

In vivo characterization of TMX1: TMX1 preferentially acts upon transmembrane polypeptides

Doctoral Thesis

Author(s):

Brambilla Pisoni, Giorgia

Publication date:

2016

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010665921>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 23381

***IN VIVO* CHARACTERIZATION OF TMX1:
TMX1 PREFERENTIALLY ACTS UPON TRANSMEMBRANE
POLYPEPTIDES**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
GIORGIA BRAMBILLA PISONI

*Laurea Magistrale in Biologia Molecolare della Cellula,
Università degli Studi di Milano*

born on *08.02.1986*
citizen of *Italy*

accepted on the recommendation of

Markus Aebi
Maurizio Molinari
Paola Picotti
Roberto Sitia

2016

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is a complex organelle divided into different sub-compartments that are required for the execution of diverse functions, such as protein and lipid synthesis, Ca^{++} storage and drug detoxification. The rough ER (rER) is the subdomain designated for the production of secretory and membrane proteins in eukaryotic cells, which constitute about one third of the total proteome of the cell.

Protein translocation into the ER represents the first stage of protein secretion. Upon ER import, the vast majority of nascent polypeptides are modified by the oligosaccharyltransferase complex (OST), which catalyzes the addition of a pre-formed 14-subunits oligosaccharide (3 glucoses, 9 mannoses and 2 N-acetylglucosamines) specifically on the -N-X-S/T/C- consensus sequences displayed by the polypeptide chains. This process is called N-glycosylation and is responsible for both the increase in solubility of the polypeptides and the creation of binding motifs for ER resident lectins that drive glycopolyptide folding.

Once the nascent polypeptide has been N-glycosylated, glucoses and several mannose residues are sequentially removed by ER-resident glycosyl hydrolases in a finely-regulated process known as glycan trimming which dictates the glycopolyptide fate until its complete maturation or selection for degradation.

Maturing mono-glucosylated polypeptides enter the folding program principally managed by the ER lectins calnexin (CNX) and calreticulin (CRT). CNX and CRT in turn recruit specific ER resident enzymes, which assist folding rate-limiting steps. These are enzymes that catalyze the formation of native inter- and intra-disulfide bonds, the protein disulfide isomerases (PDI), and the isomerization of peptidyl-prolyl bonds, the peptidyl-prolyl isomerases (PPI).

After the release from the CNX-CRT folding cage, a sophisticated quality control machinery guarantees that only correctly folded polypeptides are able to leave the ER via COPII-

mediated vesicles destined to the Golgi compartment. Polypeptide folding is an error prone process. If uncontrolled, accumulation of misfolded polypeptides can become extremely dangerous for the cell.

Specific sensors within the ER lumen judge whether misfolded proteins can re-enter the folding program for new folding attempts or must be labeled as terminally misfolded and addressed for ER-associated degradation (ERAD), a complex series of events that comprehend polypeptide recognition, linearization for retro-translocation, poly-ubiquitylation and finally degradation by cytosolic proteasomes.

The lumen of the mammalian ER contains more than 20 members of the PDI superfamily that intervene both during folding of newly synthesized polypeptides or during preparation for disposal of terminally misfolded ones. The reasons for the high redundancy of PDI members and the substrate features required for preferential engagement of one, or the other, are poorly understood.

To shed light into the PDI cellular roles and specificities, we focused our attention on the PDI subgroup called thioredoxin-related transmembrane proteins (TMX). We investigated how TMX1, one of the five transmembrane members of the TMX subfamily, intervenes during the folding program of model folding-competent substrates.

We found that TMX1 forms functional complexes with CNX and preferentially intervenes during maturation of cysteine-containing membrane-associated proteins, while ignoring the same cysteine-containing ectodomains if not anchored at the ER membrane.

Likewise, analysis of a possible involvement of TMX1 in the clearance of misfolded polypeptides from the ER revealed a selective intervention of the enzyme on membrane-bound proteins.

As such, these data demonstrate that TMX1 is the first example of a topology-specific client protein redox catalyst in living cells.

Riassunto

Il reticolo endoplasmatico (ER) è un organello complesso diviso in differenti sotto-compartimenti che sono necessari per l'esecuzione delle diverse funzioni, come sintesi di proteine e lipidi, riserva di Ca^{2+} e detossificazione da droghe. L'ER rugoso (RER) è il sottodominio designato per la produzione di proteine secretorie e di membrana in cellule eucariotiche, le quali costituiscono circa un terzo del proteoma totale della cellula.

