



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Rolul N-Glicozilării și al procesului funcțional de
degradare asociată reticulului endoplasmic în
modularea imunogenității tirozinazei**

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:
DR. ȘTEFANA MARIA PETRESCU

DOCTORAND:
GABRIELA CHIRIȚOIU

BUCUREȘTI

2016

CUPRINS (TEZA IN EXTENSO)

CUPRINS.....	IV
LISTĂ DE FIGURI.....	VI
LISTĂ DE TABELE.....	VIII
SCOPUL TEZEI	IX
1. INTRODUCERE	1
1.1. Biosinteza și procesarea glicoproteinelor	1
1.2. Degradarea asociată reticulului endoplasmic (ERAD) și degradarea proteazomală a proteinelor.....	3
1.2.1. EDEM1,2,3- proteine cu rol cheie în ERAD	5
1.2.2. Complexe proteice ale reticulului endoplasmic necesare în ERAD	6
1.2.3. Lipid droplets (LDs)-jucători importanți cu funcție abundentă în homeostazia reticulului endoplasmic.....	8
1.2.4. Degradarea proteazomală a proteinelor incorect pliate	9
1.3. Tirozinaza-autoantigen pentru celulele de melanom	11
1.3.1. Melanomul malign	11
1.3.2. Imunoterapie și cancer	12
1.3.3. Generarea și traficul la suprafața celulei a peptidelor asociate complexului major de histocompatibilitate I MHC I.....	15
1.3.4. Sinteza, procesarea și degradarea tirozinazei.....	16
2. MATERIALE ȘI METODE.....	21
Materiale.....	21
Metode.....	28
2.1. Amplificarea ADN-ului, expresia și purificarea de proteine	28
2.2. Tehnici de culturi celulare.....	33
2.3. Metode imunologice	40
2.4. Metode biochimice	42
2.5. HPLC și spectrometrie de masă	47
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	51
3.1. Purificarea proteinelor și producerea anticorpilor-Obținerea tirozinazei de șoarece și a EDEM2 umane exprimate în sistem procariot. O nouă metodă pentru producerea de anticorpi policlonali față de întreaga secvență a proteinei EDEM2 purificată	51
3.1.1. Expresia și purificarea tirozinazei de șoarece recombinante	51
3.1.2. Expresia și purificarea proteinei EDEM2 umane recombinante	57
3.2. N-glicozilarea și sistemul imun-Rolul N-glicozilării în generarea peptidelor antigenice utilizând tirozinaza ca proteină model	64
3.2.1. N-glicanii tirozinazei modulează generarea și prezentarea epitopului specific al tirozinazei YMDGTMSQV	65
3.2.2. Degradarea, dislocarea din reticulul endoplasmic și deglicozilarea tirozinazei, sunt procese cheie în generarea și prezentarea la suprafața celulei a YMDGTMSQV	81

3.2.3. Rolul domeniului transmembrantar in procesarea și degradarea tirozinazei având ca rezultat final generarea epitopului YMDGTMSQV	101
3.3. ERAD și sistemul imun- ERAD accelerează degradarea substratelor canonice și modulează generarea epitopului YMD al tirozinazei	104
3.3.1. EDEM1 este o proteină cheie în selectarea substratelor nepliate pentru degradare	105
3.3.2. Lipid droplets (LDs) - o cale potențială pentru dislocarea tirozinazei în asociere cu proteina EDEM1.....	116
3.3.3. Supraexpresia și silențierea componentelor ERAD modulează generarea epitopului YMDGTMSQV (YMD) și activarea celulelor T	128
4. CONCLUZII	143
REFERINȚE.....	147
LISTĂ DE ABREVIERI	163
MULȚUMIRI.....	170
LISTĂ DE PUBLICAȚII	171

SCOPUL ACESTOR STUDII

Dezvoltarea de terapii țintă, în special pentru tratamentul cancerului, reprezintă interesul unor cercetări și studii clinice extinse. Melanomul, cea mai agresivă formă a cancerului de piele, cu un prognostic nefavorabil și durată de viață scăzută după diagnostic este o provocare atât pentru cercetători cât și pentru clinicieni. De-a lungul ultimelor decenii cercetările în acest domeniu au vizat atât identificarea de noi markeri pentru diagnosticarea precoce cât și terapii mai eficiente; ca multe alte patologii melanomul poate fi eliminat de organism prin activarea celulelor sistemului imun, proces exploatat în scop terapeutic. Celulele de melanom au capacitatea de a prezenta la suprafața celulară peptide antigenice capabile să activeze celulele T care inițiază un răspuns imun pentru a distruge celulele melanomului. În timp ce aceasta este o situație ideală, în realitate când melanocitele sunt transformate în celule de melanom, acestea din urmă reușesc să ocolească aceasta cale și să supraviețuiască.

Tirozinaza și proteine înrudite cu aceasta (TRP1 și TRP2) sunt enzime sintetizate și pliate în reticulul endoplasmic și implicate în sinteza de melanină la nivelul melanocitelor; aceste proteine au fost identificate în celule de melanom unde se comportă ca antigene tumorale. Dintre toate cele trei proteine, tirozinaza a fost intens studiată deoarece procesarea acesteia generează peptide care sunt prezentate la suprafața celulei și recunoscute ca antigene capabile să genereze un răspuns imun. Având în vedere aceste aspecte, degradarea tirozinazei și/sau transportul la suprafața celulară pot fi modulate în vederea dezvoltării de terapii mai eficiente.

În acest studiu mi-am propus să investighez procesarea tirozinazei, degradarea și modul în care mutații specifice pot afecta producerea de peptide antigenice și respectiv prezentarea acestora la suprafața celulei de melanom. Pentru a realiza aceste obiective m-am folosit de o abordare duală: prima s-a bazat pe caracterizarea biochimică a unei linii celulare model generate în timpul acestui studiu, iar cea de-a doua pe folosirea unor metode imunologice pentru a testa efectul diferitelor mutații în tirozinază asupra producției de peptide antigenice și evaluarea capacității de activare a celulelor T de către aceste mutante.

În primul capitol am vizat descifrarea modului în care modificările în glicozilare sau mutații ale tirozinazei afectează procesul de generare a peptidelor antigenice prin evaluarea degradării, traficului și eficiența prezentării la suprafața celulei a peptidelor asociate cu moleculele complexului major de histocompatibilitate I - MHC I (major histocompatibility complex I). Aceste experimente completează studiile precedente ale laboratorului nostru care arată că plierea și procesarea tirozinazei și a mutantelor acesteia sunt dependente de

glicozilarea corectă iar truncări ale acestei proteine împiedică traficul și conduc la degradarea proteazomală (Cioaca et al., 2011, Popescu et al., 2006, Popescu et al., 2005). Mai mult, defecte ale glicozilării tirozinazei au fost identificate în albinismul oculocutanat și melanom, acest lucru motivându-ne să investigăm în detaliu acest proces (Halaban si colab. , 2001, Halaban si colab., 2000, Oetting si colab., 2003, Oetting si colab., 1991, Potter si colab., 2004).

