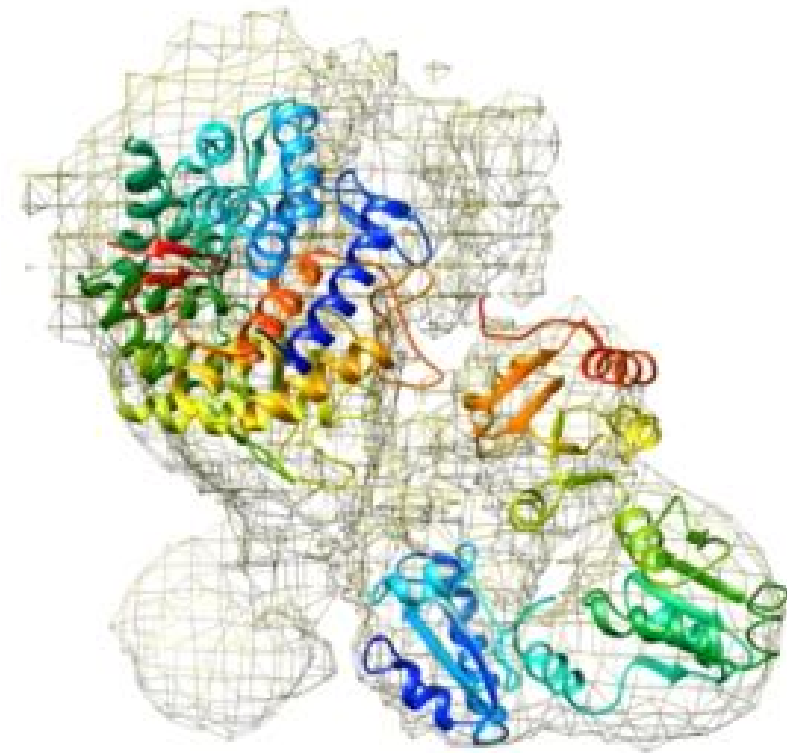
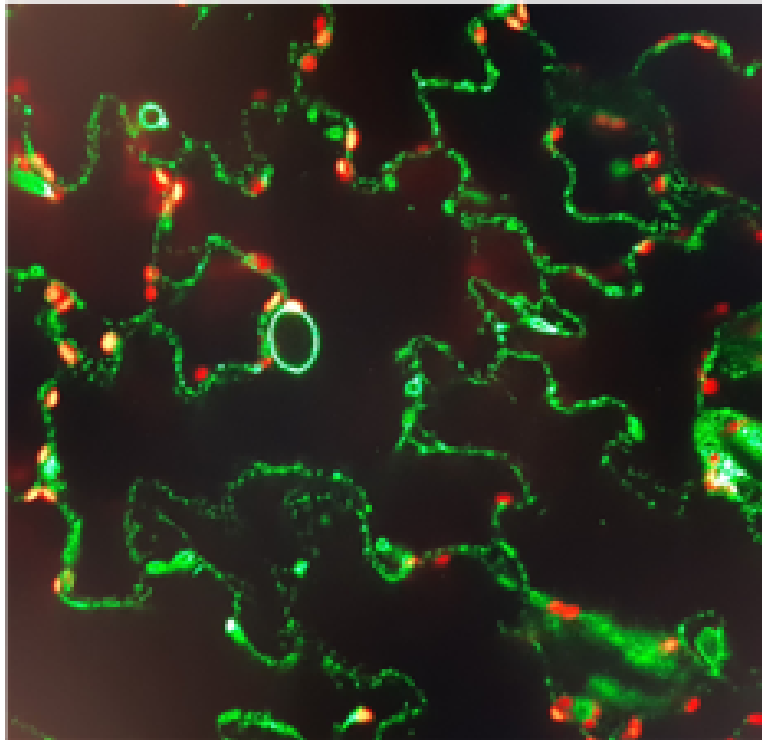


