

Université de Montréal

**Étude du rôle de la calnexine de *Schizosaccharomyces pombe*  
dans le repliement et la sécrétion de protéines**

par

Pierre-Luc Tanguay

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Science (M.Sc.)  
en Biochimie

novembre, 2003

© Pierre-Luc Tanguay, 2003



W  
4  
U58  
2004  
V.129

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle de la calnexine de *Schizosaccharomyces pombe* dans le repliement  
et la sécrétion de protéines

présenté par :

Pierre-Luc Tanguay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dan Skup, Ph.D., président-rapporteur  
Luis A Rokeach, Ph.D., directeur de recherche  
Pascal Chartrand, Ph.D., membre du jury

## Résumé

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de synthèse des protéines destinées à être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Dans cette organelle, on retrouve une batterie de protéines qui participent au repliement des protéines et qui sont impliquées dans un processus nommé le contrôle de qualité : les chaperones moléculaires. La calnexine est une chaperone jouant des rôles clés dans le RE. Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre son mode d'action avec ses différents substrats et ses partenaires résidents du RE. Cependant, le rôle de la calnexine dans la sécrétion de protéines n'est pas très bien compris.

Dans l'article présenté à la section 2 "*Cell viability and secretion of active proteins in Schizosaccharomyces pombe do not require the chaperone function of calnexin*", nous avons utilisé des mutants de la calnexine pour étudier la sécrétion des protéines chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Dans un premier temps, nous démontrons que la calnexine de *S. pombe* est bel et bien une chaperone classique pouvant prévenir l'agrégation *in vitro* de la protéine non-glycosylée luciférase. Toutefois, même si la calnexine est essentielle à la viabilité de *S. pombe*, l'activité chaperone n'est pas sa fonction vitale. Ceci est démontré par le fait que des mutants n'ayant pas la région centrale hautement conservée de la calnexine confèrent la viabilité et ne préviennent pas l'agrégation de la protéine modèle. De plus, nous démontrons que la sécrétion de la cellulase d'*Aspergillus aculeatus*, ainsi que des protéines endogènes, est augmentée dans les souches mutantes de la calnexine. Nos résultats suggèrent donc qu'il existe dans la levure un contrôle de qualité extrêmement stringent et que la rétention par la calnexine est une étape limitante de la sécrétion des protéines. Finalement dans la dernière section, je discute des fonctions essentielles possibles de la calnexine et de son rôle dans la production de protéines recombinantes dans l'industrie biotechnologique.

**Mots-clés** : BiP, Calnexine, Chaperones moléculaires, Repliement des protéines, Réticulum endoplasmique, *Schizosaccharomyces pombe*, Sécrétion

## Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is the site of synthesis of most of secreted proteins. Within this organel, a battery of resident proteins, designated molecular chaperones, assist the folding of newly synthesized proteins and are involved in a process called quality control. Calnexin is a chaperone playing key roles in the ER. Numerous studies have been carried out in order to better understand how calnexin interacts with its substrates and with its partners. Nevertheless, the actual role of calnexin in protein secretion remains poorly understood.

In the manuscript “*Cell viability and secretion of active proteins in Schizosaccharomyces pombe do not require the chaperone function of calnexin*” presented in this thesis, we have used calnexin mutants, in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, to better understand its role in protein secretion. In the first figure of the paper, we demonstrate that *S. pombe* calnexin is a true chaperone able to prevent the thermal aggregation of the non-glycosylated model protein luciferase. However, chaperone activity is not the essential function of calnexin. This is supported by the fact that yeast strains harbouring calnexin mutants deleted of its highly conserved central domain (hcd) confer viability, but are unable to prevent aggregation of luciferase *in vitro*. On the other hand, we show that secretion of the *Aspergillus aculeatus* cellulase and of endogenous proteins is increased in  $\Delta hcd$  mutants. Our results suggest that in this yeast there is an excessive quality control of proteins and that retention by calnexin is a rate-limiting step in secretion. Finally, in the last part of the thesis I elaborate on the possible essential function of calnexin for *S. pombe* viability. I also discuss about potential application of calnexin mutant strains in large scale production of recombinant proteins.

**Keywords** : BiP, Calnexin, Endoplasmic reticulum, Molecular chaperones, Protein folding, *Schizosaccharomyces pombe*, Secretion

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des Figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Le Réticulum Endoplasmique et la voie de sécrétion.....	2
1.2 Les modifications covalentes des protéines.....	4
1.2.1 La <i>N</i> -glycosylation.....	5
1.2.2 L'isomérisation des prolines.....	8
1.2.3 La formation de ponts disulfure.....	9
1.3 GRP94.....	13
1.4 BiP et les HSP70.....	14
1.4.1 Caractéristiques structurelles de BiP.....	14
1.4.2 Le cycle des HSP70 et leurs partenaires.....	18
1.4.3 Les fonctions de BiP.....	19
1.5 La famille de la calnexine/calréticuline.....	20
1.5.1 La structure de la calnexine.....	20
1.5.2 La calnexine agit dans un cycle.....	23
1.5.3 La calnexine comme chaperone classique.....	25
1.5.4 La calnexine de <i>S. pombe</i> .....	27
1.5.5 Les fonctions et partenaires de la calnexine.....	27

1.6 Le contrôle de qualité du repliement des protéines dans le RE .....	29
1.6.1 Le UPR.....	29
1.6.1.1 Le UPR de <i>S. cerevisiae</i> .....	30
1.6.1.2 Le UPR chez les mammifères.....	32
1.6.2 La dégradation associée au RE et le protéasome .....	33
1.7 Projet de recherche.....	36
<b>2. Article</b> .....	39
Cell viability and secretion of active proteins in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> do not require the chaperone function of calnexine .....	40
Contribution des auteurs .....	41
Short Title .....	41
Keywords .....	41
Abbreviations .....	41
Synopsis .....	42
Introduction.....	43
Experimental .....	47
Results and Discussion.....	51
Concluding remarks .....	61
Acknowledgments.....	62
References.....	63
Figures and Legends .....	69
<b>3. Discussion</b> .....	78
3.1 La calnexine : une chaperone classique .....	79
3.2 La quête de la fonction essentielle de la calnexine .....	79
3.2 <i>S. pombe</i> , une usine productrice de protéines .....	83
<b>Bibliographie</b> .....	87

# Liste des Figures

## 1. Introduction

Figure 1 La voie de sécrétion.....	3
Figure 2 La <i>N</i> -glycosylation d'une protéine nouvellement synthétisée .....	6
Figure 3 Réaction catalysée par la peptidyl-prolyl isomérase. ....	8
Figure 4 La formation des ponts disulfure dans les protéines en repliement.....	11
Figure 5 Structure des domaines ATPase et de liaison aux substrats des HSP70 .....	15
Figure 6 Cycle de liaison et relâchement de substrats par les membres de la famille des Hsp70, Hsc70.....	17
Figure 7 Structure de la calnexine.....	21
Figure 8 Le cycle de la calnexine/calréticuline.....	24
Figure 9 Modèle du mécanisme de la calnexine du groupe de Williams.....	26
Figure 10 Modèle du UPR chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	31
Figure 11 Protéines impliquées dans les processus de dégradation associée au RE.....	35

## 2. Article

Figure 1: Absence of chaperone function in <i>hcd</i> -deleted calnexin/Cnx1p mutants.....	69
Figure 2: Quantification of calnexin and BiP and evaluation of the glycosylation state of heterologous proteins in mutant and wild type <i>cnx1 S. pombe</i> strains.....	70

Figure 3: Secretion and quality control efficiencies of <i>cnx1</i> mutants.....	72
Figure 4: Interaction of calnexin/Cnx1p with glycosylated and non-glycosylated substrates .....	74
Figure 5: Secretion of endogenous proteins in <i>cnx1</i> mutant strains .....	76

## Liste des Tableaux

- Tableau I Alignement des séquences des acides aminés en C-terminal de la protéine  
Sbh1p de *Y. lipolytica* et d'une sous-unité de Sec61  $\beta$ 2 de *S. pombe*.....81
- Tableau II Alignement des séquences des acides aminés 460-473  
de la calnexine de *Y. lipolytica* et de *S. pombe*.....82

## Liste des abréviations

Aa	acide aminé
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BiP	Binding immunoglobuline protein
Ca <sup>++</sup>	Calcium
CS	Citrate synthase
Cellp	Cellulase de <i>Aspergillus aculeatus</i>
Cnx1p	Calnexine de <i>S. pombe</i>
ERAD	Dégradation associée au RE (ER-associated degradation)
ERGIC	Compartiment intermédiaire ER-Goli (ER-Golgi intermediate compartment)
GlcNAc	N-acétylglucosamine
Gluc	Glucose
GSH	Gluthation réduit
GSSG	Gluthation oxydé
HSA	Albumine de sérum humain
Man	Mannose
PDI	Protéine disulfide isomérase
PPIase	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomérase
OT	Oligosaccharyl-transférase
RE	Réticulum endoplasmique

sNEP	Nepriylsine soluble
SRP	Particule de reconnaissance de séquence (Sequence recognition particle)
TGN	Réseau trans-Golgien (Trans-golgi network)
UDP-GT	UDP-glucose glycoprotéine:glucosyltransférase
UPR	Réponse aux protéines mal repliées (Unfolded Protein Response)

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Luis Rokeach. Durant mes années à la maîtrise, il a toujours cru en moi et a su éveiller ma curiosité scientifique. Je le remercie de m'avoir permis de poursuivre mes études dans son laboratoire.

Merci à mon ami Alexandre Maréchal. Nous avons travaillé ensemble dans la dernière année et celle-ci a été beaucoup plus agréable et productive. La création du GRS y est pour beaucoup.

Je remercie mes amis au laboratoire, Philippe Collin, qui m'a tout montré à mes débuts, Fadi, Renée, Pascale, Cynthia, Patrick et Alex. On ne travaille ensemble que pendant un court temps, mais je ne vous oublierai jamais. Merci et bonne chance.

À Miguel et Jean-françois, pour les discussions scientifiques que nous avons eu ensemble et leur amitié, merci les gars.

Je suis très reconnaissant envers ma mère, mon père, mon frère et ma soeur, pour leur inconditionnel amour et leur support constant. Je vous remercie profondément.

Finalement, je remercie Julie, mon amour. Pour ton aide dans l'écriture de ce mémoire, et surtout pour tout ce que tu fais pour moi à chaque jour, je te remercie sincèrement. Tu me rends vraiment heureux, je t'aime beaucoup.

# **1. Introduction**

## 1.1 Le Réticulum Endoplasmique et la voie de sécrétion

Les cellules spécialisées dans la sécrétion de grande quantité de protéines, comme par exemple les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, possèdent un réticulum endoplasmique (RE) très dynamique totalisant près de 10% du volume cellulaire et dont la surface membranaire compte pour près de 50% des membranes cellulaires. Cette organelle a une structure très particulière, formant un vaste réseau de membranes et constituant la double membrane du noyau. Elle est le lieu où s'exercent plusieurs fonctions cellulaires de très grandes importances: la synthèse de phospholipides et de cholestérol sur sa surface cytosolique, l'homéostasie du  $\text{Ca}^{++}$  et la synthèse, la translocation, l'ancrage à la membrane, la glycosylation, le repliement des protéines et l'assemblage des protéines multimériques [1].

Les protéines qui doivent être sécrétées dans le milieu extracellulaire, qui exercent leur fonction dans d'autres organelles (RE, appareil de Golgi, lysosomes) ou qui sont localisées dans la membrane cellulaire, passent obligatoirement par le RE. Cette organelle est le point de départ de la voie de sécrétion qui les mènera à leur destination finale dans la cellule ou à l'extérieur de la cellule (voir Figure 1). Lorsque les protéines nouvellement synthétisées sont correctement repliées et que les protéines oligomériques sont assemblées, elles sont incorporées près de la membrane du RE lisse dans des vésicules cargos. Celles-ci sont formées par le complexe protéique COPII essentiel au transport et sont dirigées vers l'appareil de Golgi en passant par le compartiment intermédiaire ER-Golgi (nommé ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment) (revue dans [2,3]). Par la suite, les vésicules fusionnent avec la membrane de la face *cis* du Golgi pour libérer leur contenu protéique. Les protéines sont alors triées et trois voies possibles leur sont offertes selon leur nature: 1) retourner vers le RE dans des vésicules COPI (par exemple dans le cas des protéines résidentes du RE), 2) rester dans le Golgi ou 3) continuer dans la voie de sécrétion après y

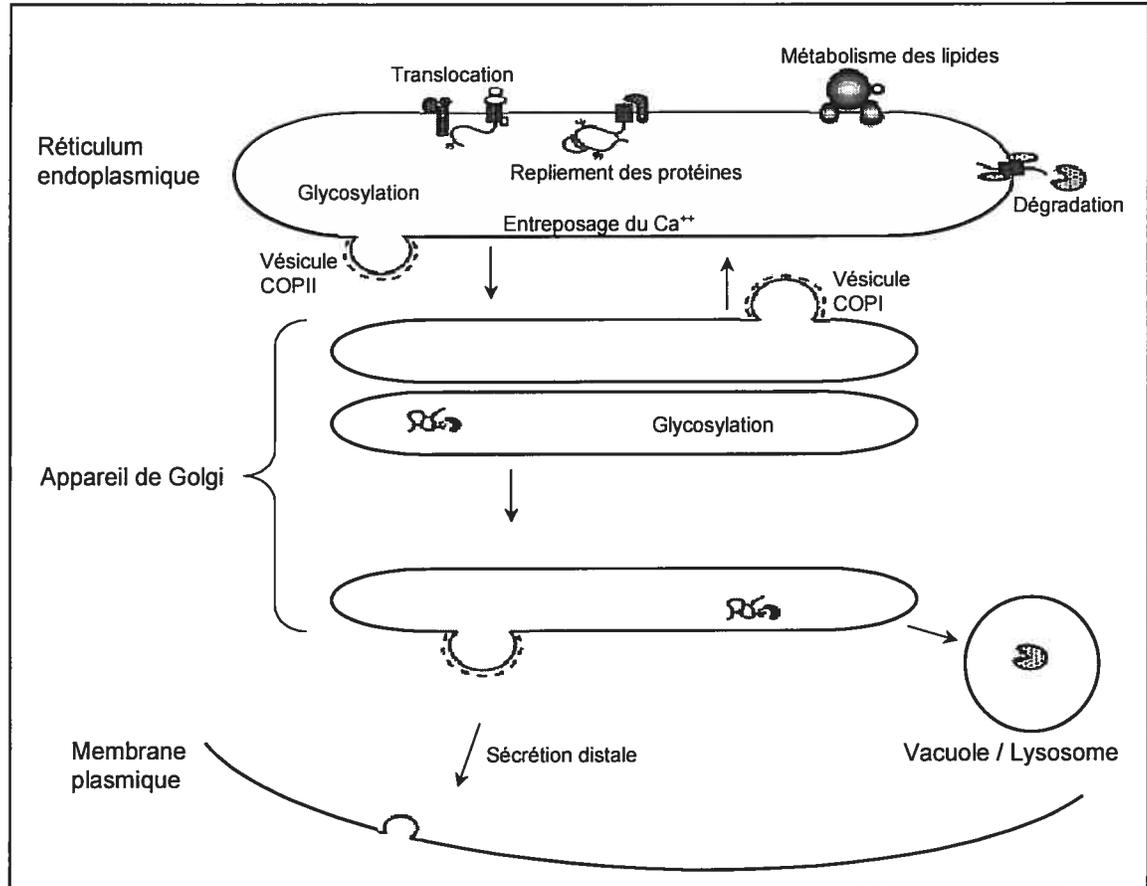


Figure 1 **La voie de sécrétion.** Représentation schématique des compartiments composants la voie de sécrétion et des processus qui ont lieu dans le RE et l'appareil de Golgi. (adaptée de [5])

avoir subi des modifications. Cette organelle est extrêmement dynamique et est composée de plusieurs saccules regroupés en trois classes, le Golgi *cis*, *median* et *trans* [4]. Dans chacun des compartiments, on retrouve des protéines résidentes qui exercent différentes fonctions et qui interviennent, entre autres, dans la maturation des oligosaccharides. Cependant, à ce jour on n'a pas trouvé de chaperones moléculaires impliquées dans le repliement d'autres protéines. Le contenu des cargos traverse donc les différents compartiments du complexe golgien et c'est à partir du réseau trans-golgien (TGN, trans-

golgi network) que les protéines seront par la suite dirigées vers les vacuoles/lysosomes ou vers la membrane plasmique dans de nouvelles vésicules de sécrétion. Lors de la fusion du cargo avec la membrane plasmique, les protéines membranaires seront incorporées à la surface de la cellule tandis que les protéines solubles seront relâchées dans le milieu extracellulaire (revue dans [2]).

Avant de pouvoir parcourir tout ce trajet à l'intérieur de la cellule, les protéines qui entrent dans le RE subissent de nombreuses modifications co/post-traductionnelles qui leur permettront d'adopter leur structure tertiaire ou quaternaire finale. Parmi ces changements, il y a la glycosylation, la formation de ponts disulfure, l'isomérisation des liens peptidiques prolyl et le repliement. Ce dernier processus est très élaboré et d'autant plus complexe considérant la concentration extrêmement élevée de protéines résidentes et nouvellement synthétisées dans le RE (100 mg/ml). Afin que seules les protéines natives, c'est-à-dire celles se retrouvant dans la conformation la plus énergiquement favorable, puissent continuer dans la voie de sécrétion, un important système a été élaboré. Comme nous allons le voir plus loin, le contrôle de qualité du repliement des protéines comprend le repliement et la rétention des protéines par les chaperones moléculaires, la réponse aux protéines mal repliées (UPR) et la dégradation associée au RE (ERAD)[6, 7].

