

DISS. ETH NO. 19089

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL
PLAYERS REGULATING PROTEIN QUALITY CONTROL AND
DEGRADATION IN THE MAMMALIAN
ENDOPLASMIC RETICULUM**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of Doctor of Sciences

presented by

RICCARDO BERNASCONI

Dipl. Natw. ETH Zurich
born March 25th, 1983
citizen of Castel San Pietro (TI), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner
Prof. Dr. Maurizio Molinari, co-examiner

2010

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is the entry site of newly synthesized proteins in the secretory pathway. Nascent polypeptide chains are co-translationally N-glycosylated at Asn-X-Ser/Thr sequons and acquire the native conformation under the assistance of a multitude of ER-resident molecular chaperones and folding enzymes. A quality-control system surveys the lumen of the ER, insuring that only correctly folded and assembled proteins are transported through the secretory pathway at their final destination. Non-native proteins are actively retained in the folding compartment, while terminally misfolded polypeptides are dislocated into the cytosol where they are degraded by 26S proteasomes.

Processing of N-glycans, initially composed of 2 N-acetylglucosamine, 9 mannose and 3 glucose residues, plays an essential regulatory role both for folding and for ER-associated degradation (ERAD) of proteins synthesized in the ER lumen. Glycopolypeptides that have not acquired their native structure in due time, become accessible to ER-resident α 1,2-mannosidases, which by de-mannosylating the peptide-bound N-glycan(s) activate the disposal pathway. In fact, mannose removal is indication of long retention in the ER lumen and represents a strong signal that labels folding-defective glycopolypeptides for degradation. To ensure removal of folding-defective proteins from the ER lumen, misfolded proteins must be extracted from the ER folding machinery, exported across the ER membrane under the assistance of multimeric protein complexes built around membrane-embedded E3 ubiquitin ligases, poly-ubiquitinated and degraded by cytosolic 26S proteasomes. Failure of protein quality control and ERAD may lead to severe human diseases such as cystic fibrosis, hereditary lung emphysema, liver failure and neurodegenerative syndromes. Several key components and mechanisms regulating protein folding, quality control and degradation have been identified, but understanding of these events at the molecular level remains incomplete.

The aim of my project was the identification and characterization of novel factors/pathways regulating protein quality control and disposal in the mammalian ER.

Initially, we focused our study on the characterization of OS-9, a putative mammalian ortholog of the *S. cerevisiae* protein Yos9p. We found that in mammalian cells, OS-9 is present in two isoforms, OS-9.1 and OS-9.2, generated by alternative splicing of the OS-9 gene. We reported that both OS-9 variants are transcriptionally induced upon activation of the Ire1/Xbp1 ER-stress pathway. Our data showed that OS-9.1 and OS-9.2 fail to associate with folding-competent proteins. Rather, they selectively bind folding-defective polypeptides thereby inhibiting transport of non-native conformers through the secretory pathway. Additionally, OS-9 substrate-binding and activity do not require an intact mannose 6-P homology domain (MRH). The intraluminal level of OS-9.1 and OS-9.2 inversely correlates with the fraction of a folding-defective glycopolyptide, the Null_{hong kong} (NHK) variant of α 1-antitrypsin that escapes retention-based ER quality control.

Thus, OS-9.1 and OS-9.2 play a dual role in mammalian ER quality control: firstly as crucial retention factors for misfolded conformers, and secondly as promoters of protein disposal from the ER lumen. It remains a matter of study if they only regulate disposal of glycopolyptides, or whether they are involved in clearance from the ER lumen of both glycosylated and non-glycosylated polypeptides (Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J. & Molinari, M. (2008) A Dual Task for the Xbp1-responsive OS-9 Variants in the Mammalian Endoplasmic Reticulum: Inhibiting Secretion of Misfolded Protein Conformers and Enhancing their Disposal. *J Biol Chem* 283, 16446-16454).

In a second study, we investigated the mechanisms regulating recognition and dislocation across the ER membrane of misfolded glycopolyptides.

In *S. cerevisiae*, the presence of structural lesions in the luminal, transmembrane, or cytosolic domains determines the classification of misfolded polypeptides as ERAD-L, ERAD-M or ERAD-C substrates and results in selection of distinct degradation pathways. ERAD-L and ERAD-M substrates are cleared from the ER lumen by the HRD1 pathway, while ERAD-C substrates use the DOA10 pathway. These pathways comprise several luminal, transmembrane and cytosolic factors associated with the ER membrane-embedded E3 ligases Hrd1p and Doa10p, respectively.

