



Academia Română

Institutul de Biochimie

Rezumatul tezei de doctorat

**Rolul Manozidazelor în Degradarea Asociață Reticului
Endoplasmic**

Coordonator științific:

DR. ANDREI J. PETRESCU

Doctorand:

CRISTIAN MARIAN BUTNARU

BUCHAREST

2017

Table of contents

List of figures	4
List of tables	6
Aims of these studies	7
1. Introduction	9
1.1. Protein synthesis, folding and degradation in the Eukaryotic cell	10
1.1.1. Protein Folding in the ER	10
1.1.2. Endoplasmic Reticulum Associated Degradation pathway ERAD	13
1.2. Model ERAD substrates	17
1.2.1. Tyrosinase and its role in melanogenesis	17
1.2.2. Alpha 1 antitrypsin (AT)	18
1.3. Mass spectrometry (MS)	20
1.3.1. Ion sources and ionization techniques.....	21
1.3.2. ESI ionization	21
1.3.3. Tandem mass spectrometry (MS / MS) and mass spectrum	22
1.3.4. Bottom-up and top-down approaches in proteomics.....	23
1.3.5. Mass spectrometry data analysis	24
1.3.6. Applications	25
2. Materials and methods	27
2.1. Materials	27
2.2. Methods:	30
2.2.1. Transformation of competent bacteria	30
2.2.2. PCR amplification of DNA fragments	31
2.2.3. Protein concentration determination-BCA assay	31
2.2.4. Protein electrophoresis	32
2.2.5. Immunoblotting	33
2.2.6. Immunoprecipitation and western blotting	34
2.2.7. Cell transfection	35
2.2.8. Inhibitors and chemical treatment	37
2.2.9. Metabolic labeling and immunoprecipitation	38
2.2.10. Immunofluorescence microscopy	39
2.2.11. In gel digestion of proteins	40
2.2.12. Optimization of sample preparation for identification of biomarkers using mass-spectrometry from human serum.....	41
2.2.13. Modeling of EDEM3 domains	43
3. Results and discussions	45
3.1. Proteomics. Identifying the possible interactors of EDEM3.	45
3.1.1. <i>In silico</i> identification of EDEM3 interactor using STRING	45
3.1.2. Optimization of extraction, immunoprecipitation and sample preparation for mass spectrometry analysis	49
3.1.3. Determination of EDEM3 interactors	53
3.2. Characterization of EDEM3 and structural analysis	62
3.2.1. EDEM3 characterization	62
3.2.2. Homology model generation for EDEM3	69
3.2.3. Production and characterization of EDEM3 truncated mutants	74
3.3. EDEM3 association and effect over the ERAD substrates	77
3.3.1. EDEM3 mutants effect on ERAD substrates	77
3.3.2. Interaction of EDEM3 mutants with the ERAD clients.	79
3.3.3. Determination of the half-life for ERAD clients in presence of EDEM3 mutants	82
3.4. Association of EDEM3 mutants with SEL1L	86

4. Conclusions	91
5. References:	94
List of abbreviations	102
Acknowledgements	104
List of publications	105

Scopul lucrării

În această lucrare am urmărit să înțeleg aspecte noi ale procesului de pliere și mecanismul de degradare al proteinelor din calea secretorie, cu accent pe proteina EDEM3 (ER degradation enhancing α mannosidase like protein 3). Rolul acestei proteine în ERAD (ER asociated protein degradation) este încă neclar, deoarece până în prezent s-au studiat doar numite aspecte legate de funcția proteinei și datele existente până în prezent sunt contradictorii.

Cu scopul de a extinde datele cunoscute în acest domeniu și pentru a atinge scopurile menționate mai sus am îmbinat cunoștințe și metode de *biologie celulară și moleculară, biochimie a proteinelor, analiză de spectrometrie de masă (MS), bioinformatică și modelare moleculară* pentru a elucida rolul proteinei EDEM3 în ERAD.

Primul capitol al acestei lucrări este organizat în jurul studiilor de proteomică, scopul principal al acestora fiind identificarea potențialilor interactori ai proteinei EDEM3 și cum această rețea de interactori este modificată de tratamentul cu inhibitori ai enzimelor implicate în procesul de glicozilare.

În cel de-al doilea capitol al acestei teze am avut ca obiectiv caracterizarea proteinei EDEM3 utilizând metode de modelare moleculară și biochimie a proteinelor pentru a genera un model cât mai precis pentru organizarea proteinei.

În cel de-al treilea și al patrulea capitol, studiile experimentale au fost îndreptate către a înțelege rolul subdomeniilor proteinei EDEM3 pentru asocierea acesteia cu proteinele client, dar și cu proteine partener în procesul de degradare asociat reticulului endoplasmic.

Pentru a atinge acest obiectiv am utilizat ca model două proteine intens studiate și caracterizate: tirozinaza și alfa 1-antitripsină. Tirozinaza este o glicoproteină membranară, sintetizată și pliată în RE fiind ulterior transportată prin calea secretorie la melanozimi unde funcționează ca enzimă cheie în sinteza melaninelor. Este o proteină cu 7 situsuri potențiale de glicozilare, care are o rată de pliere scăzută, iar din această cauză tirozinaza este predispusă mutațiilor/anomaliilor; prin urmare mutații asociate acestei gene au fost identificate în diverse patologii (albinismul oculocutanat, melanom). Melanomul este una dintre cele mai agresive forme de cancer, iar expresia tirozinazei este modificată în această patologie, deci este important să înțelegem cum această proteină este procesată în melanom cu scopul dezvoltării de terapii specifice. În cadrul acestor studii am folosit ca model ERAD tirozinaza solubilă, caracterizată anterior în grupul nostru și alfa 1-antritripsină mutantă (NHK), o proteină folosită ca model pentru studiile de secreție a glicoproteinelor solubile și utilizată ca substrat ERAD tipic. Mutații ale acestei gene conduc la ciroză hepatică și emfizem pulmonar, datorită acumulării de agregate proteice în hepatocite și respectiv lipsa transportului și efectuare funcției inhibitorii în plămâni.

Prin abordarea experimentală și teoretică descrisă anterior am identificat și confirmat potențiali interactori ai proteinei EDEM3 folosind metode de imunoprecipitare cuplate cu spectrometria de masă.

În acest context, am monitorizat dinamica rețelei de interactori a EDEM3 în ERAD prin evaluarea abundenței acestora în prezența unor inhibitori ai procesului de glicozilare care afectează și procesul de degradare al proteinelor asociat reticulului endoplasmic.

Utilizând metode de bioinformatică, predicție de structură și tehnici de modelare moleculară am obținut indicii despre organizarea proteinei EDEM3 din punct de vedere structural.

Pe baza predicțiilor teoretice și a modelării moleculare am generat forme truncate ale EDEM3 și le-am caracterizat prin metode biochimice și de biologie celulară.

În final, am investigat rolul acestor domenii în asocierea proteinei EDEM3 cu substratele ERAD și alte proteine partener în ERAD folosind metode de biologie celulară și moleculară cât și metode de silențiere folosind secvențe scurte de ARN.

Introducere

Plierea proteinelor este un proces important ce asigură funcționarea corespunzătoare a celulelor și implică homeostaziei tisulare. O treime dintre proteinele celulelor eucariote sunt sintetizate pe ribozomi atașați reticulului endoplasmic, translocate și glicozilate co-translațional, care apoi urmează un proces de pliere în lumenul reticulului endoplasmic asistat de enzime și proteinele chaperon. Însă, ca orice proces celular plierea proteinelor nu este 100% eficientă și deci este necesară verificarea eficienței acestui proces prin controlul calității plierii. Controlul calității plierii proteinelor implică monitorizarea stării native a proteinelor din reticulul endoplasmic și dacă acestea și-au achiziționat forma nativă sunt împachetate în vezicule și exportate în calea secretorie; dacă procesul de pliere este inefficient polipeptidul este trimis către degradare proteazomală pe calea ERAD (Figura 1).

Cunoașterea mecanismului de degradare a proteinelor incorect pliate este important deoarece homeostazia celulară depinde de eficiența îndepărtării proteinelor cu potențial toxic din reticulul endoplasmic pentru a facilita plierea polipeptidelor nascente (Meusser et al., 2005). Dacă rata de degradare necesară nu este atinsă, acumularea proteinelor aberante poate împiedica capacitatea RE de a asigura maturarea proteinelor nascente rezultând în funcționarea defectoasă a celulei. Îndepărtarea manozelor din structura glicanilor atașați proteinelor secretorii, a fost propusă ca semnal de selecție pentru proteinele incorect pliate către ERAD deoarece inhibarea acestei etape va proteja proteinele non-native de degradare. Această premiză sugerează demanozilarea progresivă ca sfârșit al etapei de maturare și începutul procesului de eliberare a RE și translocarea către citosol pentru degradare a polipeptidelor incorect pliate (Tamura et al., 2008).

