

DISS. ETH NO. 24684

***MOLECULAR MECHANISMS REGULATING  
CELLULAR PROTEOSTASIS***

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

presented by

***TIMOTHY JAN BERGMANN***

*MSc Biology, University of Zurich*

born on *05.02.1988*

citizen of *Bern*

accepted on the recommendation of

*Benoît Kornmann*

*Maurizio Molinari*

*Markus Aebi*

*Gisou van der Goot*

2018

## Summary

The endoplasmic reticulum (ER) is the largest organelle of eukaryotic cells. It forms an interconnected network of tubules and sheets and plays important roles in calcium storage, carbohydrate metabolism, lipid biogenesis and, importantly, it is the site of synthesis and maturation of the secretory proteome, which makes up between 30 and 40% of a cell's proteome. Given its important role in protein synthesis, the ER is a major player in maintenance of proteostasis, *i.e.* in maintenance of the correct amount and quality of the proteome. As such, it is equipped with a quality control machinery that constantly and strictly surveils the state of folding proteins and decides on their secretion or removal.

N-glycosylated proteins are assisted during their folding by ER lectins and folding enzymes. The binding of these molecules is regulated by the modification of the glycan tree by ER residing enzymes and decides on the fate of the folding polypeptide. If a protein is able to reach its native conformation it is exported via COPII vesicles in order to reach its functional destination within or outside the cell. In contrast, if a protein misfolds, it is recognized by components of the ER associated degradation (ERAD) machinery and brought to the dislocons. Dislocons are protein complexes built around membrane embedded E3 ubiquitin ligases, which mediate the retrotranslocation of the misfolded protein to the cytosol and polyubiquitination that eventually leads to the destruction by the 26S proteasome. Misfolded proteins might form aggregates, which become resistant to ERAD. In such cases, autophagy may intervene in ill-defined manner in order to remove portions of the ER that contain such aggregates and bring them to lysosomes for destruction.

The maintenance of the equilibrium between synthesis, folding, export and degradation of the secretory proteome is crucial for cell function and survival. This equilibrium can be perturbed by several external (hypoxia, nutrient deprivation, changes in temperature, drugs and attack by pathogens) and cell-intrinsic (fluctuations in proteins synthesis, gene mutations, differentiation events and aging) events, leading to ER stress. To cope with such perturbations cells developed an array of transcriptional and translational responses generally termed unfolded protein response (UPR). Activation of the UPR leads to an increase in ER chaperones, folding enzymes and ERAD factors, a diminished translation rate and expansion of the ER membrane. If the ER stress is too strong and overwhelms the cell's capacity to respond, the UPR eventually leads to the activation of apoptotic programs.

With three different projects, we aimed at understanding how cells react when challenged with situations that perturb ER homeostasis. In the first approach, cells were challenged with a drug-induced ER stress that was then removed in order to permit the recovery of pre-stress homeostasis. Monitoring of the levels and localization of ER chaperones with several techniques, including biochemical analysis, confocal and electron microscopy, nuclear mass resonance and mass spectrometry, led to the characterization of recovery dynamics and the description of SEC62 as an autophagy receptor involved in the degradation of excess/damaged ER specifically during the recovery phase. The function of SEC62 in recoverER-phagy was shown to be independent on its role in protein translocation as a component of the SEC61 complex. Rather, the role of SEC62 in recoverERphagy was shown to be dependent on a functional LC3 interacting region (LIR) in its cytosolic C-terminus.

In the second project, we characterized a degradative pathway involved in the removal of aggregated (polymeric) Z-variant of  $\alpha 1$  antitrypsin (ATZ). We described a direct delivery of ATZ-containing ER portions to lysosomes, which we termed ER-to-lysosome associated degradation (ERLAD). This delivery is dependent on the ER-phagy receptor FAM134B and its functional LIR domain, the autophagic LC3 lipidation machinery and the ER SNARE syntaxin 17. Interestingly the described mechanism is not relying on the autophagy machinery involved in autophagosome biogenesis and comprising the autophagy genes ATG9, ATG13, ULK1 and ULK2.

For the third project, we took a more unbiased approach for observing how cells respond to the expression of ER retained unfolded proteins. For this, we created a panel of inducible cell lines that express model proteins with different chimico-physical features and performed micro-array-based transcriptomics and shotgun mass spectrometry for proteomics data. The comparison of cellular responses to unfolded proteins between each other and with ER-stress inducing chemicals revealed that 1) misfolded proteins induced a much milder cellular response compared to chemicals, 2) ER retention and BiP binding are required for UPR induction and 3) misfolded proteins are well tolerated by cells and only induce a subset of UPR target genes involved in nascent/unfolded protein binding, which mainly depend on the ATF6 branch of the UPR with no (or only marginally) activation of IRE1 and PERK pathways.

All in all, the three projects dealt, from different angles, with how cells cope with perturbations of ER homeostasis and how they are able to maintain or reestablish it. The results show that cells

possess a highly interconnected network of transcriptional and translational responses that enable them to cope with a wide range of ER perturbations.

## Riassunto

Il reticolo endoplasmatico (RE) è l'organello più grande della cellula eucariote ed è costituito da una rete interconnessa di tubuli e cisterne. Esso svolge un ruolo importante nel deposito di calcio, nel metabolismo dei carboidrati, nella biogenesi dei lipidi e, soprattutto, è il sito di sintesi e maturazione delle proteine secretorie, che costituiscono tra il 30 e il 40% del proteoma totale di una cellula. Considerando la sua importante funzione nella sintesi delle proteine, il RE ricopre un ruolo fondamentale nella proteostasi, ossia il mantenimento della corretta quantità e qualità del proteoma. Per adempiere questo scopo, il RE ha sviluppato un sofisticato sistema di controllo qualità che monitora costantemente lo stato di ripiegamento delle proteine e ne decide il rilascio o la rimozione.