The mechanisms regulating recognition and dislocation of ERAD substrates across the mammalian ER membrane are much more complex (e.g. there are at least 7 ER-embedded E3 ligases) and poorly characterized. We found that disposal of soluble (non-transmembrane) misfolded proteins (that we define as ERAD-L_S substrates)

and of membrane-tethered misfolded proteins (that we define as ERAD-L_M substrates) with the same luminal lesion possess different molecular requirements. Clearance of ERAD-L_S substrates is strictly dependent on the E3 ubiquitin ligase HRD1, the associated cargo receptor SEL1L and two interchangeable ERAD shuttles, OS-9 and XTP3-B. These ERAD factors become dispensable for degradation of the same polypeptides when membrane-tethered (ERAD-L_M substrates). These findings revealed that, in contrast to budding yeast, tethering of mammalian ERAD-L substrates to the membrane changes selection of the degradation pathway (Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T. & Molinari, M. (2010) Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-L_S substrates. *J Cell Biol* 188, 223-235).

In a third study, we characterized the involvement of an ER member of the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases (PPIs) family, cyclophilin B (CyPB), in clearance of misfolded polypeptides from the mammalian ER lumen.

Cis/trans isomerization of peptide bonds preceding proline residues is a rate-limiting step for the attainment of the native and functional 3D structure. *In vitro*, it has been widely shown that this reaction is catalyzed by PPIs. Nevertheless, the importance of PPIs during protein quality control in the ER of living cells has not been demonstrated yet. We found that CyPB, the most abundant archetypical ER-resident PPI, plays a crucial role in disposal from the ER of soluble (non-membrane) folding-defective polypeptides (ERAD-L_S substrate) containing *cis*-prolines. On the other hand, CyPB is dispensable for disposal of the same polypeptides when tethered at the ER membrane (ERAD-L_M substrates) and for disposal of polypeptides lacking *cis* proline residues. Thus, *cis-to-trans* isomerization of peptidyl-prolyl bonds of misfolded polypeptides seems to contribute to efficient protein disposal from the mammalian ER (Bernasconi, R., Soldà, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J. and Molinari, M. (2010) Cyclophilin B promotes degradation of misfolded polypeptides from the mammalian endoplasmic reticulum SUBMITTED).

We have previously reported (Calì et al. 2008) that EDEM1, a short-living regulator of ERAD, is segregated from ER-resident long-living chaperones such as BiP and Calnexin, and is released from the ER in LC3-I-coated vesicles.

In a fourth study, we have showed that mouse hepatitis virus (MHV), a coronavirus (CoV), exploits the host cell machinery for the COPII-independent vesicular export from the ER of EDEM1 to co-opt cellular membranes for replication. In this study we have found that cell infection with MHV substantially delays EDEM1 turnover, causing its accumulation and of at least another short-living ER chaperone, OS-9, in the virus-induced double membrane vesicles (DMVs) containing the viral replication and transcription complexes (RTCs). DMVs are coated with non-lipidated LC3/Atg8 and LC3/Atg8 down-regulation, but not inactivation of the host cell autophagy, protects mammalian cells from CoV infection.

Our study identifies the host cellular pathway hijacked by CoV paving the way for the development of new therapies to combat this family of viruses and describes a new autophagy-unrelated role for non-lipidated LC3-I (Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M.H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., deHaan, C.H.M. and Molinari, M. (2010) Coronaviruses Hijack LC3-I-Positive EDEMosome Membranes for Replication. *Cell Host & Microbe*).

Riassunto

Il reticolo endoplasmatico (ER) é il sito dove le proteine appena sintetizzate entrano nella via secretoria. Catene polipeptidiche nascenti sono glicosilate co-traduzionalmente sulle catene laterali delle asparagine (Asn) in sequenze Asn-X-Ser/Thr e acquisiscono la conformazione nativa grazie all'assistenza di una moltitudine di chaperoni molecolari ed enzimi residenti nell'ER. Un controllo di qualità sorveglia le proteine prodotte nel lume dell'ER garantendo che solo proteine correttamente ripiegate e assemblate siano trasportate attraverso la via secretoria fino a raggiungere la destinazione finale. Proteine non native sono trattenute attivamente, mentre polipeptidi mal piegati vengono rapidamente rimossi dal lume dell'ER.