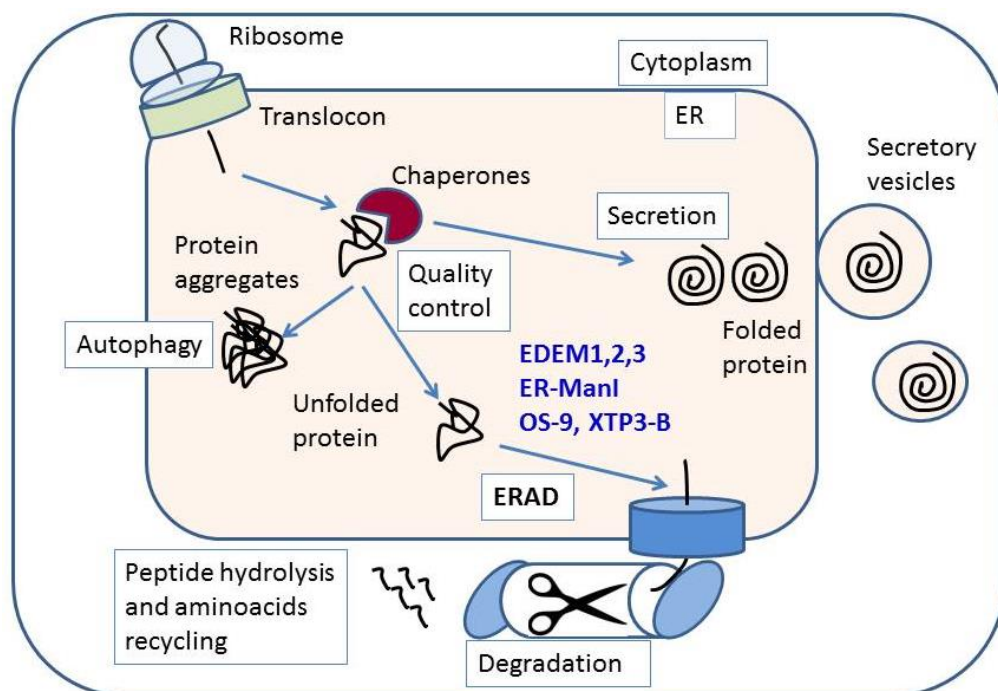


Figura 1. Reprezentarea schematică a împachetării proteinelor și controlul calității plierii în reticulul endoplasmic.

Pentru ca aceste evenimente să aibă loc este nevoie de un set specializat de proteine care să asigure funcționarea corectă a procesului, dintre acestea cele mai importante sunt: EDEM 1,2,3, OS-9, XTP3-B, ERMan I, SEL1L și HRD1.

În ultimi ani rolul proteinelor EDEM1,2,3 aparținând familiei Glicozil Hidrolază (GH47) împreună cu manozidaza 1 din RE, a fost intens dezbătut, rezultatul rămânând încă sub semnul întrebării. Deși în organismul model *S. cerevisiae* calea ERAD este bine caracterizată, în sistemul mamalian procesul nu este încă complet înțeles. În contextul ipotezei procesării glicanilor, acest proces are loc în două etape, prima etapă fiind convertirea glicanului de la Man9GlcNAc2 (M9) la Man8GlcNAc2 (M8B) de către ERManI permițând astfel unuia dintre cele trei EDEM-uri să proceseze glicanul până la M6GlcNAc2 de pe brațul B.

În 2003, Hosokawa a propus că supraexpresia EDEM1 și EDEM3, dar nu și a lui EDEM2, stimulează procesarea manozelor (Hosokawa et al., 2003). Această ipoteza a ajutat la consolidarea poziției lui ERManI ca prima enzimă urmată de EDEM1 și EDEM3, EDEM2 având domeniul manozidazic inactiv. Totodată aceste rezultate erau în contradicție cu articolul precedent al aceluiași grup în care EDEM1 este enzimatic inactiv și ERManI este implicată în procesarea glicanului la M7-5 GlcNAc2. Două rapoarte publicate în anul 2009 și respectiv 2010 au crescut confuzia legată de acest proces când Cormier și colab, Tamura și colab și grupul nostru au arătat că EDEM1 poate recruta proteine neglicozilate pentru a le transporta către degradare cu ajutorul complexului SEL1L-HRD1, punând astfel sub semnul întrebării funcționarea acestora ca manozidaze sau lectine (Cormier et al., 2009, Tamura et al., 2010). Adițional acestor ipoteze în 2014 și 2015 Ninagawa și colab sugerează

ipoteza că EDEM2 are activitate manozidazică și inițiază procesarea manozelor de la M9 la M8 urmată de EDEM3 responsabilă pentru convertirea de la M8 la M7-6 dar și de EDEM1, mult mai puțin activă enzimatic. De asemenea, propune ideea că deleția genelor EDEM1,2,3 activează o cale alternativă de degradare pentru a menține homeostazia celulară (Ninagawa et al., 2015, Ninagawa et al., 2014).

După cum am menționat anterior N-glicanii servesc ca etichetă pentru a asigura nu doar informația necesară despre maturarea proteinei, dar și pentru a servi ca situs de legare pentru domeniile de omologie cu receptorii de manoză-6-fosfat (MRH-mannose-6-phosphate receptor homology). Procesarea manozelor pe brațul C și interacția cu domeniul MRH sunt etape importante în dirijarea glicoproteinelor denaturate în ERAD, iar acesta funcție este cel mai probabil îndeplinită de către OS-9 și XTP3-B. A fost propusă ipoteza că domeniul MRH al acestor proteine este necesar pentru interacția cu SEL1L, dar nu și cu substratele ERAD, iar interacția OS-9 cu glicoproteinele incorect pliate nu este de tip lectină (Christianson et al., 2008). Însă în opoziție cu aceste rezultate, alte laboratoare au demonstrat specificitatea domeniilor MRH pentru glicanii de tipul M1-6 și importanța legării acestor glicani pentru degradarea substratelor.

Proteinele incorect pliate, în general, expun porțiuni hidrofobe, care predispun către formarea de agregate proteice cauzând astfel stres celular. Pentru a asigura funcționarea corespunzătoare a RE și plierea eficientă a polipeptidelor nascente este nevoie ca substratele ERAD să fie îndepărtate, iar pentru ca acest proces să aibă loc acestea trebuie să fie solubile, denaturate și fără punți disulfidice. Una dintre cele mai intens studiate căi de dislocare a proteinelor din RE este cea mediată de proteinele SEL1L cu rol de adaptor pentru E3-ubiquitin ligaza HRD1 (synoviolin). Acest complex de proteine a fost propus ca fiind principala cale de export a proteinelor incorect pliate din RE către degradare proteazomală. În acest context proteina SEL1L joacă un rol important fiind mediatorul dintre proteinele substrat și HRD1, cât și în abilitatea sa de a interacționa cu proteinele Derlin-1 și 2, VIMP, UBDX8, AUP1 și HERP importante pentru recrutarea AAA-ATPazei VCP/p97 care furnizează energia pentru dislocarea substratului prin membrana RE.

Așa cum am descris mai sus procesele celulare sunt reglate prin mecanisme bine-definite, unele studiate și înțelese până în prezent, iar altele nu. În condiții fiziologice, pentru menținerea concentrației optime a proteinelor în celulă procesele de pliere și degradare a proteinelor se găsesc într-un echilibru. Principalul proces prin care este menținută homeostazia proteinelor în reticulul endoplasmic este degradarea pe calea ERAD prin care proteinele incorect pliate din RE sunt transportate în citosol și supuse degradării proteazomale.

În concordanță cu ultimele rapoarte în domeniu cel mai probabil model pentru calea ERAD este un model auto-adaptativ, dominat de o rețea de interactori și complexe funcționale dinamice ce facilitează recunoașterea, recrutarea, dislocarea, ubiquitinarea și degradarea unor clase diferite de proteine din calea secretorie.

Proteine folosite ca substrat ERAD model

Tirozinaza (figura 2) este exprimată constitutiv de melanocite și celulele de melanom, unde este sintetizată în RE și transportată prin calea secretorie la melanozomi pentru sinteza melaninelor. Este o glicoproteină cu șase sau șapte glicani expuși în lumenul melanozomilor și coordonează doi atomi de cupru necesari pentru activitatea enzimatică (Olivares et al., 2003).

Mutații asociate acestei gene ce conduce la inactivarea enzimei sau anomalii ale procesului de glicozilare au fost identificate în albinismul oculocutanat de tipul IA (OCA IA). În melanom tirozinaza este fie hiperactivă (melanomul hiperpigmentat), fie reglată negativ la nivel de ARN, fie este sintetizată dar nu este activă, datorită traficului deficitar la melanozomi (melanomul amelanotic). În cele mai multe cazuri mutații ale genei ce codifică pentru tirozinază conduc la retenția proteinei în RE și transportul pe calea ERAD către degradare, deci aceasta fiind un model bun pentru studierea degradării glicoproteinelor din RE (Popescu et al., 2005, Branza-Nichita et al., 2000).

