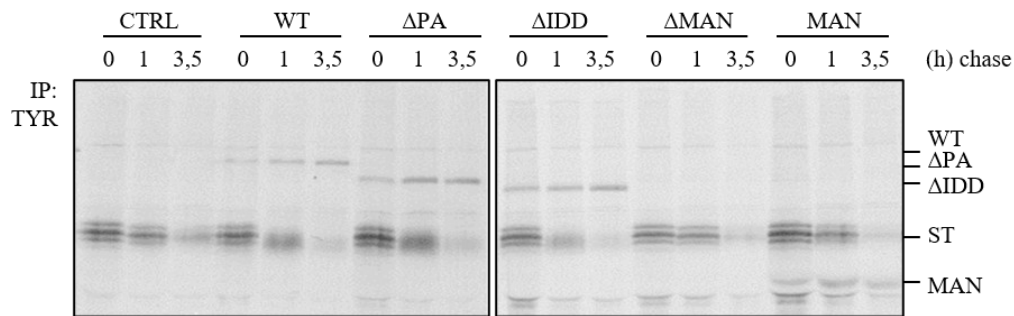


Figura 3. Degradarea ST în prezența mutantelor EDEM3. Celulele EDEM3-KO au fost transfectate astfel încât să exprime ST și mutantele EDEM3. Acestea au fost marcate radioactiv cu [S^{35}] și lizate corespunzător. Lizatele celulare au fost incubate cu anticorpi anti-TYR iar complexe rezultate au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Rezultatele au fost vizualizate prin autoradiografie. Graficul reprezintă degradarea ST în funcție de timp ca medie \pm DS a 3 experimente individuale.

Un al doilea substrat supus investigării a fost **Null Hong Kong (NHK), varianta trunată a alfa-1-antitripsinei** (Figura 4). Nivelul atins de substratul ERAD în afara celulelor este în concordanță cu activitatea degradativă a mutantelor EDEM3. Se pare că domeniul IDD are un rol important în degradarea și secreția NHK, conferind un feedback negativ asupra prelucrării acestui substrat. În absența sa, NHK este reținut mai eficient la nivelul RE, cantitatea disponibilă pentru secreție scăzând considerabil. Mai mult, rata de secreție scade semnificativ statistic comparativ cu proba control. Asemănător, și formele WT, Δ PA și MAN scad secreția NHK, susținând activitatea lor degradativă și capacitatea de a reține substratul în RE. Numai constructul Δ MAN permite secreția NHK, fenomen așteptat având în vedere inactivitatea acestei proteine. Dimerii NHK se formează indiferent de activitatea enzimatică a proteinei EDEM3. Aceștia sunt prezenți încă de la punctul 0h al experimentului și își păstrează expresia pe durata întregului interval de timp.

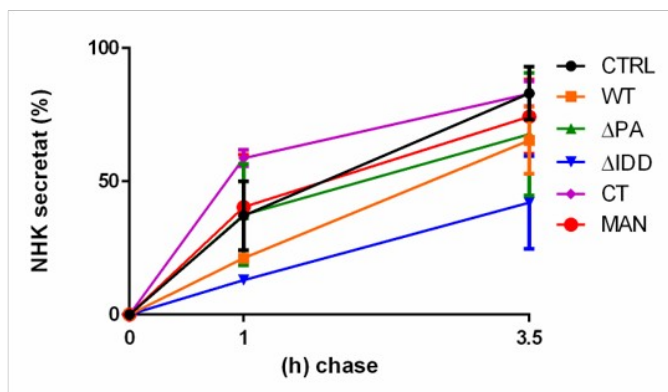
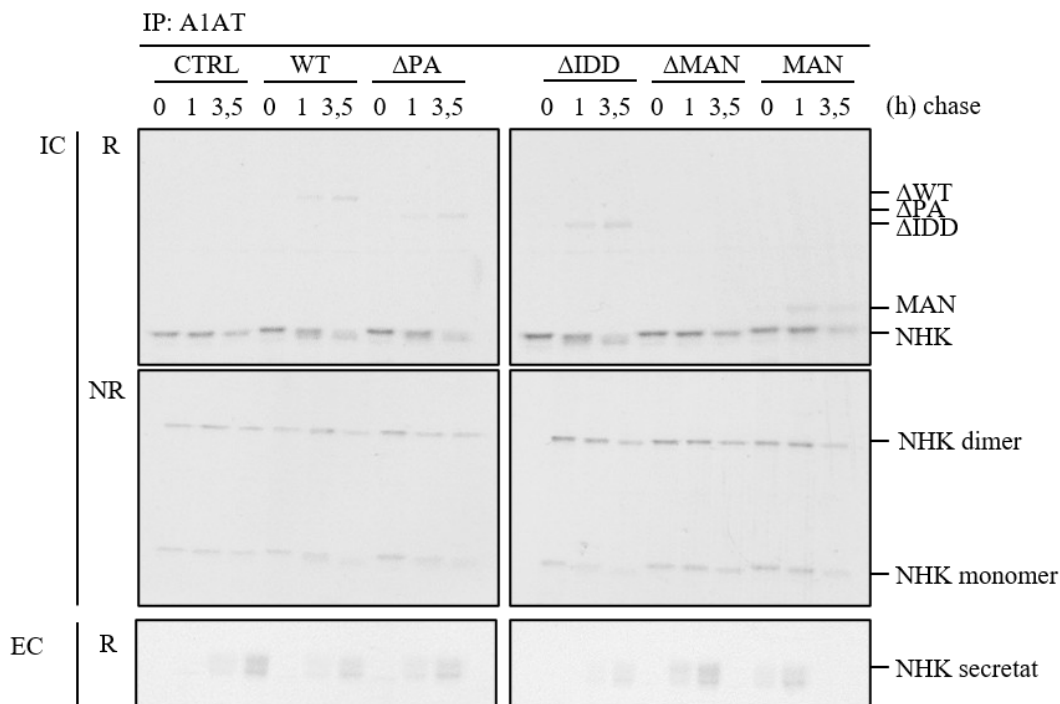