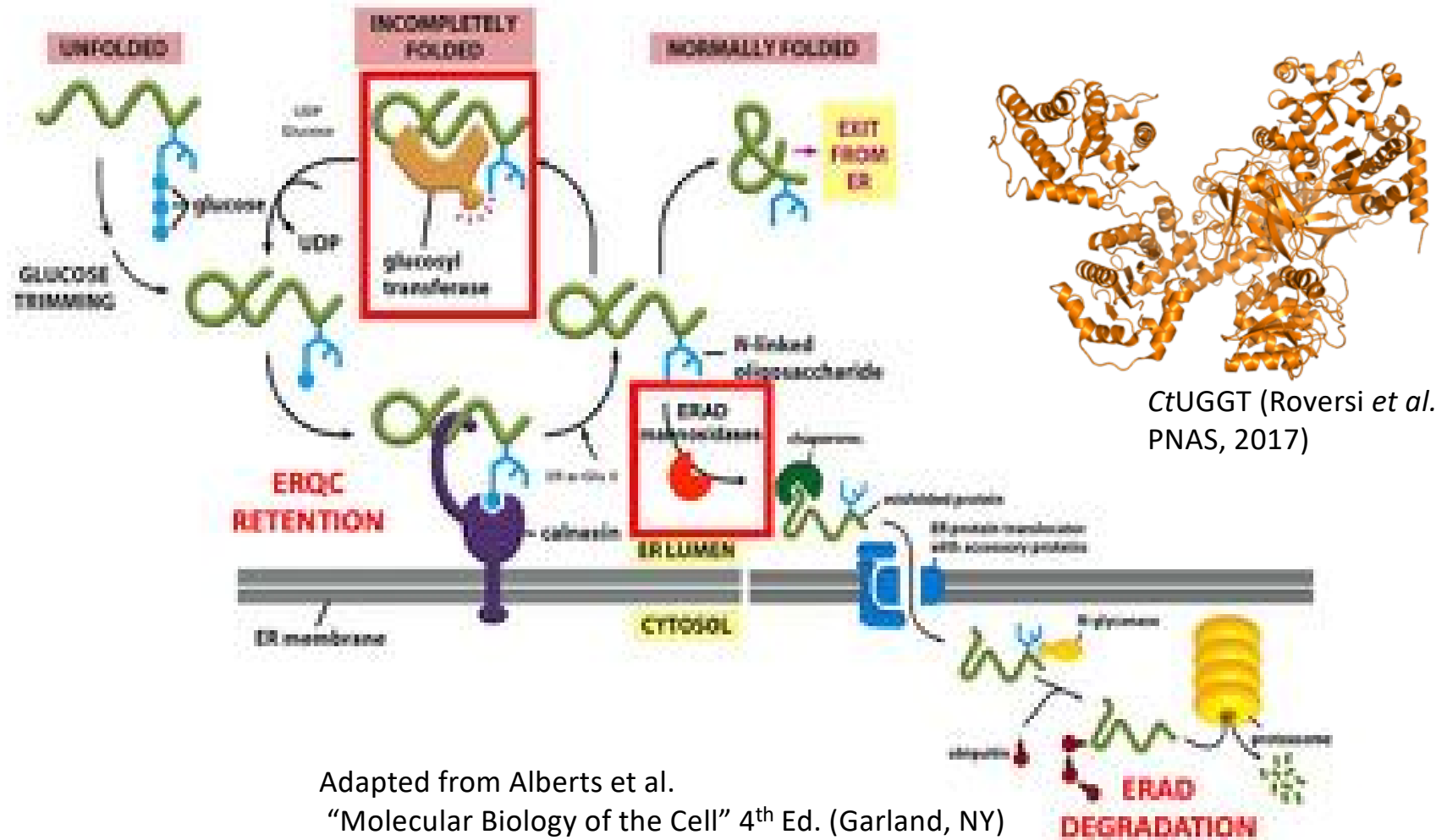
Struttura e funzione di EDEM:PDI, il controllore della degradazione associata al reticolo



Outline

1. Introduzione: **EDEM:PDI** invia le proteine mal-piegate alla degradazione associata al reticolo.
2. Verso saggi di resistenza al calore di pianta che esprime una **EDEM termoresistente**
3. Verso la determinazione della prima **struttura** di una **EDEM:PDI**

UGGT/EDEM:PDI rilevano i difetti di piegamento delle glicoproteine nel reticolo: ERQC/ERAD



Adapted from Alberts et al.
“Molecular Biology of the Cell” 4th Ed. (Garland, NY)

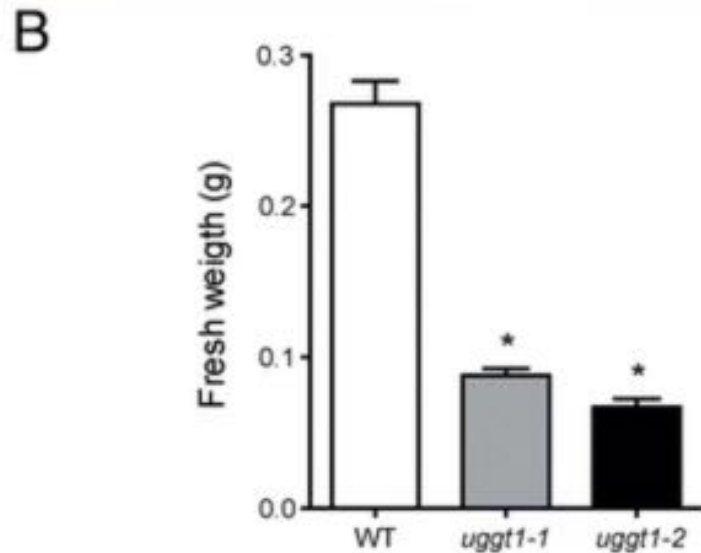
Saggi d'attività di UGGT e EDEM con mutanti nani del recettore 1 del brassinosteroido (BR1)