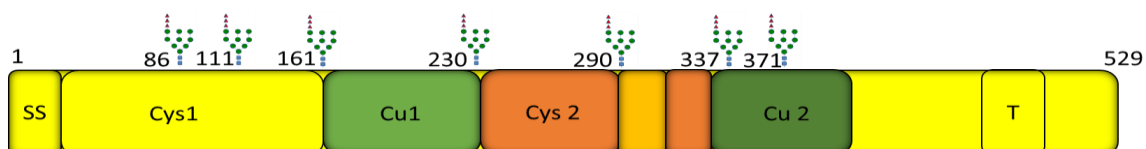


Figura 2. Reprezentare schematică a tirozinazei

Alfa 1-antitripsină (AT) (figura 3) este o glicoproteină monomerică sintetizată predominant în hepatocite și care funcționează ca inhibitor de protează în plămâni. Degradarea AT din RE are loc pe calea ERAD, iar această proteină a fost utilizată în multe studii ca glicoproteină model pentru plierea în RE (Termine et al., 2005).

Două dintre numeroasele mutații identificate pentru alfa 1-antitripsină sunt denumite NHK, forma truncată și ATZ, ce conține o mutație punctiformă. Majoritatea formelor NHK sunt incorect pliate, implicit sunt reținute în RE și supuse degradării proteazomale. În schimb expresia mutantei ATZ favorizează formarea de polimeri și împiedică secreția formei monomerice și poate fi degradată atât pe cale proteazomală cât și lizozomală, în ultimul caz implicând procesul de autofagie (Graham et al., 1990).

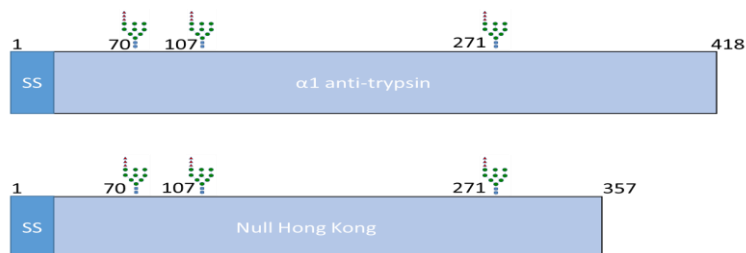


Figura 3. Reprezentarea schematică a alfa 1 anti-tripsinei și a formei sale trunchiate NHK.

Rezultate

Proteomică. Identificarea interactorilor EDEM3

O limitare majoră a datelor de rețea de interacție proteină-proteină (PPI) este reprezentarea statică, care neglijează organizarea temporală și spațială a dinamicii proteinelor precum și efectul modificărilor posttranslaționale (PTM). Mai mult, aceste PPI pot diferi datorită perturbațiilor date de boli sau alți factori externi. Natura interacției proteină-proteină este astfel un proces dinamic, care se schimbă dependent de timp, spațiu, ciclu celular sau alți factori și necesită investigații suplimentare pentru a asambla o imagine completă. Pentru a face față la toți parametrii variabili care definesc proteomul, diferite strategii, metode și tehnici au fost combinate pentru a crește capacitatea de analiză și de a înțelege mai bine cum se adaptează aceste rețele. Datorită îmbunătățirilor tehnologice, astăzi, putem asigura mai mult decât un parametru al proteomului (ex: abundența, PTM), utilizând o gamă largă de teste și instrumente biochimice. O metodă apărută în ultimele decenii și care a reușit să câștige o poziție bine meritată în acest clasament este spectrometrie de masă. Proteomica bazată pe spectrometrie de masă vizează în mod specific a combina îmbunătățiri în instrumente și proceduri analitice cu modele experimentale cu accent pe adnotarea proteomului cu informații biologice multi-dimensionale, astfel, la rândul său, permițând utilizatorului să distingă grupuri de proteine care se comportă diferit și să examineze proprietățile lor (Yates et al., 2009).

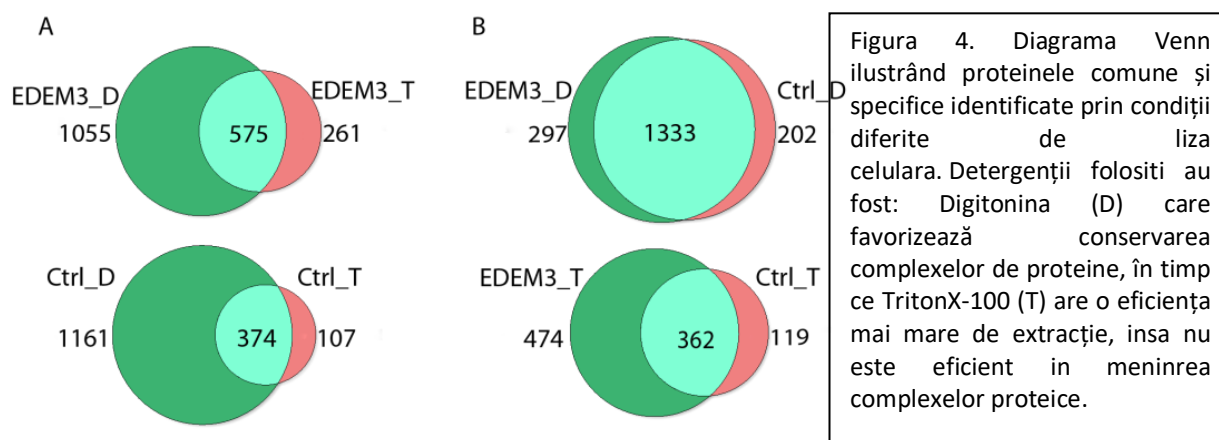
În acest studiu, ne-am propus să dezvoltăm o abordare sistematică, pe mai multe niveluri, care integrează bioinformatica, spectrometrie de masă și teste biochimice pentru a elucidă interconectivitatea EDEM3 cu partenerii ERAD.

Identificarea posibilor interactori ai lui EDEM3 prin imunoprecipitare cuplată cu spectrometrie de masă necesită optimizarea fiecărei etape, cu scopul de a face identificări în mod eficient și corect. Pe scurt, celulele au fost crescute până la o confluență de 90%, ulterior au fost lizate tamponul de liză a inclus Digitonină 1% deoarece menține interacția complexelor proteice și ca tampon de eluție a fost folosit 150 mM hidroxid de amoniu pH 12, datorită compatibilității cu spectrometrul de masă și volatilității care a permis concentrarea probei (Figura 4).

Deoarece condițiile au fost optimizate pentru extracția și conservarea interacțiilor proteină-proteină, am determinat rețeaua de interacție pe care EDEM3 o urmează și modul în care aceasta este modificată prin tratament chimic.

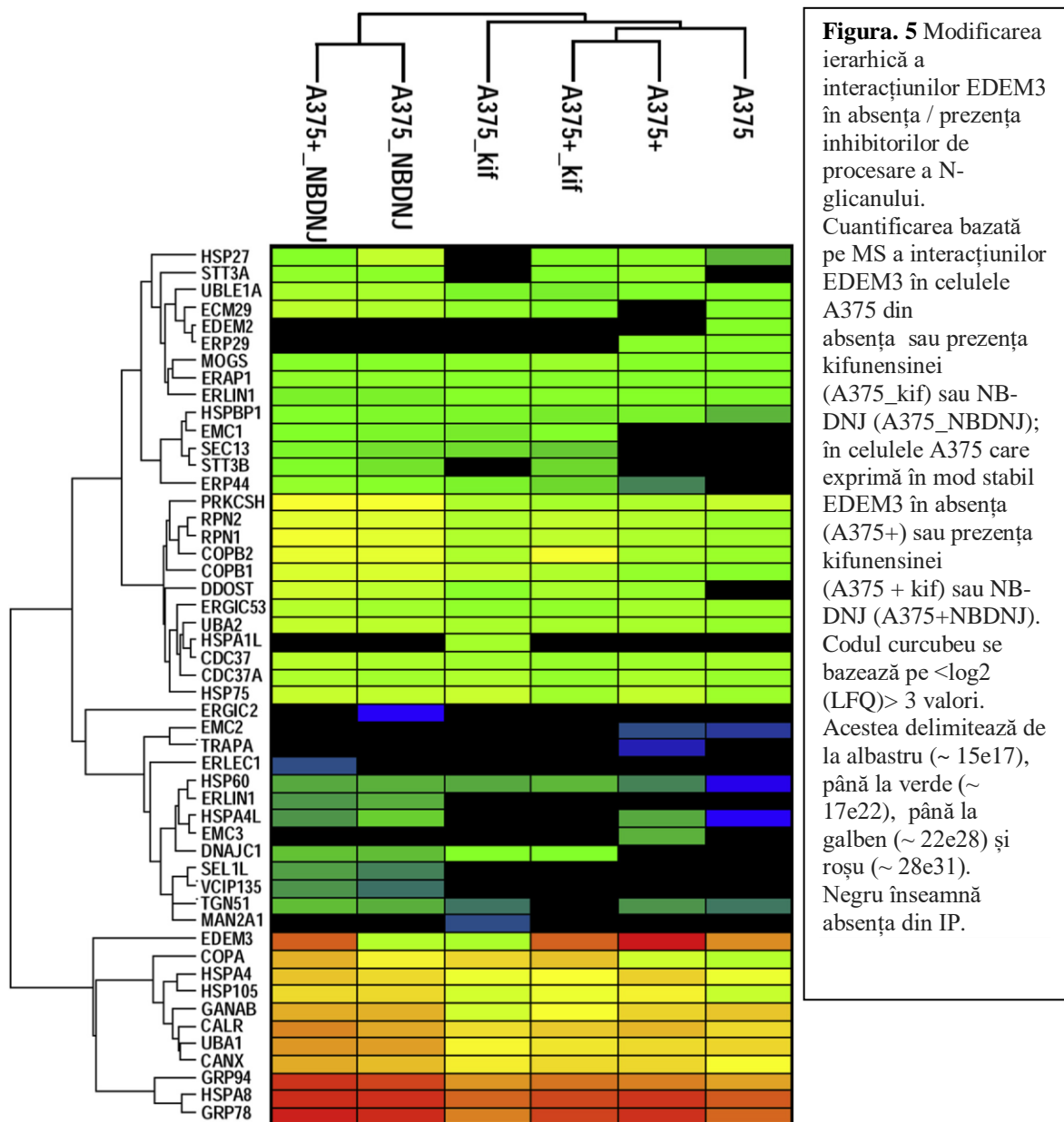
Pentru a face o evaluare corectă din punct de vedere statistic, experimentele au fost efectuate în triplicat biologic. Pe scurt, linia celulară A375 supraexprimând stabil sau nu EDEM3, au fost tratată peste noapte cu: kifunensină, un inhibitor specific al de-manozilării glicanilor care blochează activitatea ERManI și N-butil deoxinojirimicină (NB-DNJ) un iminozahar care blochează activitatea α -glucozidazelor I și II prevenind astfel procesarea glicanilor atașați proteinelor nascente. Un efect important al inhibării procesului de N-glicozilare este interacția crescută a polipeptidelor imature cu