Figura 4. Influența mutantelor EDEM3 asupra degradării și secreției NHK. Celulele EDEM3-KO au fost transfectate pentru 48h cu plasmidele indicate. Acestea au fost înfometate, marcate metabolic și urmărite conform punctelor de timp prezentate. S-a colectat inclusiv mediul celular corespunzător fiecărui punct. Lizatele (IC, intracelular) și mediul colectat au fost imunoprecipitate cu anticorpi anti-A1AT și au fost analizate atât în condiții reducătoare (R) cât și nereducătoare (NR). Secreția NHK (EC, extracelular) a fost cuantificată și reprezentată sub formă grafică ca (media \pm DS) a trei experimente biologice independente.

ASOCIEREA MUTANTELOR EDEM3 CU SUBSTRATELE ERAD

Prin analiza Figurilor 3 și 4 am decelat asocierea timpurie a mutantelor EDEM3 cu ST sau NHK, cu excepția mutantei Δ MAN. Se pare că există un trend ascendent al asocierii dintre cele două substraturi ERAD și WT, Δ PA sau Δ IDD. Interacția dintre enzimă și substrat crește în intensitate odată cu trecerea timpului. Aceleași observații au fost făcute în trecut și de alți autori pentru proteina EDEM1. În schimb, mutanta MAN posedă o capacitate diferită de asociere cu substraturile ERAD, interacția atingând un maxim la punctul de o oră și scăzând apoi în magnitudine. În consecință, am studiat acest profil de asociere și prin imunoprecipitare și Western blot (Figura 5).

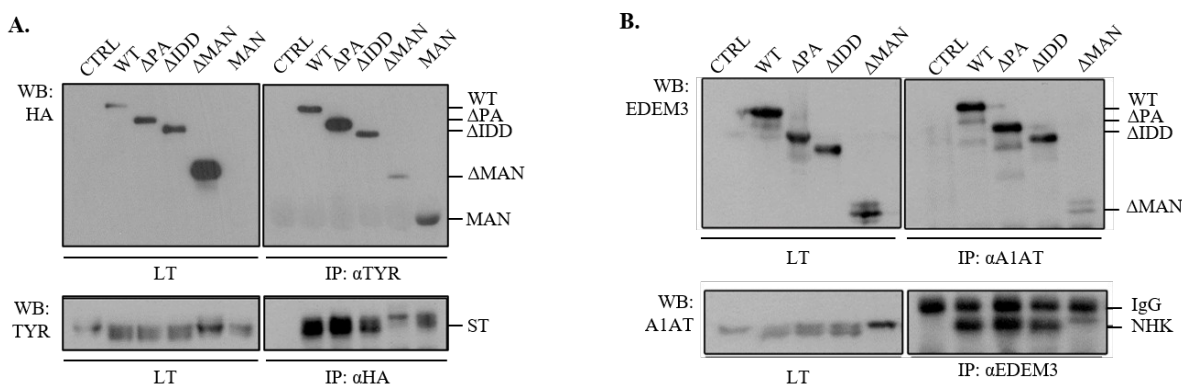


Figura 5. Determinarea asocierii ST și NHK cu mutantele EDEM3 prin imunoprecipitare și Western blot.