## 1.2 Les modifications covalentes des protéines

La traduction d'un ARNm codant pour une protéine qui doit être importée dans le RE est arrêtée temporairement lorsque la séquence peptidique est reconnue par une protéine SRP (sequence recognition particle). Cette SRP dirige le complexe ARNm-ribosome, vers la surface du RE où elle va se lier à un récepteur de SRP. Il y a alors relâchement de la SRP et le ribosome reprend la traduction [8]. Le peptide en cours de synthèse est transloqué dans le RE à travers un canal nommé le pore de translocation. La translocation d'une protéine peut avoir lieu soit co- ou post-traductionnellement. Chez *S. cerevisiae*, le

pore de translocation est composé de Sec61p, Sss1p et Sbh1p et est assemblé en tétramère afin de former un canal aqueux [9]. Les premiers acides aminés de ces protéines en synthèse correspondent au peptide signal et ne font pas partis de la structure finale des protéines. Ceci est dû au fait qu'aussitôt à l'intérieur du RE, ils sont clivés par une protéase abondante dans le RE, Sec11p, une sous-unité du complexe membranaire formant la signal peptidase [10]. Suite à cette modification, 70 % des protéines qui passent dans la voie de sécrétion se voient ajouter un oligosaccharide, par un processus désigné glycosylation.

### 1.2.1 La N-glycosylation

Dépendamment de l'espèce, du tissu, du type cellulaire ou de la glycoprotéine, la structure finale d'un oligosaccharide varie considérablement. Cependant, les premières étapes de glycosylation et de modification de l'oligosaccharide dans le RE sont à peu près les mêmes chez les mammifères, *S. cerevisiae* et *S. pombe* [11]. La glycosylation d'un résidu asparagine (Asn), qui se trouve dans une séquence Asn-X-Ser/Thr, se déroule en trois grandes étapes qu'on peut voir illustrées à la Figure 2. Premièrement, l'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  est transféré en bloc à partir du dolichol-P-P. La synthèse de cet oligosaccharide a la particularité de se dérouler à deux endroits de la cellule. Les sept premiers monosaccharides sont assemblés sur la face cytosolique de la membrane du RE et « flippés » par la flippase Rft1p dans la lumière du RE par un mécanisme inconnu mais de façon ATP indépendante [12]. Les autres molécules de mannose et de glucose sont ajoutées jusqu'à ce que l'oligosaccharide lié au dolichol pyrophosphate soit prêt à être transféré sur un peptide en synthèse par l'Oligosaccharyl-transférase, OT. Cette enzyme est un complexe multimérique de 9 protéines membranaires différentes toutes conservées à travers les espèces [12]. Deuxièmement, dans la lumière du RE, il y a un clivage séquentiel des glucoses par les glucosidases I et II [13]. Chez les mammifères, jusqu'à deux mannoses peuvent être enlevés par autant de mannosidases pour

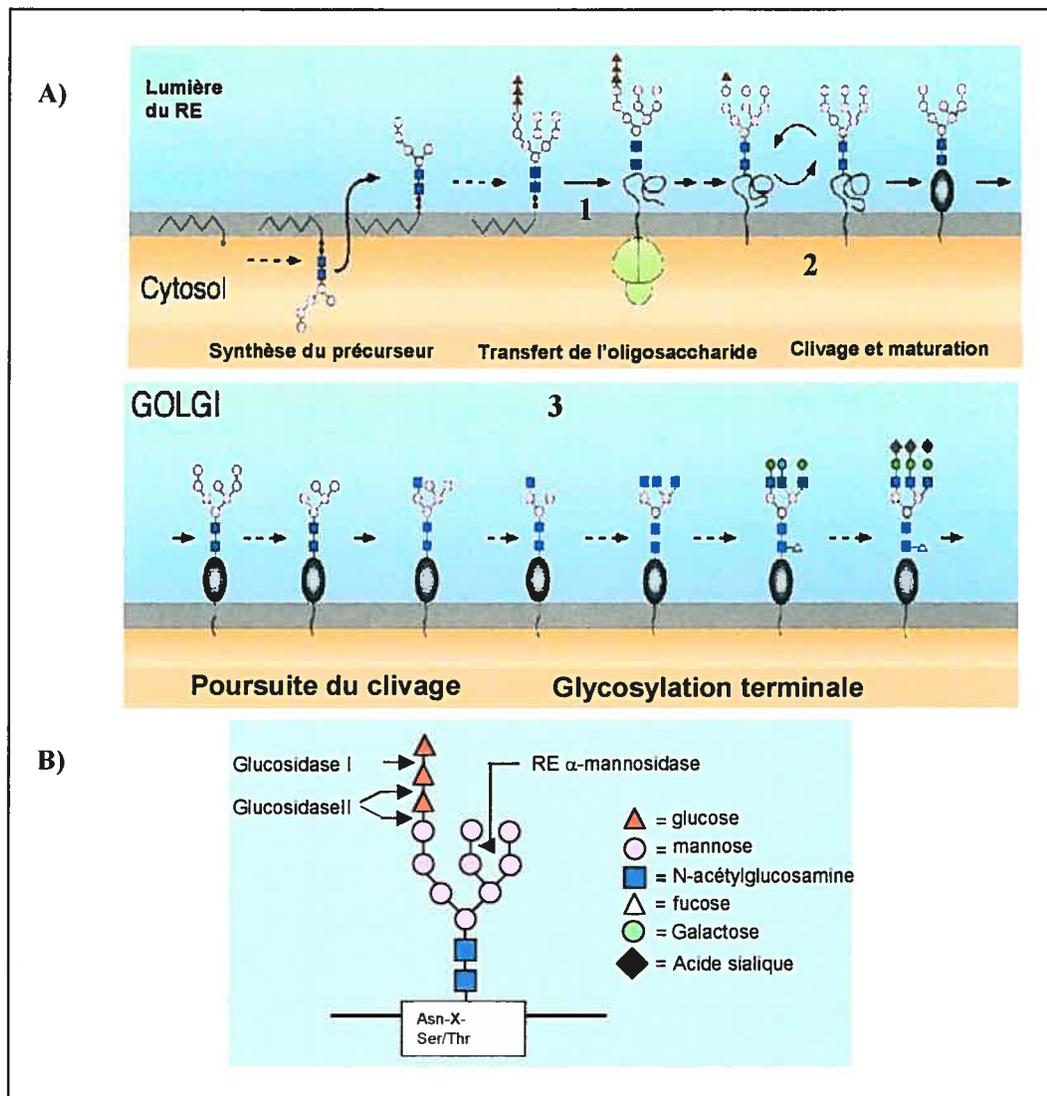


Figure 2 La *N*-glycosylation d'une protéine nouvellement synthétisée. A) La *N*-glycosylation d'une protéine a lieu dans le RE où l'oligosaccharide transféré (1) y est modifié (2). Rendu dans l'appareil de Golgi, une maturation finale a lieu (3). B) Composition en saccharides et les différentes enzymes qui interviennent dans les premières étapes de la maturation d'un oligosaccharide. (Modifié d'après [14])

donner à l'oligosaccharide la structure (Man<sub>7-8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>). Dans la levure *S. cerevisiae*, le sucre complexe sera Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> dû à l'action de l' $\alpha$ -mannosidase. Par contre on ne retrouve aucune mannosidase chez *S. pombe*, alors la composition de l'oligosaccharide à sa sortie du RE est Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>. Dans cette même organelle, on retrouve une autre enzyme, l'UDP-glucose glycoprotéine:glucosyltransférase (UDP-GT), qui peut modifier la structure de l'oligosaccharide et dont il sera question dans la section 1.5. Troisièmement, la glycoprotéine est dirigée vers le Golgi, où il y a clivage de plusieurs mannoses et addition de molécules GlcNAc, acide sialique, fucose et galactose [14,15].

La *N*-glycosylation joue un rôle primordial dans le repliement et l'activité biologique des différentes protéines sécrétées [14]. En effet, l'ajout d'embranchements sur une chaîne peptidique permet d'augmenter la complexité des protéines et ainsi d'accroître leur spécificité d'action. Les oligosaccharides jouent également un rôle important dans le transport et le ciblage des glycoprotéines à l'intérieur de la cellule en servant d'étiquettes. Par exemple, dans le RE, il y a une lectine homo-oligomérique membranaire, ERGIC-53, qui lie spécifiquement les mannoses des glycoprotéines et les dirige dans des vésicules jusqu'au Golgi [16]. Dans le cas des hydrolases lysosomales, un groupement mannose-6-phosphate est reconnu par le récepteur M-6-P dans le Golgi et entraîne ces protéases vers les lysosomes [17]. Les oligosaccharides sont également impliqués dans la dégradation des glycoprotéines comme nous le verrons plus loin (section 1.6.2).

En plus de l'ajout d'oligosaccharides sur leur chaîne peptidique, les protéines nouvellement synthétisées subissent deux autres modifications covalentes. Les enzymes qui catalysent ces étapes limitantes dans le repliement des protéines sont les foldases. Les peptidyl-prolyl cis/trans isomérases (PPI) accélèrent l'isomérisation des liens peptidiques prolyl et les protéines disulfide isomérases (PDI) catalysent la formation des ponts S.

### 1.2.2 L'isomérisation des prolines

Dans chacun des compartiments de la cellule où il y a des protéines qui doivent se replier (cytoplasme, noyau, mitochondrie, RE), on retrouve des PPI. Ces enzymes agissent en accélérant la vitesse de rotation du lien en N-terminal d'une proline (X-Pro) afin de changer la conformation *cis* en *trans* (Figure 3). Sans la catalyse enzymatique, cette isomérisation est thermodynamiquement défavorisée [18]. Bien que les PPI participent sans aucun doute au repliement des protéines, leur rôle dans ce processus reste encore bien mal compris. Aucune étude n'a démontré de façon claire qu'elles facilitent le repliement des protéines *in vivo* dans le RE [7]. La famille d'enzymes des PPI a été divisée en trois classes basées sur l'inhibition par différentes drogues : 1) Les « Cyclosporin A-binding cyclophilins », 2) les « FK506-binding proteins » et 3) les « Parvulin-like PPIases » qui ne lient pas d'immunosuppresseurs. Dans la première famille, plusieurs cyclophilines ont été identifiées et classées en 4 familles selon des similarités de séquences : CypB, CypC, CypD

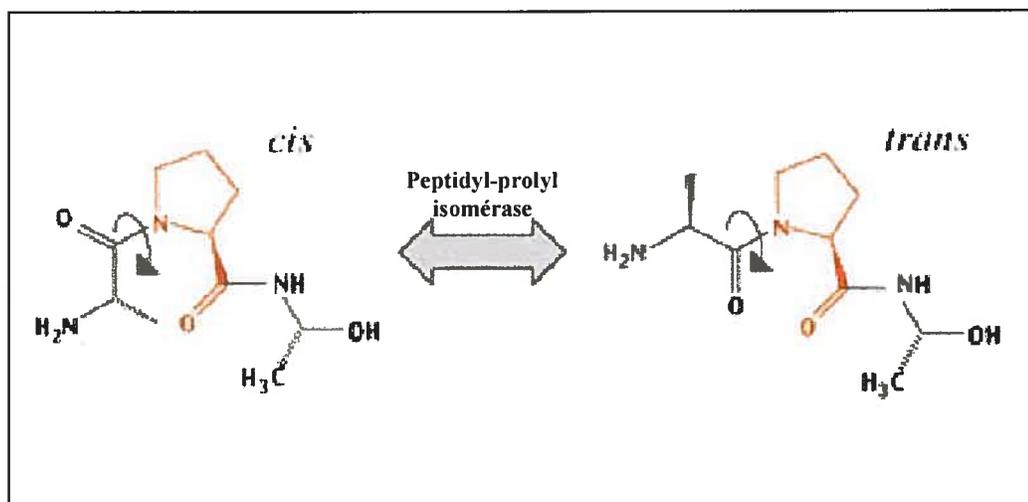


Figure 3 Réaction catalysée par la peptidyl-prolyl isomérase. La flèche démontre l'isomérisation du lien peptidique qui précède une proline (en rouge). La forme *cis* ou *trans* existe à l'équilibre. Plus de détails dans le texte. (Figure tirée de [18])

et cyclophiline de type NinaA [19]. Plusieurs d'entre elles sont présentes dans le RE puisqu'elles possèdent un peptide signal pour y être dirigé. La cyclophiline NinaA des cellules photoréceptrices des yeux de *Drosophila melanogaster* est un type très particulier de PPI puisque son activité se limite seulement à réguler le niveau de rhodopsins 1 et 2 fonctionnels [6]. Lorsque NinaA est mutée, il y a accumulation de ces deux seuls substrats dans le RE. Dans la deuxième famille, les protéines FKBP65 et FKBP13 de mammifères sont retrouvées dans le RE [19]. De plus, l'expression de l'homologue chez *S. cerevisiae* des FK506 binding protein, Fpr1p (FKBP proline rotamase 1), est augmentée quand il y a accumulation de protéines mal repliées dans le RE [20]. Dans la troisième famille, on retrouve la protéine parvulin de *E. coli*, Pin1 et hPar14 chez les mammifères ainsi que Ess1 chez *S. cerevisiae* [18]. Les études sur les PPI portent surtout sur leur rôle dans le système immunitaire et dans le contrôle du cycle cellulaire dans lesquels elles interviennent en changeant la conformation de certaines protéines [18]. Ces dernières fonctions sont régulées par la phosphorylation de leurs substrats.

### 1.2.3 La formation de ponts disulfure

Dans le RE, l'environnement est très différent de celui observé dans le cytoplasme. En fait, le RE est physiologiquement très semblable au milieu extracellulaire. Deux facteurs affectant le repliement des protéines présentent de grandes variations entre ces deux compartiments de la cellule : 1) La concentration en  $\text{Ca}^{++}$  (1 mM dans le RE et 100 nM dans le cytoplasme) et le potentiel oxydo-réducteur (-230 mV dans le RE comparativement à -150 mV dans le cytosol) [6]. Dû à l'environnement très oxydant du RE, une grande proportion de protéines y pénétrant acquièrent des ponts disulfure. Ceux-ci sont formés par l'oxydation de groupements thiol libres de cystéines à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique et sont nécessaires à l'atteinte de la structure native. Dans le cytosol, la formation de tels liens covalents est cinétiquement et thermodynamiquement défavorable parce que l'environnement est plutôt réducteur. Il y a maintenant 40 ans qu'on a identifié

la première enzyme catalysant l'isomérisation de ponts disulfure *in vivo*, la PDI (Protein disulfide isomerase), une protéine-thiol oxydoréductase et depuis, des homologues de cette protéine ont été isolés dans plusieurs organismes [21]. En effet, chez les mammifères on retrouve PDI, PDIp, PDIr, Erp57, Erp72 et P5, chez la levure *S. cerevisiae* il y a Pdi1p, Mpd1-2p, Eug1p et Eps1p [22]. Chez les procaryotes, on a identifié quatre homologues de PDI, DsbA-D, situés dans l'espace périplasmique, un endroit également favorable à la formation de ponts S-S [22]. Aucun homologue de PDI n'a encore été isolé chez *S. pombe*, non pas parce qu'il n'y en pas, mais parce qu'aucun effort n'a été fait dans ce sens. PDI est en fait une sous-unité de deux enzymes du RE très bien caractérisées: prolyl 4-hydroxylase et la protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP, microsomal triglyceride transfer protein) [23]. Les PDI sont retrouvées dans plusieurs endroits de la cellule, le cytoplasme, le RE et toute la voie de sécrétion, dans des endosomes ainsi qu'à la surface de la membrane. Dans le RE, l'expression de cette foldase est augmentée suite à des stress induisant le mauvais repliement. Elles y exercent aussi différentes fonctions dont la régulation cellulaire de l'homéostasie du  $Ca^{++}$  [23]. On a également accepté pendant un certain temps que PDI jouait un rôle de chaperone classique. En effet, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* qu'elle facilitait le repliement des protéines nouvellement synthétisées, grâce à des interactions peptide-peptide [24,25]. Cependant, il devient de plus en plus clair que cette propriété n'est pas indépendante de sa fonction de catalyse de la formation des ponts S-S. En fait, les interactions peptide-peptide seraient nécessaires pour accélérer cette étape limitante du repliement [26].

La famille des PDI est responsable, *in vivo*, de la formation, la réduction (dans le cytoplasme et RE) et l'isomérisation des ponts S-S. Pour ce faire, PDI possède deux paires de cystéines dans la séquence Cys- $X_a$ - $X_b$ -Cys qui sont responsables de son activité enzymatique [22]. Quand ces cystéines sont dans un état oxydé, comme on peut le voir à la Figure 4, PDI peut transférer un lien disulfide à un substrat, le groupement thiol des cystéines se retrouve alors sous la forme réduite. Sous la forme SH, PDI peut échanger des

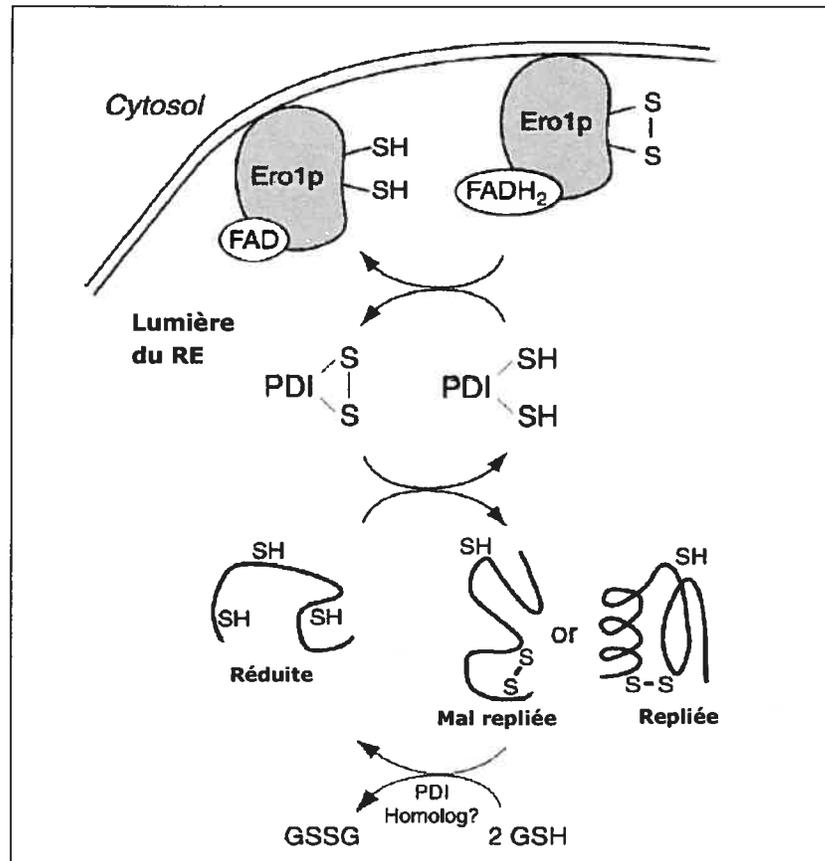


Figure 4 **La formation des ponts disulfure dans les protéines en repliement.** Dans le RE, PDI catalyse la formation des ponts S-S. Avec le FAD, Ero1p oxyde PDI afin de la rendre compétente à la catalyse enzymatique. Le glutathion présent dans le RE joue un rôle non-essentiel dans la catalyse de la formation des ponts S-S. PDI (Protéine disulfide isomérase), SH (atomes de soufre des cystéines sous la forme réduite), GSSG (2 molécules de glutathion oxydées), GSH (molécule de glutathion réduite), FAD (flavine adénine dinucléotide oxydée), FADH<sub>2</sub> (flavine adénine dinucléotide réduit). Pour plus de détails, lire le texte. Adaptée de [6]

liens S de substrats en voie de repliement dans le RE ou être à nouveau oxydée. Pendant longtemps le mécanisme par lequel PDI redevenait oxydée était incompris.