chaperonele calnexină/calreticulină în prezența kifunensinei, față de blocarea acestor interacții cu NBDNJ (Hering et al., 2005, Petrescu et al., 1997).



Datorită faptului că un număr mare de proteine sunt identificate prin LC-MS/MS, o analiză statistică a spectrelor dobândite a fost făcută folosind MaxQuant. Pe scurt, fluxul de lucru constă în stabilirea condițiilor în care a fost realizat experimentul, și anume stabilirea enzimei utilizate, situsurile de clivare ratate, toleranța fragmentului de masă și modificările posttranslaționale, precum și tipul de bază de date folosite pentru cautari. Metoda de cuantificare utilizată a fost label free quantification (LFQ), și a fost făcută pe baza intensităților de peptide. Valorile LFQ obținute au fost ulterior analizate utilizând algoritmul Perseus, unde lista de interactori posibili obținută a fost adnotată prin adăugarea genei, a denumirii proteinei și a localizării subcelulare.

Datele obținute au fost grupate ierarhic pe rânduri și coloane utilizând următorii parametri: ***distanța (distance)***, o funcție euclidiană care descrie cât de aproape sunt două perechi și ***legătura (link)*** care descrie modul în care este definită distanța dintre două clustere, pe baza distanțelor dintre elementele unice. Așa cum s-a arătat în figura 5, am constatat că pentru gruparea coloanelor, profilul general al proteinelor identificate este diferit la tratamentul cu inhibitori comparativ cu probele control. În ceea ce privește gruparea rândurilor, intensitatea măsurată a EDEM3 este mai mare în cazul celulelor netratate care supraexprimă proteina, în timp ce pentru celulele tratate chimic alte proteine sunt mai intense decât proteina țintă, și anume: GRP78, GRP94, CNX, CRT, PDI, PDIA4. Tratamentul cu kifunensină sau NBDNJ a redus intensitatea EDEM3 comparativ cu celulele netratate, în timp ce tratamentul cu NBDNJ a indus supraexprimarea componentelor ERAD și ERQC HSPA8, BiP, GRP94, ERP60, PDIA3 și PDI.



Interesant, în afară de acești parteneri ER așteptați, în figura 5 sunt identificate și unele proteine citosolice legate de degradare cum ar fi UBA1 și UBA2 precipitate atât în prezența/absența inhibitorilor, sugerând o posibilă asociere funcțională cu EDEM3. Pe baza acestor analize putem concluziona că rețeaua de interactori a EDEM3 se modulează după inhibarea chimică a procesului de N-glicozilare, deoarece diferite proteine au expresia modificată în aceste cazuri. Mai mult, prin utilizarea unei abordări statistice putem forma o posibilă listă a candidaților de asociere, ceea ce ne-ar permite să validăm în continuare aceste ipoteze prin tehnici complementare.

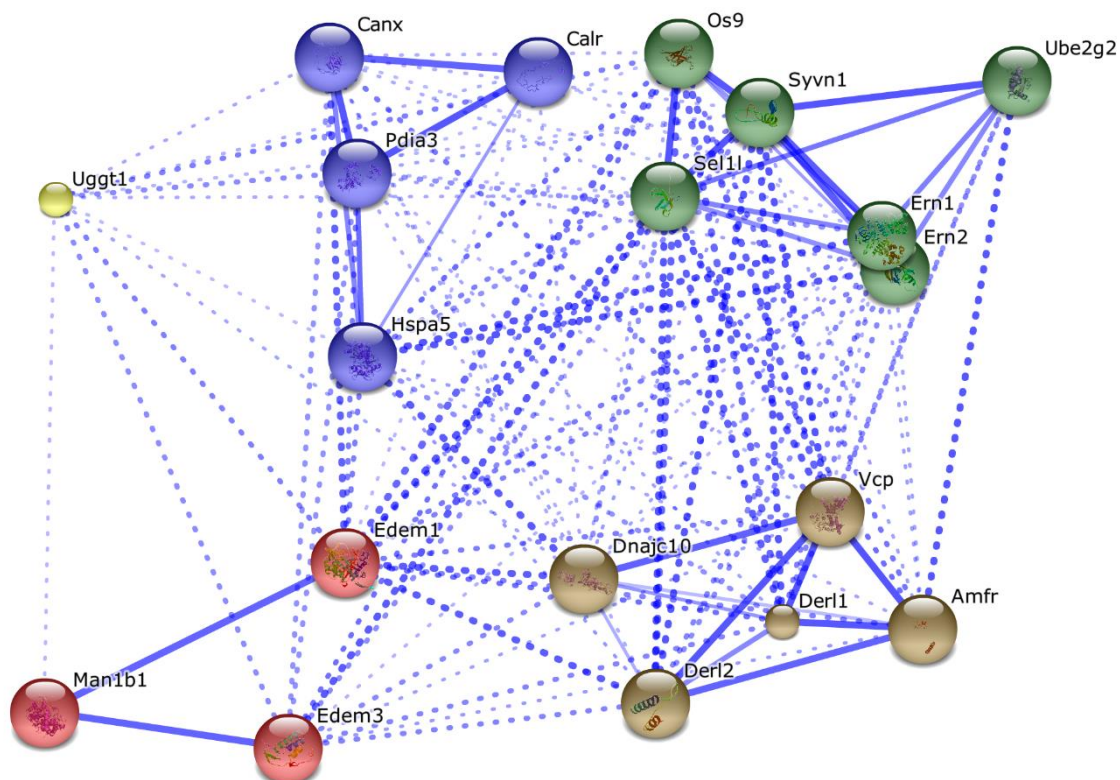


Figura 6. Harta de asociere a proteinelor prezise. Reprezentare a grupurilor posibile care ar putea fi formate cu proteinele prezise. Liniile punctate reprezintă interacțiile între cluster.

Pe baza rezultatelor obținute prin analiza statistică a datelor MS/MS și a documentării rolului din ER, au fost selectați următorii rezidenți pentru maparea rețelei folosind STRING (figura 6): EDEM3, SEL1L, Dnajc10, CNX, CRT și GRP94. Pe lângă cele de mai sus, STRING a adăugat până la 10 interacții directe și 5 indirecte folosind ca sursă: literatură științifică, interacții proteine-proteine documentate și baze de date. Această simulare a atribuit Man1B1, SEL1L, Ugg1l și OS-9 ca principalii interactori ai lui EDEM3. Proteinele au fost grupate pe baza algoritmului Markov Cluster (MCL). Scorul global STRING format din cele trei surse selectate a fost folosit pentru a obține o matrice de distanță care a fost introdusă în procedura de grupare. Prin aceasta, proteinele au fost împărțite în trei cluster. Liniile punctate arată interconectivitățile grupului, în timp ce grosimea descrie intensitatea interacțiunii.

Așa cum s-a observat mai sus, numărul potențialelor interacții ale lui EDEM3 determinate prin spectrometrie de masă este mare și în anumite cazuri, pot apărea fals pozitive, astfel metode complementare de validare sunt necesare. În acest caz, am ales să validăm unele dintre proteinele identificate prin spectrometrie de masă prin imunoprecipitare și Western blotting. Pentru că selecția a fost făcută având în vedere diferența observată între proteina supraexprimată și cea endogenă, interacția potențială deja descrisă în literatură, implicarea în controlul calității RE, ERAD sau degradarea proteozomală

Dupa cum se observă în figura 7A, EDEM3 este co-immunoprecipitat cu calnexina, sugerând că EDEM3 ar putea stabili o interacțiune directă cu aceasta sau poate fi o asociere funcțională prin intermediul proteinelor substrat care fie sunt legate la calnexină pentru plierea productivă, fie sunt extrase din acest ciclu de pliere. În plus, o altă proteină testată ca potențial interactor pentru EDEM3 a fost SEL1L (figura 7B), deja raportată că se asociază cu EDEM3 și s-a confirmat că este un interactor al EDEM3 atât prin spectrometrie de masă, cât și prin IP și WB.