Celulele EDEM3-KO au fost transfectate corespunzător, lizate și procesate pentru imunoprecipitare fie cu anticorpi anti-HA și anti-TYR (A) sau anticorpi anti-EDEM3 și anti-A1AT (B). Rezultatele au fost vizualizate prin Western blot cu anticorpii indicați. LT indică lizate totale.

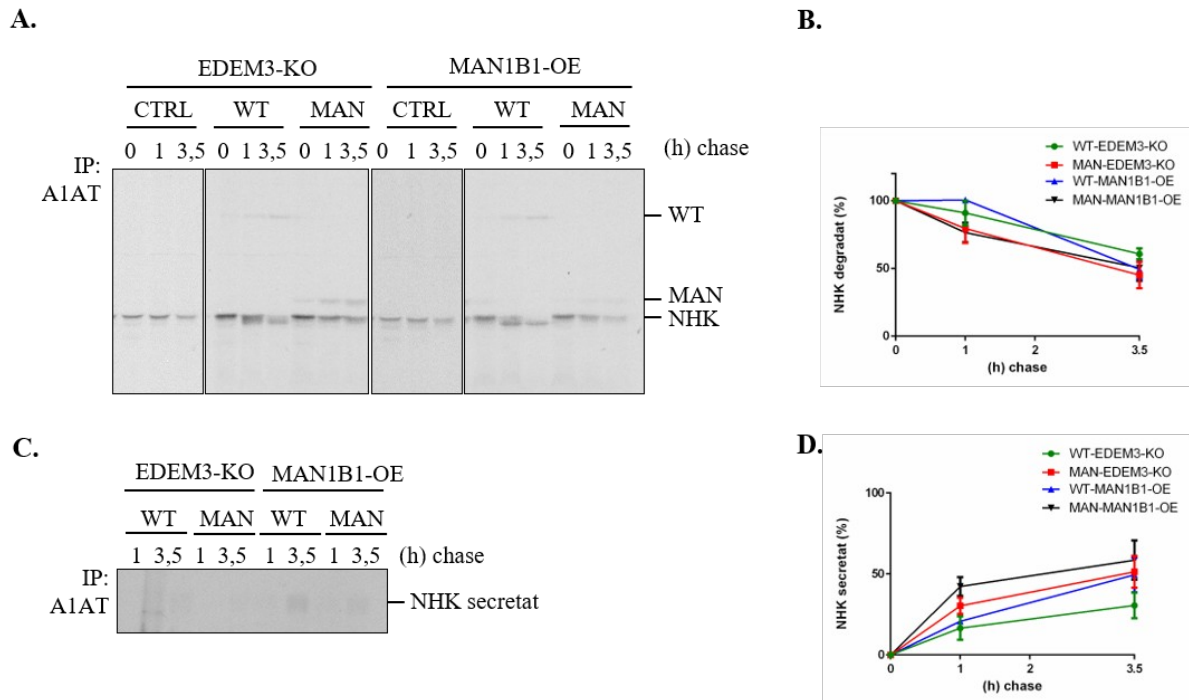
Cumulând observațiile tuturor acestor experimente, am identificat domeniul manozidazic ca fiind principalul responsabil de asocierea EDEM3 cu proteinele incorect pliate. Deleția secvențială a PA și IDD nu influențează capacitatea mutantelor de a interacționa cu substraturile ERAD. Mai mult, domeniul manozidazic de sine stătător se poate angaja în stabilirea de interacții proteină-proteină. Există totuși o diferență în ceea ce privește dinamica acestui proces, susținând o asociere de tip lectinic mediată de EDEM3. Procesarea avansată a resturilor manozice conduce

la creșterea intensității interacțiilor, ceea ce sugerează importanța activității enzimatice a EDEM3 asupra stabilirii de complexe stabile în cadrul ERAD.

EDEM3 ȘI MUTANTELE SALE ÎN CONTEXTUL ERAD

În continuare mi-am propus să studiez implicarea EDEM3 în contextul mai larg al ERAD. Am investigat atât colaborarea sa cu alte manozidaze ale familiei GH47, cât și asocierea cu proteine cheie ale ERAD utilizând spectrometria de masă.