Următorul capitol al acestei teze disecă modul în care schimbările în degradarea asociată reticulului endoplasmic - ERAD (Endoplasmic reticulum associated degradation) modulează traficul, degradarea și generarea de peptide antigenice derivate de la tirozinază. Motivația pentru investigarea acestui subiect a fost apariția crescută a unor dovezi care corelează ERAD-ul cu prezentarea antigenelor în câteva sisteme experimentale.

O parte a acestui studiu este dedicată demonstrării implicării unor noi organite identificate, mai precis picăturile lipidice-LDs (lipid droplets), în procesarea tirozinazei. Deși LDs au fost identificate majoritar ca depozite intracelulare pentru lipide neutre, din ce în ce mai multe date propun funcții noi și foarte diverse pentru aceste organite: modularea funcției nucleare, semnalizarea intracelulară mediată de lipide, asamblarea particulelor virale, chiar și disfuncții mitocondriale asociate cu neurodegenerescență (Welte, 2015).

Pentru a atinge obiectivele menționate mai sus am combinat metode de biochimie, biologie celulară și imunologie destinate descifrării modului în care pot fi manipulate degradarea și procesarea tirozinazei la peptide antigenice în vederea generării unui răspuns imun mai eficient. Rezultatele obținute și prezentate în acest studiu contribuie la descifrarea mecanismului prin care procesele celulare pot fi modulate în vederea dezvoltării eficiente a unor terapii specifice, în acest caz, pentru tratamentul melanomului.

INTRODUCRE

Homeostazia celulară este menținută de un echilibru între sinteza, secreția și degradarea moleculelor efector și anume proteinele. Proteinele pot fi sintetizate fie pe ribozomi liberi în citoplasmă în cazul în care acestea sunt proteine citosolice sau pe ribozomi legați de reticulul endoplasmic în cazul în care aceste proteine sunt destinate unei organite intracelulare, membranei plasmatică sau secretate în spațiul extracelular (Powers și Balch, 2013, Roth și Balch, 2011).

Biosinteza, procesarea și degradarea glicoproteinelor

Cele mai multe proteine membranare sau secretate sunt translocate în reticulul endoplasmic pentru a dobândi conformația nativă și apoi sunt transportate în calea secretorie; în mod ideal aceste proteine ar trebui să fie pliate corect într-un proces complet eficient, cu toate acestea stresul, mutațiile sau sinteza deficitară reduc rata plierii (Guerriero și Brodsky, 2012). Plierea proteinelor a fost considerată a fi un proces liniar, direcționat de interacțiunile proteinei țintă cu factori de pliere. Studii recente au arătat că procesul de pliere al unei proteine nu este liniar, iar proteina trece prin diferite stări de energie și forma pliată corespunde stării cu cea mai mică energie (Wiseman și colab., 2007, Tsytlonok și Itzhaki, 2013).

În reticulul endoplasmic pentru a dobândi o conformație corespunzătoare, un polipeptid nou sintetizat este asistat de chaperoni, enzime de pliere și oxidoreductaze care previn interacțiunile neobișnuite inter și intra -moleculare, previn expunerea la suprafață a aminoacizilor hidrofobi și catalizează formarea/ruperea legăturilor specifice.

Imediat după intrarea în reticulul endoplasmic, proteinele nou sintetizate sunt N-glicozilate la secvențe specifice de tipul Asn-X-Ser/Thr, unde X nu poate fi prolina, precum și în cazul în care aminoacidul din poziția N+3 este de asemenea o prolina deoarece atașarea N-glicanului poate fi blocată datorită impedimentelor sterice (Petrescu și colab., 2004, Gagneux și Varki, 1999). Prezența glicanilor promovează, în general, procesul de pliere, control al calității și evenimentele de sortare. Lanțul oligozaharidic este procesat rapid de către glucozidazele și manozidazele rezidente în reticulul endoplasmic, facilitând astfel recunoașterea de către chaperonii moleculari și enzimele de pliere, pentru a obține structura lor nativă (Helenius și Aebi, 2001). Verificarea procesului de pliere este realizată de sistemul de control al calității reticulului endoplasmic care livrează prin intermediul unor vezicule lipidice specifice proteinele corect pliate către calea secretorie și redirecționează proteinele incorect pliate către degradarea proteazomală prin intermediul ERAD.

Similar procesului de pliere al proteinelor și celui de selecție pentru transportul către calea secretorie a fost propus că selecția substratelor incomplet pliate destinate degradării este dependentă de înlăturarea manozelor, funcție atribuită manozidazei de tip I din reticulul endoplasmic - ERManI (Endoplasmic Reticulum ManosidaseI) și familiei de proteine EDEM (ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein)(Moremen și Molinari, 2006, Kostova și Wolf, 2005, Lederkremer, 2009, Ninagawa și colab., 2014).

Alte proteine ce s-au dovedit a fi implicate în ERAD-ul proteinelor incomplet pliate sunt OS-9 și XTP3-B desemnate să funcționeze ca lectine, SEL1L care este o proteină transmembranară propusă să funcționeze ca adaptor pentru E3-ubiquitin ligaza HRD1 și ERManI, o manozidază reciclată între reticulul endoplasmic și cis-Golgi care retrimite substratele ERAD incomplet pliate înapoi în reticulul endoplasmic (Christianson și colab., 2011, Christianson și colab., 2008). Proteinele Derlin, HERP, ATPaza p97/VCP, PDI, ADRP, gp78 etc. sunt exemple pentru care s-a demonstrat implicarea în ERAD (Chapman și colab., 2011, Chen și colab., 2012, Franz și colab., 2014, Greenblatt și colab., 2011, Leitman și colab., 2014). Ca și concluzie generală a studiilor de degradare a proteinelor asociată reticulului endoplasmic se pare că doi pași și anume recunoașterea substratului și transportul prin membrană sau dislocarea proteinelor din reticulul endoplasmic sunt cruciali pentru o degradare proteazomală eficientă.

Exportul proteinelor incorect pliate din reticulul endoplasmic este descris ca un proces complex; multe proteine au fost propuse a fi implicate în dislocarea substratului din reticulul endoplasmic, cu toate acestea un mecanism care să definească acest proces încă nu a fost descris. O prezentare interesantă a complexelor de proteine din ERAD a fost făcută în raportul lui Christianson și colaboratorii, în care autorii au arătat modul în care sunt organizate în "clustere" și complexe funcționale proteine implicate în ERAD (Christianson și colab., 2011). Așa cum am menționat mai sus, un punct cheie în ERAD este dislocarea substratului prin membrana reticulului endoplasmic și deși au fost depuse eforturi ample pentru a identifica "disloconul", până în prezent nu a fost stabilit. Cu toate acestea, a fost arătată necesitatea unor complexe de proteine sau structuri subcelulare pentru exportul unor substraturi specifice. Pentru dislocarea proteinelor au fost propuse diferite căi cum sunt: Sec61, proteinele Derlin sau LDs (Wiertz și colab., 1996)(Lilley și Ploegh, 2004) (Fujimoto și Ohsaki, 2006).