La catalyse de la formation de ponts disulfure dans le RE nécessite la participation d'une autre résidente du RE, Ero1p (ER Oxidoreductin 1p), identifiée par des analyses génétiques chez *S. cerevisiae* [27]. Cette enzyme membranaire est impliquée dans le maintien de l'état oxydatif du RE et par conséquent de l'oxydation de PDI lorsqu'elle se trouve sous sa forme réduite. Cette réaction est rendue possible par la présence de FAD qui agit comme co-facteur de Ero1p [revu dans 6]. Un autre élément important dans la formation des ponts S-S est le glutathion présent dans le RE sous forme réduit et oxydé (figure 4). Il existe une quantité importante de GSH et de GSSG et en fait, le glutathion est le tampon rédox le plus abondant dans le RE [22]. Cependant, il ne semble pas qu'il soit essentiel à la formation des ponts S-S puisque dans des levures *S. cerevisiae* sans *GSH1*, donc sans glutathion, l'oxydation des ponts disulfure se fait avec une cinétique normale [28]. Il semble donc que le glutathion soit un agent réducteur empêchant l'hyperoxydation du RE.

Comme nous venons de le voir, en entrant dans le RE, les protéines en voie de synthèse et/ou repliement subissent des modifications covalentes, telles la glycosylation, l'isomérisation des prolines et la formation de liens disulfure. En plus des enzymes qui accélèrent la vitesse de ces étapes, il existe une autre classe de protéines qui facilite le repliement dans le RE. Ces protéines, appelées chaperones moléculaires, stabilisent des protéines mal ou partiellement repliées afin d'éviter la formation d'agrégats en interagissant avec leurs substrats. Ces contacts se font soit via des interactions peptide-peptide ou via des interactions peptide-oligosaccharide. Parmi les chaperones moléculaires, on retrouve GRP94, BiP (binding immunoglobuline protein), et les calnexines/calréticulines.

### 1.3 GRP94

Membre de la famille des Hsp90, GRP94 est une chaperone moléculaire très abondante dans le RE, représentant 5 à 10 % des protéines luminales. Elle est retrouvée chez les mammifères, chez le nématode *C. elegans* et chez les plantes, mais est absente chez la levure et les bactéries. Comme la majorité des chaperones, elle est constamment exprimée et son expression est augmentée en situation de stress tels une diminution de la quantité de glucose et un pH extracellulaire faible. GRP94 a un domaine N-terminal très homologue à celui de Hsp90 et en C-terminal on retrouve un domaine de dimérisation. En fait, GRP94 existe sous forme d'homodimère et il semble qu'une molécule de GRP94 a la forme d'une canne de Noël [29]. C'est une protéine soluble qui possède un signal de rétention KDEL, un site de glycosylation exploité et des sites de phosphorylation sur quelques résidus thréonine et sérine. Bien que le rôle de sa glycosylation ne soit pas précis, le rôle de la phosphorylation est de prévenir son association avec les chaînes légères des immunoglobulines et pourrait jouer un rôle dans la régulation de son activité [30]. Comme la majorité des protéines résidentes du RE, Grp94 a de l'affinité pour le  $\text{Ca}^{++}$ , et sa liaison au calcium pourrait réguler ses interactions avec les autres protéines. Contrairement à d'autres chaperones moléculaires qui lient une très grande variété de protéines dans le RE, GRP94 ne possède qu'un faible éventail de substrats avec lesquels elle interagit : les chaînes des IgG, les MHC de classe II, la thyroglobuline, erB2, une glycoprotéine du virus de l'herpes, l'apolipoprotéine B, le collagène, la protéine C et BSDL [28]. Des études d'interactions entre les IgG, BiP (section 1.4) et GRP94 ont mené à formuler un modèle voulant que GRP94 lie ses substrats après que Bip ou d'autres chaperones soient intervenues. De plus, GRP94 n'a de l'affinité que pour des intermédiaires de repliement très tardifs ou des protéines partiellement assemblées [30,31]. Cette chaperone possède une activité ATPasique très faible mais dont le rôle au niveau de la liaison chaperone-substrat n'est pas très bien compris. Il est important de rappeler, afin de comprendre le rôle moléculaire limité que joue cette chaperone, qu'elle ne lie qu'un petit nombre de substrats

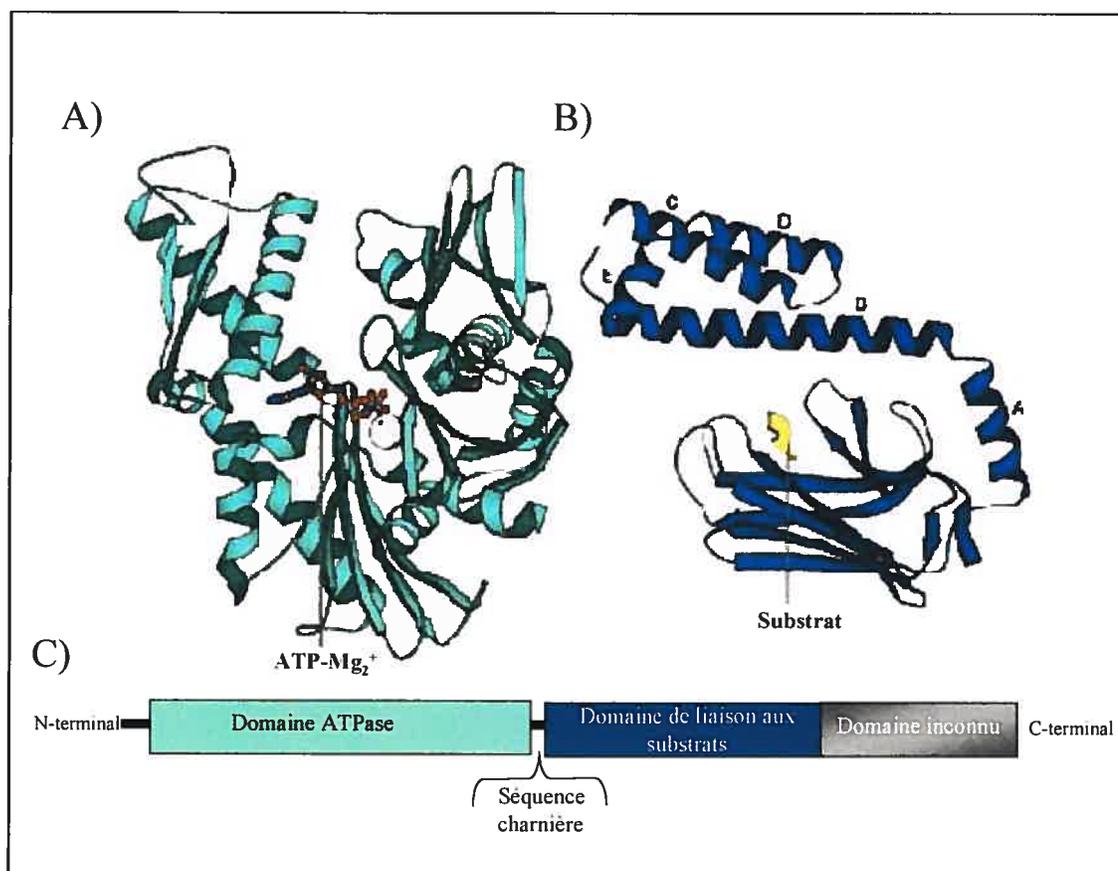
et qu'elle n'est pas retrouvée chez les organismes unicellulaires, contrairement à BiP qui est une protéine ubiquitaire jouant un rôle de premier plan dans le repliement des protéines.

## 1.4 BiP et les HSP70

Les membres de la famille des Hsp70 (Heat shock proteins 70) et des Hsc70 (Heat shock cognate proteins 70) sont retrouvés dans tous les organismes et dans presque toutes les organelles. Ces protéines sont composées des mêmes domaines et agissent dans un même cycle dépendant de l'ATP, elles sont donc structurellement et fonctionnellement très similaires. Elles interviennent dans plusieurs processus cellulaires : repliement, translocation dans la mitochondrie ou le RE et rétrotranslocation vers le cytosol. Dans cette section, nous allons principalement nous intéresser à la chaperone moléculaire BiP membre de la famille des Hsp70 et retrouvée dans le RE [32]. En 1977, des chercheurs ont identifié une protéine dont l'expression était régulée par le glucose, Grp78 (Glucose regulated protein 78) [33]. Par la suite, en 1983 un autre groupe de chercheurs a identifié une protéine liée aux chaînes lourdes des immunoglobulines en absence des chaînes légères dans le RE des cellules pre-B [34]. Peu après, on s'est rendu compte que GRP78 identifiée quelques années plus tôt était en fait la même protéine que BiP (Binding immunoglobuline protein).

### 1.4.1 Caractéristiques structurelles de BiP

La chaperone moléculaire BiP est une protéine résidente du RE qui possède un signal de rétention (KDEL chez les mammifères [35], HDEL chez *S. cerevisiae* [36,37] et ADEL chez *S. pombe* [38]) et un peptide signal pour la localisation au RE. Les séquences de la majorité des Hsp/Hsc70 sont très homologues et ce qu'on constate c'est qu'elles possèdent toutes un domaine qui contient l'activité ATPasique en N-terminal et un autre domaine au centre qui est responsable de la liaison aux substrats. Bien que la structure



**Figure 5 Structure des domaines ATPase et de liaison aux substrats des HSP70.** A) La structure en ruban à gauche est celle du domaine ATPase de Hsc70 bovine. La sphère blanche représente l'ion  $Mg^{2+}$  et la molécule en rouge est l'ATP [39]. B) La structure en bleue est celle du domaine de liaison aux substrats de DnaK de *E.coli*. En jaune, on voit le substrat NRLLLTG qui est lié dans la cavité [40]. C) Structure linéaire de BiP, en N-terminal il y a un peptide signal pour la localisation au RE, il y a une courte séquence charnière d'une dizaine d'acides aminés qui fait le lien entre les deux domaines et en C-terminal il y a une séquence de rétention dans le RE (ADEL chez *S.pombe*).

tridimensionnelle complète de BiP et d'aucune Hsp/Hsc70 n'ait jamais été résolue, celle de quelques domaines de Hsp/Hsc70 l'a été. Comme on peut le voir à la Figure 5 A) et B), par diffraction des rayons X, la structure du domaine ATPase de Hsc70 bovin [39] et du domaine de liaison aux substrats de la protéine DnaK de *E.coli* ont été déterminées [40]. On observe que le domaine ATPase est formé par 4 sous-unités constituant une cavité au milieu de laquelle la molécule d'ATP va se lier [39]. Le domaine de liaison aux peptides, quant à lui, est composé principalement d'une région riche en feuillets  $\beta$  formant un canal où se lie le peptide en voie de repliement. Ce domaine comprend également une autre structure d'hélices  $\alpha$  formant un couvercle flexible [40]. En plus de ces deux domaines, la structure de BiP inclue une séquence charnière d'environ une dizaine d'acides aminés qui fait le lien entre les deux domaines et un troisième domaine à l'extrémité C-terminal dont la fonction n'est pas connue. Des expériences de criblage d'affinité de larges banques de peptides ont démontré que le domaine d'affinité aux peptides se lie préférentiellement à des peptides possédant des motifs heptamériques Hy-(W/X)-Hy-X-Hy-X-Hy où Hy est surtout tryptophane, phénylalanine, leucine, méthionine ou isoleucine et W est tryptophane [32]. Ces résultats suggèrent donc que BiP puisse lier une très grande variété de substrats, lorsque ces motifs sont exposés au solvant dans le RE.

Chez les mammifères, BiP existe sous forme monomérique ou oligomériques et peut être phosphorylée et rybosylée [32]. Chez *S. pombe*, BiP possède un site de glycosylation qui est utilisé [38]. Le rôle de ces modifications est encore très peu compris, bien qu'on suggère qu'elles puissent modifier l'activité ATPasique de BiP ou sa spécificité pour certains substrats. L'expression de BiP est modulée en fonction des besoins de la cellule en chaperone moléculaire. BiP est en effet une cible du UPR (décrit dans la section 1.6.1) et son niveau d'ARNm augmente en situation de stress affectant le repliement des protéines dans le RE [59].

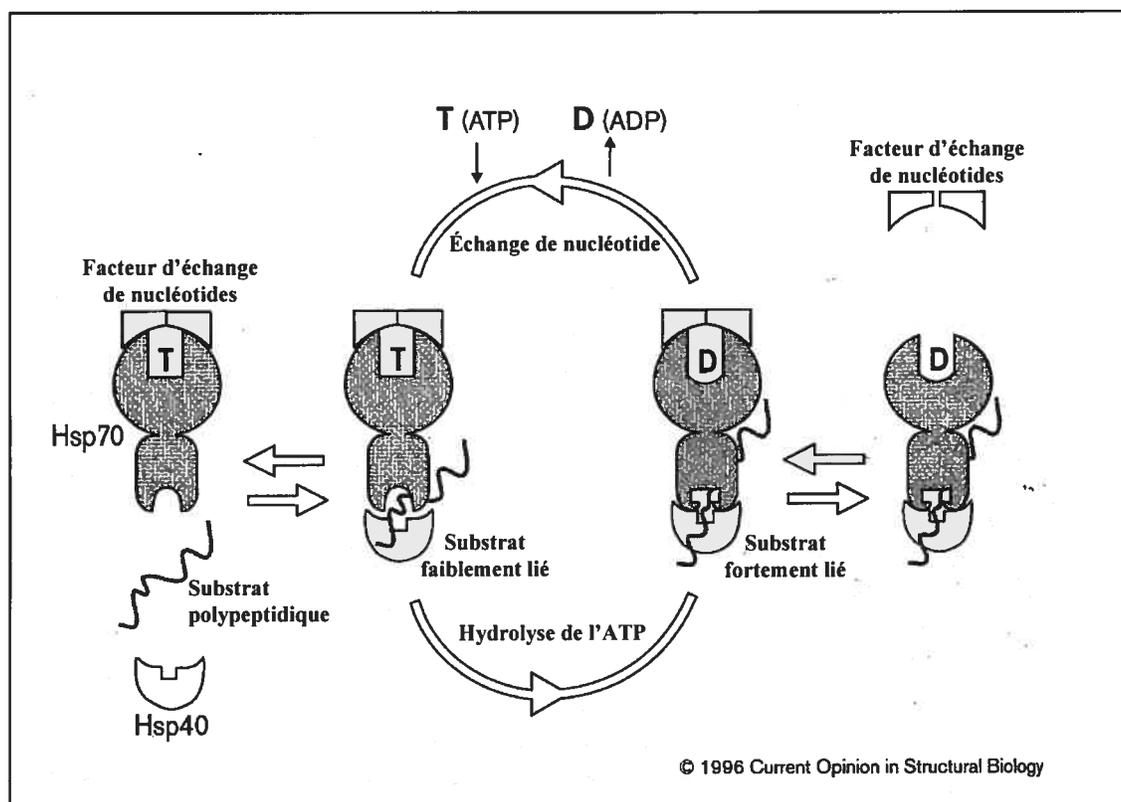


Figure 6 Cycle de liaison et relâchement d'un substrat par les membres de la famille des Hsp70, Hsc70. Les HSP70 lient et relâchent les substrats lorsqu'une molécule d'ATP (T) est liée au domaine ATPase. Après l'hydrolyse, généralement facilitée par des membres de la famille des HSP40, le substrat est lié plus fortement à HSP70-ADP (D). Un facteur d'échange GrpE favorise l'échange de l'ADP par un ATP et ainsi le cycle de liaison recommence. Plus de détails sur ce mécanisme sont disponibles dans le texte. (Tirée de [41])

### 1.4.2 Le cycle des HSP70 et leurs partenaires

Les deux domaines de BiP sont intimement reliés et la liaison des substrats dépend en grande partie du domaine ATPasique. Comme illustré à la Figure 6, lorsque le domaine ATPase de BiP est lié à l'ATP, le « couvercle » du domaine de liaison aux substrats est ouvert, permettant ainsi un échange rapide de substrats et BiP à une affinité faible pour ceux-ci [41]. Suite à l'hydrolyse de l'ATP, la conformation du domaine de liaison aux peptides se modifie, augmentant l'affinité qu'a BiP pour les protéines en voie de repliement. Ce cycle de liaison et relâchement des peptides dépend grandement de la vitesse à laquelle BiP hydrolyse l'ATP et échange l'ADP pour une nouvelle molécule d'ATP. Ces dernières réactions sont facilitées par les activités des protéines qui stimulent l'activité ATPasique de BiP et des facteurs d'échange de nucléotides. Les membres de la famille des Hsp40 aident à stabiliser l'interaction entre BiP et les peptides car ce sont eux qui stimulent l'hydrolyse de l'ATP. Ces protéines sont caractérisées par la présence, dans toutes les Hsp40, d'un domaine DnaJ contenant une séquence HPD, qui interagit directement avec les Hsp70. Chez les souris, MTJ1, une protéine avec un DnaJ, a été isolée et clonée et agit comme stimulateur de BiP/Grp78 [42,43]. Maintenant, quatre DnaJ du RE ont été identifiées et sont désignées ERdj 1-4 ( Endoplasmic Reticulum DnaJ 1-4) [42,44-47]. À l'exception de ERdj2, il a été démontré pour les autres ERdj qu'*in vitro* elles interagissent avec BiP d'une façon dépendante de l'ATP via leur domaine J et qu'elles peuvent stimuler son activité ATPasique. Chez *S. cerevisiae*, Kar2p interagit avec trois membres de la famille des Hsp40, soient Sec63p, Scj1p et Jem1p, afin de remplir ses différentes fonctions [48-50]. Scj1p interagit avec Kar2p dans le réticulum de la levure afin de faciliter le repliement des protéines nouvellement synthétisées. Jem1p et Sec63p interagissent avec Kar2p durant la karyogamie dans le but d'entraîner la fusion des membranes. De plus, Sec63p intervient dans la translocation des nouvelles protéines et la rétrotranslocation des protéines vers le cytoplasme [32]. Le cycle des HSP70 comprend comme nous venons de le voir, HSP70 et des protéines de la famille des HSP40 qui

agissent comme stimulateur de l'hydrolyse de l'ATP. Il y a également une autre famille de protéines, les facteurs d'échange de nucléotides GrpE, dont la fonction est d'échanger la molécule d'ADP obtenue suite à l'hydrolyse par une nouvelle molécule d'ATP. Ces protéines permettent d'augmenter le nombre de cycles de liaison et relâchement des substrats par les HSP70 dans un laps de temps donné. Une telle protéine dans le RE a d'abord été isolée chez *Yarrowia lipolytica* mais c'est son homologue Sls1p/Sil1p chez *S. cerevisiae* qui a été démontré la première comme étant une GrpE [51-53]. Par double hybride, les chercheurs ont démontré que Sls1p interagit avec Kar2p quand celle-ci est liée à une molécule d'ADP. La première GrpE du RE chez les mammifères a été isolée encore une fois à l'aide du double hybride et est désignée BAP (BiP associated protein) [54]. Jusqu'à présent, bien que BiP ait été cloné chez *S. pombe*, aucun membre de la famille des Hsp40 ou GrpE n'a été isolé.