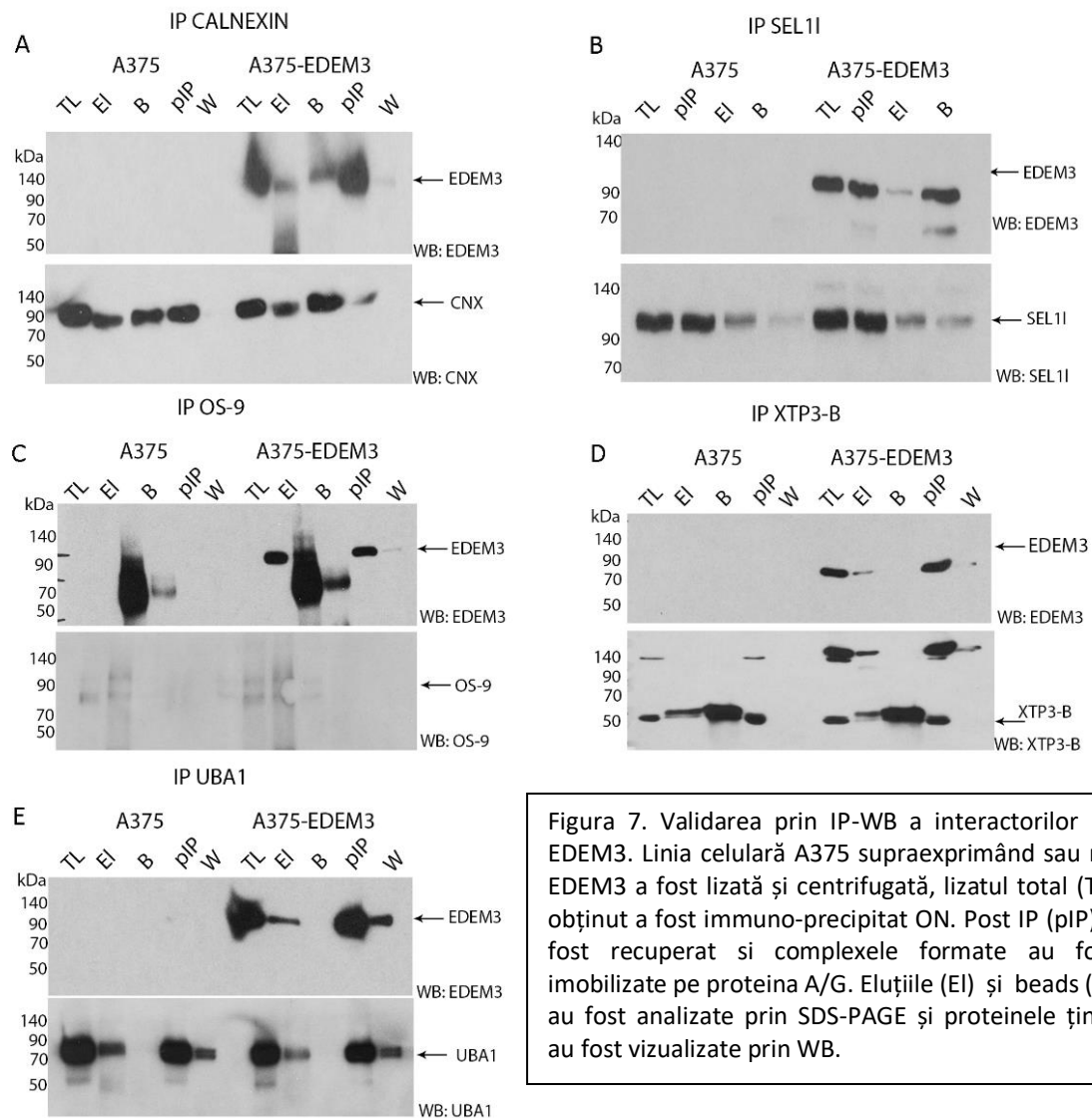


Figura 7. Validarea prin IP-WB a interactorilor lui EDEM3. Linia celulară A375 supraexprimând sau nu EDEM3 a fost lizată și centrifugată, lizatul total (TL) obținut a fost immuno-precipitat ON. Post IP (pIP) a fost recuperat și complexe formate au fost immobilizate pe proteina A/G. Eluțiile (EI) și beads (B) au fost analizate prin SDS-PAGE și proteinele țintă au fost vizualizate prin WB.

OS-9 și XTP3-B sunt două proteine care au fost propuse a funcționa ca lectine în ERAD, recunoscând și legând glicanii oligomanozidici prin domeniile lor de homologie cu receptorii de fosfat manoză-6 (MRH). Datorită prezenței acestor domenii care le permit să interacționeze cu proteine incorrect pliate am presupus că pot să se asocieze cu EDEM3 sau cu substratele legate de EDEM3. După cum s-a observat în figurile 7C și D, a fost detectată asocierea slabă cu EDEM3 atât pentru OS-9, cât și pentru XTP3-B, deși numai asocierea cu OS-9 a fost prezisă de STRING.

O altă proteină identificată prin spectrometrie de masă a fost UBA1 (enzima 1 de activare a ubiquitinei), care catalizează prima etapă în conjugarea cu ubiquitină, pentru a marca proteina incorect pliată pentru degradare pe calea proteazomală. În comparație cu celelalte două enzime implicate în etichetarea cu ubiquitină, ubiquitina de conjugare (~ 35 proteine) și ubiquitin ligaza (> 1000 de proteine), ubiquitina de activare este codificată de 9 gene, dintre care cea legată de ERAD este UBA1. Astfel, am fost interesați să investigăm dacă această asociație este validă și confirmată prin IP și WB. După cum se observă în figura 7E, interacția detectată apare puternică și stabilă în comparație cu celelalte testate, ceea ce ne permite să presupunem că EDEM3 ar putea funcționa ca mediator între ERQC și ERAD.

Rezultatele prezentate sugerează că interferența cu modificarea N-glicanilor modulează compoziția interactomului. Astfel, EDEM3 interacționează cu componente ale mașinariilor de dislocare ERAD, cum ar fi SEL1L, HRD1 și ERLEC1 atunci când interacția calnexinei cu glicoproteinele este afectată. În schimb, există o asociere constantă a EDEM3 cu calnexina, indiferent de statutul de glicozilare al clienților ERAD. Acestea pot indica faptul că EDEM3 se asociază cu componentele disloconului pentru a furniza proteinele incorect pliate care nu au fost asistate în ciclul de pliere. Prin urmare, rețeaua de interactori EDEM3 este dinamică și modulată de stresul indus prin modificarea procesării normale a N-glicanilor în RE.

Generarea modelelor 3D a domeniilor EDEM3

EDEM3 este un membru al familiei de proteine GH47 având un domeniu asemănător cu manozidaza, un domeniu asociat proteazei și o secvență de sortare către RE (KDEL). În acest capitol ne-am propus să investigăm aspectele structurale ale acestei proteine utilizând instrumente de bioinformatică pentru predicția structurii, identificarea de domenii și dinamică moleculară. Folosind metodele menționate mai sus am putut prezice trei domenii majore pentru EDEM3: un domeniu de similar cu manozidazele, un domeniu asociat proteazelor (PA) și un domeniu dezordonat intrinsec (ID), acestea fiind conectate unul de altul prin două linkere. Datorită lungimii și complexității proteinei, fiecare domeniu a fost modelat separat prin omologie și omologie îndepărtată.

Domeniul asemănător cu manozidaza (E3MAN) al EDEM3 este cel mai extins cuprinzând aminoacizi de la 50 până la 500 din structura EDEM3 astfel a fost primul domeniu pe care am vrut să îl investigăm. Un model de omologie a fost construit pe baza unui șablon de structură de cristal (cod PDB - 1NXC) (Tempel et al., 2004) aparținând alfa 1-2-manozidazei IA de la *Mus musculus*. Alinierea secvenței dintre țintă și șablon a relevat o identitate de ~ 30% și o similitudine de aproximativ 50% de secvență pentru domeniul asemănător cu manozidaza al EDEM3 cu structura de cristal. Consensul structurii secundare arată o potrivire foarte bună cu structura secundară a șablonului și predicțiile de dezordine indică faptul că domeniul manozidazic este foarte ordonat, cu excepția

regiunii care cuprinde aa83-96 la capătul N-terminal. Modelul structural al domeniului manozidazei a fost ridicat față de acest șablon cu rafinări specifice și este prezentat în figura 8.