Proteinele incomplete pliate, selectate pentru degradare, în general nu pot intra în proteazom într-o stare pliată sau parțial pliată, cu glicani atașați și resturi de ubiquitină.

Datorită acestui fapt, lanțurile de polipeptide sunt supuse unor procese de deglicozilare, deubiquitinare și depliere înainte de a fi degradate pe calea proteazomală.

Sistemul imun-Tirozinaza-autoantigen pentru celulele de melanom

Melanomul malign este unul dintre cele mai agresive tipuri de cancer, cu aproape 60% letalitate pentru aproximativ 5 % dintre tumorile maligne (Radovic-Kovacevic și colab., 1997) și cu o incidență crescută printre populația albă (Chuang și colab., 1999, Hall și colab., 1999). Aceasta este o malignitate a melanocitelor, celule originare din creasta neurală, specializate în producerea de melanină. Melanina este produsă în interiorul melanozomilor, organite specifice melanocitelor. Acestea sunt organite membranare, care fac parte din lineajul lizozomal (Orlow, 1995), unde tirozinaza catalizează transformarea tirozinei la 3,4-dihidroxifenilalanină-DOPA și oxidarea DOPA la DOPA quinonă-pigmentul maro-roșu care dă culoarea pielii și a ochilor la mamifere (Hearing și Jimenez, 1989, Naeyaert și colab., 1991). Melanozomii maturi migrează la periferia melanocitelor în dendrite dând posibilitatea keratinocitelor să preia pigmentul de melanină și să îl distribuie în interiorul celulei (Bologna și Pawelek, 1988).

Melanomul, alături de alte forme de cancer, apare datorită recunoașterii deficitare a sistemului imun al gazdei; astfel intervențiile terapeutice își propun să stimuleze celulele sistemului imun astfel încât să își exercite capacitatea de a recunoaște și distruge celulele transformate. În general, celulele sunt echipate cu mecanisme de apărare, înăscute sau adaptative, capabile să răspundă invadatorilor. Celulele transformate sau canceroase prezintă de obicei structuri specifice la suprafața celulei astfel încât să poată fi recunoscute de către sistemul imun care este capabil să le distrugă pentru a menține homeostazia țesutului (Ploegh, 2013). Cele mai cunoscute celule ale sistemului imun sunt limfocitele ca parte a sistemului imun adaptativ. Datorită receptorului specific-TCR (T cell receptor), aceste celule sunt capabile să recunoască structuri străine de la suprafața celulelor organismului, în general numite antigene și să le distrugă prin intermediul activității granulelor citotoxice care eliberează conținutul lor: perforine, granzime și granulozine în sinapsele formate între celula efector și cea gazdă (Lieberman, 2003). Antigenele sunt transportate la suprafața celulei prin intermediul complexului major de histocompatibilitate - MHC denumit și antigen leucocitar uman -HLA (human leucocyte antigen) cu diferite structuri pentru peptide derivate din proteine intracelulare- MHCI sau pentru peptidele produse prin proteoliza patogenilor extracelulari- MHCII.

Astfel, o atenție deosebită a fost acordată dezvoltării imunoterapiilor împotriva melanomului bazate pe vaccinuri cu peptide antigenice. O serie de antigene asociate tumorilor au fost identificate, caracterizate și testate pentru activarea limfocitelor T citotoxice în urma vaccinării pacienților cu o singură peptidă sau un amestec de peptide (Parmiani și colab., 2002). Tirozinaza este un antigen tumoral care generează o serie de peptide prezentate de către diferite molecule ale MHCI sau MHCII. Împreună cu alte antigene de diferențiere tirozinaza a fost raportată ca având răspuns clinic pozitiv în imunoterapii (Robbins și colab., 1994, Topalian și colab., 1994b).

Peptidele antigenice sunt generate intracelular de către proteine mature sau forme imature ale acestora (produși de translație necorespunzători) prin intermediul degradării proteazomale, în cursul sau după sinteza acestora (Colbert și colab., 2013, Yewdell și colab., 1996). Glicozilarea, o modificare co și/sau post-translațională are loc în cazul majorității proteinelor secretate, incluzând antigenele, care poate influența eficiența procesării și prezentării acestora ca peptide la suprafața celulei (Altrich-VanLith și colab., 2006, Kario și colab., 2008). Încă nu este complet înțeles cum procesul de glicozilare ar putea afecta producerea de peptide antigenice. Datorită faptului că tirozinaza este o proteină cu numeroase situsuri de glicozilare, aceasta reprezintă un model bun pentru a studia efectul glicozilării asupra procesării și prezentării antigenelor la suprafața celulei.

Tirozinaza, ca și alte antigene, este sintetizată pe ribozomii atașați reticulului endoplasmic, co-translațional și se atașază glicani imediat după intrarea în lumen și este procesată în continuare pentru a ajunge la forma matură. N-glicanii sunt adăugați covalent la resturile de Asn din motivul Asn-X-Ser /Thr (secvența de glicozilare) al polipeptidului nou sintetizat, co și post-translațional, prin urmare N-glicozilarea ar putea influența atât producția de translație necorespunzători cât și proteinele complet sintetizate. Frația de tirozinază care nu ajunge la conformația nativă, este reținută în reticulul endoplasmic, dislocată în citosol și degradată în proteazom (Branza-Nichita și colab., 2000, Halaban și colab., 2000, Popescu și colab., 2005). În acest caz, degradarea proteazomală a tirozinazei produce peptide care pot fi preluate de complexul major de histocompatibilitate și prezentate la suprafața celulară. Un epitop important și bine documentat generat după degradarea tirozinazei este peptidul YMNGTMSQV corespunzător aminoacizilor 369-377 din structura tirozinazei. Interesant, acest epitop conține un situs de N-glicozilare în poziția 371 și este prezentat la suprafața celulară ca YMDGTMSQV, datorită faptului că asparagina este procesată la acid aspartic în timpul îndepărtării glicanului correspondent (deglicozilare) (Skipper și colab., 1996).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Purificarea proteinelor și obținerea anticorpilor - Obținerea tirozinazei și a EDEM2 exprimate în sistem procariot. O nouă metodă pentru generarea anticorpilor policlonali realizați față de întreaga secvență a proteinei EDEM2 purificată

Pentru a obține informații cu privire la imunogenitatea tirozinazei și pentru a produce anticorpi specifici, am optimizat o metodă de expresie și purificare pentru tirozinaza de șoarece în sistem bacterian. Cantitatea de tirozinază de șoarece și puritatea produsului a fost evaluată prin SDS-PAGE urmată de colorarea cu soluție ce conține Coomassie blue după cum este arătat în figura 1. În concluzie am optimizat o metodă pentru purificarea eficientă a tirozinazei de șoarece în sistem bacterian.