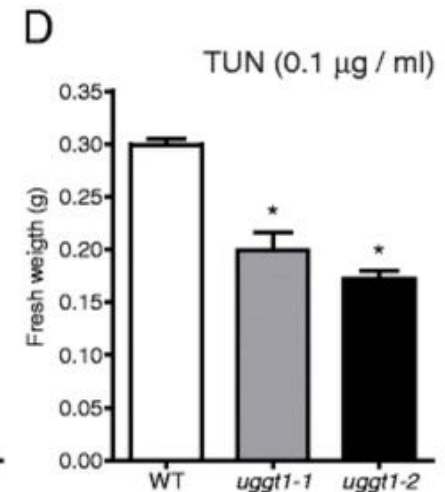
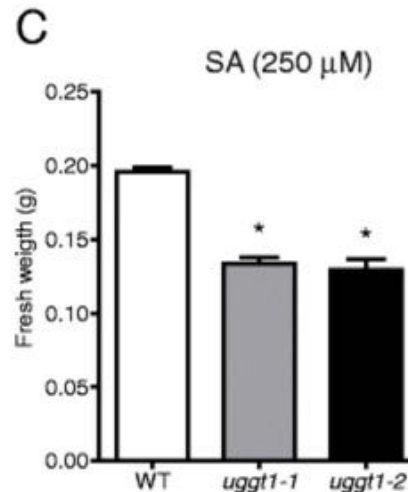
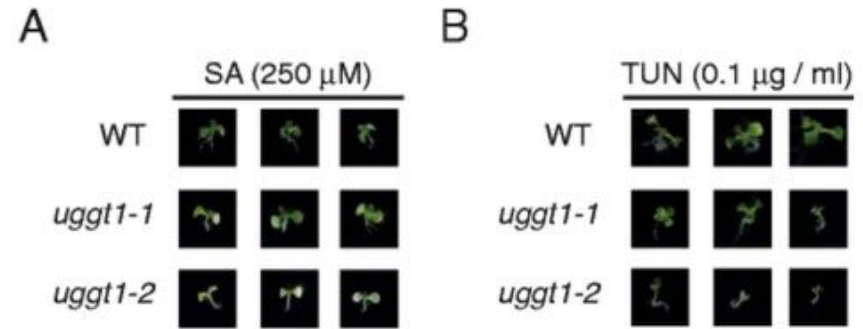
S. Hüttner *et al.*, *Plant Cell*. **26**, 1712–1728 (2014).

Jin H *et al.* *Mol Cell*. 2007 Jun 22;26(6):821-30

UGGT è importante nella risposta allo stress della pianta



Mutanti di *AtUGGT* soffrono stress salino più del WT



Mutanti di *AtUGGT* soffrono stressori di ER più del WT

Blanco-Herrera, *et al.* The UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), a key enzyme in ER quality control, plays a significant role in plant growth as well as biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **15**, 127 (2015).

Domande a cui rispondere / ipotesi da testare:

1. Come fa EDEM a riconoscere e demannosilare le glicoproteine mal-piegate?
2. Qual è la struttura 3D del checkpoint di ERAD?
3. Possiamo scoprire/sintetizzare inibitori specifici di EDEM?
4. *At* EDEM KO - ricomplementata con EDEM termofila - acquisisce resistenza allo stress di reticolo?

Esperimenti pianificati:

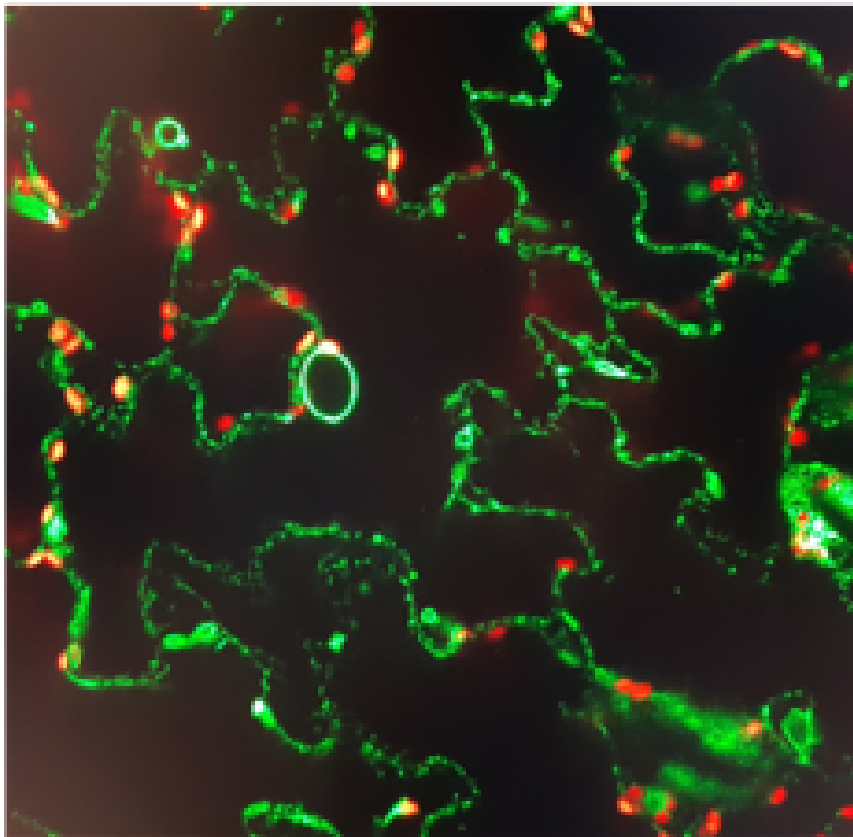
1. Determinazione di strutture del checkpoint di ERAD (cristallografia a raggi X e criomicroscopia elettronica):
CtEDEM e *AtEDEM*
2. Studio struttura/funzione di EDEM via saggi biochimici e cellulari di attività di mutanti di EDEM
3. Saggi fenotipici di *At* in condizioni normali e sotto stress (*At* WT, *At* EDEM KO e *At* EDEM KO ricomplementata con EDEM termofila).
4. Frazionamento cellulare di *At* in condizioni normali e sotto stress (piante di cui sopra):
MS glicosecretomica
(ER, Golgi, membrane, ...)