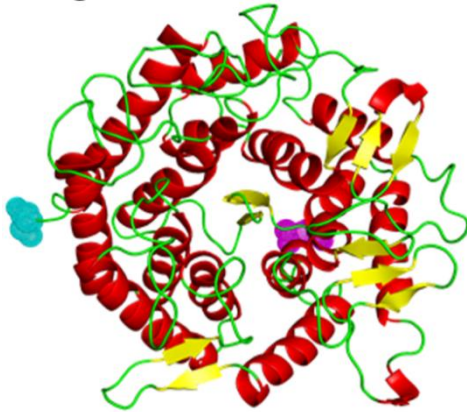


Figura 8. Modelarea prin omologie a domeniului de omologie cu manozidazele al EDEM3 comparativ cu cristalul șablon 1NXC. Cu rosu sunt reprezentate structurile alfa hélix, cu galben structurile beta pliate si cu verde sunt reprezentate zonele flexibile.

Secvența EDEM3 a evidențiat existența unui domeniu asociat proteazelor (PA) (aa 679-779 - E3PA) care a fost modelat utilizând două șabloane: o aminopeptidază de la *Escherichia coli* (cod PDB - 2EK9) și o proteină virală de la *Spodoptera frugiperda* (cod PDB - 3KAS) (Abraham et al., 2010). Asemănarea cu șabloanele prezintă o similitudine de ~ 17,9% și o similitudine de ~ 33,3% cu aminopeptidaza și o identitate de ~ 14% și o asemănare de aproximativ 26% cu proteina virale (figura

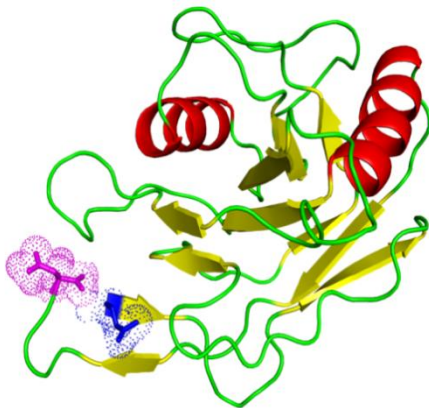


Figura 9. Modelarea prin omologie îndepărtată a domeniului asociat proteazei al EDEM3 comparativ cu cristalele șablon 3KAS și 2EK9. . Cu rosu sunt reprezentate structurile alfa hélix, cu galben structurile beta pliate si cu verde sunt reprezentate zonele flexibile.

9).

Toate modelele au fost generate folosind INSIGHT II de la Accelrys și au fost rafinate folosind metoda NAMD pe un cluster de calcul de înaltă performanță de 14 x HP BL280c G6. Simularea a folosit câmpul de forță CHARMM36 și restricțiile poziției armonice pe coloana vertebrală a proteinei în regiunile structurii secundare, în timp ce buclele au fost lăsate să se miște liber pentru a elimina conflictele sterice și pentru a aduce modelul la un minim de energie mai scăzut. Pentru validarea preciziei modelului a fost utilizată metoda QA-RecombineIT.

Modelele globale au fost aduse la $GDT_TS = 72,3$ și $RMSD$ (deviația modelului de la o cale optimă a $C\alpha$) = 2,16Å pentru domeniul manozidazei, în timp ce pentru domeniul PA $GDT_TS =$

61,34 și RMSD = 3,03 Å. Ambele scoruri sunt bune conform modelului de validare QA-RecombineIT.

Generarea și caracterizarea mutantelor truncate ale EDEM3

Corelând informațiile obținute din abordarea bioinformatică, au fost generate două mutante cu scopul de a identifica rolul fiecărui domeniu pentru EDEM3 în ERAD. Prima mutantă generată a fost Δ IDD-EDEM3 prin eliminarea domeniului dezordonat intrinsec, cea de-a doua fiind mutanta Δ PA-EDEM3 eliminând domeniul asociat proteazei. Următoarea etapă a fost de a testa expresia domeniilor

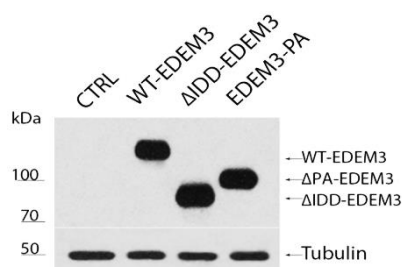


Figura 10 Expresia mutantelor EDEM3. Formele truncate ale EDEM3 au fost transfectate în HEK 293T determinând expresia lor prin Western Blot cu anticorpi specifici.

în celulele HEK293T prin transfecție tranzientă. Masa teoretică pentru fiecare domeniu este: Δ IDD-

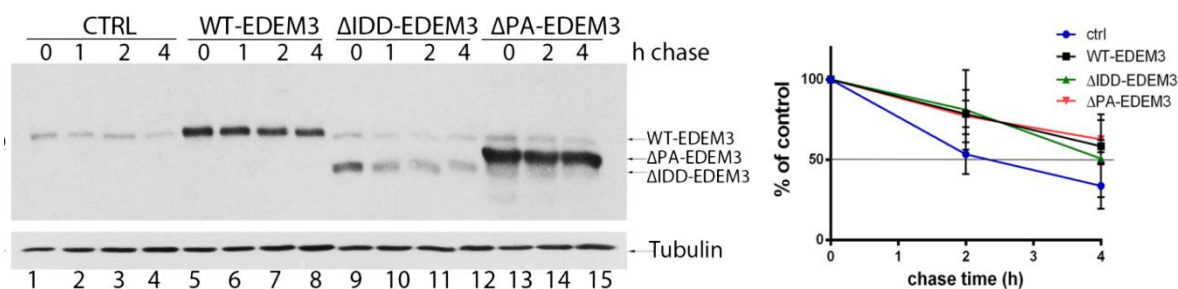


Figura 11. Determinarea timpilor de înjumătățire a mutantelor EDEM3. Pentru a determina rata de degradare a mutantelor EDEM3, linia celulară HEK293T supraexprimându-le a fost tratată cu cicloheximidă și celulele au fost recoltate la 0, 1, 2 și 4h. Liza celulară a fost făcută în tampon cu Tris-HCl cu 1% Triton X-100 și cantități egale de proba au fost supuse SDS-PAGE. Graficul alăturat prezintă media procentuală a cantității de mutante de EDEM3 rămasă după tratament și recoltarea la timpii specificați. Cuantificarea intensităților benzilor a fost realizată cu programul Image J și rezultatele reprezentate sunt media a trei experimente independente \pm SEM.

EDEM3 = 85 kDa, Δ PA-EDEM3 = 87,35 kDa; o bandă cu greutate moleculară similară a fost detectată pentru fiecare mutantă prin Western blotting. În plus, au fost observate nivele similare de expresie (figura 10) și timpi de înjumătățire apropiați pentru cele trei mutante (figura 11).

În continuare, am fost interesați să investigăm dacă localizarea intracelulară a mutantelor EDEM3 este similară cu proteina wild type. Astfel, a fost efectuat un experiment de