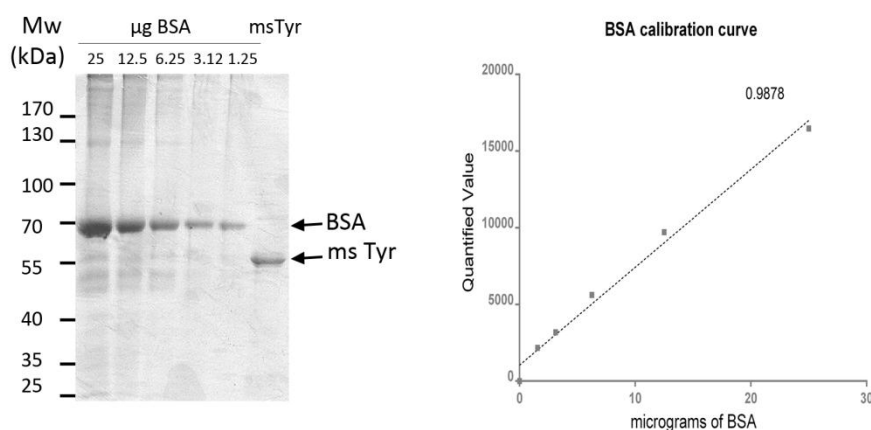


Figura 1. Analiza prin SDS-PAGE a tirozinazei recombinante de șoarece, stabilitatea proteinei și estimarea concentrației

Diluții seriale de albumină bovină serică-BSA (bovine serum albumin) (1.6-25μg) au fost separate în gel de poliacrilamidă, colorate cu soluție de Coomassie blue (imagine stânga), urmat de densitometrarea benzilor utilizând Image J, au fost utilizate ca și curbă de calibrare, reprezentată sub formă de puncte (imagine dreapta), care a fost utilizată pentru a estima concentrația proteinei purificate din același gel.

Pentru generarea anticorpilor policlonali ce recunosc proteina EDEM2 am purificat întreaga secvență a proteinei, fără secvența semnal utilizând protocolul menționat mai sus adaptat la un alt vector de clonare și respectiv o etichetare diferită. Proteina obținută a fost utilizată la imunizarea unui iepure, antiserul colectat după câteva imunizări a fost testat în comparație cu anticorpi comerciali disponibili. Anticorpul policlonal produs prin această metodă a recunoscut cu aceeași specificitate sau chiar mai bine proteina EDEM2 comparativ cu anticorpii comerciali.

N-glicozilarea și sistemul imun – Rolul N-glicozilării în generarea peptidelor antigenice utilizând tirozinaza ca proteină model

Pentru a stabili dacă glicozilarea este implicată în generarea de peptide antigenice derivate de la tirozinază am analizat implicarea fiecărui glican în generarea de antigene, prin mutație unică ($\Delta 1 - \Delta 7$), triplă ($\Delta 123$, $\Delta 567$) sau prin inactivarea tuturor situsurilor de N-glicozilare (Δall) din secvența tirozinazei. În acest sens, celulele de melanom amelanotic A375, izolate de la un pacient cu melanom metastatic, HLA A2⁺, care a pierdut expresia tirozinazei (Herlyn și colab., 1985) au fost transfectate stabil cu fiecare mutantă de tirozinază. După selectarea unor clone cu nivel de expresie al tirozinazei similar pentru toate mutantele, acestea au fost caracterizate din punct de vedere al procesării și activității enzimatic evaluate în figura 2.

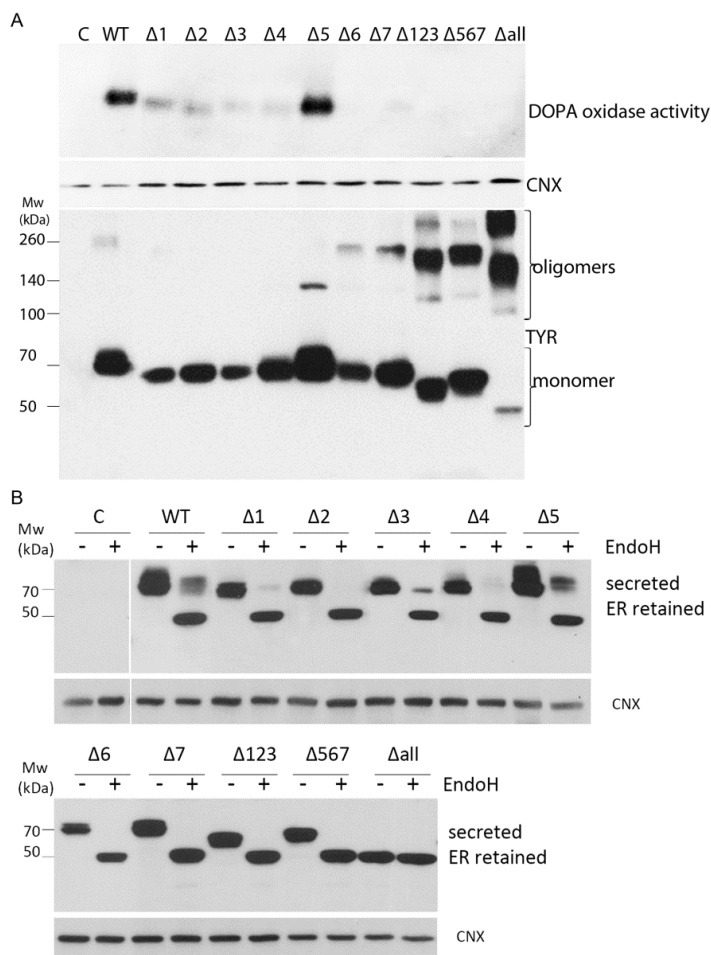


Figura 2. Expresia, activitatea enzimatică și procesarea mutantelor de glicozilare ale tirozinazei exprimate stabil în linia celulară A375.

A. Clone selectate cu expresie stabilă a mutantelor de tirozinază au fost cultivate în mediu de selecție, recoltate și lizate în tampon de liză care conține TritonX100. Cantități egale din fiecare probă au fost separate în gel de poliacrilamidă în condiții nereducătoare (fără ditiotreit (DTT) și fierbere) și gelul a fost incubat cu soluție de L-DOPA pentru a determina activitatea tirozinazei (imaginea de sus) sau transferat pe o membrană de nitroceluloză, probată cu calnexină ca și control de încărcare (imaginea din mijloc) sau anticorp de tirozinază (imaginea de jos) B. Sedimentele celulare au fost lizate și cantități egale de proteină din fiecare probă au fost

supuse digestiei cu EndoH. După digestia peste noapte probele au fost separate prin SDS-PAGE, transferate pe o membrană de nitroceluloză, probate cu anticorpi de tirozinază (imagine sus) și calnexină ca și control de încărcare (imagine jos). Pentru a verifica specificitatea anticorpilor un lizat obținut de la linia A375 netransfectată (C) a fost analizat în același timp și a fost folosit ca și control negativ.