*Ct*EDEM:eGFP localizza al reticolo di *At*

Andrea Lia,
Maria de Benedicts



B



At EDEM KO
ricomplementata con
*Ct*EDEM:eGFP:
fluorescenza nel reticolo

CtEDEM manda *AtBRI1-5* a ERAD

Andrea Lia,
Maria de Benedicts

C



WT

mns4-1 mns5-1 bri1-5

CtHTM1P-GFP #1

mns4-1 mns5-1 bri1-5

CtHTM1P-GFP #2

mns4-1 mns5-1 bri1-5

At EDEM KO *BRI1-5* ricomplementata con
CtEDEM:eGFP:
provoca fenotipo nano.

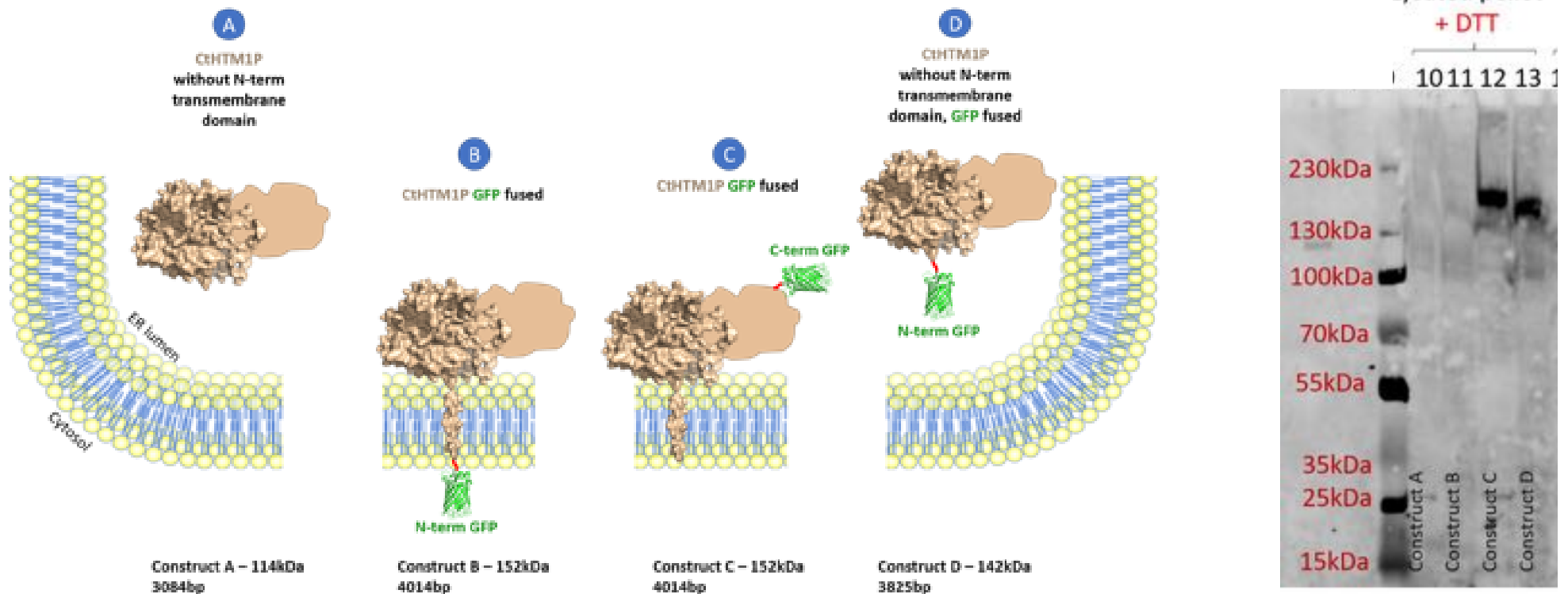
Ortologi putativi di EDEM:PDI del fungo termofilo *Chaetomium thermophilum*

Andrea Lia

In lievito e nell'uomo, EDEM forma un eterodimero con una disolfuro isomerasi (PDI).