În mod surprinzător, co-expresia EDEM3 și Man1B1 nu a condus la accelerarea degradării substratelor ERAD (Figura 6), comparativ cu expresia singulară a lui EDEM3. Mutanta Δ MAN nu cooperează cu Man1B1, sugerând faptul că activitatea enzimatică a EDEM3 contribuie la funcționalitatea acestui sistem. Mai degrabă se observă o secreție îmbunătățită a



NHK .

Figura 6. Analiza pulse-chase a procesării NHK în prezența EDEM3 și Man1B1. (A) Celulele EDEM3-KO și MAN1B1 au fost co-transfectate cu plasmidele corespunzătoare. Acestea au fost tratate conform protocolului de pulse-chase. Substratul a fost imunoprecipitat cu anticorpi anti-A1AT și rezultatele vizualizate prin autoradiografie. (B) Nivelul intracelular al NHK din (A) a fost cuantificat și reprezentat ca (medie ± DS) a 3 experimente biologic independente. (C) Mediul de cultură al celulelor din (A) a fost recoltat și tratat identic ca lizatele celulare. (D)

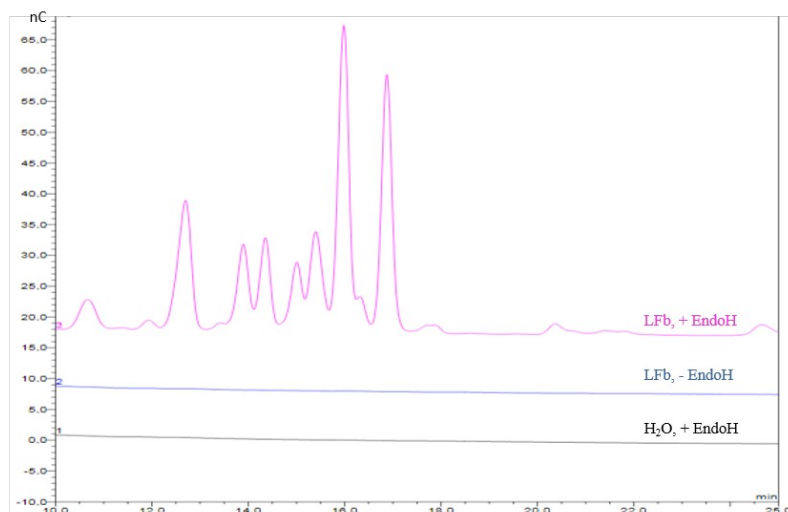
Nivelul extracelular al NHK din (C) a fost cuantificat și reprezentat ca și (media ± DS) a 3 experimente biologice independente.

EDEM3 prezintă un profil neobișnuit de interactori. În primul rând, condițiile experimentale utilizate au influențat capacitatea de extracție a proteinelor din lizatul celular. Suplimentar, tăria tamponului de liză a condus la menținerea sau pierderea interacțiilor proteice. Cu ajutorul spectrometriei de masă am identificat interactori ai EDEM3 implicați mai degrabă în plierea proteinelor. Asocierea cu SeL1L sau CNX rămâne neclară, EDEM3 putând avea un rol specific în ERAD. Mai mult, experimentele de co-immunoprecipitare au întărit observațiile anterioare referitoare la impredictibilitatea asocierilor observate.

DEZVOLTAREA UNEI METODE DE HPAE-PAD PENTRU IDENTIFICAREA ȘI CUANTIFICAREA N-GLICANILOR

Ultimul obiectiv al lucrării de față a fost dezvoltarea unei tehnici de analiză rapidă a N-glicanilor atașați la suprafața polipeptidelor, cu scopul de a caracteriza în amănunt activitatea enzimatică a proteinei EDEM3. Astfel am pus bazele unei metode de cromatografie de lichide de înaltă performanță de schimb anionic, cuplată cu detecție puls-amperometrică (HPAE-PAD).

Cu ajutorul protocolului dezvoltat am reușit să separ N-glicanii unei proteine purificate și anume, lactoferina bovină (Figura 7). Am testat aceeași metodologie și asupra unui lizat celular, în încercarea de a determina profilul glicozilării unei linii celulare. Este necesară însă o serie de optimizări în ceea ce privește metodologie de extracție a N-glicanilor din lizatele celulare.