În continuare experimentele au fost direcționate către a înțelege mecanismul de degradare a acestor mutante. Rezultatul experimentelor prezentate în acest studiu sugerează că mutantele de tirozinază urmează o degradare proteazomală, iar un efect mai pronunțat a putut fi observat pentru mutantele cu deleții ale glicanilor C-terminali.

După ce am stabilit că degradarea acestor mutante are loc pe calea proteazomală am fost interesată să determin potențialul antigenic al acestora. Acest potențial a fost măsurat fie printr-o cuantificare a peptidelor izolate de la suprafața celulelor utilizând spectrometria de masă sau prin metode imunologice specifice. Atât spectrometria de masă cât și secreția de interferon γ (IFN γ) au arătat că glicanii din partea C-terminală a tirozinazei au un rol important în generarea peptidului imunogenic după cum este arătat în figura 3.

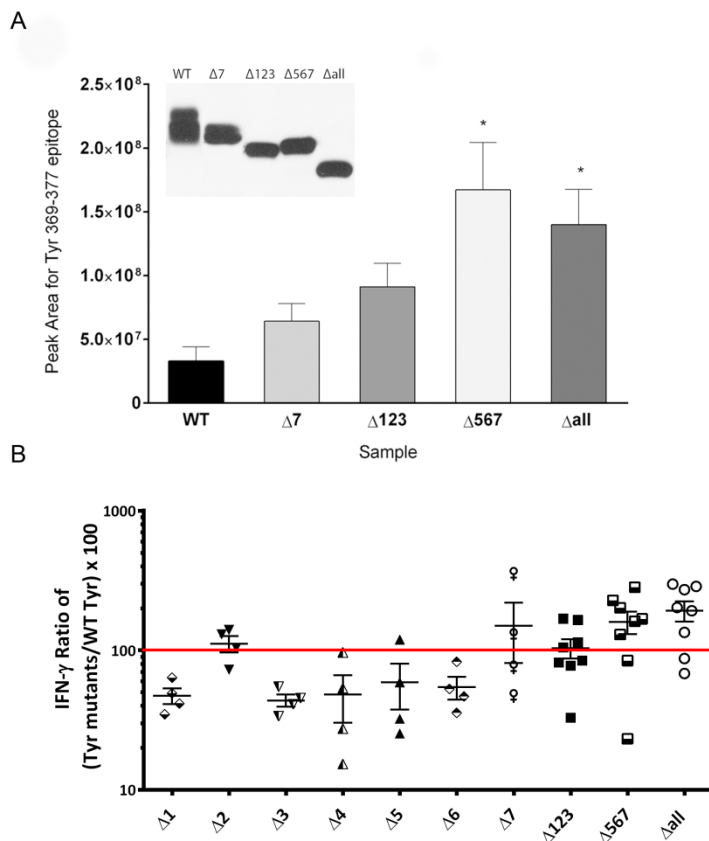


Figura 3. Cuantificarea relativă a peptidului YMD identificat în eluția de la suprafața celulară a transfectanților de tirozinază și secreția de IFN γ a clonelor de celule T CD8⁺ YMD specifice, stimulate cu A375 care exprimă stabil mutantele de tirozinază.

A. Eluția acidă a $\sim 12 \times 10^6$ celule din fiecare linie celulară care supraexprimă tirozinaza tip sălbatic (WT) sau mutantele de glicozilare: cu o singură mutație, exemplu reprezentativ ($\Delta 7$), triple ($\Delta 123$ și $\Delta 567$) și neglicozilată (Δall) au fost purificate față de proteinele cu mase moleculare mari prin ultrafiltrare, desalinizate pe vârfuri conținând fază staționară C18 și analizate prin nano cromatografie lichidă cuplată cu detecție prin spectrometrie de masă. Media ariilor picurilor cunoscute (acuratețea masei 7 ppm, 5 zecimale, fără netezire) pentru m/z

516.21 corespunzător YMD identificat în trei replicare biologice independente ale eluțiilor la suprafața fiecărei linii stabile A375 au fost reprezentate ca grafice tip bar. Barele de erori sunt SEM. *reprezintă schimbări semnificative ($p < 0.05$ cu corecție Benferroni) comparativ cu WT. Inset-ul reprezintă expresia de tirozinază în probele analizate evaluată prin Western blotting. B. Activarea celulelor T citotoxice YMD specifice a fost măsurată prin cuantificarea cantității de IFN γ secretat după stimularea (co-cultură), timp de 24 h, cu A375 supraexprimând mutantele de tirozinază. Rezultatele sunt reprezentate ca % al raportului IFN γ secretat în prezența A375 transfectate cu mutantele de tirozinază și A375 transfectate cu forma salbatică a tirozinazei (clonele testate $n=4-8$).

În concluzie, mutantele de glicozilare C-terminale sunt incomplet pliate, mult mai susceptibile degradării proteazomale, capabile să producă peptide antigenice pentru a declanșa un răspuns imun mai eficient comparativ cu mutantele de glicozilare N-terminale.

ERAD și sistemul imun - ERAD accelerează degradarea substratelor canonice și modulează generarea epitopului YMD al tirozinazei

Deoarece tirozinaza a fost arată a fi un bun candidat pentru ERAD, în experimente următoare am adresat efectul supraexpresiei unor componente ERAD asupra generării peptidului YMD antigenic și prezentarea la suprafața celulară a acestuia.

Pentru început am evaluat interacția unui component principal al ERAD, EDEM1 cu câteva mutante de tirozinază analizate în acest studiu și am găsit că asocierea acestor mutante cu EDEM1 este mediată de domeniul său intrinsec dezordonat după cum se poate observa în Figura 4.