### 1.4.3 Les fonctions de BiP

Les fonctions cellulaires de BiP ont été grandement étudiées. Elle a été la première chaperone du RE à être identifiée et à être reconnue comme faisant partie du mécanisme de contrôle de qualité des protéines. BiP prévient la sécrétion de différentes protéines qui passent par le RE avant qu'elles n'aient acquis leur conformation native en s'associant avec celles-ci. Elle favorise également le repliement des protéines et l'assemblage des multimères [55]. D'autres études sur les fonctions de BiP ont été menées principalement chez *S. cerevisiae*. Kar2p interagit avec Sec63p, une protéine membranaire du RE, et ensemble ils constituent le moteur nécessaire à tirer les protéines à travers le pore de translocation. McClellan *et al.* ont démontré que des mutations qui empêchent l'interaction avec Sec63p et des changements conformationnels ATP-dépendant inhibait la translocation de protéines nouvellement synthétisées *in vivo* et *in vitro* [56]. Également, il a été démontré à l'aide de protéines purifiées que dans des microsomes reconstitués *in vitro*, BiP maintenait la perméabilité du pore de translocation en scellant les translocons du RE [57]. BiP joue un rôle dans l'exportation des protéines mal repliées vers le cytosol pour être

dégradées par le protéasome [58]. Finalement, BiP contribue comme la majorité des protéines résidentes du RE à la réserve cellulaire du  $\text{Ca}^{++}$  [32].

## 1.5 La famille de la calnexine/calréticuline

Dans le réticulum endoplasmique on retrouve une autre famille de chaperones moléculaires jouant un rôle essentiel dans le repliement: la calnexine/calréticuline. La structure moléculaire de la calnexine est maintenant très bien connue et elle a été clonée à partir d'un grand nombre d'espèces de mammifères (chien, humain, souris, rat), de la plante *Arabidopsis thaliana*, de champignons tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* et *Aspergillus niger* ainsi que de la mouche *Drosophila melanogaster* [60-68]. La présence de cette protéine dans plusieurs cellules eucaryotes indique qu'elle joue un rôle très conservé et très fondamental à la vie.

### 1.5.1 La structure de la calnexine

Le nom calnexine a été donné après l'avoir identifiée comme une phosphoprotéine transmembranaire de type I du RE homologue à la calréticuline [60]. Par la suite, on s'est rendu compte que la protéine p88 identifiée auparavant comme une chaperone du MHC I était la même protéine que la calnexine [69]. En effet, il avait été démontré que pendant leur biogenèse, les molécules d'histocompatibilité de classe I se liait à une nouvelle chaperone, p88, et que l'interaction n'avait lieu que dans le RE [70]. Il est maintenant bien établi que la calnexine lie un grand nombre de substrats glycosylés et non-glycosylés. À la Figure 7 A), on peut voir la structure linéaire de la calnexine/calréticuline. La calréticuline est l'homologue soluble de la calnexine et elle possède un signal de rétention dans le RE (KDEL). Les deux protéines possèdent deux motifs (motif 1 (I-DPD/EA-KPEDWDD/E) et motif 2 (G-W- -P-I- NP-Y)) très conservés et répétés en tandem. Il y a trois répétitions des

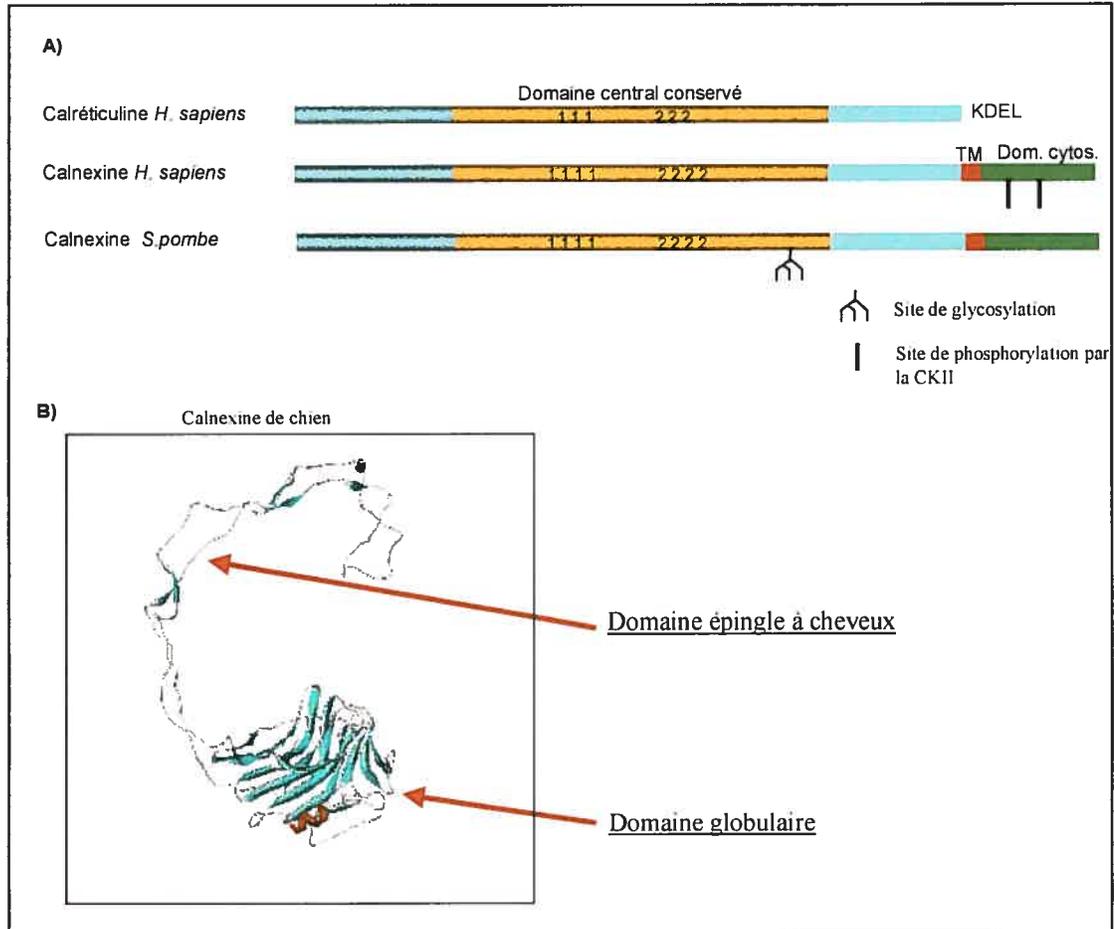


Figure 7 **Structure de la calnexine.** A) Représentation linéaire de la calnexine/calréticuline humaines et de la calnexine de la levure *S. pombe*. 1 représente la séquence (I-DPD/EA-KPEDWDD/E) et 2 désigne le motif (G-W- -P-I- NP-Y), TM défini le domaine transmembranaire et KDEL est la séquence de rétention dans le RE. B) Structure tridimensionnelle de la calnexine de chien résolue à 2,9 Å. [73]

motifs 1 et 2 dans la calréticuline et quatre répétitions de ces motifs dans la calnexine de mammifères et *S. pombe*, alors qu'on ne trouve qu'une seule fois le motif 1 dans la calnexine de *S. cerevisiae*. Ce que l'on peut remarquer de ces motifs, c'est qu'ils sont riches en résidus proline. Pour cette raison, on a nommé cette région centrale hautement conservée (hcd) le domaine P [71]. Des analyses de RMN de ce domaine de la calréticuline et de cristallographie de la partie soluble de la calnexine ont démontré que les résidus 277 à 414 formant ces deux motifs sont organisés en épingle à cheveux qui s'allonge à l'extérieur de la structure. Les motifs 2 se trouvent repliés sur les motifs 1 et chacun des motifs forme un petit feuillet  $\beta$  (en bleu cyan dans le domaine épingle à cheveux sur la figure 7 B) [72,73]. La structure tridimensionnelle de la calnexine de chien révèle un autre domaine formé des résidus 61 à 262 et 415 à 45 et organisé majoritairement en feuillets  $\beta$ , un domaine globulaire similaires à celui des lectines de végétaux [73].

Dans toutes les calnexines étudiées, à l'exception de *S. cerevisiae*, on retrouve un domaine cytosolique dont la longueur en acides aminés varie [74]. Le domaine cytosolique de la calnexine de mammifères contient différentes régions, dont un domaine de phosphorylation et un signal pour recycler la calnexine vers le RE. Il a été démontré que la calnexine est phosphorylée *in vivo* par la caséine kinase II (CKII) et par la kinase ERK1 (Extracellular-signal Regulated Kinase-1). L'ajout de groupements phosphate sur ces séquences spécifiques augmente l'association de la calnexine avec les ribosomes. Il a été proposé que cela favorise le rapprochement de la calnexine près du pore de translocation afin de promouvoir plus rapidement et efficacement le repliement des nouvelles protéines [75,76]. La phosphorylation de la calnexine a également comme fonction de contrôler le niveau de  $\text{Ca}^{++}$  à l'intérieur du RE [77]. D'autres modifications ont été rapportées chez la calnexine de *S. pombe* et *S. cerevisiae* où la partie luminale est glycosylée une et cinq fois respectivement. Toutefois, le rôle que joue la glycosylation n'est pas encore connu [63-65].

Dans cette famille on compte deux autres membres qui sont très identiques mais que l'on retrouve seulement dans les testicules : calmégine et calnexine-t [74].

### 1.5.2 La calnexine agit dans un cycle

Les premières études sur la calnexine ont démontré qu'elle interagissait avec un grand nombre de substrats différents, mais on ne savait pas comment avait lieu cette interaction. C'est d'abord Ou *et al.* qui ont montré que la calnexine interagissait spécifiquement et transitoirement avec les protéines N-glycosylées [78]. Par la suite, le groupe de Helenius a rapporté que l'utilisation de tunicamycine (inhibiteur de la glycosylation), de castanospermine et de 1-deoxynojirimycin (inhibiteur de glucosidase I et II) prévenait l'association de la calnexine avec HA (Hemagglutinine) et VSVG (Vesicular Stomatitis Virus G protein) [79]. Ces données suggéraient donc que la calnexine était spécifique aux glycoprotéines monoglycosylées et ont conduit les auteurs à élaborer un modèle d'action de la calnexine. Ce modèle, connu comme « le cycle de la calnexine/calréticuline », implique différentes protéines du RE. Comme on peut le voir à la Figure 8, après clivage séquentiel des résidus externes de glucose par la glucosidase I et II, l'oligosaccharide de la glycoprotéine est mono-glucosylé [14]. À cette étape, la glycoprotéine peut s'associer via son oligosaccharide à la calnexine/calréticuline. Cette interaction entre la calnexine et la protéine, qui peut durer de quelques minutes à quelques heures, favorise le repliement de la nouvelle protéine en empêchant la formation d'agrégats de protéines. Après que la calnexine ait relâché le substrat, celui-ci peut être reglycosylé par une protéine résidente du RE, la UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransférase (UDP-GT), s'il n'est pas dans sa structure native. Cette enzyme soluble a une préférence pour les oligosaccharides riches en mannose et sert de senseur du repliement [14]. En fait, il a été démontré que ce sont seulement les oligosaccharides des domaines partiellement mal repliés qui seront reglycosylés par cette enzyme [80]. L'UDP-GT ne reconnaît pas de séquence particulière, mais est plutôt sensible à l'exposition de régions hydrophobes, à une

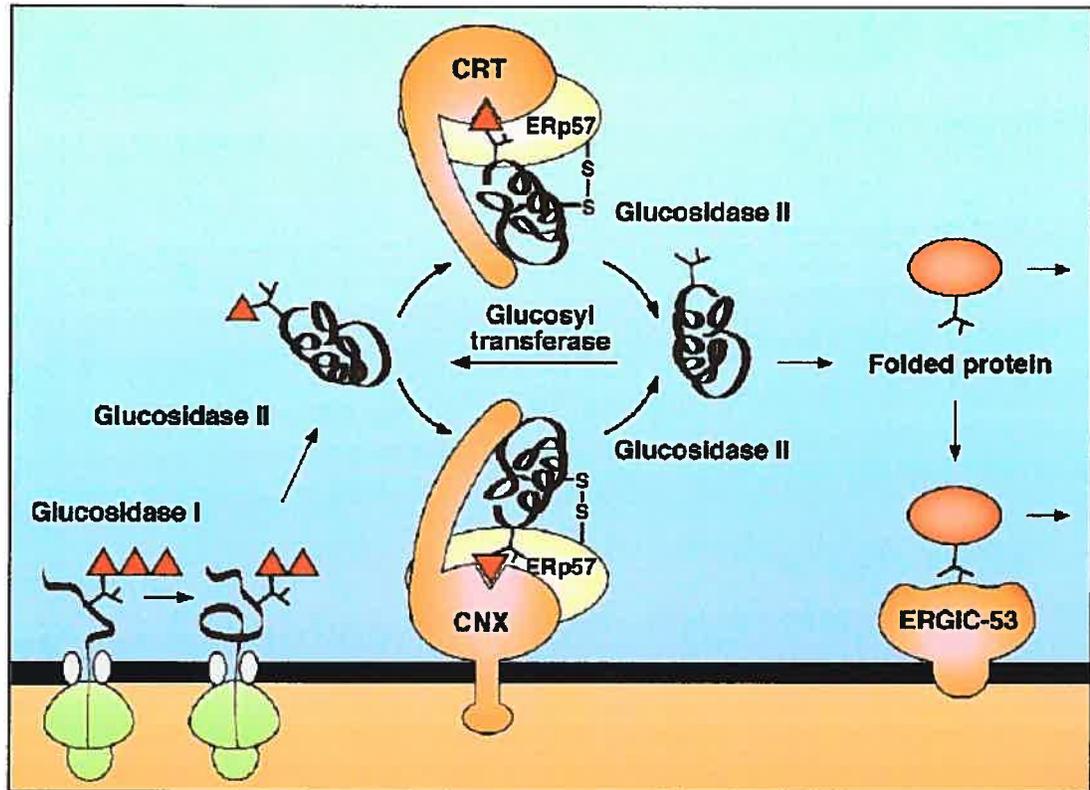


Figure 8 **Le cycle de la calnexine/calréticuline.** Ces deux chaperones moléculaires lient préférentiellement des protéines mono-glucosylées. Lorsque le glucose restant est clivé par la glucosidase II, l'UDP-glucose glycoprotéine:glucosyltransférase (UDP-GT) peut ajouter un glucose et ainsi permettre une nouvelle interaction entre la calnexine/calréticuline et la protéine mal repliée. Les triangles rouges représentent des résidus de glucose. Plus de détails sur ce cycle dans le texte. [14]

mobilité accrue de la chaîne peptidique ou n'importe quelles autres propriétés biophysiques que possèdent une protéine mal repliée [81]. L'action de l'UDP-GT permet à une protéine en voie de repliement d'entrer dans le cycle de la calnexine à nouveau et de pouvoir se replier correctement. Lorsque la protéine est dans la bonne conformation, elle pourra continuer dans la voie de sécrétion.

La protéine Erp57, une thiol oxidoréductase, fait également partie de ce cycle (Figure 8). En effet, il a été démontré que cette résidente du RE est spécifique seulement pour les protéines glycosylées et qu'elle forme un complexe avec les chaperones calnexine/calréticuline [82,83]. Le domaine épingle à cheveux des lectines est la région impliquée dans la formation de ce complexe [84].

### 1.5.3 La calnexine comme chaperone classique

Le modèle que je viens de décrire prend en considération seulement le fait que la calnexine agisse à titre de lectine et non pas comme une chaperone classique, pouvant faire des interactions peptide-peptide avec ses substrats. Pourtant, il avait été démontré que l'oligosaccharide pouvait être clivé sans défaire l'association calnexine-substrats [85]. Le groupe de Williams a donc proposé un modèle en deux étapes postulant que l'interaction oligosaccharide-calnexine servait d'étape initiale, mais que par la suite les lectines pouvaient interagir directement via les peptides [86]. Il a été grandement démontré que la calnexine/calréticuline pouvait agir comme une chaperone classique aussi bien *in vitro*, où elle prévient l'aggrégation de protéines dénaturées qu'*in vivo*, où elle peut être co-immunoprécipitée avec des substrats qui ne sont pas mono-glucosylés [87-90]. Ceci peut être démontré soit en utilisant des inhibiteurs de glycosylation, de glucosidase I et II ou en utilisant des substrats non-glycosylés. De plus, une étude présentant les fonctions des différentes régions de la calnexine a été publiée [84]. Il semble que le domaine épingle à cheveux soit impliqué dans la formation d'un complexe avec Erp57 et ce même domaine

participe avec le domaine globulaire dans l'activité lectine. Le site où ont lieu les interactions entre polypeptides est dans le domaine globulaire et nécessite le domaine épingle à cheveux pour être complètement actif. Aujourd'hui, ce groupe a revu son modèle qui inclut désormais toutes les informations disponibles sur la calnexine (Figure 9). Ce qu'on constate sur ce modèle, c'est que la calnexine relâche le substrat une fois que la glucosidase II ait clivé le glucose terminal, mais également lorsque l'ATP est dissocié de la calnexine. En effet, il a été montré que la calnexine lie l'ATP et qu'elle subit des changements conformationnels qui affectent son affinité pour les protéines en repliement [91-93].