I glicani legati a proteine di nuova sintesi sono inizialmente composti da 2 N-acetilglucosamine, 9 mannosidi e 3 glucosidi. I saccaridi terminali sono progressivamente eliminati da glucosidasi e mannosidasi attive nel lume dell'ER. Questi processi giocano un ruolo essenziale nella biogenesi proteica reclutando lectine e ossidoriduttasi che facilitano l'acquisizione della struttura nativa, o reclutando fattori che deviano le proteine difettose verso il citosol per permetterne la degradazione (Degradazione associata all'ER (ERAD)). Glicopolipeptidi che non riescono ad acquisire per tempo la struttura nativa diventano accessibili alle α 1,2-mannosidasi residenti nell'ER che rimuovono uno dopo l'altro 4-5 mannosidi generando un segnale degradativo che determina estrazione dalla *macchina* di piegamento, dislocazione nel citosol, poli-ubiquitinazione e degradazione operata dal 26S proteasoma. Difetti nel ripiegamento, nel controllo di qualità o nella degradazione di proteine di nuova sintesi possono condurre a gravi malattie umane come la fibrosi cistica, l'enfisema polmonare ereditario, la cirrosi epatica e a svariate sindromi neurodegenerative. Molte componenti chiave e meccanismi che regolano il piegamento, il controllo di qualità e la degradazione delle proteine prodotte nell'ER sono state identificate. Ciononostante, la comprensione di questi eventi a livello molecolare rimane incompleta.

L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di identificare e caratterizzare nuovi fattori/vie che regolano il controllo di qualità e la rimozione di proteine mal piegate dal lume dell'ER di mammiferi.

Inizialmente abbiamo caratterizzato OS-9, un orologio nel mammifero della proteina di lievito *S. cerevisiae* Yos9p. Abbiamo dimostrato che in cellule di mammifero OS-9 è presente in due isoforme (OS-9.1 e OS-9.2), derivate dallo splicing alternativo del gene OS-9. Abbiamo riportato che entrambe le varianti di OS-9 sono indotte trascrizionalmente mediante l'attivazione della via Ire1/Xbp1 in risposta a stress dell'ER. I nostri dati mostrano che OS-9.1 e OS-9.2 non si associano a proteine native ma legano selettivamente polipeptidi con ripiegamento difettoso, inibendo il trasporto di conformazioni non native attraverso la via secretoria. Il legame con il substrato e l'attività di OS-9 non necessitano di un dominio lectinico omologo al mannosio 6-P funzionale. Abbiamo inoltre osservato che il livello intraluminale di OS-9.1 e OS-9.2 correla inversamente con la frazione di un glicopolipeptide parzialmente incapace di acquisire una corretta struttura tridimensionale, la variante Null_{hong kong} (NHK) di α 1-antitrypsin, che riesce ad evitare la ritenzione mediata dal controllo di qualità dell'ER.

I nostri dati indicano che OS-9.1 e OS-9.2 hanno un doppio ruolo nel controllo di qualità dell'ER di mammifero: in primo luogo operano da fattori di ritenzione per proteine piegate non native; in secondo luogo agiscono da promotori di degradazione dal lume dell'ER. Rimane ancora da verificare se OS-9 interviene esclusivamente nella degradazione di proteine glicosilate o se controlla anche la degradazione di proteine non-glicosilate (Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J. & Molinari, M. (2008) A Dual Task for the Xbp1-responsive OS-9 Variants in the Mammalian Endoplasmic Reticulum: Inhibiting Secretion of Misfolded Protein Conformers and Enhancing their Disposal. *J Biol Chem* 283, 16446-16454).

In un secondo studio, abbiamo caratterizzato i meccanismi che regolano il riconoscimento e la dislocazione attraverso la membrana dell'ER di glicopolipeptidi piegati non nativi. In *S. cerevisiae* la presenza di lesioni strutturali luminali, transmembranali o citosoliche determina la classificazione di proteine non native in substrati ERAD-L, ERAD-M o ERAD-C e risultano nella selezione di vie degradative distinte. Substrati ERAD-L ed ERAD-M sono rimossi attraverso la via HRD1, mentre

substrati ERAD-C usano la via DOA10. Queste vie comprendono molte componenti luminali, transmembranalni e citosoliche associate rispettivamente con le E3 ligasi Hrd1p o Doa10p.