Coloană: Pre-coloană și coloană analitică Dionex CarboPac PA100, \varnothing 2 mm. **Eluent:** 100 mM NaOH + 250 mM NaOAc în 100 mM NaOH, 20 °C, 0.3 mL/min. **Volum de injecție:** 10 μ L. **Detecție:** Electrod indicator detașabil de Au-PTFE, cuplat cu electrod de referință de Ag/AgCl. Detecție puls-amperometrică integrată cu serie de potențial cvadruplu standard. **Sistem cromatografic:** ICS-5000 HPIC, software Chromeleon 6.8.

Figura 7. Identificarea glicanilor lactoferinei bovine prin HPAE-PAD.

CONCLUZII (teza în extenso)

Dobândirea unei conformații native este indispensabilă funcționalității proteinelor. În ciuda unui efort celular susținut, o mare parte dintre proteinele ce străbat RE nu reușesc să adopte o formă stabilă. Pentru a evita acumularea sau agregarea proteinelor incorect pliate, acestea sunt eliminate prin ERAD, în urma unui proces de selecție, transport și dislocare către citosol.

În această lucrare mi-am propus să elucidez contribuția manozidazei EDEM3 în procesul ERAD. Deși a fost descrisă ca o proteină redundantă, aceasta prezintă câteva particularități față de ceilalți membri ai familiei GH47. În structura sa s-au identificat trei domenii funcționale distincte: un domeniu manozidazic GH47, un domeniu asociat proteazelor și un domeniu intrinsec dezordonat. Mai mult, este singura manozidază GH47 care posedă un domeniu KDEL.

Astfel, pentru a atinge scopul acestei lucrări, am utilizat o serie de proteine truncate ale EDEM3 obținute prin deleția secvențială a domeniilor sale structurale. Construcții rezultate au fost următorii: Δ PA, ce nu exprimă domeniul PA; Δ IDD, ce nu exprimă domeniul IDD; Δ MAN, ce nu exprimă domeniul MAN, și MAN, ce nu posedă PA și IDD, exprimând selectiv domeniul manozidazic. În cazul tuturor, s-a menținut secvența semnal, domeniul KDEL și s-a introdus suplimentar un tag molecular (HA).

Primul pas al studiului a fost caracterizarea mutantelor EDEM3. Pentru a putea decela între efectele proteinei sălbatice, exprimate endogen de către sistemul celular utilizat, și efectele proteinelor mutante, exprimate exogen prin transfecție tranzientă, am recurs la generarea unei linii deplețate de proteina EDEM3 (EDEM3-KO). La nivelul acestora am arătat că mutantele EDEM3 se exprimă la masa moleculară așteptată și posedă nivele de expresie similare, cu excepția Δ MAN și MAN. Diferențele observate pot fi atribuite însă unei erori de recunoaștere a anticorpului folosit, întrucât plierea proteinelor decurge cu aceeași eficiență. Mai mult, am adus dovezi ce susțin capacitatea domeniului manozidazic de a forma punți disulfidice.

Am reușit să demonstrez că toți construcții EDEM3 sunt degradați pe cale proteazomală, fiind totodată și proteine glicozilate. Acestea sunt reținute la nivelul RE, fiind sensibile la acțiunea EndoH și colocalizând cu două proteine rezidente în RE, calnexina și SeL1L.

În continuare, pentru a atinge unul dintre obiectivele principale ale studiului, am investigat efectele mutantelor EDEM3 asupra degradării a trei substraturi ERAD. Proteinele WT, Δ PA și Δ IDD au activitate manozidazică și degradativă asemănătoare, în timp ce mutanta Δ MAN are o acțiune net diminuată. Surprinzător, proteina MAN, deși își pierde capacitatea enzimatică, o păstrează pe cea degradativă. Mai mult, se pare că există și o acțiune substrat-dependentă ce evidențiază rolurile subtile ale domeniilor structurale în degradarea proteinelor incorect pliate. Mai exact, domeniul manozidazic devine principalul responsabil de activitatea EDEM3 în ERAD. Deleția sa conduce la inactivitatea moleculei. Domeniul PA pare să fie necesar pentru degradarea ST, întrucât eliminarea sa crește timpul de înjumătățire al substratului cu 30 de minute. În schimb, domeniul IDD conferă un feedback negativ asupra degradării NHK, deleția sa accelerând și secreția substratului.