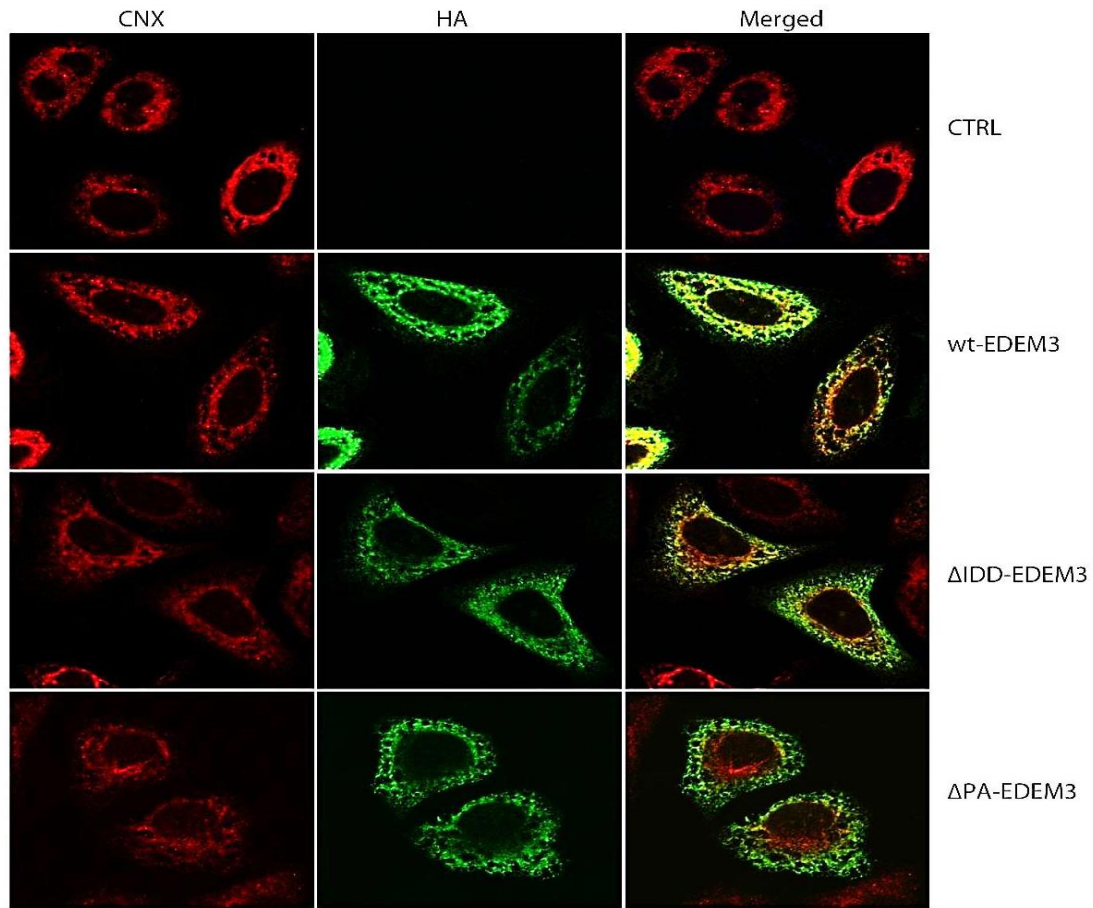


Figure 12. Colocalizarea mutantelor EDEM3 cu calnexina. Celulele HeLa au fost transfectate cu plasmidele corespunzătoare pentru a exprima mutantele EDEM3, menținute în cultură pentru 24 de ore și apoi fixate cu paraformaldehidă și permeabilizate cu Triton 0.2%. În continuare, celulele au fost incubate cu anticorpi primari, apoi anticorpi secundari cuplați cu fluorofori și fixate pe lame de sticlă în mediu de montare. Vizualizarea și prelucrarea imaginilor a fost făcută cu microscop confocal LSM de la Zeiss.

imunofluorescență pentru a evalua co-localizarea cu calnexină utilizată ca marker pentru RE (Figura 12).

Mutantele de EDEM3 au fost utilizate pentru experimentele de co-expresie cu substratele ERAD pentru a evalua efectul eliminării diferitelor domenii asupra degradării proteinelor client. În acest scop, tirozinaza și alfa1-antitripsina mutante au fost utilizate ca substrat. Adicional, s-a investigat și interacția acestor mutante cu substratele ERAD. Am observat aici că excluderea

diferitelor domenii ale EDEM3 nu elimină interacția EDEM3 cu substratele ERAD, ceea ce înseamnă că asocierea cu proteinele client depinde de mai multe domenii EDEM3. Cu toate acestea, rezultatele sugerează că înlăturarea domeniului ID îmbunătățește degradarea substratelor ERAD, determinată prin co-expresie și western blot. Astfel putem sugera ipoteza că IDD-ul EDEM3 poate funcționa ca regulator negativ și limitează activitatea WT-EDEM3, în timp ce în absența acestui domeniu activitatea de degradare indusă de EDEM3 este crescută.

Concluzii

Prin prisma studiilor prezentate mai sus am obținut informații despre organizarea structurală a EDEM3 și am desemnat un rol ipotetic pentru această proteină în degradarea proteinelor asociată reticulului endoplasmic.

Folosind metode de biologie celulară și moleculară, tehnici de biochimie, spectrometrie de masă, bioinformatică și modelare moleculară am propus o organizare structurală a domeniilor EDEM3, pe baza căreia am construit mutante pe care le-am caracterizat și am investigat rolul lor în calea ERAD.

Un prim obiectiv al acestui studiu a fost să analizez rețeaua de interactori a EDEM3 prin spectrometrie de masă complementată cu predicții *in silico* pentru a genera o listă de potențiali interactori cât mai acurată. Pentru a evalua cât mai detaliat rețeaua de interactori a EDEM3 am utilizat pentru experimente o linie celulară de melanom imortalizată și o linie generată pe baza acesteia care supraexprimă proteina EDEM3, astfel analizând atât interactorii proteinei endogene cât și pe cei ai proteinei supraexprimate. Acest lucru ne-a permis să evaluăm modificări ale rețelei de interactori, stabilitatea acesteia și reorganizarea ei în funcție de abundența proteinei EDEM3.

Am investigat de asemenea dinamica rețelei de interactori a EDEM3, prin spectrometrie de masă și cuantificare utilizând algoritmul MaxQuant, în condiții de stres prin utilizarea unor inhibitori ai glicozilării. De asemenea, am confirmat asocierea proteinei EDEM3 prin IP și WB cu proteine implicate în plierea și degradarea proteinelor din RE cum sunt calnexina, SEL1L, OS-9, XTP3-B și Uba1, proteine identificate ca potențiali interactori ai EDEM3 prin spectrometrie de masă.

În continuare, pentru a înțelege rolul lui EDEM3 în calea ERAD am încercat în primul rând să caracterizez această proteină, motiv pentru care am folosit diferite chimicale care blochează diferite căi de degradare pentru a identifica calea urmată de EDEM3. Experimentele prezentate aici sugerează că timpul de viață al proteinei EDEM3 este modulată de inhibitori ai enzimelor implicate în glicozilare și este extins în prezența kifunensinei, un inhibitor al de-manozilării glicanilor.

Utilizând algoritmi de predicție pentru structura secundară, profil de sarcină și modificări post-tranlaționale am intenționat să propun un model relativ pentru organizarea structurală a proteinei pe baza secvenței de aminoacizi. Informațiile obținute prin aceste predicții au fost coroborate cu

modelare moleculară pe baza de șablon pentru a identifica cea mai potrivită structură cunoscută pe care domeniile EDEM3 ar putea să o adopte. În concluzie, aplicând toate aceste constrângeri am identificat trei domenii majore pentru EDEM3: un domeniu de omologie cu manozidazele, un domeniu asociat proteazelor și un domeniu dezordonat intrinsec. Pe baza structurilor cristalizate, am obținut, cu încredință bună, modele 3D pentru primele două domenii.

Pentru a diseca rolul fiecărui domeniu din structura EDEM3, am generat, folosind tehnici de biologie moleculară, mutante truncate prin deleția alternativă a domeniilor identificate anterior. Mutantele au fost caracterizate pentru a determina nivelul de expresie după transfecție tranzientă, timpul de viață și localizare intracelulară; acestea sunt exprimate la nivel similar și co-localizează parțial cu calnexina, o proteină marker pentru RE.

În continuare, am investigat comportamentul acestor mutante în ceea ce privește degradarea substratelor și asocierea cu proteinele client. Rezultatele prezentate în acest studiu sugerează că IDD-ul poate fi necesar pentru o interacție mai puternică cu substratele deoarece deletarea acestui domeniu reduce asocierea EDEM3 cu substratul, așa cum s-a demonstrat prin imunoprecipitare și Western blot complementat cu experimente de pulse-chase și imunoprecipitare. În plus, experimentele de WB și chase cu cicloheximidă sugerează că domeniul ID modulează activitatea pentru a accelera degradarea substratelor ERAD. Mai mult, atunci când mutanta Δ PA-EDEM3 este supraexprimată, nu este indusă degradarea substratelor ERAD în comparație cu mutanta careia îi lipsește domeniul ID sugerând că acest domeniu ar putea fi important pentru activitate și funcționează ca reglator negativ în acest context.

Pentru a investiga dacă deleția acestor domenii este importantă pentru asocierea cu SEL1L, un interactor cunoscut al EDEM3, am testat asocierea acestor mutante cu SEL1L exprimat endogen. Asocierea cu SEL1L nu este abrogată prin îndepărtarea niciunui dintre cele două domenii, dar este mai slabă atunci când lipsește domeniul IDD.

Având în vedere observațiile menționate mai sus, am testat dacă degradarea indusă de EDEM3 a substratelor este dependentă de SEL1L sau poate fi independentă de această proteină. Astfel, SEL1L endogen a fost silențiat și efectul pe care mutantele EDEM3 l-au avut asupra degradării substratelor ERAD a fost evaluat. O observație importantă este că supraexpresia mutantei Δ IDD-EDEM3 poate induce degradarea substratelor independent de nivelul de SEL1L. Acest lucru ar putea fi explicat printr-o hiperactivitate a SEL1L rămas, de a exporta proteine incorect pliate sau activarea unei cai alternative pentru exportul din RE și degradare care este activată atunci când cel clasic este afectat, aceasta din urmă fiind mai plauzibilă.

În concluzie, în încercarea mea de a înțelege rolul EDEM3 în ERAD, au fost stabilite mai multe aspecte referitoare la aceste proteine, rezumate după cum urmează:

1. Am optimizat un protocol pentru prepararea probelor din ser uman pentru a identifica biomarkeri folosind spectrometrie de masă

2. Interacțiile potențiale ale EDEM3 au fost identificate prin simulări *in silico* și analiză de spectrometrie de masă și validate prin metode biochimice
3. Timpul de înjumătățire și degradarea proteinei EDEM3 endogenă și supraexprimată este afectată de inhibitori de glicozilare așa cum s-a observat din experimentele WB și chase cu cicloheximidă
4. Kifunensina afectează degradarea indusă de EDEM3 a substratelor, în timp ce NB-DNJ nu interferează cu acest proces, așa cum s-a observat prin co-expresia în celulele HEK293T și Western blotting
5. Am generat modelul 3D pentru două domenii ale EDEM3 folosind modelarea prin omologie.
6. Pe baza predicțiilor bioinformatică am proiectat și am generat mutante trunchiate de EDEM3 și le-am caracterizat
7. Investigarea interacțiunii mutantelor generate cu substratele ERAD selectate a arătat că domeniul IDD al lui EDEM3 pare să moduleze această asociere
8. Îndepărtarea domeniului PA rezultă într-o eficiență mai scăzută în accelerarea degradării substratelor
9. Ștergerea domeniilor menționate mai sus a EDEM3 nu elimină asocierea cu SEL1L, totuși lipsa domeniului IDD slăbește interacția
10. WT-EDEM3 și Δ IDD-EDEM3 accelerează degradarea substratului ERAD independent de nivelul de SEL1L, eventual prin activarea unei căi alternative de dislocare de la ER.