CtEDEM: 140 kDa mannosidase Uniprot CTHT_0058730

CtPDI: 70 kDa PDI Uniprot CTHT_0067360

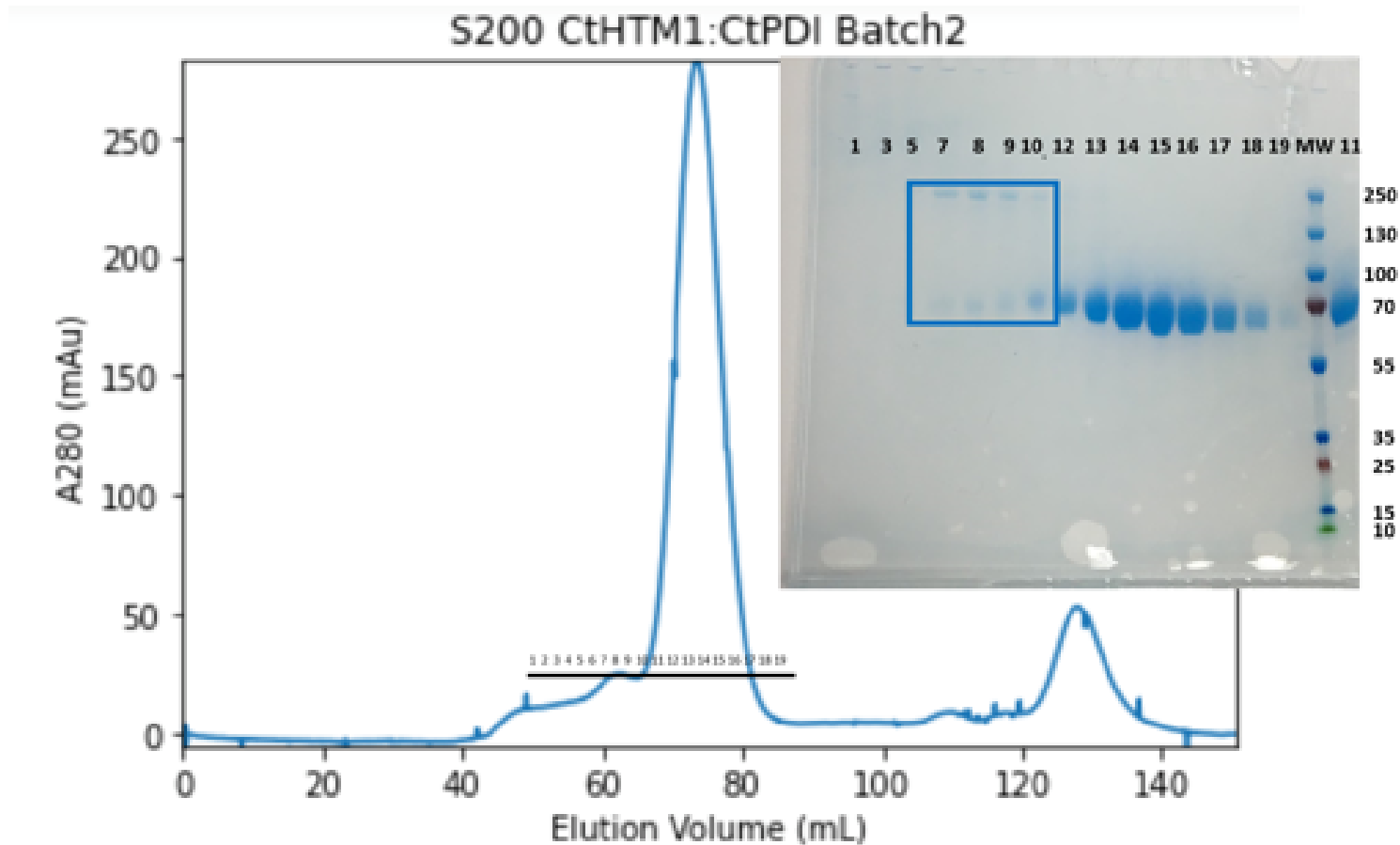


Prove d'espressione con vettore pHLsec (coda 6xHis) in cellule HEK293F

A.R. Aricescu et al., Acta Cryst. D 62(10):1243–1250 (2006)