Domeniul manozidazic este și principalul responsabil de asocierea EDEM3 cu proteinele incorect pliate, constructul Δ MAN pierzând orice capacitate de a se angaja într-un complex cu acestea. Deleția secvențială a PA și IDD nu influențează capacitatea mutantelor de a interacționa cu NHK sau ST. Domeniul manozidazic ca atare se poate angaja în stabilirea de interacții tranziente proteină-proteină dar cu o dinamică diferită de proteina WT. Constructul MAN atinge un maxim de asociere, după care intensitatea scade, sugerând proprietatea EDEM3 de a interacționa preferențial cu formele prelucrate enzimatic.

Cel de-al doilea obiectiv principal al acestei lucrări a fost evidențierea relației dintre mutantele EDEM3 și ceilalți membri ai ERAD. În ceea ce privește cooperarea sa cu alte manozidaze, am observat că supraexpresia Man1B1 și EDEM3 poate conduce la pierderea accelerării degradării proteinelor incorect pliate. Acest fenomen poate decurge din blocarea transportului retrograd către RE, ținând cont de localizarea Man1B1 la nivelul aparatului Golgi. Mai mult, am demonstrat că proteina EDEM3 nu este redundantă prin comparație cu EDEM1 și EDEM2, manozidazele colaborând în degradarea și demanozilarea NHK.

EDEM3 prezintă însă un profil neobișnuit de interactori. Condițiile experimentale utilizate au influențat capacitatea de extracție a proteinelor din lizatul celular, tăria tamponului de liză conducând la menținerea sau pierderea interacțiilor proteice. Cu ajutorul spectrometriei de masă am identificat proteine neașteptate ca și posibili interactori ai EDEM3, precum BiP, ERdj6 sau riboforina 1. În schimb, proteinele SeL1L sau CNX au prezentat profile de interacții instabile.

Al treilea obiectiv, și anume studierea implicării EDEM3 la nivelul altor procese celulare, a fost realizat prin utilizarea liniei celulare de melanom amelanotic A375. Expresia EDEM3 scade în hipoxie, contrar EDEM2, influențând în același timp și nivelul de HIF1 α . Mai mult, supraexpresia de EDEM3 conferă celulelor o migrare îmbunătățită, ce poate sugera implicarea EDEM3 în modularea semnalizării invazivității celulelor canceroase.

Ultimul obiectiv a fost reprezentat de dezvoltarea unei metode de cromatografie de înaltă performanță de schimb anionic pentru studiul N-glicanilor. Am reușit să pun bazele unei astfel de metodologii ce ar putea fi utilizată cu succes în caracterizarea glicozilării proteinelor purificate și a activității *in vivo* a manozidazelor.

În concluzie, rezultatele prezentate în această lucrare aduc o nouă contribuție asupra rolului proteinei EDEM3 în ERAD. Domeniile funcționale ale proteinei au proprietăți diferite, fiecare reglând activitatea EDEM3 corespunzător. Principalele observații originale aduse de acest studiu sunt:

- Mutantele EDEM3 se exprimă stabil la nivelul unei linii celulare EDEM3-KO, localizându-se la nivelul reticulului endoplasmatic;
- Domeniul manozidazic poate stabili legături disulfidice mixte, plierea sa fiind afectată de prezența agenților reducători;
- Domeniul manozidazic al EDEM3 este principalul responsabil de activitatea manozidazică și degradativă a proteinei;
- Domeniul manozidazic poate trimite la degradare substratele ERAD chiar și în lipsa unei activități manozidazice evidente;
- Domeniile PA și IDD nu sunt vitale pentru funcția proteinei, dar modulează procesul ERAD în funcție de substratul de degradat;
- EDEM3 stabilește interacții cu substratele ERAD strict prin intermediul domeniului manozidazic;
- EDEM3 se poate asocia cu substratele ERAD printr-o interacție de tip lectinic, interacția crescând o dată cu procesarea manozidazică a proteinelor incorect pliate;
- EDEM3 și Man1B1 au un efect cumulativ în degradarea mutantei alfa1-antitripsinei NHK deși nu facilitează degradarea acesteia; se observă mai degrabă secreția accelerată a NHK în mediul extracelular;
- EDEM3 prezintă un răspuns distinct la hipoxie, comparativ cu EDEM2;

- EDEM3 modulează migrarea și viabilitatea celulelor de melanom uman A375;
- Metoda HPAE-PAD dezvoltată în această lucrare poate fi utilizată cu succes în caracterizarea N-glicozilării proteinelor.