All'interno del RE sono presenti lectine ed enzimi che assistono il ripiegamento delle proteine N-glicosilate, il cui legame è regolato dalla modifica delle catene glicaniche operata da enzimi residenti nel RE. Questo procedimento detta la sorte del polipeptide. Se una proteina è in grado di raggiungere la sua conformazione nativa sarà riconosciuta ed esportata attraverso vescicole COPII per raggiungere la sua destinazione funzionale all'interno/esterno della cellula. Al contrario, se una proteina non è correttamente ripiegata, sarà riconosciuta dagli elementi del processo di degradazione associato al RE (ERAD) e portata ai disloconi, complessi proteici assemblati attorno alle E3-ubiquitina ligasi, che mediano la retrotranslocazione al citosol e la poliubiquitinazione portando alla degradazione della proteina aberrante da parte del proteasoma 26S. In alcuni casi, le proteine aberranti possono formare aggregati che le rendono resistenti a ERAD. In questi casi l'autofagia può intervenire (in modi non ancora chiaramente compresi) per rimuovere le porzioni del RE contenenti tali aggregati e portarli ai lisosomi nei quali avverrà la degradazione.

Il mantenimento dell'equilibrio tra la sintesi, il ripiegamento, l'esportazione e la degradazione del proteoma secretorio è fondamentale per la funzione e la sopravvivenza delle cellule. Questo equilibrio può essere perturbato da numerosi fattori esterni (ipossia, deprivazione dei nutrienti, cambiamenti di temperatura, farmaci e patogeni) ed interni (fluttuazioni nella sintesi delle proteine, mutazioni genetiche, differenziamento ed invecchiamento) che portano ad uno stress del RE. Per far fronte a tali perturbazioni, le cellule hanno sviluppato una serie di risposte trascrizionali e traduzionali generalmente chiamate *unfolded protein response* (UPR). L'attivazione dell'UPR porta ad un aumento di fattori ripieganti, enzimi del RE e di componenti

ERAD, ad una ridotta sintesi proteica e all'espansione della membrana del RE. Se lo stress è troppo forte e sovrasta le capacità autoprotettive della cellula, l'UPR porta all'attivazione dei programmi apoptotici.

Attraverso tre diversi progetti abbiamo analizzato come le cellule reagiscono quando vengono sottoposte a condizioni che perturbano l'omeostasi del RE. In un primo approccio, le cellule sono state sottoposte ad uno stress indotto da farmaco, in seguito rimosso per consentire il recupero. Il monitoraggio dei livelli e della localizzazione dei fattori ripieganti e degli enzimi del RE con diverse tecniche, tra cui analisi biochimiche, microscopia confocale ed elettronica, risonanza magnetica nucleare e spettrometria di massa, ha portato alla caratterizzazione delle dinamiche di recupero e all'identificazione della funzione della proteina SEC62 come recettore di autofagia coinvolto nella degradazione del RE in eccesso o danneggiato durante la fase di recupero. La funzione di SEC62 in questo processo, nominato *recoVER-phagy*, risulta indipendente dal suo ruolo nella traslocazione proteica ed è garantita da una regione LIR (*LC3-interacting region*) nella porzione citosolica C-terminale.

Nel secondo progetto, abbiamo caratterizzato un percorso degradativo coinvolto nella rimozione della variante Z polimerica di  $\alpha 1$  antitripsina (ATZ) come un trasporto diretto di porzioni di RE contenenti ATZ ai lisosomi che abbiamo definito *ER-to-lysosome associated degradation* (ERLAD). Tale trasporto dipende dal recettore residente nel RE, FAM134B e dal suo dominio funzionale LIR, dalla lipidazione di LC3 e dalla SNARE syntaxin 17. La peculiarità del meccanismo descritto è che questo non si basa sulle componenti coinvolte nella biogenesi dell'autofagosoma tra le quali ATG9, ATG13, ULK1 e ULK2.

Nel terzo progetto abbiamo adottato un approccio più imparziale per osservare come le cellule rispondono all'espressione di proteine non correttamente ripiegate trattenute nel RE. Abbiamo quindi creato una serie di linee cellulari inducibili esprimenti proteine modello con differenti caratteristiche chimico-fisiche e ne abbiamo analizzato la risposta trascrizionale mediante microarray e la fluttuazione proteica tramite spettrometria di massa. Il confronto tra le risposte cellulari alle diverse proteine aberranti e allo stress indotto da farmaci ha rivelato che 1) le proteine aberranti inducono una risposta cellulare molto ridotta rispetto alle sostanze chimiche; 2) la ritenzione nel RE e il legame a BiP sono necessari per l'induzione dell'UPR e 3) le proteine aberranti vengono tollerate dalle cellule, inducendo un sottoinsieme di geni dell'UPR coinvolti

nel legame a proteine nascenti/non correttamente ripiegate, che dipendono principalmente dalla via ATF6 dell'UPR senza (o solo marginalmente) l'attivazione di IRE1 e PERK.

Nel complesso, i tre progetti hanno analizzato, da diversi punti di vista, come le cellule affrontano le perturbazioni nell'omeostasi del RE e la loro capacità nel mantenerla o ristabilirla. I risultati dimostrano che le cellule possiedono una rete altamente interconnessa di risposte trascrizionali e post-traduzionali che consentono di affrontare una vasta gamma di perturbazioni del RE.