Mulțumiri:

În primul rând, aș dori să mulțumesc Dl. Dr. Andrei J. Petrescu și Dna. Dr. Ștefana M. Petrescu pentru sprijin și îndrumare științifică în toți acești ani și să-mi exprim recunoștința pentru încrederea acordată în realizarea proiectelor de cercetare pe baza cărora a fost concepută această teză.

Îi datorez o apreciere deosebită Dr. Marioara Chirițoiu pentru îndrumarea și discuțiile în proiectarea experimentelor prezentate în această teză.

De asemenea, îmi exprim recunoștința față de Drd. Marius Surleac pentru contribuții și sfaturi, cu care am colaborat pentru a genera cele două modele pentru domeniile EDEM3 și pentru discuțiile critice pe parcursul dezvoltării acestui proiect.

În plus, aș dori să-mi exprim recunoștința față de Dr. Cristian V.A. Munteanu pentru ajutorul și discuțiile sale legate de rezultatele generate de spectrometria de masă.

Multe mulțumiri Dr. Gabriela Chirițoiu pentru generarea liniilor celulare stabile utilizate în acest studiu, sprijinul și discuțiile pentru unele din experimentele prezentate.

Îi datorez mulțumiri speciale Dr. Simonei Ghenea, care m-a ajutat cu toate experimentele de biologie moleculară efectuate în timpul acestui proiect, pentru discuțiile științifice și sfaturi valoroase.

De asemenea, trebuie să le mulțumesc tuturor colegilor mei din departamentele Biologie celulară moleculară și Bioinformatică și Biochimie Structurală pentru discuții fructuoase și sugestii pentru munca mea.

În cele din urmă, aș dori să mulțumesc familiei mele pentru sprijin moral, încurajare și înțelegere pe parcursul acestei perioade.

Lista de publicații:

1. **Butnaru CM**, Chiritoiu MB, Chiritoiu GN, Petrescu SM, Petrescu AJ, “*Inhibition of N-glycan processing modulates the network of EDEM3 interactors*”, ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, **486(4)**, 978-984, (2017);

AI=0.7; IF=2.29

2. **Butnaru C. M.**, Munteanu C. V.A., , Chiritoiu G. N., Ghenea S., Petrescu A.J., Petrescu S. M., “Comparison of protein extraction conditions for EDEM3 interactors in melanoma cells”, ***Romanian Journal of Biochemistry***, **52(1)** 2015, ISSN 1582-3318

AI < 0.1; IF = 0

Conferințe naționale/internaționale

1. September 2015: **Butnaru C. M.**, Chiritoiu M.B., Surleac M., Petrescu A.J., Petrescu S.M., “Investigating and assigning functions to EDEM3 domains” *Annual International Meeting of RSBMB, Bucharest, Romania*

2. June 2015: Ionescu A.I., Mențel M, Munteanu C. V.A., **Butnaru C. M.**, Badea R.A., Iancu I., Szedlacsek S.E. “Mass spectrometric investigations regarding phosphorylation of human EYA3 by SRC kinase”, *Europhosphatase, Turku, Finland*.

3. June 2014: **Butnaru C. M.**, Chiritoiu M.B., Surleac M., Petrescu AJ, Petrescu S.M., “Role of EDEM3 in ERAD”-*Annual International Meeting of RSBMB, Oradea, Romania*

4. June 2014: Munteanu C. V.A., **Butnaru C. M.**, Jiglaru C., Ganea E., “Advanced mass spectrometric analysis of glycosylated BSA, and comparative proteomic screening of temporal and hippocampal old brain tissue” -*Annual International Meeting of RSBMB, Oradea, Romania*

Articole în pregătire

1. Chiritoiu M. B., Chiritoiu G.N., **Butnaru C. M.**, Munteanu C. V.A., Pastrama F., Ivessa N.E., Petrescu S. M.: “An intrinsically disordered region of EDEM1 selects ERAD clients for degradation” –*manuscris în pregătire*

2. Cârciumaru A., **Butnaru C.M.**, Petrescu S.M., “Identification of new biomarkers for rheumathoid pathologies using mass spetrometry”- *manuscris în pregătire*
3. **Butnaru C. M.**, Chiritoiu M. B., Chiritoiu G. N., Surleac M., Ghenea S., Petrescu S. M., Petrescu A.J., “Modelling and characterization of EDEM3 domains and investigating their role in ERAD substrates degradation”- *manuscris în pregătire*

Referințe:

- ABRAHAM, J., CORBETT, K. D., FARZAN, M., CHOE, H. & HARRISON, S. C. (2010) Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 438-44.
- BRANZA-NICHITA, N., NEGROIU, G., PETRESCU, A. J., GARMAN, E. F., PLATT, F. M., WORMALD, M. R., DWEK, R. A. & PETRESCU, S. M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem*, 275, 8169-75.
- CHRISTIANSON, J. C., SHALER, T. A., TYLER, R. E. & KOPITO, R. R. (2008) OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol*, 10, 272-82.
- CORMIER, J. H., TAMURA, T., SUNRYD, J. C. & HEBERT, D. N. (2009) EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol Cell*, 34, 627-33.
- GRAHAM, A., HAYES, K., WEIDINGER, S., NEWTON, C. R., MARKHAM, A. F. & KALSHEKER, N. A. (1990) Characterisation of the alpha-1-antitrypsin M3 gene, a normal variant. *Hum Genet*, 85, 381-2.
- HERING, K. W., KARAVEG, K., MOREMEN, K. W. & PEARSON, W. H. (2005) A practical synthesis of kifunensine analogues as inhibitors of endoplasmic reticulum alpha-mannosidase I. *J Org Chem*, 70, 9892-904.
- HOSOKAWA, N., TREMBLAY, L. O., YOU, Z., HERSCOVICS, A., WADA, I. & NAGATA, K. (2003) Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem*, 278, 26287-94.
- MEUSSER, B., HIRSCH, C., JAROSCH, E. & SOMMER, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7, 766-72.
- NINAGAWA, S., OKADA, T., SUMITOMO, Y., HORIMOTO, S., SUGIMOTO, T., ISHIKAWA, T., TAKEDA, S., YAMAMOTO, T., SUZUKI, T., KAMIYA, Y., KATO, K. & MORI, K. (2015) Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway. *J Cell Biol*, 211, 775-84.
- 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.
- OLIVARES, C., SOLANO, F. & GARCIA-BORRÓN, J. C. (2003) Conformation-dependent post-translational glycosylation of tyrosinase. Requirement of a specific interaction involving the CuB metal binding site. *J Biol Chem*, 278, 15735-43.
- PAWLOWSKI, M., BOGDANOWICZ, A. & BUJNICKI, J. M. (2013) QA-RecombineIt: a server for quality assessment and recombination of protein models. *Nucleic Acids Res*, 41, W389-97.
- PETRESCU, S. M., PETRESCU, A. J., TITU, H. N., DWEK, R. A. & PLATT, F. M. (1997) Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J Biol Chem*, 272, 15796-803.
- PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALE, L. & SCHULTEN, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26, 1781-802.
- POPESCU, C. I., PADURARU, C., DWEK, R. A. & PETRESCU, S. M. (2005) Soluble tyrosinase is an endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation substrate retained in the ER by calreticulin and BiP/GRP78 and not calnexin. *J Biol Chem*, 280, 13833-40.
- TAMURA, T., CORMIER, J. H. & HEBERT, D. N. (2008) Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem Sci*, 33, 298-300.
- TAMURA, T., SUNRYD, J. C. & HEBERT, D. N. (2010) Sorting things out through endoplasmic reticulum quality control. *Mol Membr Biol*, 27, 412-27.
- TEMPEL, W., KARAVEG, K., LIU, Z. J., ROSE, J., WANG, B. C. & MOREMEN, K. W. (2004) Structure of mouse Golgi alpha-mannosidase IA reveals the molecular basis for substrate specificity among class I (family 47 glycosylhydrolase) alpha1,2-mannosidases. *J Biol Chem*, 279, 29774-86.
- TERMINE, D., WU, Y., LIU, Y. & SIFERS, R. N. (2005) Alpha1-antitrypsin as model to assess glycan function in endoplasmic reticulum. *Methods*, 35, 348-53.
- YATES, J. R., RUSE, C. I. & NAKORCHEVSKY, A. (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 11, 49-79.