LISTĂ DE PUBLICAȚII

ARTICOLE ȘTIINȚIFICE

1. **Manica, G.**; Ghenea, S.; Munteanu, C.V.A.; Martin, E.C.; Butnaru, C.; Surleac, M.; Chiritoiu, G.N.; Alexandru, P.R.; Petrescu, A.-J.; Petrescu, S.M. EDEM3 Domains Cooperate to Perform Its Overall Cell Functioning. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2172. <https://doi.org/10.3390/ijms22042172>. **IF: 4,556.**

POSTERE

1. **Manica, G.**; Butnaru, C.; Ghenea, S.; Chiritoiu, M.; Marin, I.; Petrescu, S.M. New mechanistic insights from studies of EDEM3 conformational domains. *RSBMB Annual International Meeting*, 2019, Iasi, Romania.
2. **Manica, G.**; Ghenea, S.; Butnaru, C.; Munteanu, C.V.A.; Petrescu, A.-J.; Petrescu, S.M. Investigation of the multi-domain structure of EDEM3. *RSBMB Annual International Meeting*, 2018, Bucuresti, Romania.
3. **Manica, G.**; Chiritoiu, G.N.; Butnaru, C.; Ghenea, S.; Petrescu, S.M. EDEM3 and its function in ERAD. *RSBMB Annual International Meeting*, 2017, Timisoara, Romania.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

42. Mitra, N.; Sinha, S.; Ramya, T.N.C.; Surolia, A. N-Linked Oligosaccharides as Outfitters for Glycoprotein Folding, Form and Function. *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, *31*, 156–163, doi:10.1016/j.tibs.2006.01.003.
43. Hanson, S.R.; Culyba, E.K.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H.; Kelly, J.W.; Powers, E.T. The Core Trisaccharide of an N-Linked Glycoprotein Intrinsically Accelerates Folding and Enhances Stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 3131–3136, doi:10.1073/pnas.0810318105.
44. Solá, R.J.; Griebenow, K. Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *98*, 1223–1245, doi:10.1002/jps.21504.
45. Skropeta, D. The Effect of Individual N-Glycans on Enzyme Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 2645–2653, doi:10.1016/j.bmc.2009.02.037.
46. Lyons, J.J.; Milner, J.D.; Rosenzweig, S.D. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Front. Pediatr.* **2015**, *3*, doi:10.3389/fped.2015.00054.
49. Ruiz-Canada, C.; Kelleher, D.J.; Gilmore, R. Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. *Cell* **2009**, *136*, 272–283, doi:10.1016/j.cell.2008.11.047.
50. Schallus, T.; Jaech, C.; Fehér, K.; Palma, A.S.; Liu, Y.; Simpson, J.C.; Mackeen, M.; Stier, G.; Gibson, T.J.; Feizi, T.; et al. Malectin: A Novel Carbohydrate-Binding Protein of the Endoplasmic Reticulum and a Candidate Player in the Early Steps of Protein N -Glycosylation. *MBoC* **2008**, *19*, 3404–3414, doi:10.1091/mbc.e08-04-0354.
53. Ware, F.E.; Vassilakos, A.; Peterson, P.A.; Jackson, M.R.; Lehrman, M.A.; Williams, D.B. The Molecular Chaperone Calnexin Binds Glc1Man9GlcNAc2 Oligosaccharide as an

Initial Step in Recognizing Unfolded Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 4697–4704, doi:10.1074/jbc.270.9.4697.

54. Kozlov, G.; Pocanschi, C.L.; Rosenauer, A.; Bastos-Aristizabal, S.; Gorelik, A.; Williams, D.B.; Gehring, K. Structural Basis of Carbohydrate Recognition by Calreticulin*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 38612–38620, doi:10.1074/jbc.M110.168294.

57. Taylor, S.C.; Thibault, P.; Tessier, D.C.; Bergeron, J.J.M.; Thomas, D.Y. Glycopeptide Specificity of the Secretory Protein Folding Sensor UDP–Glucose Glycoprotein:Glucosyltransferase. *EMBO Rep* **2003**, *4*, 405–411, doi:10.1038/sj.embor.embor797.

58. Izumi, M.; Kuruma, R.; Okamoto, R.; Seko, A.; Ito, Y.; Kajihara, Y. Substrate Recognition of Glycoprotein Folding Sensor UGGT Analyzed by Site-Specifically ¹⁵N-Labeled Glycopeptide and Small Glycopeptide Library Prepared by Parallel Native Chemical Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11421–11426, doi:10.1021/jacs.7b03277.