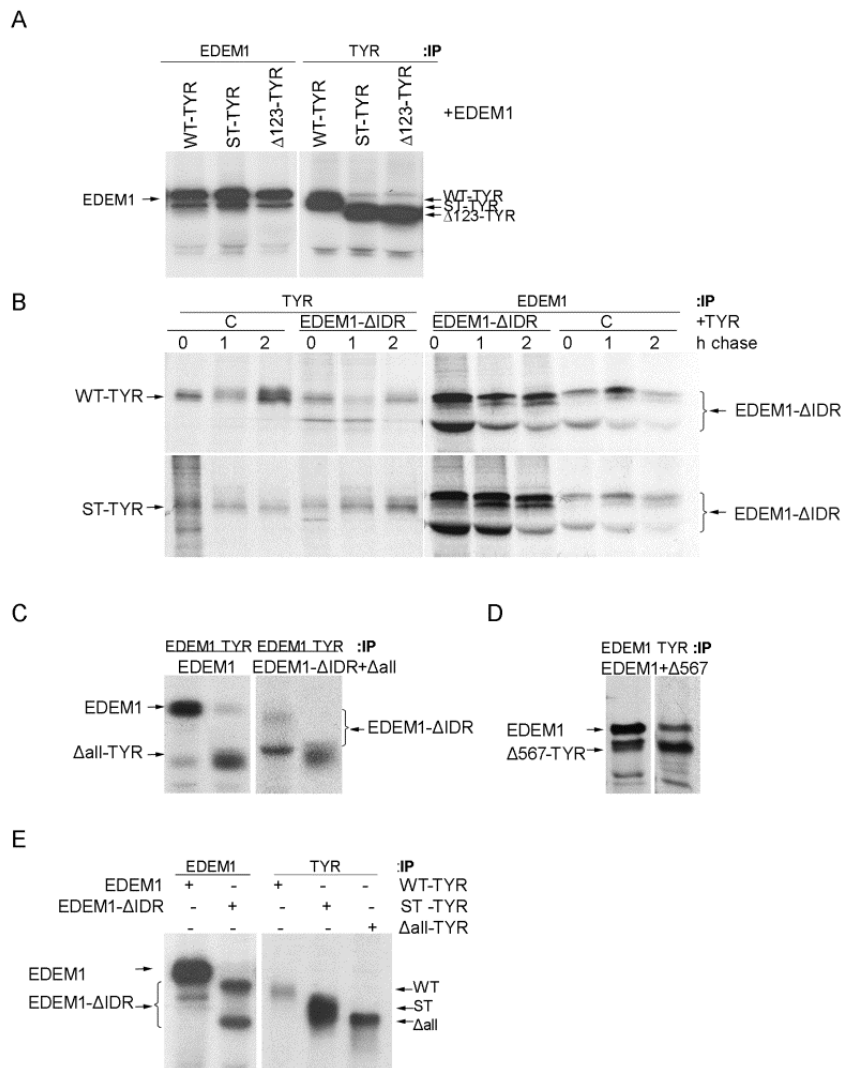


Figura 4. Interacția EDEM1 și EDEM1 fără regiunea intrinsec dezordonată (EDEM1-ΔIDR) cu tirozinazele.

A. HEK293T co-transfectate cu plasmide care codifică pentru EDEM1, EDEM1-ΔIDR sau vector (CTRL) și tirozinaze, au fost marcate pentru 30 min cu $[S^{35}]$ -Met/Cys și recoltate. Jumătate din probă a fost imunoprecipitată fie cu anticorp de tirozinază (stânga) sau EDEM1-descriș anterior (Marin și colab., 2012) (dreapta). B. Celulele HEK293T care co-exprimă EDEM1-ΔIDR sau vectorul (CTRL) cu tirozinazele WT și ST au fost marcate 30 min, recoltate la punctele de timp indicate și mai apoi prelucrate după cum a fost descriș la punctul A. C. și D. Interacția EDEM1 și EDEM1-ΔIDR cu tirozinazele Δall și Δ567, urmând același protocol ca la punctul A. E. HEK293T cu supraexpresie de EDEM1, mutantă IDR sau mutante de tirozinază au fost imunoprecipitate cu anticorpi de EDEM1 și tirozinază ca și control.

Pentru a monitoriza efectul supraexpresiei proteinelor ERAD asupra generării de peptide antigenice derivate de la tirozinază am supraexprimat stabil în linia A375 cu supraexpresie de tirozinază WT, proteinele ERAD și am analizat prin LC-MS/MS și secreție de $IFN\gamma$ cantitatea peptidului YMD exprimat la suprafața celulei. În pofida predicțiilor noastre se pare că o cantitate crescută de componente ERAD nu declanșează o creștere semnificativă a peptidului de la suprafața celulei și implică o stimulare mai bună a răspunsului imun.

CONCLUZII (TEZA IN EXTENSO)

Pentru a obține informații complete referitoare la procesarea și prezentarea la suprafața celulară a antigenelor tumorale în melanom, care reprezintă principalele obiective ale acestei teze am combinat proceduri de biochimie și biologie celulară cu metode imunologice.

Principalele obiective ale acestei lucrări au fost legate de înțelegerea modului în care tirozinaza este procesată la peptide antigenice în celulele de melanom și non-melanom și dacă alterarea glicozilării tirozinazei, procesării și/sau modularea expresiei componentelor ERAD, ar genera o prezentare îmbunătățită a peptidelor.

În acest studiu am prezentat rezultate care susțin ipoteza că glicozilarea tirozinazei este importantă pentru prezentarea la suprafața celulară a peptidelor antigenice și am realizat o estimare cantitativă a acestui proces prin spectrometrie de masă și evaluarea secreției de IFN γ . Mai mult decât atât, deoarece în multe melanoame și în albinismul oculocutan tirozinaza prezintă mutații referitoare la procesul de glicozilare am investigat abilitatea mutantelor de tirozinază de a produce un epitop imunogenic viabil, capabil să activeze celulele T citotoxice.

Pentru a fi procesată la forme imunogenice, tirozinaza trebuie să parcurgă câteva etape critice cum sunt degradarea și retrotranslocarea, procese încă incomplet înțelese. Pentru a stabili calea prin care tirozinaza WT și mutantele sale de glicozilare sunt capabile să producă peptide specifice am investigat implicarea degradării proteazomale în acest proces și asocierea cu MHCI a peptidelor clivate. Deasemenea am verificat implicarea LDs în retrotranslocarea tirozinazei, pas care are loc înaintea procesului de degradare proteazomală și rezultatele obținute indică faptul că aceste “organite” pot fi implicate în degradarea tirozinazei în condiții specifice.

ERAD este o cale importantă în menținerea homeostaziei proteinelor în reticulul endoplasmic și înțelegerea la nivel molecular a acestor procese este foarte importantă. Mai mult, corelarea disfuncțiilor ERAD cu avansarea unor patologii cum sunt cele neurodegenerative și boli imunologice, cancere și boli inflamatorii reprezintă o țintă viabilă pentru dezvoltarea de noi terapii. În acest studiu am arătat că modulând nivelul componentelor cheie în degradarea proteinelor este modificată cantitatea de peptide antigenice prezentate la suprafața celulară, un avans important în acest domeniu, posibil cu multiple aplicații clinice. Mai mult, rezultatele prezentate sugerează că ERAD este un proces

dinamic care reglează nivelul propriilor componente, o descoperire care extinde domeniul de degradare al proteinelor din biologia celulară.

Pentru a realiza studii de imunogenicitate și a caracteriza sistemul de lucru utilizat în aceste studii am dezvoltat metode specifice pentru obținerea de proteine pure exprimate în sistem bacterian care pot fi folosite pentru a produce anticorpi cât și pentru studii biochimice și imunologice.