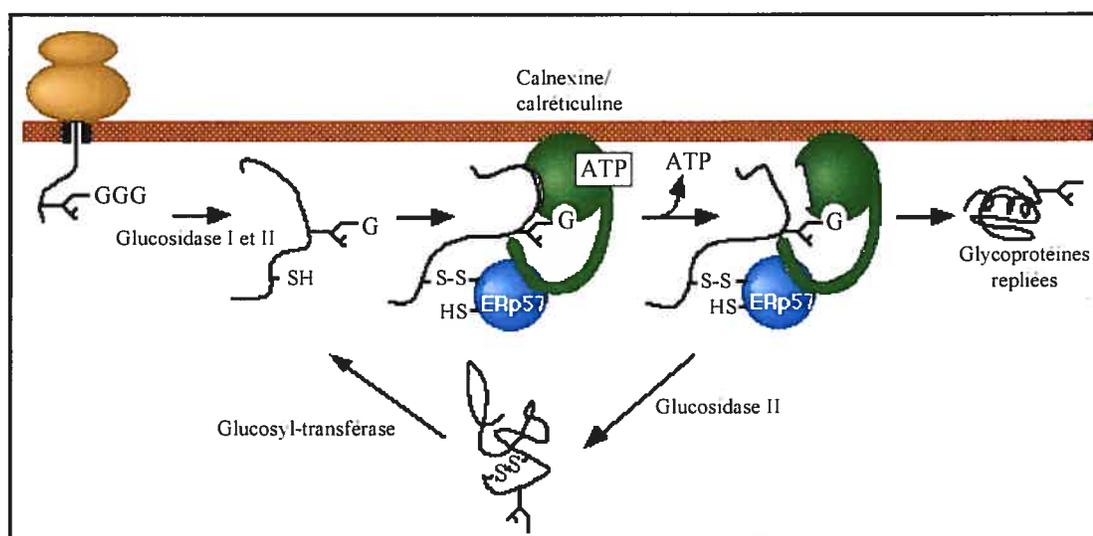


Figure 9 **Modèle du mécanisme de la calnexine du groupe de Williams.** Lorsque l'oligosaccharide de la glycoprotéine est sous forme monoglucosylée, celle-ci est liée à la calnexine à la fois via le domaine lectine et via le domaine impliqué dans les interactions peptide-peptide. Erp57, qui catalyse la formation des ponts S-S des glycoprotéines, est associée avec la calnexine. La calnexine a de l'affinité pour l'ATP et lorsque la chaperone ne lie plus cette molécule, le peptide est relâché. Il est à noter que dans ce modèle, la protéine en repliement possède un oligosaccharide, mais cela pourrait aussi être une protéine non-glycosylée. (Modèle présenté sur le site internet du Laboratoire de David Williams) [96].

#### 1.5.4 La calnexine de *S. pombe*

Notre laboratoire a également suggéré que la calnexine ne reconnaît pas uniquement les oligosaccharides  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  des glycoprotéines. Tout d'abord, nous et un autre groupe avons démontré que le gène *cnx1*<sup>+</sup> de *Schizosaccharomyces pombe* est essentiel à la viabilité de cette levure [64-65 ], mais que la délétion du gène *gpt1*<sup>+</sup> codant pour la UDP-GT de *S. pombe* donnait des cellules viables [94]. Cette enzyme n'est essentielle qu'en situation de stress excessif du RE [95]. Ensuite, notre laboratoire a démontré à l'aide d'inhibiteurs de glycosylation et des glucosidases I et II, que la glycoprotéine phosphatase acide endogène interagit avec la calnexine indépendamment du clivage des glucoses et de la reglycosylation par UDP-GT [88]. Finalement, nous avons publié que la région centrale hautement conservée de la calnexine n'est pas nécessaire pour conférer la viabilité à la levure [97]. En fait, un mutant qui ne comprend que les 52 acides aminés en C-terminal dans le RE, les domaines transmembranaire et cytoplasmique permet la viabilité. Les régions prédites pour faire les interactions oligosaccharide-peptide (domaine épingle à cheveux et domaine globulaire) ne sont pas présentes dans ce mutant. Toutes ces données suggèrent donc que la calnexine interagit avec les protéines en voie de repliement via des interactions peptide-peptide, soit directement ou indirectement via BiP qui est associée à la calnexine [88,97].

#### 1.5.5 Les fonctions et partenaires de la calnexine

La calnexine/calréticuline agit dans le RE afin d'intervenir principalement dans deux processus fondamentaux. Le premier est de favoriser le repliement des nouvelles protéines, tout comme le font les PDI, GRP94 et BiP. Cette fonction implique qu'elle prévient la formation d'agrégats de protéines qui sont toxiques, voir mortels pour la cellule et qu'elle retient les protéines ou les complexes non-assemblés dans le RE afin d'éviter leur exportation prématurée [14]. Le deuxième mécanisme, dans lequel la calnexine est

impliquée, est la dégradation associée au RE (ERAD) [14], dont il sera question dans la section 1.6.2. En effet, il a été montré *in vitro* que la calnexine était requise pour la dégradation d'une forme mutante non-glycosylée du pré-pro facteur  $\alpha$  de *S. cerevisiae* [98]. Dans le RE, la calnexine/calréticuline s'associe avec d'autres résidentes pour exercer ses fonctions. Nous avons déjà parlé des complexes avec Erp57, mais il a également été démontré par notre laboratoire pour la calnexine de *S. pombe* et par le groupe de Denecke pour la calréticuline des cellules de tabac que ces deux chaperones sont associées avec BiP [88,99]. Ces complexes sont stables en présence ou absence de synthèse protéique et sont indépendants des stress qui induisent un mauvais repliement aux protéines. De plus, dans la levure *Yarrowia lipolytica*, la calnexine est retrouvée en association avec la protéine Sbh1p, une sous-unité du pore de translocation Sec61, favorisant probablement le rapprochement de la chaperone près des protéines nouvellement synthétisées et transloquées [67]. Il a été observé que d'autres chaperones forment des complexes : BiP, GRP94, CaBP1, PDI, ERdj3, cyclophilin B, ERp72, GRP170, UDP-GT et SDF2-L1 sont associés avec des protéines incomplètement repliées ou mal assemblées [100]. On peut expliquer la présence de ces complexes par une organisation spatiale accrue afin de rendre les mécanismes de repliement des protéines dans le RE plus efficace et plus rapide. Ceci a pour effet d'amener à un niveau plus compatible avec la vie un processus qui est extrêmement lent s'il n'est pas catalysé par des enzymes.

Dans les sections que nous venons de voir, il a été question des protéines clés impliquées dans le processus de repliement des protéines. Les différentes foldases et chaperones moléculaires sont très efficaces et les mécanismes dans lesquelles elles interviennent sont rigoureusement contrôlés. Cependant, il arrive que des protéines soient irrémédiablement mal repliées ou que des facteurs environnementaux ou intracellulaires affectent le repliement des protéines dans le RE. Afin de corriger ces situations, il existe un contrôle de qualité du repliement dont font partie les chaperones moléculaire et qui inclut

aussi la réponse au mauvais repliement des protéines (UPR) et la dégradation associée au RE (ERAD).

## 1.6 Le contrôle de qualité du repliement des protéines dans le RE

Le contrôle de qualité du repliement des protéines dans le RE est primordial et plusieurs maladies sont associées au mauvais repliement et à la formation d'agrégats protéiques. Les maladies à prions telles la tremblante du mouton, l'encéphalopathie spongiforme de type bovine, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, ou les maladies neuro-dégénératives comme le Parkinson et l'Alzheimer sont causées par l'agrégation de protéines [101,102]. D'autres maladies, comme la fibrose kystique et l'emphysème juvénile sont le résultat du mauvais repliement du CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator, un canal de chlore) et de l' $\alpha$ 1-antitrypsine, respectivement [103]. En accord avec un rôle majeur de la calnexine dans le contrôle de qualité, les deux formes mutantes des protéines qui provoquent l'apparition de ces deux maladies sont retenues dans le RE par cette chaperone [104,105]. Afin de prévenir la toxicité et éventuellement la mort cellulaire que la présence d'agrégats et de protéines mal repliées pourraient engendrer, les cellules se sont dotées d'un système de réponse au mauvais repliement (UPR « unfolded protein response ») et de dégradation des protéines (ERAD « ER-associated degradation ») (revue dans [106,107]).

### 1.6.1 Le UPR

Lorsque surviennent des situations qui provoquent un stress au niveau du RE comme par exemple, l'expression de protéines mutantes, la surexpression de certaines protéines recombinantes, le traitement des cellules avec des drogues telles la tunicamycine (inhibiteur de la *N*-glycosylation) ou le  $\beta$ -mercaptoéthanol (inhibiteur de la formation des ponts S) et la haute température, le RE doit réagir afin d'éviter une accumulation de

protéines mal repliées. Pour ce faire, des mécanismes de communications entre le RE et le noyau ont évolué afin de contrôler l'expression d'une multitude de gènes. C'est chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que cette cascade de signalisation a été d'abord très bien caractérisée contrairement aux mammifères chez qui cette voie est comprise depuis peu d'années.

#### 1.6.1.1 Le UPR de *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, deux groupes ont identifié la même année le gène *IRE1/ERN1* (Inositol REquiring et ER to Nucleus signaling) en criblant pour des cellules mutantes dont le gène *lacZ* placée sous le contrôle d'un promoteur contenant la séquence UPRE (Unfolded protein response element) de 22 pb. Dans cette souche, *lacZ* n'était pas surexprimée en cas de stress [108,109]. *IRE1/ERN1* code pour une protéine transmembranaire de type I résidente du RE dont l'extrémité N-terminal est dans la lumière du RE et le C-terminal se situe soit dans le cytoplasme ou le noyau. Ce domaine possède des activités kinase et ribonucléase nécessaires pour la réponse au mauvais repliement suite à un stress (UPR) [110]. Le mécanisme UPR est schématisé à la Figure 10. BiP est normalement lié à Ire1p, mais lorsqu'il y a accumulation de protéines mal repliées dans le RE, BiP va interagir avec les protéines en voie de repliement. Ainsi Ire1p n'est plus associé avec BiP et va pouvoir homo-oligomériser [59]. Il y a par la suite trans-autophosphorylation qui est nécessaire à l'activité endoribonucléase du domaine cytosolique. Alors, Ire1p peut cliver l'ARNm *HAC1* à deux endroits, éliminant de ce fait un petit intron. Les deux exons générés par la réaction précédente sont ligasés par la tRNA ligase Rgl1p. On observe alors une traduction plus accrue de l'ARNm *HAC1* épissé dans le cytoplasme. Hac1p est un facteur de transcription de type « basic leucine zipper » qui est ciblé au noyau où il se lie à sa séquence d'ADN cible, le UPRE retrouvé dans les promoteurs de plusieurs gènes codant pour des protéines résidentes du RE (*KAR2*, *PPI*, *EUG1* et *PDII*, *LSH1*, *FKB2*, *ERO1*, *INO1*) [5]. En fait, ce mécanisme de réponse conduit à l'expression de ces gènes énumérés mais également de gènes impliqués dans la

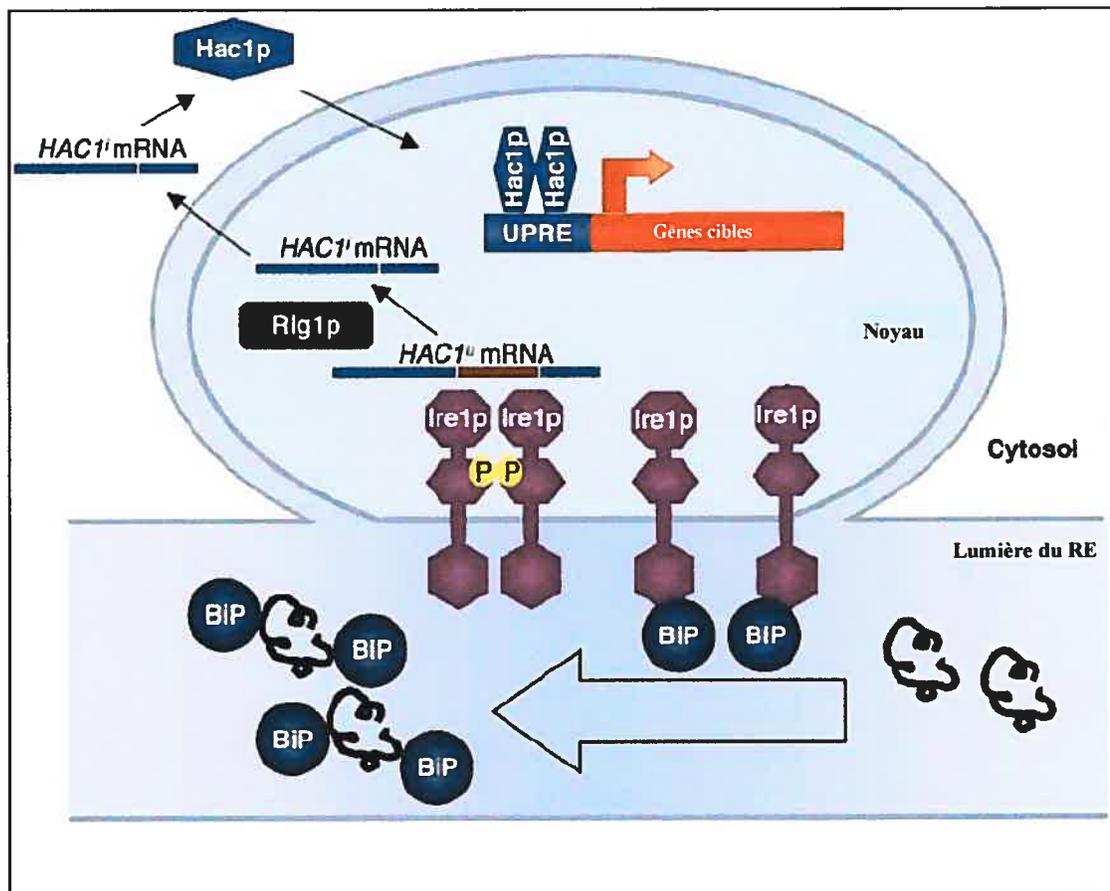


Figure 10. **Modèle du UPR chez la levure. *S. cerevisiae*** L'accumulation de protéines mal repliées conduit à la dissociation du complexe Ire1p-BiP. Ire1p s'autophosphoryle, devient alors actif et peut cliver le mRNA de *HAC1*. Avec l'aide de la tRNA ligase Rlg1p, un nouveau messager *HAC1* est généré. Une fois traduit, Hac1p, un facteur de transcription, est ciblé dans le noyau et lie sa cible UPRE. Ainsi, un certain nombre de gènes cibles sont plus fortement transcrits. (Tirée de [110])

translocation, la glycosylation et la modification d'oligosaccharides, le repliement et la dégradation des protéines, le transport vésiculaire, le métabolisme des lipides et la biogenèse de la membrane cellulaire [5].

### 1.6.1.2 Le UPR chez les mammifères

Chez les mammifères, le mécanisme de UPR est beaucoup plus complexe et fait intervenir un plus grand nombre de protéines (revue dans [106]). Deux gènes homologues à *IRE1* ont été isolés, *Ire1 $\alpha$*  et *Ire1 $\beta$*  [112,113], cependant ils ne semblent pas nécessaire à l'activation du UPR. Longtemps ce mécanisme chez les mammifères a été un casse-tête pour les chercheurs, parce qu'il manquait un morceau important : un homologue de *HAC1*. La protéine ATF6 a été isolée et il s'agit d'un facteur de transcription qui présente un peu d'homologie avec *Hac1p*. Son mRNA est aussi exprimé de façon constitutive, mais il n'est pas clivé comme celui de *HAC1* [114]. ATF6 est une protéine transmembranaire du RE et suite à un stress, le domaine de transactivation soluble est clivé et dirigé vers le noyau pour induire l'expression de gènes cibles. Cependant, ce mécanisme d'activation de ATF6 est indépendant de l'activité *Ire1*. Il n'y a que deux ans en fait que l'importance de *Ire1* chez les mammifères a été mise de l'avant avec l'identification de *XBP-1* [114]. Chez *C. elegans* et les mammifères, le mRNA *XBP-1* est clivé par *Ire1* entraînant une délétion de 26 pb qui favorise un changement de cadre de lecture. La nouvelle protéine traduite est un facteur de transcription qui se lie à des gènes cibles pour répondre au stress du RE. Un autre gène qui a été identifié et qui joue un rôle crucial dans l'inhibition de la synthèse de protéine en cas de stress au niveau du RE est le gène *perk* [115]. Lorsqu'il y a un surplus de protéines mal repliées dans le RE, par des mécanismes semblables à ceux qui activent IRE1, la protéine kinase membranaire PERK (PKR-like ER Kinase) phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation eIF2, arrêtant la traduction des protéines. Comme on peut le constater, le UPR chez les mammifères est très élaboré et fait intervenir différentes voies, mais plusieurs questions demeurent toujours sans réponse.

D'après ce que nous savons aujourd'hui, il est clair qu'il s'agit de merveilleux systèmes qui se sont développés afin de réduire les dommages aux cellules provoqués par l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. D'une part, il y a des mécanismes qui favorisent l'expression des chaperones moléculaires qui assistent le repliement des protéines néo-synthétisées dans le RE et d'autre part, des mécanismes veillent à arrêter la synthèse de nouvelles protéines afin de laisser à la cellule le temps de se départir des agrégats dans le RE. Dans certains cas, les protéines sont irrémédiablement mal repliées, elles devront alors être dégradées.