Purificazione di *CtEDEM_D*:*CtPDI*

Profilo SEC dopo IMAC



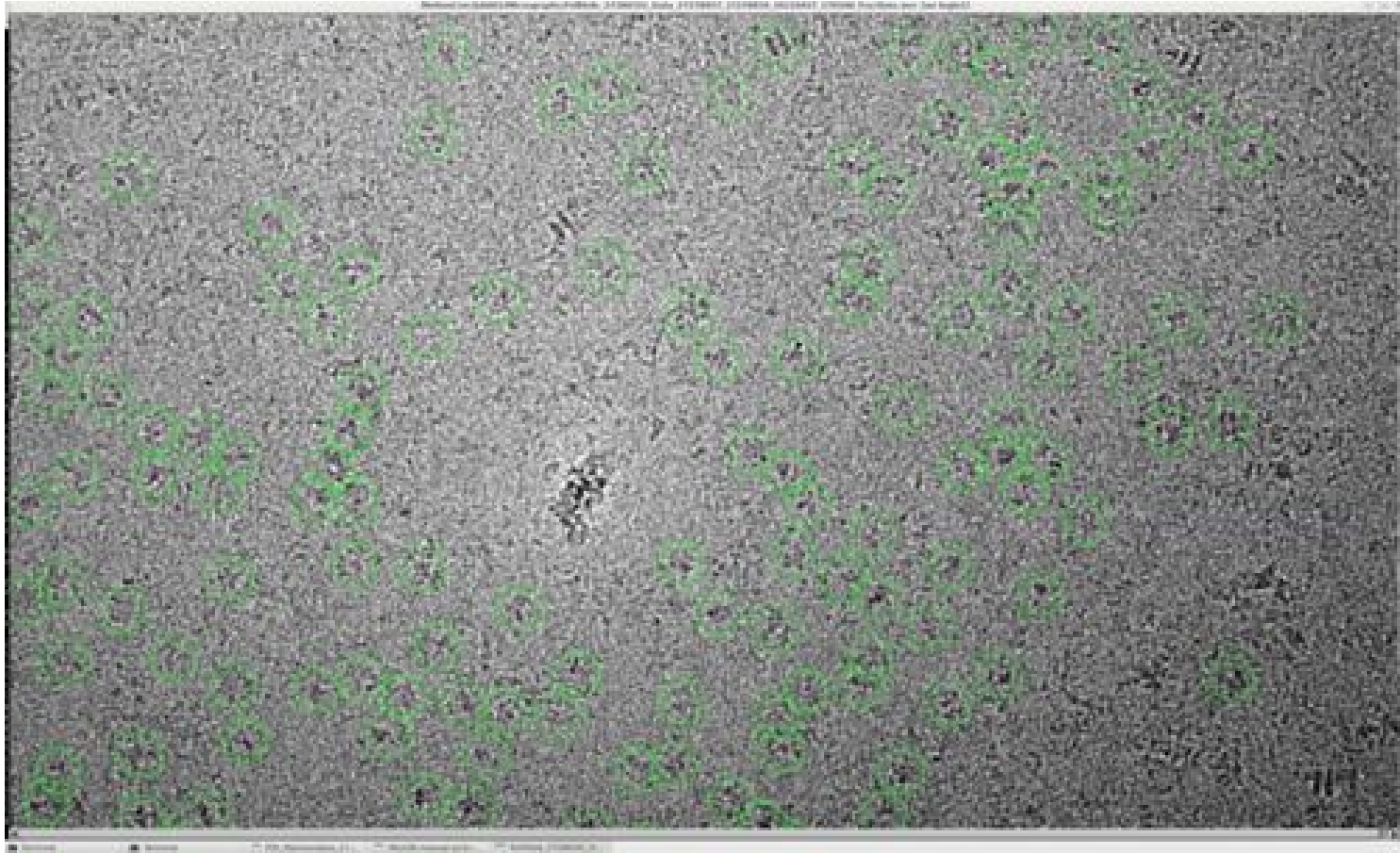
Identità di entrambe le proteine confermata
da MS delle bande tagliate dal gel

Cryo-EM di $CtEDEM_D:CtPDI$

Charlie Hitchman, TJ Ragan, Christos Savva

939 microgrammi – 912 “buoni”

raccolte da Dr. Christos Savva sul Titan Krios alla struttura Midlands Cryo-EM a Leicester (UK).



379,817 molecole isolate nei 912 microgrammi con TOPAZ in Relion. In media 416 molecole/microgramma.
Classificazione 2D iterativa. Numero finale di molecole: 208,310