La traslocazione nell'ER della proteina rappresenta la prima fase della via secretoria. A seguito dell'importazione nell'ER, la stragrande maggioranza dei polipeptidi nascenti viene modificata dalla oligosaccaride trasferasi (OST), che catalizza l'aggiunta di un oligosaccaride costituito da 14-subunità (3 glucosi, 9 mannososi e 2 N-acetilglucosammine) specificamente sulle sequenze consenso -N-X-S/T/C- delle catene polipeptidiche. Questo processo è chiamato N-glicosilazione ed è responsabile sia dell'aumento della solubilità dei polipeptidi, che della creazione di motivi che vengono specificamente riconosciuti da lectine che risiedono nell'ER e che guidano il ripiegamento delle glicoproteine.

Una volta che il polipeptide nascente è stato N-glicosilato, i residui di glucosio e diversi mannososi vengono sequenzialmente rimossi da idrolasi dell'ER in un processo finemente regolamentato noto come *trimming* dei glicani che detta il destino della glicoproteina fino alla sua completa maturazione o fino alla sua degradazione.

La forma mono-glucosilata della proteina entra nel programma di ripiegamento, principalmente gestito dalle lectine calnexina (CNX) e calreticulina (CRT). CNX e CRT, a loro volta reclutano enzimi specifici che assistono alcune fasi *rate-limiting* del processo di ripiegamento proteico. Questi comprendono enzimi che catalizzano la formazione di ponti disolfuro, chiamati disolfuro isomerasi (PDI), e l'isomerizzazione dei legami peptidil-prolil, chiamati peptidil-prolil isomerasi (PPI).

Al termine del programma di ripiegamento supervisionato da CNX e CRT, un sofisticato apparato di controllo garantisce che solo i peptidi correttamente ripiegati siano in grado di

lasciare il reticolo tramite vescicole COPII destinate al compartimento di Golgi. Il ripiegamento delle proteine è un processo incline all'errore. Se tale processo diviene incontrollato, l'accumulo di peptidi mal ripiegati può costituire un pericolo reale per la sopravvivenza della cellula.

Sensori specifici all'interno del lume dell'ER giudicano se le proteine mal ripiegate possono rientrare nel programma di ripiegamento per un nuovo ciclo di *fold*ing o se devono essere etichettate come prodotti aberranti e indirizzati alla degradazione associata all'ER (ERAD), la quale prevede una complessa serie di eventi che comprende il riconoscimento del polipeptide, la sua linearizzazione per abilitarlo alla retro-traslocazione, la sua poli-ubiquitinazione e, infine, la sua degradazione ad opera dei proteasomi citosolici.

Il lume dell'ER delle cellule di mammifero contiene più di 20 membri facenti parte della superfamiglia delle PDI che intervengono sia durante il processo di ripiegamento delle proteine di nuova sintesi, sia durante la preparazione per la degradazione di peptidi mal ripiegati. La ragione che si cela dietro all'alto grado di ridondanza tra i membri delle PDI e la preferenza di questi per taluni specifici substrati, sono aspetti poco conosciuti.

Per fare luce sul ruolo e sulle diverse specificità esibite dalle PDI, in questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle PDI del sottogruppo TMX, il quale comprende cinque proteine legate alla membrana che presentano un dominio *thioredoxin-like*. Abbiamo studiato come TMX1, il primo membro della sottofamiglia TMX, interviene durante il programma di ripiegamento di proteine modello *fold*ing-competent.

In questo lavoro mostriamo che TMX1 forma complessi funzionali con CNX e preferenzialmente interviene durante la maturazione di proteine associate alla membrana e che contengono residui di cisteina, ignorando le stesse, se non ancorate alla membrana.

Analogamente, in uno studio volto all'identificazione di un ruolo di TMX1 nel processo di preparazione per la degradazione di peptidi mal ripiegati, abbiamo mostrato che TMX1 interviene selettivamente su proteine legate alla membrana.

Questi dati dimostrano che TMX1 rappresenta il primo esempio di catalizzatore redox in cellule viventi specifico per substrati che presentano una determinata topologia.