### **1.6.2 La dégradation associée au RE et le protéasome**

Le UPR décrit dans la section précédente conduit à l'expression de certains gènes cibles dont les produits font partie de la machinerie impliquée dans la dégradation de protéines [111]. Longtemps on a crut que les protéines étaient dégradées directement dans le RE ou dirigées vers les organelles spécialisées dans la dégradation, les lysosomes/vacuoles. En fait, la majorité des protéines du RE qui doivent être éliminées sont dégradées par l'action du système ubiquitine-protéasome présent dans le cytosol [116]. Il semble que les glycoprotéines mal repliées soient identifiées en fonction de la structure de leurs oligosaccharides chez *S. cerevisiae* et chez les mammifères [13]. En effet, les oligosaccharides des glycoprotéines qui restent longtemps dans le RE, donc celles qui sont mal repliées, sont clivés par l' $\alpha$ -mannosidase 1 qui agit moins rapidement que la UDP-GT. Ainsi, puisque les protéines mal repliées passent plus de temps dans le RE, elles contiennent un plus grand nombre d'oligosaccharides démannosylés. L'oligosaccharide  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  serait ainsi le signal de dégradation. Il se pourrait également que ce soit plutôt la présence de complexes particuliers lectine-glycoprotéines qui soit le message de dégradation, compte tenu de la diversité des oligosaccharides et l'absence de mannosidase dans certains organismes, comme *S. pombe*. Chez *S. cerevisiae*, Htm1p est une protéine semblable à la mannosidase 1, elle reconnaît les oligosaccharides  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  et la

délétion du gène provoque un retard dans la dégradation de certaines glycoprotéines [117]. Chez les mammifères, l' $\alpha$ 1,2-mannosidase du RE clive un mannose de l'embranchement central de l'oligosaccharide, ce qui a pour effet que les glycoprotéines sont liées par une lectine récemment identifiée, EDEM (ER degradation-enhancing 1,2 mannosidase-like protein) [118]. EDEM est une protéine membranaire de type II, dont la partie luminale est très semblable à celle de  $\alpha$ 1,2-mannosidase, mais qui ne possède aucune activité catalytique. Il a été démontré que EDEM retire les glycoprotéines mal repliées du cycle de la calnexine [119,120]. En effet, EDEM et la calnexine interagissent ensemble via leur domaine transmembranaire et la surexpression d'EDEM diminue le temps que passe une glycoprotéine dans le cycle de la calnexine et accélère l'ERAD. Bien que les mécanismes de rétention et ciblage vers le protéasome des glycoprotéines mal repliées soient connus, on sait peu de chose sur ceux régissant la dégradation des protéines non-glycosylées. Il se pourrait que l'interaction prolongée entre BiP et les régions hydrophobes d'une protéine irrémédiablement mal repliée constitue le signal nécessaire pour diriger la protéine vers le rétrotranslocon. On peut penser que BiP, après un certains temps, passe le substrat mal replié à d'autres composants du RE qui font le lien entre la dégradation et la rétention [116].

Ces protéines mal repliées sont retournées dans le cytosol via un pore formé par la même protéine qui compose le pore de translocation des protéines à l'intérieur du RE, Sec61p [121]. Toutefois, il est possible de penser qu'il existe deux types de translocons qui permettent de mieux contrôler le trafic vers l'intérieur ou l'extérieur du RE. Le complexe protéique formant le canal Sec61 interagit avec des protéines qui sont impliquées dans le ciblage vers le rétrotranslocon des protéines à être dégradées. Parmi celles-ci on retrouve, chez *S. cerevisiae*, BiP, PDI, les lectines Htm1p/Mnl1 et Hrd3p une protéine qui interagit avec les protéines ubiquitine-ligase (Der3p/Hrd1p), (Figure 11 A, revue dans [116]). Pour qu'une protéine puisse ressortir du RE vers le cytosol, elle doit se déplacer dans un seul sens, et pour ce faire, certains facteurs doivent tirer ou pousser sur la chaîne polypeptidique.

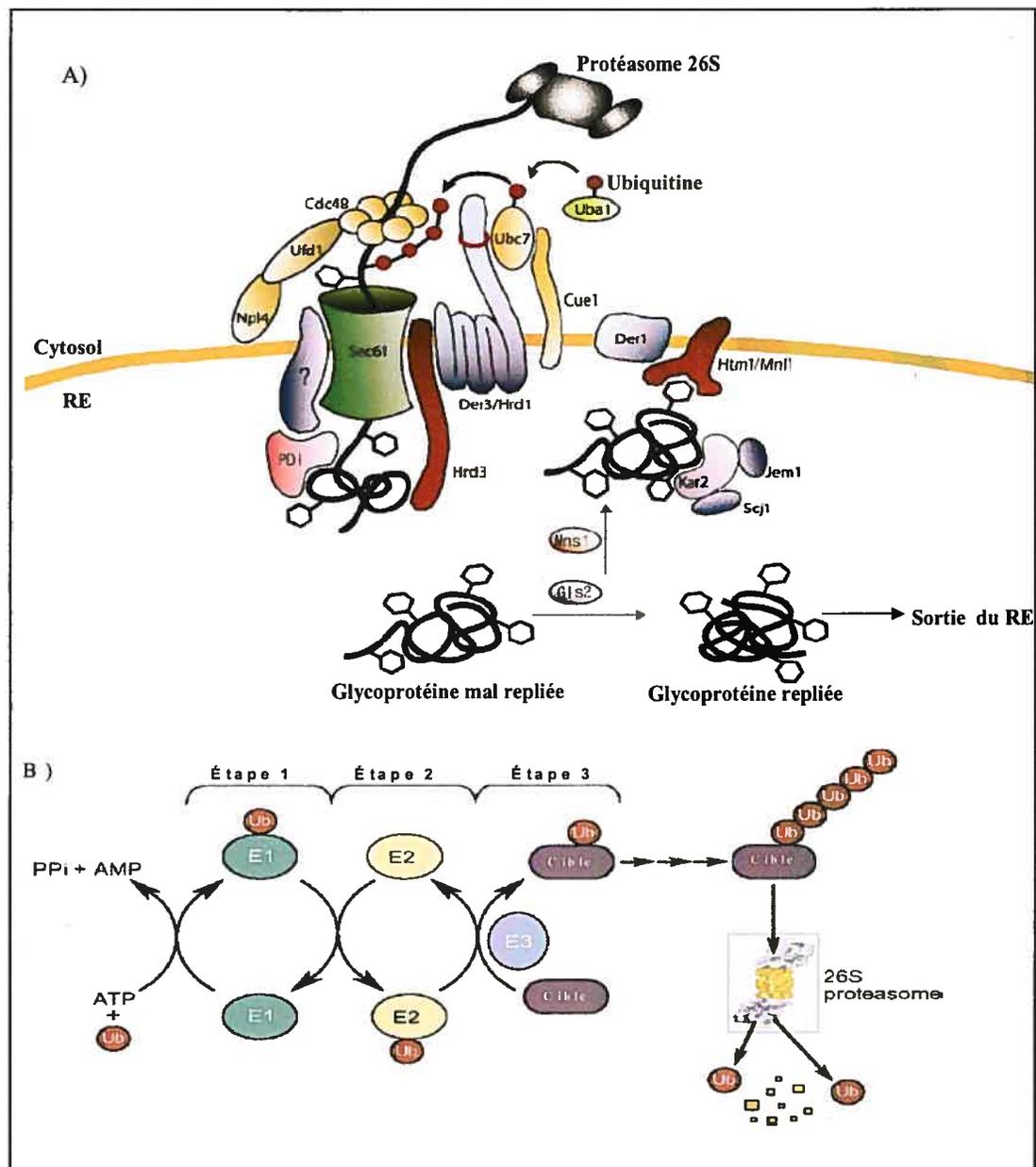


Figure 11 **Protéines impliquées dans les processus de dégradation associée au RE (ERAD).** A) Une protéine mal repliée dans le RE est prise en charge par les protéines qui composent le ERAD, dont BiP et est transloquée dans le cytosol pour être dégradée par le protéasome. B) Réaction en chaîne impliquant les enzymes E1-E3 qui sont responsables de l'ubiquitination nécessaire pour la dégradation par le protéasome. (Figures inspirées de [116,122])

Comme on peut le voir à la Figure 11A, après que la protéine soit partiellement sortie du RE et qu'elle ait été ubiquitinée, le complexe Cdc48-Ufd1p-Np14 s'y lie. Des cycles d'hydrolyses d'ATP induisent des changements de conformation dans le complexe qui tire sur la protéine afin de la diriger vers le protéasome [116]. Au niveau de la membrane du RE, dans le cytosol, se trouve la machinerie responsable de l'ubiquitination. L'ajout d'ubiquitines sur des protéines ciblées vers le protéasome se fait suite à une série de transferts enzymatiques (Figure 11B) [122]. Les molécules d'ubiquitine sont d'abord activées par l'enzyme Uba1 (E1). E1 transfère ensuite l'ubiquitine sur l'enzyme Ubc7 (ubiquitin-conjugating enzyme), qui est une E2. Le substrat peut alors être directement ubiquitiné par E2 ou via la protéine ubiquitine ligase E3. Les substrats identifiés à l'aide de plusieurs molécules d'ubiquitine sont par la suite pris en charge par le protéasome qui va les dégrader. Le protéasome 26S est composé de 3 complexes multi-protéiques: deux capuchons identiques de 19S qui sont ATP-dépendant, dont la fonction est de déplier les substrats poly-ubiquitinés et un assemblage protéique de forme cylindrique de 20S possédant l'activité protéase [123]. Le substrat reconnu est lié par la sous-unité 19S, entre dans le cylindre et y est dégradé par l'activité protéase. La dé-ubiquitination est effectuée par une protéine du 20S ce qui rend donc le processus irréversible à partir du moment où une protéine est ubiquitinée. Ces mécanismes très complexes qui font intervenir un grand nombre de gènes permettent ainsi à la cellule de se départir des protéines qui pourraient devenir toxiques pour la cellule si elles formaient des agrégats.

## 1.7 Projet de recherche

Notre laboratoire et un autre laboratoire ont montré que chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, la calnexine est un gène essentiel [64,65]. Notre laboratoire a également établi que la région minimale de la calnexine pouvant conférer la viabilité se retrouve dans les derniers 123 acides aminés en C-terminal [97]. Parmi ceux-ci, 52 aa sont dans le RE, 23 aa dans la membrane et 48 aa dans le cytosol. De plus, ce mutant de la

calnexine, nommé Mini\_Cnx1p, forme un complexe avec la chaperone BiP [97]. Un autre mutant qui confère la viabilité est nommé  $\Delta hcd\_Cnx1p$  ( $hcd$  : highly conserved domain). Il possède les même 123 aa que Mini\_Cnx1p plus 86 aa en N-terminal et interagit également avec BiP. Dans ce projet de recherche, nous voulons déterminer dans un premier temps si Cnx1p est une chaperone classique pouvant prévenir l'agrégation de protéine *in vitro*. En effet, cette caractéristique a été démontrée pour la calnexine de mammifère, mais n'a jamais été rapportée pour la calnexine de levure. Nous voulons aussi savoir si la fonction essentielle de la calnexine encodée par  $\Delta hcd\_Cnx1p$  et Mini\_cnx1p est l'activité chaperone. L'utilisation d'essais d'agrégation *in vitro* est un excellent moyen pour tester cette hypothèse. En effet, il est assez simple de purifier des mutants recombinants de la chaperone ou des peptides de plus petite taille (52 aa) et les essais *in vitro* d'agrégation de protéines modèles, telle la luciférase qui se dénature à basse température (42°C), sont simples et bien établis. Ensuite, nous voulons savoir si les mutants  $\Delta hcd\_cnx1$  et  $mini\_cnx1$  permettent un repliement efficace de trois protéines modèles : sNEP, Cel1p, et HSA. La sNEP (soluble Neutral endopeptidase) de lapin est bien sécrétée dans la levure [124], son activité est relativement simple à mesurer et c'est une grande protéine de 90 kDa portant cinq sites de glycosylation. Cel1p (cellulase de *Aspergillus aculeatus*) est une protéine de 40 kDa portant trois sites de glycosylation et dont l'activité est facilement mesurable. Finalement, HSA (Human Serum Albumin) est une protéine non-glycosylée, dont la taille est de 68 kDa mais qui n'a pas d'activité enzymatique. Afin de tester *in vivo* le repliement des protéines, nous allons mesurer l'activité des protéines sécrétées et la quantité de protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire dans chacune des souches.

La levure *S. pombe* est un excellent outil pour étudier le repliement des protéines et plus particulièrement pour faire des études structures-fonctions de la calnexine. En effet, *S. pombe* est un micro-organisme dont la séquence des 13,8 Mb des trois chromosomes est connue [125]. Cette levure peut vivre sous forme haploïde ou diploïde et il est très facile de faire de la génétique classique ou inversée. Contrairement à ce qui est le cas avec les

cellules de mammifères, on peut ainsi facilement créer des mutants et les étudier sans avoir la calnexine sauvage comme bruit de fond et sans recourir à une surexpression d'un mutant qui pourrait fausser les résultats. De plus, comme il a été question dans les sections précédentes, plusieurs aspects du repliement des protéines de la voie de sécrétion sont similaires chez cette levure et chez les mammifères. Chez *S. pombe*, la glycosylation des protéines est très semblable à celle des mammifères, entre autres parce que les oligosaccharides possèdent un galactose terminal [13]. De plus, comme mentionné dans la section 1.5.1, la calnexine de *S. pombe* est structurellement plus semblable à celle des mammifères que ne l'est celle de *S. cerevisiae* [64,65]. Le cycle de la calnexine décrit chez les mammifères comprend les enzymes UDP-GT, et les glucosidases I et II que l'on retrouve également chez la levure *S. pombe*. Ainsi, les résultats obtenus dans nos études peuvent facilement être extrapolés aux mécanismes impliquants la calnexine chez les mammifères.

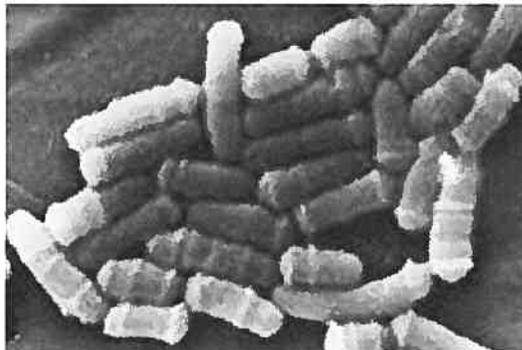
## **2. Article**

**Cell viability and secretion of active proteins  
in *Schizosaccharomyces pombe*  
do not require the chaperone function of calnexine**

**Alexandre Maréchal<sup>1</sup>, Pierre-Luc Tanguay<sup>1</sup>, Mario Callejo,  
Renée Guérin, Guy Boileau and Luis A. Rokeach\***

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work

Article soumis à la revue Biochemical Journal, Octobre 2003



### **Contribution des auteurs**

L'article présenté dans ce chapitre a été écrit dans sa première version par mon collègue Alexandre Maréchal et moi-même. Notre directeur Luis Rokeach l'a corrigé et ensemble nous avons apporté les dernières modifications avant de soumettre le manuscrit à la revue *Biochemical Journal*. Dans la figure 1, j'ai purifié toutes les protéines et fait les expériences des panneaux 1B, C et Renée Guérin m'a aidé pour le panneau 1D. Alexandre Maréchal a fait l'expérience 2A et il a étudié la protéine HSA en 2C. Les études avec la sNEP et la cellulase en 2C ont été réalisées par moi. J'ai également effectué les expériences avec la cellulase en 3A et B, Alexandre Maréchal a fait celles avec la HSA en 3A et Mario Callejo celles avec la sNEP en 3A et B. Finalement, la figure 4A a été réalisé par moi, et Alexandre Maréchal a fait les expériences présentées à la figure 4A-B et à la figure 5.

### **Short Title:**

**Cells lacking the chaperone function of calnexin secrete active proteins**

### **Keywords:**

Calnexin, Endoplasmic Reticulum, Molecular Chaperone, Protein Folding, Secretion, Yeast Genetics

### **Abbreviations :**

Cellp, cellulase I from *Aspergillus aculeatus* ; *cnx1*<sup>+</sup>, gene encoding wild type calnexin in *S. pombe*; Cnx1p, calnexin from *S. pombe*; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; HSA, human serum albumin; sNEP, soluble nepilysin.

## Synopsis

Folding of newly-synthesized proteins within the endoplasmic reticulum (ER) is a rate-limiting step in protein secretion. Thus, ER molecular chaperones and foldases have a major impact in determining the rate and yield of these crucial cellular processes. Calnexin is a key ER chaperone implicated in the folding, retention, and targeting for degradation of proteins that go through the secretory pathway. Calnexin molecules contain a highly conserved central domain (hcd) that has been proposed to be involved in the interaction with folding substrates and other chaperones. To gain a better understanding of the roles played by calnexin in the secretory pathway, we examined the efficiency of fission yeast strains expressing calnexin mutants to secrete different model proteins. Remarkably, calnexin hcd-deletion mutants, while devoid of detectable chaperone activity *in vitro*, confer viability and cause a considerable increase in the secretion of heterologous cellulase and of endogenous proteins. Surprisingly the quality control efficiency, measured as the activity/amount ratio of secreted model protein, was not severely reduced in these calnexin hcd-deletion mutant strains. Our results indicate that calnexin's essential function does not reside in its role in the folding or in the retention of misfolded proteins. These observations suggest the existence of an overzealous quality control mechanism in the ER of *S. pombe* that might reduce the secretion efficiency of endogenous proteins.

## Introduction

Secreted and membrane proteins enter the secretory pathway at the level of the endoplasmic reticulum (ER) [1]. Upon entering the ER, a larger number of newly-synthesized proteins undergo covalent modifications such as *N*-glycosylation and disulfide-bond formation, and most of the proteins acquire their final structure. Because of the high concentration of newly-synthesized and resident proteins in the ER (attaining about 100 mg/ml), folding in this compartment is a major mechanistic challenge for the cell. Nevertheless, the ER constitutes a cellular compartment optimized for the efficient and accurate folding of secretory proteins. To this effect, the ER contains a battery of molecular chaperones and foldases that cooperate to increase the successful acquisition of the tertiary and quaternary structures of proteins (reviewed in [2,3]). In addition, a quality control system of protein folding ensures that only correctly folded polypeptides and assembled multimeric proteins exit the ER to continue on the secretion pathway (reviewed in [4,5]). On the other hand, proteins that are irretrievably misfolded are targeted to the cytosol to be degraded by the proteasome [6], a process that has been named ERAD, for ER-associated degradation (reviewed in [7,8]).