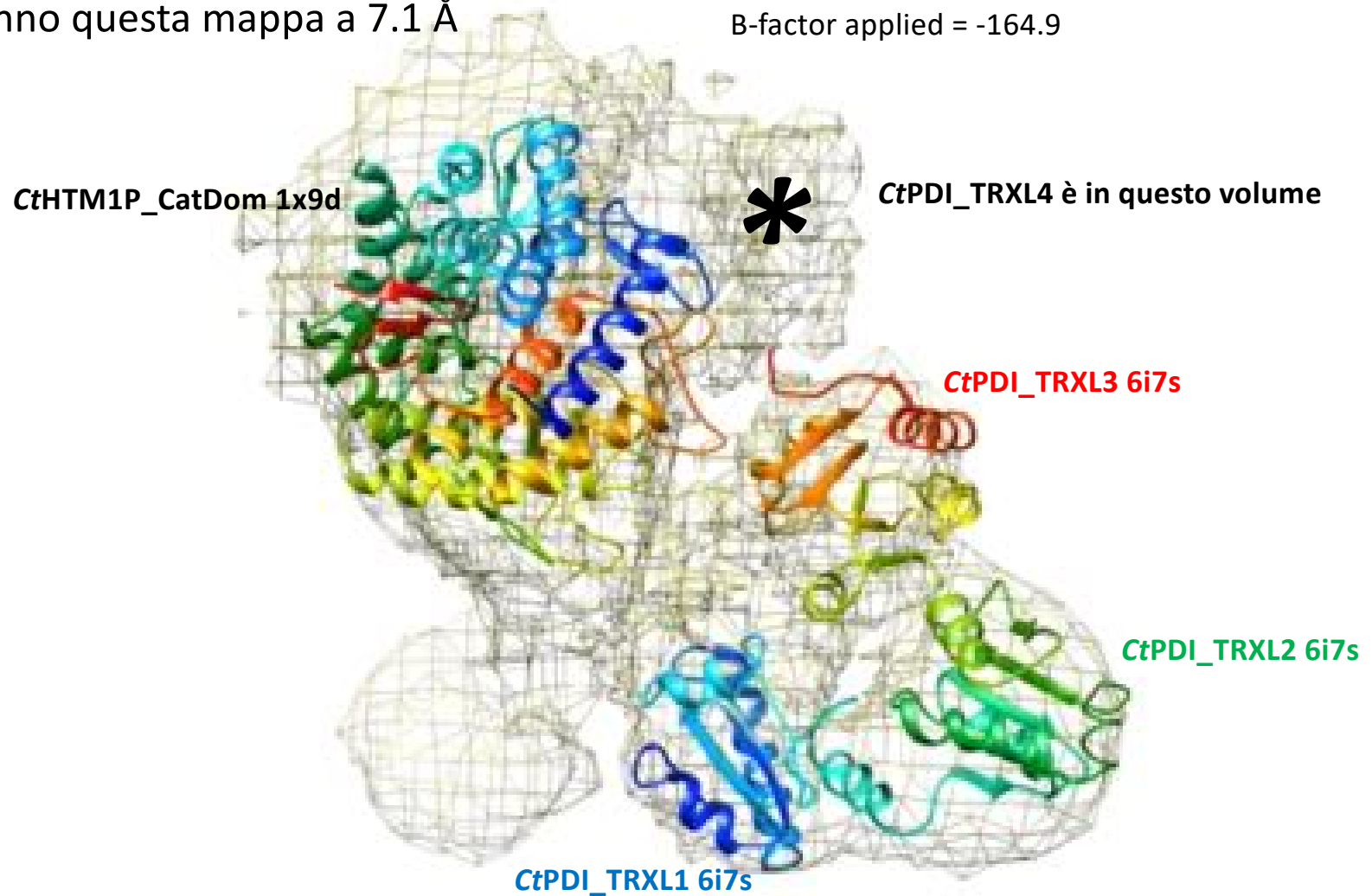
Classi 2D $CtEDEM_D$: $CtPDI$



7.1 Å Cryo-EM mappa attuale

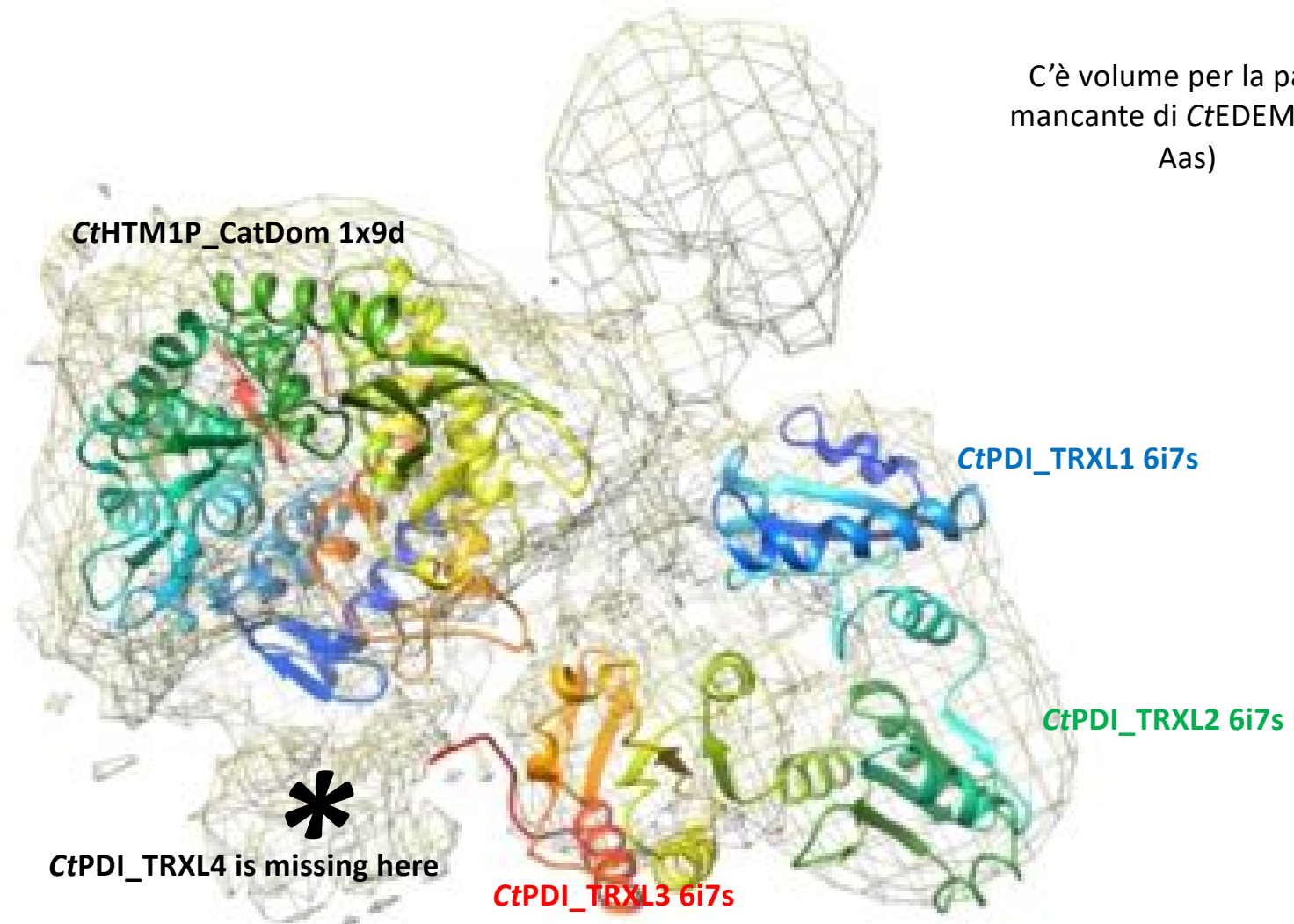
379,817 molecole scelte da 912 microgrammi
~35,000 danno questa mappa a 7.1 Å