În concluzie, în acest studiu s-au clarificat câteva aspecte referitoare la maturarea tirozinazei în reticulul endoplasmic și au fost optimizate două metode de expresie și purificare a proteinelor în sistem bacterian, cu potențiale aplicații în studiul antigenicității tirozinazei, deasemenea au fost stabilite legături între plierea, maturarea și degradarea tirozinazei, toate acestea prezentate pe scurt mai jos:

Purificarea proteinelor și obținerea anticorpilor

- ✓ A fost dezvoltată o nouă metodă pentru pregătirea tirozinazei pure, în stare nedenaturată utilizând celulele bacteriene ca sistem de expresie. Acest preparat poate fi folosit în studii imunologice care necesită antigene tumorale native.
- ✓ S-au generat anticorpi policlonali față de proteina EDEM2 utilizând proteina EDEM2 recombinantă, exprimată în tulpini bacteriene modificate, purificată printr-o nouă metodă de purificare și utilizând o schemă secvențială de imunizare în iepuri.
- ✓ Anticorpii produși au o specificitate mai mare față de proteina target EDEM2 comparativ cu anticorpii comerciali, după cum s-a observat în experimente de imunoprecipitare și microscopie de fluorescență.

N-glicozilarea și sistemul imun

- ✓ Investigarea rolului N-glicanilor individuali în procesarea și degradarea tirozinazei a fost realizată atât prin transfecție tranzientă cât și transfecție stabilă, cu un sistem de infecție retroviral optimizat pentru mutantele generate în celulele de melanom amelanotic. Datele din această lucrare indică faptul că deleția glicanilor C-terminali induce o stare de pliere incompletă mai severă în comparație cu cei N-terminali, după cum a fost observat în experimentele de activitate enzimatică și deglicozilare *in vitro*.
- ✓ Deleția N-glicanilor C-terminali produce o creștere a cantității de YMD prezentat la suprafața celulară după cum a fost arătat prin experimente de citotoxicitate a celulelor T împotriva celulelor tumorale, metoda de liză, degranulare și secreție de IFN γ .

- ✓ Analiza Western blot și cea proteomică au indicat pentru prima dată că mutantele de tirozinază incomplet pliate sunt detectate ca agregate în complexe cu chaperoane și enzime ale căii ERAD, care preced degradarea.
- ✓ Mutantele de glicozilare ale tirozinazei sunt degradate pe calea proteazomală pentru a putea genera peptide MHC I specifice, demonstrat prin experimente de Western blot care arată o acumulare de proteină când activitatea proteazomală este inhibată și activarea celulelor T de către transfectanții de melanom tratați cu inhibitori de proteazom scăzută.
- ✓ Tirozinaza și mutantele sale de glicozilare sunt dislocate în citosol ca forme deglicozilate, observație evidentă ca urmare a unei permeabilizări parțiale a celulelor, pentru a separa conținutul citosolului de alte organite.
- ✓ O descoperire importantă a acestui studiu este aceea că forme chimice modificate ale peptidului standard YMDGTMSQV, sunt capabile să declanșeze o activare semnificativă a celulelor T citotoxice.

ERAD și sistemul imun

- ✓ Experimente de pulse-chase și imunoprecipitare dedicate investigării interacției EDEM1 cu antigene tumorale au contribuit la înțelegerea rolului domeniului intrinsec dezordonat al EDEM1 în această interacție. Astfel, am adus contribuții la definirea interacției moleculei de EDEM1 cu tirozinaza, mediată de domeniul intrinsec dezordonat.
- ✓ În încercarea de a elucida calea ERAD pentru o proteină client am arătat că EDEM1 este capabil să trimită substratele ERAD la degradare independent de unele componente canonice ale căii ERAD.
- ✓ Utilizând studii de co-localizare prin microscopie și ultracentrifugare în gradient pentru a investiga rolul LDs în ERAD am arătat că dislocarea anumitor molecule din reticulul endoplasmic în citosol este mediată de EDEM1 și utilizează LDs ca transportori.
- ✓ O concluzie importantă a acestei teze, bazată pe o metodă imunologică și anume secreția de interferon gama ca răspuns la celulele de melanom transduse este aceea că pentru a produce peptide antigenice, celulele au nevoie de un proces ERAD funcțional. Am arătat că silențierea EDEM1 induce o scădere în potențialul imunologic al tirozinazei, care a fost procesată ineficient la peptide antigenice.

REFERINȚE

- CHAPMAN, E., FRY, A. N. & KANG, M. (2011) The complexities of p97 function in health and disease. *Mol Biosyst*, 7, 700-10.
- CHEN, Z., DU, S. & FANG, S. (2012) gp78: a multifaceted ubiquitin ligase that integrates a unique protein degradation pathway from the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci*, 13, 414-24.
- CHRISTIANSON, J. C., OLZMANN, J. A., SHALER, T. A., SOWA, M. E., BENNETT, E. J., RICHTER, C. M., TYLER, R. E., GREENBLATT, E. J., HARPER, J. W. & KOPITO, R. R. (2011) Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol*, 14, 93-105.
- 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.
- 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.
- FRANZ, A., ACKERMANN, L. & HOPPE, T. (2014) Create and preserve: proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 205-15.
- GAGNEUX, P. & VARKI, A. (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9, 747-55.
- GREENBLATT, E. J., OLZMANN, J. A. & KOPITO, R. R. (2011) Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant alpha-1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 1147-52.
- GUERRIERO, C. J. & BRODSKY, J. L. (2012) The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev*, 92, 537-76.
- HALABAN, R., CHENG, E., SVEDINE, S., ARON, R. & HEBERT, D. N. (2001) Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J Biol Chem*, 276, 11933-8.
- HALABAN, R., SVEDINE, S., CHENG, E., SMICUN, Y., ARON, R. & HEBERT, D. N. (2000) Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5889-94.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-9.
- KOSTOVA, Z. & WOLF, D. H. (2005) Importance of carbohydrate positioning in the recognition of mutated CPY for ER-associated degradation. *J Cell Sci*, 118, 1485-92.
- LEDERKREMER, G. Z. (2009) Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 515-23.
- LEITMAN, J., SHENKMAN, M., GOFMAN, Y., SHTERN, N. O., BEN-TAL, N., HENDERSHOT, L. M. & LEDERKREMER, G. Z. (2014) Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD. *Mol Biol Cell*, 25, 1050-60.
- MOREMEN, K. W. & MOLINARI, M. (2006) N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 592-9.
- 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.
- OETTING, W. S., FRYER, J. P., SHRIRAM, S. & KING, R. A. (2003) Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. *Pigment Cell Res*, 16, 307-11.
- OETTING, W. S., HANDOKO, H. Y., MENTINK, M. M., PALLER, A. S., WHITE, J. G. & KING, R. A. (1991) Molecular analysis of an extended family with type IA (tyrosinase-negative) oculocutaneous albinism. *J Invest Dermatol*, 97, 15-9.