Membrane-bound calnexin and its soluble homologue calreticulin are molecular chaperones acting as key components of ER quality control process. For instance, calnexin has been implicated in the ER-retention of misfolded mutant molecules in a vast number of hereditary protein-folding diseases such as cystic fibrosis, juvenile emphysema, and coagulation disorders (reviewed in [9]). Both calnexin [10] and calreticulin [11] were shown to interact with newly-synthesized glycoproteins via their monoglucosylated glycan moieties. Nevertheless, calnexin and calreticulin were also reported to interact *in vitro* and *in vivo* via peptide-peptide contacts, as classical chaperones such as BiP and GRP94 do [12,13].

The luminal portion of the calnexin molecule shares with calreticulin a highly conserved central domain (hcd), also known as the “P-domain”, containing two tandemly repeated motifs I-DPD/EA-KPEDWDD/E and G-W--P-I-NP-Y. NMR [14] and crystallographic [15] studies on calreticulin and calnexin revealed that the 3D structure of these chaperones is highly asymmetrical and composed of two distinct domains : i) a globular core formed by the *N*- and *C*- termini; ii) a long, extended protrusion formed by the highly conserved central domain (hcd). Several reports have established *in vitro* and *in vivo* the importance of the various domains of mammalian calnexin/calreticulin for oligosaccharide recognition and binding, peptidic substrate interactions as well as cooperation with the thiol-oxidoreductase ERp57. For instance, *in vitro* experiments have shown that the lectin- and peptide-binding regions of calnexin are mainly localized in the globular domain, while the extended hairpin domain was found to be required for interaction with ERp57, both regions being required for optimal activity of the chaperone [16]. Another example of calnexin/calreticulin structure-function studies examined *in vivo* the role of their ER sub-localization on selectivity of substrates [17]. This study reported that when calreticulin was fused to the transmembrane domain of calnexin, its spectrum of substrates shifted to become very similar to those interacting with calnexin. This suggests that these paralogues partition via their different sub-localizations the spectrum of substrates in the ER.

Pointing to a crucial cellular role, calnexin (Cnx1p) was shown to be essential for viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [18,19]. Interestingly, neither *S. pombe* nor *S. cerevisiae* possess a calreticulin-encoding gene, suggesting that the membrane-bound lectin chaperone is sufficient to ensure glycoprotein folding. Nevertheless, Cne1p, the calnexin molecule in *S. cerevisiae* is not required for viability [20]. In studies to assess the substrate specificity of calnexin in the fission yeast, our laboratory observed that calnexin/Cnx1p can interact *in vivo* with the glycoproteins acid phosphatase and sNEP in the absence of glucose trimming and reglucosylation [21, 22].

These observations indicated that calnexin/Cnx1p could bind folding polypeptides in a lectin/oligosaccharide independent fashion. Supporting this notion, we reported that *cnx1* mutants lacking the highly conserved central region and the *N*-terminal domain ( $\Delta hcd\_cnx1$  and *mini\_cnx1*), including the region putatively implicated in direct glycan contacts, are viable in spite of calnexin/Cnx1p being essential in the fission yeast [23]. Consequently this suggested that, at least in the ER of *S. pombe*, enough glycoproteins may fold in the absence of the calnexin-lectin activity to sustain life under standard growth conditions.

Since protein folding is rate limiting for the exit of proteins from ER, changes in the expression levels of key ER chaperones are expected to have detectable effects on secretion. When considering chaperone function, the rate of protein exit from the ER can be schematically regarded as the resultant of two “opposite forces”, protein folding that favours secretion, and protein retention for quality control that slows-down secretion [4,24]. Therefore, affecting the levels of chaperones such as BiP and calnexin may have contrary results, depending on the chaperone and the particular substrate studied. Such a phenomenon has been reported for BiP, calnexin and other chaperones (reviewed in [25]). A lower level of BiP chaperone in the ER of *Saccharomyces cerevisiae* led to a diminution in the secreted quantity of three heterologous proteins: human granulocyte colony-stimulating factor, *S. pombe* acid phosphatase, and bovine pancreatic trypsin inhibitor [26]. In the same vein, another study reported that in *A. niger* overexpression of calnexin resulted in a four to five fold increase in extracellular levels of *P. chrysosporium* manganese peroxidase [27]. In contrast, a stable overexpression of BiP in CHO cells resulted in a diminished secretion of both von-Willebrand factor and a mutant form of the coagulation factor VIII [28].

Here we present evidence that fission yeast calnexin/Cnx1p acts as a *bona fide* chaperone *in vitro*, while *hcd*-deleted mutants are not functional in the same assay; thus strongly indicating that the essential function of calnexin/Cnx1p in the ER of *S. pombe* does

not reside in its chaperone activity. The relative importance of various domains of calnexin on the secretion process was directly evaluated in a calreticulin-less background using *cnx1* mutants. It was found that the overall secretion of proteins was substantially increased in cells devoid of calnexin's chaperone function. Surprisingly, this did not significantly alter the ER quality control efficiency measured as the activity/amount of secreted model proteins. Our observations suggest that the stringency of the *S. pombe* quality control mechanism might reduce the secretion efficiency of certain endogenous proteins.

## Experimental

### *S. pombe* strains and media

*S. pombe* (h<sup>-</sup>, his3-D1, ade6-M216, ura4-D18, leu1-32, Δ*cnx1::his3*) expressing full-length *cnx1*<sup>+</sup>, Δ*gly\_cnx1*, *lumenal\_cnx1*, *lumadel\_cnx1*, Δ*hcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* on pREP41 were used throughout this study [23]. *S. pombe* strains constitutively producing HA-tagged cellulase I from *Aspergillus aculeatus* were constructed by genomic integration of the encoding gene under the control of the *adh1* promoter, both derived from the plasmid pP1Tc1 (kind gift from Thomas Sandal) at the *leu1* locus. Minimal medium (EMM) was prepared as described [29]. *S. pombe* transformations were performed by PEG/Li acetate procedure [29].

### Plasmids

Plasmids pSPCA3220 (wild-type *cnx1*<sup>+</sup>), pSPCA3222 (Δ*hcd\_cnx1*), pSPCA7102 (*mini\_cnx1*), pSPCA3221 (*lum\_cnx1*), pSPCA7095 (*lumadel\_cnx1*), and psNEP7019 (producing the secreted form of NEP/nepriylsin) are derivatives of the pREP41 and pREP2 vectors [30], and were constructed in our laboratory as described previously [21-23]. Plasmid pSPCA3262 (Δ*gly\_cnx1*) was constructed by site-directed mutagenesis using the Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis System and the pALTER-1 vector (Promega), according to manufacturer's recommendations. The sequences encoding HSA were amplified by PCR using the plasmid pHiL-D2 HSA [31] as a template (a kind gift from Dr. Bhagavan), with the following primers: 5' AAAACTCGAGATGAAGTGGGTAACC3' and 5' AAAAGCGGCCGCTTAAGCCTAAGG CAGC3'. Following amplification, this HSA expression cassette was inserted into the *XhoI* and *NotI* (underlined) sites of the *S. pombe* expression vector pSLF172, to create plasmid pSLF172 HSA. Expression from this plasmid

is under the control of the thiamine-repressible promoter *nmt1*. The HSA produced with this construct contains 3 copies of the HA epitope at its C-terminal.

### Purification of proteins for *in vitro* aggregation assays

The coding sequences of BiP and soluble\_Cnx1p (sCnx1p) were amplified by PCR and cloned in pH6EX3 [32] to create fusion proteins with hexa-histidine tags. The primers used for BiP amplification were: (A) 5'-GGA TCC AGT GGT GAT GAT AAC TCT ACA G-3' and (B) 5'-GGA TCC TTA AAG TTC ATC GGC CTC ATC ATC-3'. Primers used for *cnx1* amplification were: (C) 5'-GGA TCC GAT CCT GAA TCC GAA CAA GAA-3' and (D) 5'-CGG GAT CCT TAA AGC TCG TCA GCC CCA ATT TCA GGA GTC TCG ATG-3'. Underlined bases correspond to the *Bam*HI restriction site. To obtain GST fusion proteins, the ER soluble  $\Delta$ hcd\_Cnx1p (s $\Delta$ hcd\_Cnx1p) and soluble mini\_Cnx1p (smini\_Cnx1p) coding sequences were cloned in pGEX-2T (Amersham-Pharmacia). For *s $\Delta$ hcd\_cnx1* amplification, primers (C) and (D) and plasmid pSPCA3222 ( *$\Delta$ hcd\_cnx1*) were used. For *smini\_cnx1* amplification, primers (D) and (E) 5'-GGAT CCA TGG AAA AGC AAT CAA TGC-3' were employed. In order to produce the recombinant proteins, the expression plasmids were transformed into the *E. coli* AP401 strain (*lon::mini tet<sup>R</sup>*, *ara<sup>-</sup>*,  *$\Delta$ lac-pro*, *nalA*, *argE am*, *rif<sup>R</sup>*, *thi I*, [*F'*, *pro AB*, *lacI<sup>d</sup>* Z M15]). Proteins were purified from a 1 L culture of cells at OD<sub>554</sub> 0.7, induced for 3 hours at 37°C with 0.4 mM IPTG. Cells expressing BiP were lysed by repeated freeze-thawing in buffer A (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) containing 0.2 mM PMSF. The lysates were then treated with 10 µg/mL DNaseI for 15 minutes at 37°C. To purify the His<sub>6</sub>-tagged proteins extracts were incubated overnight at 4 °C with Ni-NTA-agarose (Qiagen), and the beads were washed twice with buffer B (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, pH 8.0), and twice with buffer C (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, pH 8.0). Elution of bound proteins was performed with 10 times the column's volume of buffer D (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM

NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0). Purification of GST-smini\_Cnx1p using glutathione-Sepharose® resin (Amersham-Pharmacia) was carried out following the manufacturer's recommendations. GST-sΔhcd\_Cnx1p was purified following the manufacturer's recommendations (Amersham Pharmacia), followed by a Q-Sepharose® chromatography (as described below). sCnx1p-His<sub>6</sub> was purified using nickel-affinity column chromatography using a different protocol. Briefly, cells expressing sCnx1p-His<sub>6</sub> were lysed in binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, 0.75% Tween-20, 30 mM imidazole, 1 mM CaCl<sub>2</sub>). The beads were washed three times with washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1mM PMSF, 0.75% Tween-20, 30 mM imidazole, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20% glycerol) using 10X the volume of the column. Elution was done in the same buffer except that there was no glycerol and 200 mM imidazole were added. Fractions containing the proteins were pooled and dialysed against binding buffer for Q-Sepharose which consists of 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, 0.75% Tween-20, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Elution was made with a step gradient ranging between 200 to 1000 mM NaCl. Concentrations of proteins were determined by the method of Bradford, using Bio-Rad Protein Assay®.

#### ***In vitro* aggregation assays.**

Aggregation assays using luciferase as model protein were carried out essentially as described previously [33]. Briefly, luciferase (1 μM) was incubated alone or with smini\_Cnx1p, sΔhcd\_cnx1p, sCnx1p and BiP (1 μM) in Buffer 1 (50 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.8) for 5 min. at RT and then at 42°C for 10 min. Following which centrifugation at 13,000 rpm in a table-top centrifuge for 10 min at 4°C was done to separate aggregates (misfolded) from soluble (folded) proteins. Fractions were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels (30:2.67 acrylamide/bisacrylamide) and bands were visualized by Coomassie Blue Staining.

### **Endoglycosidase H digestions**

Approximately 20  $\mu\text{g}$  of protein from total cell extracts containing cellulase, soluble neprilysin (sNEP) and albumin were incubated for 10 minutes at 100°C in denaturing buffer (0.5% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol). Sodium citrate was added to a final concentration of 50 mM and incubated with 1 unit of endoglycosidase H (New England Biolabs) at 37°C for 1 hour. Reaction products were separated by SDS-PAGE (10% gel for sNEP and 12% for the other model proteins), and subsequently detected by immunoblot analysis.

### **Enzymatic assays**

The enzymatic activity assays for sNEP were carried out as previously described [22]. In the case of cellulase (Cel1p), the enzymatic assays were done essentially as described [34] except that twice the amount of substrate was used. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of growth supernatant from *cnx1* mutant cells containing Cel1p (OD<sub>595</sub> 1.0) were mixed in an Eppendorf tube with 100  $\mu\text{l}$  of 0.1 M citrate pH 3.0 buffer and 100  $\mu\text{l}$  of 0.8% AZCL-HE-Cellulose as a substrate (Megazyme). The reactions were then incubated at 40°C during 4 hours. 500  $\mu\text{l}$  of water was added to stop the reaction. The activity of Cel1p was expressed as the ratio OD<sub>620</sub> / OD<sub>595</sub> (cell density).

### **Immunoprecipitations and immunoblotting**

Co-immunoprecipitations and immunoblotting were done as previously described except that cell extracts were spun at 13000 rpm in a table-top centrifuge for a total of 60 minutes [21]. The mouse mAb 18B5 [22] was used for the detection of secreted NEP (sNEP), while 12CA5 mouse mAb was used to detect HA-tagged HSA and Cel1p.

## Results and Discussion

### Viable calnexin/Cnx1p hcd-mutants exhibit no chaperone function *in vitro*

Previously, we have shown that while calnexin is essential in the fission yeast *S. pombe*, its highly conserved central domain (hcd) is not required for the viability of this organism [23]. Therefore, it was of interest to investigate whether calnexin mutants lacking the central domain exhibited at least a remnant of chaperone activity. To this end, we produced in *E. coli* three different forms of calnexin/Cnx1p corresponding to viable mutants of our previous studies [23]: the ER soluble domain of wild-type calnexin (referred to as sCnx1p; Figure 1A), the luminal portion of calnexin deleted of the 329 amino acids of the central conserved domain (referred to as sΔhcd\_Cnx1p), and a construct consisting of the 52 C-terminal amino acids in the ER (denoted as smini\_Cnx1p; Figure 1A). To assess the potential chaperone function of these purified proteins, we measured their respective ability to prevent thermal aggregation of the non-glycosylated model protein luciferase from the firefly *Photinus pyralis* [33]. These assays were done in the presence or absence of ATP, ADP and MgCl<sub>2</sub> to analyze the possible requirement of these factors for calnexin/Cnx1p chaperone activity. As shown in Figure 1B, sCnx1p used in a 1:1 ratio behaved as a classical chaperone preventing aggregation of about 60% of the luciferase, while both the sΔhcd\_Cnx1p and smini\_Cnx1p forms were devoid of chaperone function when the assay was carried out without added factors. In the presence of ATP and MgCl<sub>2</sub> however, the sΔhcd\_Cnx1p mutant was slightly more effective in preventing aggregation of luciferase than rabbit IgG, which was used as a negative control (Figure 1B). This increase in the solubility of the substrate with sΔhcd\_Cnx1p could be due to the occurrence of conformational changes caused by the Mg-ATP complex, which might enable some interaction of this mutant with misfolded luciferase. Such structural modifications have been shown to occur for mammalian calnexin *in vivo* for [35,36] *in vitro* [37]. The smini\_Cnx1p construct exhibited no detectable chaperone activity under the conditions

used in our *in vitro* assays. These results indicate that the chaperone activity of calnexin/Cnx1p is dispensable for cell viability, and therefore its essentiality may reside in another function.

BiP and calnexin/calreticulin are known to interact in a non-substrate fashion *in vivo* in fission yeast and tobacco cells [21,38]. To examine a possible synergetic cooperation between these two ER chaperones *in vitro*, we first tested the capacity of recombinant *S. pombe* BiP to prevent aggregation. As shown in Figure 1C, BiP prevented thermal denaturation of luciferase and required ATP and  $Mg^{2+}$  for optimal activity. BiP prevented the aggregation of 40% of the substrate when used in an equimolar fashion, reaching 60% of anti-aggregation when present in a 4:1 molar ratio. Thus, BiP required a 4-molar excess with respect to the substrate in order to be as efficient as calnexin/Cnx1p at a 1:1 ratio (Figure 1C). Therefore, in the case of luciferase, a non-glycosylated protein, calnexin/Cnx1p is considerably more efficient than the classical chaperone BiP in preventing aggregation. This is in contrast with previous results showing that mammalian calnexin was less efficient than BiP in promoting the refolding of deglycosylated  $\alpha$ -mannosidase [39]. However, it is in agreement with the fact that mammalian calnexin is as efficient as BiP in suppressing the thermal aggregation of the non-glycosylated substrate citrate synthase [39]. Taken together, these observations further support the notion that different substrate proteins have different chaperone requirements. Our study also provides additional proof that calnexin/Cnx1p can indeed act as a classical chaperone in the folding of non-glycosylated proteins.

Next, wild-type and mutant calnexin/Cnx1p were tested for cooperativity with BiP, using the same thermal-aggregation assay. No significant synergetic interaction between the two chaperones was observed with or without cofactors. Nevertheless, the combination of BiP with sCnx1p increased to about 80% the proportion of soluble substrate, as compared to 40% and 68% for BiP and sCnx1p alone, respectively. When rabbit IgG was

added to calnexin and to BiP a 10% increase in the soluble fraction of luciferase was observed in both cases, pointing to a crowding effect caused by the higher concentration of proteins in the assay rather than actual chaperoning (Figure 1D). Consequently, the calnexin/Cnx1p mutants  $s\Delta hcd\_Cnx1p$  and  $smini\_Cnx1p$  were not able to enhance the ability of BiP to prevent aggregation of luciferase, because the observed augmentation in the prevention of aggregation was also obtained using rabbit IgG (data not shown). These results support the notion that *in vivo*, fission yeast expressing  $\Delta hcd\_Cnx1p$  or  $mini\_Cnx1p$  are able to survive without the chaperone function of calnexin/Cnx1p.