61. Słomińska-Wojewódzka, M.; Sandvig, K. The Role of Lectin-Carbohydrate Interactions in the Regulation of ER-Associated Protein Degradation. *Molecules* **2015**, *20*, 9816–9846, doi:10.3390/molecules20069816.

62. Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C ERGIC-53 and Traffic in the Secretory Pathway. *J Cell Sci* **2000**, *113*, 587–596.

63. Satoh, T.; Suzuki, K.; Yamaguchi, T.; Kato, K. Structural Basis for Disparate Sugar-Binding Specificities in the Homologous Cargo Receptors ERGIC-53 and VIP36. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87963, doi:10.1371/journal.pone.0087963.

64. Duden, R. ER-to-Golgi Transport: COP I and COP II Function (Review). *Molecular Membrane Biology* **2003**, *20*, 197–207, doi:10.1080/0968768031000122548.

68. Nakatsukasa, K.; Brodsky, J.L. The Recognition and Retrotranslocation of Misfolded Proteins from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic* **2008**, *9*, 861–870, doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00729.x.

69. Helenius, A. How N-Linked Oligosaccharides Affect Glycoprotein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *MBoC* **1994**, *5*, 253–265, doi:10.1091/mbc.5.3.253.

70. Satoh, T.; Chen, Y.; Hu, D.; Hanashima, S.; Yamamoto, K.; Yamaguchi, Y. Structural Basis for Oligosaccharide Recognition of Misfolded Glycoproteins by OS-9 in ER-Associated Degradation. *Molecular Cell* **2010**, *40*, 905–916, doi:10.1016/j.molcel.2010.11.017.

71. Avezov, E.; Frenkel, Z.; Ehrlich, M.; Herscovics, A.; Lederkremer, G.Z. Endoplasmic Reticulum (ER) Mannosidase I Is Compartmentalized and Required for *N*-Glycan Trimming to Man₅₋₆GlcNAc₂ in Glycoprotein ER-Associated Degradation. *MBoC* **2008**, *19*, 216–225, doi:10.1091/mbc.e07-05-0505.
117. Ninagawa, S.; Okada, T.; Sumitomo, Y.; Kamiya, Y.; Kato, K.; Horimoto, S.; Ishikawa, T.; Takeda, S.; Sakuma, T.; Yamamoto, T.; et al. EDEM2 Initiates Mammalian Glycoprotein ERAD by Catalyzing the First Mannose Trimming Step. *Journal of Cell Biology* **2014**, *206*, 347–356, doi:10.1083/jcb.201404075.
118. Yu, S.; Ito, S.; Wada, I.; Hosokawa, N. ER-Resident Protein 46 (ERp46) Triggers the Mannose-Trimming Activity of ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like Protein 3 (EDEM3). *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 10663–10674, doi:10.1074/jbc.RA118.003129.
119. Shenkman, M.; Ron, E.; Yehuda, R.; Benyair, R.; Khalaila, I.; Lederkremer, G.Z. Mannosidase Activity of EDEM1 and EDEM2 Depends on an Unfolded State of Their Glycoprotein Substrates. *Commun Biol* **2018**, *1*, 172, doi:10.1038/s42003-018-0174-8.
141. Mahon, P.; Bateman, A. The PA Domain: A Protease-Associated Domain. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1930–1934, doi:10.1110/ps.9.10.1930.
142. Xu, Y.-X.; Peloso, G.M.; Nagai, T.H.; Mizoguchi, T.; Deik, A.; Bullock, K.; Lin, H.; Musunuru, K.; Yang, Q.; Vasan, R.S.; et al. EDEM3 Modulates Plasma Triglyceride Level through Its Regulation of LRP1 Expression. *iScience* **2020**, *23*, 100973, doi:10.1016/j.isci.2020.100973.
143. Munkley, J.; Vodak, D.; Livermore, K.E.; James, K.; Wilson, B.T.; Knight, B.; McCullagh, P.; McGrath, J.; Crundwell, M.; Harries, L.W.; et al. Glycosylation Is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability. *EBioMedicine* **2016**, *8*, 103–116, doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.018.
144. Kofanova, O.; Bellora, C.; Quesada, R.A.; Bulla, A.; Panadero-Fajardo, S.; Keipes, M.; Shea, K.; Stone, M.; Lescuyer, P.; Betsou, F. IL8 and EDEM3 Gene Expression Ratio Indicates Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Quality. *Journal of Immunological Methods* **2019**, *465*, 13–19, doi:10.1016/j.jim.2018.11.012.