Nelle cellule di mammifero, i meccanismi che regolano il riconoscimento e la dislocazione di substrati ERAD attraverso la membrana dell'ER sono molto più complessi (per esempio ci sono almeno 7 E3 ligasi nella membrana dell'ER) e sono scarsamente caratterizzati. Abbiamo dimostrato che la degradazione di proteine non ancorate alla membrana (da noi definite substrati ERAD-L_S) richiede l'intervento di fattori specifici che non sono richiesti per la degradazione delle stesse proteine quando sono ancorate alla membrana dell'ER (da noi definite substrati ERAD-L_M). La rimozione di substrati ERAD-L_S è strettamente dipendente dall'E3 ligase HRD1, dal cargo recettore associato SEL1L e da due ERAD shuttles intercambiabili, OS-9 e XTP3-B. L'intervento di questi fattori non è invece obbligatorio per i substrati ERAD-L_M. Questi dati rivelano che, rispetto a *S. cerevisiae*, la selezione della via di degradazione dipende dal legame o meno del substrato ERAD alla membrana (Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T. & Molinari, M. (2010) Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J Cell Biol* 188, 223-235).

In un terzo studio, abbiamo caratterizzato il coinvolgimento di un membro della famiglia delle peptidil-prolil *cis/trans* isomerasi (PPIs) residente nell'ER, la ciclofilina B (CyPB), in ERAD nelle cellule di mammifero.

L'isomerizzazione *trans/cis* di un legame peptidico che precede una prolina è una delle reazioni chimiche che determina la velocità dell'acquisizione della struttura tridimensionale nativa e funzionale. *In vitro*, numerosi dati dimostrano che tale reazione è catalizzata da PPIs. *In vivo*, l'intervento delle PPIs durante la biogenesi (ripiegamento, controllo della qualità o degradazione) di proteine espresse nell'ER non è stato ancora dimostrato.

I nostri risultati mostrano che CyPB, la più abbondante PPI che risiede nell'ER, gioca un ruolo cruciale nella degradazione di un polipeptide solubile (substrato ERAD-L_S) contenente proline in *cis*, mentre non interviene nella degradazione di proteine che non contengono legami polipeptidici in *cis* o nella degradazione di proteine ancorate alla membrana. Perciò, l'isomerizzazione da *cis* a *trans* di legami peptidil-prolil in polipeptidi non nativi sembra facilitare la loro rimozione dal lume dell'ER (Bernasconi,

R., Soldà, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J. and Molinari, M. (2010) Cyclophilin B promotes degradation of misfolded polypeptides from the mammalian endoplasmic reticulum SUBMITTED).

In uno studio precedente (Calì et al. 2008), abbiamo riportato che EDEM1, un regolatore di ERAD a corta emivita, è selettivamente segregato da chaperoni dell'ER di lunga emivita come BiP e Calnexina, e lascia l'ER tramite vescicole ricoperte da LC3-I.

In un quarto studio, abbiamo mostrato come il virus dell'epatite murina (MHV), un coronavirus (CoV), sfrutta una via cellulare già esistente nella cellula infettata al fine di replicare. Tale via permette alla cellula di ridurre il contenuto luminale di chaperoni che regolano ERAD, per esempio EDEM1, OS-9 e SEL1L. Queste proteine vengono selettivamente rilasciate dall'ER in vescicole non rivestite da COPII come capita per le vescicole secretorie, ma da LC3/Atg8 non lipidato. Il contenuto di tali vescicole (da noi definite EDEMosomi) viene degradato da enzimi endo/lisosomiali. I nostri dati mostrano che l'infezione con MHV causa un accumulo di EDEM1, OS-9 e altri chaperoni coinvolti in ERAD a corta emivita in vescicole che il virus induce per incorporare complessi di trascrizione che sono necessari per la replicazione virale. Queste DMV (per Double Membrane Vesicles) derivanti dalle membrane dell'ER sono rivestite da LC3 non lipidato (proprio come gli EDEMosomi). La riduzione del livello intracellulare di LC3, ma non l'inattivazione dell'autofagia, protegge le cellule di mammifero da infezione di CoV. Il nostro studio ha identificato la via cellulare dirottata da CoV, una scoperta che potrebbe permettere lo sviluppo di nuove terapie volte a impedire la replicazione virale e descrive un nuovo ruolo della forma non lipidata di LC3 in un processo non correlato all'autofagia (Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M.H., Calì, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., deHaan, C.H.M. and Molinari, M. (2010) Coronaviruses Hijack LC3-I-Positive EDEMosome Membranes for Replication. *Cell Host & Microbe*).