B-factor applied = -164.9



Charlie Hitchman, TJ Ragan, Christos Savva

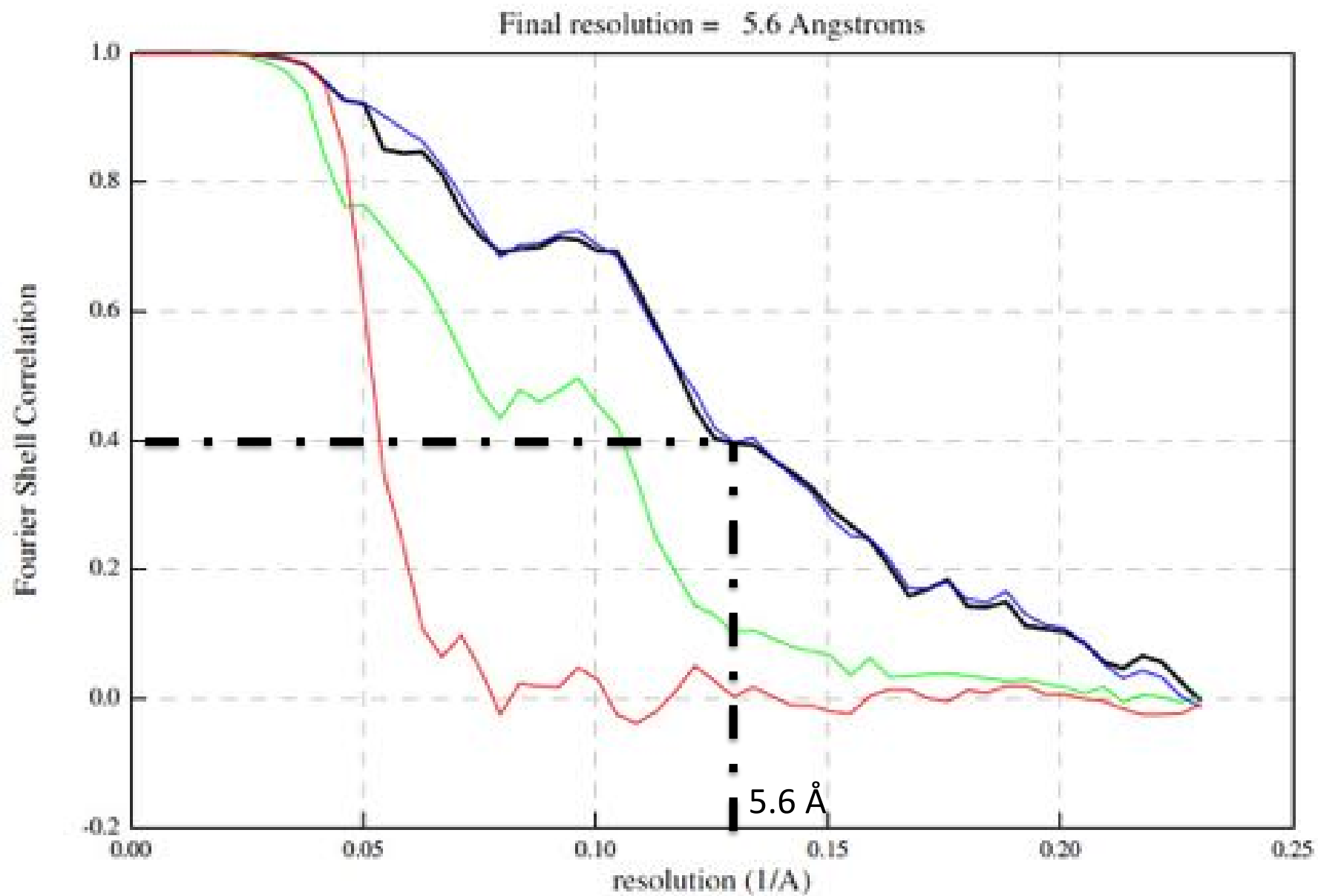
7.1 Å Cryo-EM mappa attuale (un'altra vista)



C'è volume per la parte mancante di CtEDEM (500 Aas)

Charlie Hitchman, TJ Ragan, Christos Savva

Latest Fourier Shell Correlation plot: 5.6 Å





Acknowledgements



Charlie Hitchman, Christos Savva, TJ Ragan, (University of Leicester, UK)

Lucia Marti, Maria De Benedictis, Andrea Lia (ISPA-CNR, Lecce, Italy)



UNIVERSITY OF
LEICESTER

LISCB WT ISSF Fellowship,
Seed Award in Science