-
- PETRESCU, A. J., MILAC, A. L., PETRESCU, S. M., DWEK, R. A. & WORMALD, M. R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 14, 103-14.
- POPESCU, C. I., MARES, A., ZDRENTU, L., ZITZMANN, N., DWEK, R. A. & PETRESCU, S. M. (2006) Productive folding of tyrosinase ectodomain is controlled by the transmembrane anchor. *J Biol Chem*, 281, 21682-9.
- 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.
- POTTER, B. A., IHRKE, G., BRUNS, J. R., WEIXEL, K. M. & WEISZ, O. A. (2004) Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 15, 1407-16.
- POWERS, E. T. & BALCH, W. E. (2013) Diversity in the origins of proteostasis networks--a driver for protein function in evolution. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 237-48.
- ROTH, D. M. & BALCH, W. E. (2011) Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 126-34.
- TSYTLONOK, M. & ITZHAKI, L. S. (2013) The how's and why's of protein folding intermediates. *Arch Biochem Biophys*, 531, 14-23.
- WELTE, M. A. (2015) Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*, 25, R470-81.
- WISEMAN, R. L., KOULOV, A., POWERS, E., KELLY, J. W. & BALCH, W. E. (2007) Protein energetics in maturation of the early secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 359-67.

MULȚUMIRI

În primul rând aș dori să mulțumesc conducătorului științific Dr. Ștefana Petrescu pentru că mi-a oferit oportunitatea să descopăr aptitudinile mele pentru știință și motivarea de a lucra în cercetare, pentru suport și îndrumare științifică de-a lungul acestor ani, pentru încrederea de a mă ocupa de proiectele descrise mai sus și nu în cele din urmă pentru ghidarea în elaborarea acestei teze și publicarea manuscrisurilor pe care se bazează.

Aș dori de asemenea să mulțumesc Prof. Pedro Romero și Dr. Camilla Jandus, colaboratori din cadrul Ludwig Cancer Research Center, Facultatea de Biologie și Medicină a Universității din Lausanne, care mi-au permis să realizez experimentele imunologice sub îndrumarea acestora și pentru că mi-au oferit posibilitatea să îmi îmbogățesc cunoștințele imunologice.

Datorez mulțumiri speciale surorii mele Dr. Marioara Chirițoiu și lui Cristian Munteanu pentru susținerea morală și științifică, încredere pentru a merge mai departe în acest domeniu, pentru discuțiile științifice productive, interpretarea datelor și implicarea în partea experimentală. Lui Cristian în mod particular îi mulțumesc, pentru ajutorul cu stabilirea condițiilor experimentale, analiza și interpretarea datelor de spectrometrie de masă prezentate în această teză.

Multe mulțumiri aș dori să adresez Dr. Livia Sima și Dr. Simona Ghenea, persoanele care m-au supravegheat în primele tentative experimentale respectiv culturi de celule și instruire la FACS (L.S.) și biologie moleculară și microscopie (S.G.) și pentru opinia critică privind organizarea manuscrisurilor trimise către publicare.

Vreau să mulțumesc Mihaelei Uță pentru producerea lentivirusului ce conține shRNA față de proteina EDEM1. Aș vrea să mulțumesc și Dr. Crina Păduraru și Dr. Florentina Pena pentru discuțiile critice referitoare la interpretarea datelor și sfaturile experimentale. De asemenea aș dori să mulțumesc tuturor persoanelor din departament, în mod special lui Cristian Butnaru, cu care am colaborat intens în ultima perioadă și Dr. Ioana Popa pentru asistența la imaginile de microscopie și tuturor colegilor din Institutul de Biochimie.

Nu în ultimul rând aș dori să mulțumesc familiei mele pentru suportul moral, încurajări și înțelegerea de-a lungul acestei perioade și a studiilor anterioare.

LISTĂ DE PUBLICAȚII

Publicații în cadrul tezei:

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN JURNALE “PEER- REVIEWED” (P):

P1:

Marin MB, Ghenea S, Spiridon LN, **Chiritoiu GN**, Petrescu AJ, Petrescu SM, “Tyrosinase degradation is prevented when EDEMI lacks the intrinsically disordered region.” *PLoS ONE* 7(8): e42998 (2012)

DOI:10.1371/journal.pone.0042998

AI=1.2; **IF (JCR 2012)=4.82,** Citări WoS =**10**

P2:

Chiritoiu 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 (JCR 2014) = 3.028,** Citări WoS = **0**

* autori cu contribuție egală

P3:

Chiritoiu 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 (JCR 2014) = 1.003,** Citări WoS = **0**

[#] autor corespondent, * autori cu contribuție egală

P4:

Chiritoiu MB, **Chiritoiu GN**, Butnaru MB, Munteanu CVA, Pastramă F, Ivessa EN, Petrescu SM, “An intrinsically disordered region of EDEMI selects ERAD clients for degradation.”

Lucrare în pregătire pentru a fi transmisă

PATENTE (PA):**PA1:**

Patent depus la OSIM: “*Production of polyclonal antibodies against EDEM2.*”, Autori: **Chiritoiu GN**, Ghenea S, Petrescu SM_ – (Reg.Dep.OSIM: A / 00989 / 18.10.2010 (2010))

PA2:

Patent Internațional spre depunere: “*Novel tyrosinase antigenic peptides and uses thereof.*”, Autori: Munteanu CVA, **Chiritoiu GN**, Petrescu SM, Jandus C, Romero P

PREZENTĂRI ORALE (PO):

Chiritoiu GN, Petrescu SM, “*Lipid droplets-alternative transport route to degradation for ERAD substrates?*” International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, București, România

POSTERE SELECTATE (PS):**PS1:**

Chiritoiu GN, Sima L, Marin M, Petrescu “*Tyrosinase traffic and delivery to antigen presenting complexes*” RSBMB, Craiova, România, 2011, **premiul pentru cel mai bun poster**

PS2:

Chiritoiu GN, Sima L, Marin M, Petrescu “*Processing and delivery of tyrosinase mutants as melanoma-associated antigens*” FEBS, Torino, Italia, 2011

PS3:

Chiritoiu GN, Jandus C, Ghenea S, Romero P, Petrescu SM, “*Expresssion of Tyrosinase N-glycosylation mutants in the amelanotic A375 human melanoma cell line and investigation of their potential of attracting T cells.*” 2nd Faculty and Staff Retreat of the Lausanne Cancer Research Community, Lausanne, Elveția, 2013

ALTE PUBLICAȚII (AP):**AP1:**

Cucu D, **Chiritoiu GN**, Petrescu S, Babes A, Stanica L, Duda DG, Horii A, Dima SO, Popescu I, “*Characterization of functional transient receptor potential melastatin 8 channels in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells*”, **Pancreas** 43(5):795-800 (2014)

AI = 0.9 ; **IF (JCR 2014) = 2.959**, Citări WoS = **3**

DOI: 10.1097/MPA.000000000000106

AP2:

Pastramă F, Munteanu CVA, **Chiritoiu 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 (JCR 2014) = 0, Citări WoS = 0

AP3:

Butnaru CM, Munteanu CVA, **Chiritoiu 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 (JCR 2014) = 0, Citări WoS = 0