### **Secreted heterologous model proteins are accurately glycosylated in fission yeast calnexin mutants**

To explore the role of calnexin/Cnx1p in the secretion process of fission yeast, several *cnx1* mutant strains were constructed (see Fig. 1A), and the effect of these mutations was tested on three heterologous model proteins. Because WT calnexin/Cnx1p is glycosylated in *S. pombe* [18,19], while recombinant sCnx1p used in our *in vitro* assays is not, it was of interest to assess whether this post-translational modification had an effect on protein secretion. To this effect, the mutant  $\Delta gly\_cnx1$  was constructed in which the codon for Asn418 was changed to a triplet encoding the neutral residue Ala. To study a possible effect of the sub-localization of calnexin/Cnx1p within the ER, a soluble version was constructed, *lum\_cnx1*, lacking the sequences encoding the transmembrane and cytosolic domains. A second version of the latter mutant was also constructed, *lumadel\_cnx1*, in which the encoded lumADEL\_Cnx1p contains the ADEL ER-retention signal of fission yeast at its C-terminus [40]. Mutants  $\Delta hcd\_cnx1$  in which the region encoding central conserved domain has been deleted, and *mini\_cnx1* spanning the 52 luminal amino acids of the C-terminus linked to the transmembrane and cytosolic domains have been previously described [23] (see also Figure 1A). All mutants grew at rates similar to the wild type

*cnx1*<sup>+</sup> at 30°C in minimal medium (not shown), indicating that they did not severely affect the fission yeast's physiology under standard culture conditions.

The levels of the different calnexin/Cnx1p were evaluated by Western blotting in the mutant *S. pombe* strains (Figure 2A). While WT,  $\Delta$ *gly\_cnx1*, *lum\_cnx1* and *lumadel\_cnx1* strains contained similar amounts of calnexin, the  $\Delta$ *hcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* strains contained a much lower quantity as shown by the exposure times required to obtain equivalent signals. Because these mutants are heavily truncated forms of the wild-type calnexin/Cnx1p, it was possible that most of the diminution in the signal was caused by the loss of epitopes recognized by the polyclonal antibodies used. To examine this possibility we evaluated the quantity of calnexin/Cnx1p in strains expressing Wt\_Cnx1p and *mini\_Cnx1p* fused to a *c-myc* epitope. When we used the monoclonal 9E10 antibody, we obtained the same ratios of calnexin/Cnx1p as those observed using polyclonal antibodies (data not shown). Thus, these particular mutants appear to be more susceptible to mRNA or protein degradation. Therefore, in addition to an absent calnexin-chaperone function in the  $\Delta$ *hcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* strains these cells also contain lower amounts of calnexin/Cnx1p molecules.

To assess the impact of calnexin/Cnx1p mutations on glycoprotein secretion, two glycosylated enzymes, rabbit soluble neprilysin (sNEP) [22] and cellulase (Cellp) from *Aspergillus aculeatus*, were expressed in all strains. Moreover, to explore a possible effect of calnexin/Cnx1p on the secretion of non-glycosylated proteins, human serum albumin (HSA) was also used as model protein. A schematic representation of these three heterologous model proteins is presented in Figure 2B. Because of the link between glycoprotein folding and glycosylation (reviewed in [41]), and because the studied glycoproteins are heterologous to fission yeast, the *N*-glycosylation state of all the model proteins was first assessed by endoglycosidase H digestion. As shown in Figure 2C, sNEP and Cellp appeared as being correctly modified *in vivo* as demonstrated by the shift in

migration of the proteins after endoH digestion. As expected, HSA which does not contain any potential Asn-glycosylation acceptor site [42], was not glycosylated (Figure 2C). Hence, glycosylation of the model glycoproteins sNEP and Cellp was not noticeably affected in the *cnx1* mutant strains.

### **Increased secretion of fungal cellulase in strains lacking the highly conserved domain of calnexin/Cnx1p**

The secretion efficiency in the *cnx1* mutant strains was evaluated by Western blotting as the ratio of secreted/intracellular model proteins. As it is possible to see in Figure 3A, no major variations in the secretion efficiency sNEP, HSA was observed among the WT, *Δgly\_cnx1*, *lum\_cnx1* and *lumadel\_cnx1* strains. On the other hand, the mutants *lumadel\_cnx1*, *Δhcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* secreted more cellulase than the WT, *Δgly\_cnx1*, *lum\_cnx1* strains. This increase in secretion was greater for the *Δhcd\_cnx1* strain (about 5-fold compared to WT strain) than for the *mini\_cnx1* strain (about 4-fold compared to the WT strain). Thus neither the glycosylation of calnexin/Cnx1p nor its membrane anchoring drastically affect the secretion of sNEP and HSA. However, the soluble form of calnexin/Cnx1p bearing an ER-retention signal exhibited a two-fold increase in cellulase secretion, suggesting that for certain proteins ER-export may be affected by the physical accessibility of this chaperone.

Several studies have reported that altering the levels of ER chaperones entails divergent effects on the secretion of heterologous proteins [25]. On one hand, overexpression of BiP or calnexin were shown to increase secretion of some heterologous proteins [26,27,43]. On the other hand, overexpression of BiP entailed a reduction in the secretion efficiency of von-Willebrand factor and a mutant form of the coagulation factor VIII in CHO cells [28]. Together, these studies suggest that for some proteins the rate-limiting step in their secretion is their accurate folding so an increase in secretion correlates

with an increase in the molecular chaperone content of the ER. In other cases, retention of proteins by ER chaperones limits their overall secretion because they are able to fold quickly and efficiently. Based on these observations, one could speculate that in the case of cellulase the rate-limiting step in its secretion might not lie in its folding but rather in its retention by WT calnexin/Cnx1p and/or calnexin/Cnx1p associated factors. Whereas in the case of HSA and sNEP, removal of the chaperone function of calnexin/Cnx1p slightly reduced their secretion, presumably because folding might be the determining factor in their secretion.

#### **Quality control of protein folding is not severely affected in strains lacking the hcd region of calnexin/Cnx1p**

Since mutants devoid of the folding/retention functions of calnexin/Cnx1p could be affected in their mechanism of ER quality control, it was of interest to assess whether the secreted proteins by these strains were as functional as those secreted by wild-type cells. To this end, the efficiency of quality control was estimated by determining the ratio of activity/quantity of secreted model enzymes cellulase and sNEP (Figure 3B). No drastic variations could be observed in the activity/quantity ratio of sNEP secreted by the *cnx1* mutants as compared to that of the WT strain. Nevertheless, in the case of cellulase a slight reduction of activity/quantity ratio was observed, and this was roughly correlated with an increase in secretion efficiency. For instance, in the case of  $\Delta hcd\_cnx1$  activity/quantity ratio was approximately 0.5. That the quality control of protein folding was not severely affected in *cnx1* mutants could be due to overlapping functions of the components of the ER folding machinery. In addition, we observed an increased level of BiP in the *lum\\_cnx1*, *lumadel\\_cnx1*,  $\Delta hcd\_cnx1$ , and *mini\\_cnx1* mutants compared to the WT and  $\Delta gly\_cnx1$  strain (Figure 2A, lower panel). An augmentation in BiP levels due to an active unfolded protein response was also detected in calreticulin deficient fibroblasts [44]. Therefore, an increased level of chaperones such as BiP, combined with the functional redundancy of

other factors involved in the folding, retention, and targeting to degradation of proteins could be responsible for the maintenance of a functional quality-control machinery in the ER of the *cnx1* mutants studied.

### **The *Δhcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* mutants are affected in the retention of the glycoprotein cellulase**

It is believed that to exert their function, chaperones interact transiently with their substrates, in binding-release cycles, freeing them definitely once the newly-synthesized proteins have acquired their mature structure. Nevertheless, it has been observed that some misfolded substrates can stably remain bound to chaperones awaiting release by other factors for their eventual correct folding or degradation [4]. To gain additional insight on the cause of the divergence of protein secretion efficiency for the various heterologous proteins, we evaluated the length of the interaction of WT\_Cnx1p, *Δhcd\_Cnx1p*, and *mini\_Cnx1p* with the model proteins. The mutant strains *Δgly\_cnx1*, *lum\_cnx1*, *lumadel\_cnx1* were not further analyzed because their secretion efficiency was similar to that of the WT. To perform this experiment, the cells were first treated with the reducing agent DTT to trigger the accumulation of misfolded nascent proteins in the ER, then they were incubated with the translational inhibitor cycloheximide, and samples were collected at several time points to observe release of the model protein if the interaction is transient. The interaction of calnexin/Cnx1p with the substrates was evaluated by immunoprecipitating the chaperone and subsequently blotting against the substrates. Figure 4A shows that the interaction of cellulase with wild-type calnexin/Cnx1p was constant for 180 minutes following cycloheximide treatment. In contrast, no co-immunoprecipitation of cellulase could be observed with the mutants *Δhcd\_Cnx1p* and *mini\_Cnx1p*, which *in vitro* lack chaperone activity. We have previously shown that BiP interacts with the last 52 residues of the luminal domain of calnexin/Cnx1p, thus it also co-immunoprecipitates with *Δhcd\_Cnx1p* and *mini\_Cnx1p* mutants [23]. As shown in the

right panel of Figure 4A, the presence of BiP in the immune-complexes attested that the experimental conditions were appropriate for co-immunoprecipitation with  $\Delta hcd\_Cnx1p$  and  $mini\_Cnx1p$ , confirming the lack of interaction of cellulase with these mutants. Hence, while wild type calnexin/Cnx1p retained at least a fraction of cellulase in the ER for the time evaluated, the hcd-deleted calnexin/Cnx1p mutants, which *in vitro* lack chaperone activity, were unable of doing so. These observations would correlate the increase in secretion of cellulase with an abrogated interaction of this model protein with the truncated mutants of calnexin/Cnx1p.

In the case of HSA, the amount co-precipitated with wild-type calnexin/Cnx1p lessened with time (Figure 4B). We have previously shown that the calnexin/Cnx1p content in the ER was stable in the presence of 2mM cycloheximide even after an incubation period of 8 hours [21]. Moreover, the amount of BiP found in the immune-complex with wild-type remained constant, indicating that the reduction in HSA levels observed was not due to experimental flaw in the immunoprecipitation assay. Hence, it is unlikely that the diminution over time in the quantity of substrate immunoprecipitated be due to a decrease in the calnexin/Cnx1p content of the cells, rather these results indicate a transient interaction of HSA with the wild-type chaperone. This is also supported by an approximately constant amount of BiP in the immune complex (right panel of Figure 4B). However, the amount of this model protein precipitated with the hcd-deleted calnexin/Cnx1p mutants remained apparently constant during 180 minutes (Figure 4B). Thus, while HSA appeared to bind and release from WT calnexin/Cnx1p, this model protein seemed retained by  $\Delta hcd\_Cnx1p$  and  $mini\_Cnx1p$ . Interestingly, the secretion of HSA was slightly diminished in *cnx1* mutant strains (Figure 3A), hinting to a possible correlation between binding of this model protein to calnexin/Cnx1p mutants and reduced protein secretion. However, in the case of sNEP there is a diminution in the interaction with the hcd-truncated calnexin/Cnx1p mutants (Figure 4C), but no detectable increase in secretion was observed (Figure 3A). This could be due to the interaction of sNEP with

other components of the folding or quality control machineries after release from the hcd-deleted calnexin/Cnx1p mutants. In this vein, it is possible to speculate that the residual productive interaction observed between truncated mutants of calnexin/Cnx1p and sNEP, occurs via BiP which is found in a stable association with calnexin/Cnx1p as demonstrated in the right panel of Figure 4 A, B and C. Such cooperative interactions among ER chaperones have been well documented [21, 38, 45].

### **Increase in the overall secretion of endogenous proteins is increased in *cnx1* mutants lacking the highly conserved domain**

The results described thus far reveal that the hcd-deleted *cnx1* mutants affect differently the secretion of the model proteins studied, the secretion of cellulase (36 KDa) was significantly increased, while HSA (70 KDa) and sNEP (85 KDa) secretion was slightly reduced in the hcd-deleted *cnx1* mutants. In this context, one could argue that smaller proteins such as cellulase could fold more rapidly and be less dependent on the chaperone function of calnexin/Cnx1p, and thus deletion of the hcd domain would in general favour the secretion of small proteins. In the same vein, because they have more domains larger proteins might have longer folding kinetics, and consequently their chaperone requirements would be higher than for smaller proteins. In cases such as sNEP and HSA, retention by wild-type calnexin/Cnx1p would not constitute a limiting factor in the secretion process. In order to test these assumptions and formulate more general conclusions about the effects on secretion by the hcd-deleted mutant calnexin/Cnx1p, the overall amount of secreted endogenous proteins in the spent medium was analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining. As shown in Figure 5, the  $\Delta hcd\_cnx1$  and *mini\_cnx1* mutant strains exhibited a considerable increase in the secretion of a number of endogenous proteins. To verify that this significant increment of proteins in the spent medium of hcd-deleted mutants was due to actual secretion and not to cell lysis, the extracellular lactate-dehydrogenase (LDH) activity for all the strains was measured. No LDH activity could be

detected in the spent medium of any strain (data not shown), confirming that the observed increase in extracellular proteinaceous concentration was due to a general augmentation in the secretion of endogenous proteins in the *Δhcd\_cnx1* and *mini\_cnx1* mutant strains. Remarkably, the proteins over-secreted spanned a wide range of molecular masses (see arrows), suggesting that at least in the case of endogenous proteins the benefit of deleting the hcd region encoding the calnexin/Cnx1p chaperone function on secretion does not appear to be size-restricted.

## Concluding remarks

In this study, we established that *S. pombe* calnexin acts as a classical chaperone *in vitro* while mutants lacking the highly conserved central domain are devoid of this activity. Since hcd-deleted *cnx1* mutants are viable, these observations indicate that the essentiality of calnexin/Cnx1p for viability is not in its chaperone activity, but in another yet to be determined function. We have previously shown that calnexin/Cnx1p interacts with BiP independently of translation [21].  $\Delta$ hcd-Cnx1p and mini\_Cnx1p are able to form stable complexes with BiP (Figure 4), thus mapping the essential function of calnexin/Cnx1p and the site of interaction with BiP to the last 52 residues of the luminal domain of calnexin/Cnx1p. Therefore, it is tempting to speculate that the essential function of calnexin/Cnx1p in the fission yeast could be in the binding of BiP, and/or the scaffolding of other ER folding/quality control components.

While the chaperone function and substrate specificity of calnexin/calreticulin have been intensively investigated in the past, the specific role of these chaperones in the secretion process remains poorly understood. Recent papers studied the effects of calnexin/calreticulin overexpression on the secretion efficiency of various heterologous proteins in different organisms and obtained contradictory results [27,46,47]. Similarly, in the present study with three model proteins, we observed that strains devoid of the calnexin/Cnx1p chaperone function exhibited an important increase in the secretion of fungal cellulase, whereas secretion of rabbit sNEP and HSA was not affected or slightly reduced. While the molecular mass of the model proteins could be a factor in determining the effect of these mutations on their secretion, it is noteworthy that the increase in secretion of endogenous proteins in the hcd-deleted strains did not appear dependent on their size. In this vein, it could be argued that *S. pombe* secreted proteins are less dependent on the chaperone function of calnexin/Cnx1p, having evolved to fold optimally in the specific conditions of the ER of fission yeast. Hence, one could expect an increase in the overall

secretion of homologous proteins when the retention capabilities of calnexin/Cnx1p are diminished. In this context, it is interesting to consider that among our model proteins studied here, cellulase is the only fungal protein and is also the only one showing an increase in its secretion. On the other hand, mammalian proteins for which folding in the ER of *S. pombe* is rate limiting might require additional chaperone content in order to improve their secretion. Our studies may provide hints for future attempts at secreting large quantities of heterologous proteins in fungal hosts

### **Acknowledgments**

We thank Fadi Hajjar for the *S pombe* strain containing the genomic cellulase under the control of the *adh* promoter. We thank all members of the lab for critical reading of the manuscript (PBB, AD, FH, PS, CT, GRS). This work was supported by grants from The Medical Research Council of Canada (L.A.R. and G.B) and The National Science and Engineering Research Council of Canada (L.A.R.). M.C. was a Doctoral Fellow of the Cystic Foundation of Canada. A.M. was supported by an NSERC M.Sc studentship. P-L T. was supported by studentships from the Luigi Liberatore Foundation and the Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal.

## References

- 1 Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H. and Hirschberg, K. (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 557-589
- 2 Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: The role of Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 603-647
- 3 Fewell, S. W., Travers, K. J., Weissman, J. S., and Brodsky, J. L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 149-191
- 4 Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 181-191
- 5 Chevet, E., Cameron, P. H., Pelletier, M. F., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. M. (2001) The endoplasmic reticulum : integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 120-124
- 6 Adams, J. (2002) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* **29** suppl. 1, 3-9
- 7 Hampton, R. Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 476-82
- 8 McCracken, A. A. and Brodsky, J. L. (2003) Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *BioEssays* **25**, 868-877.
- 9 Kostova, Z. and Wolf, D. H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* **22**, 2309-2317

- 10 Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A. and Williams, D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 4697-4704
- 11 Spiro, R. G., Zhu, Q., Bhoyroo, V. and Soling, H. D. (1996) Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* **271**, 11588-11594
- 12 Danilczyk, U. G. and Williams, D. B. (2001) The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 25532-25540
- 13 Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F. and Williams, D. B., (1999) Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* **18**, 6718-6729
- 14 Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Güntert, P., Braun, D., Helenius, A. and Wüthrich, K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3133-3138
- 15 Schrag, J. D., Bergeron, J. J. M., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y. and Cygler, M. (2001) The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell* **8**, 633-644
- 16 Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y. And Williams, D. B. (2002) Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 29686-29697

- 17 Wada, I., Shin-ichi, I., Masahiro, K., Sakane, F. and Kanoh H. (1995) Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J. Biol. Chem.* **270**, 20298-20304
- 18 Jannatipour, M. and Rokeach, L. A. (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J. Biol. Chem.* **270**, 4845-4853
- 19 Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J. J. M. and Thomas, D. Y. (1995) The calnexin homologue *cnx1*<sup>+</sup> in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **14**, 3064-3072
- 20 Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J. and Thomas, D. Y., (1995) *Saccharomyces cerevisiae CNE1* encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J. Biol. Chem.* **270**, 244-253
- 21 Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A. J., Armstrong, J. and Rokeach, L. A. (1998) Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* **37**, 17253-17261
- 22 Beaulieu, H., Elagoz, A., Crine, P and Rokeach, L. A. (1999) Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* **340**, 813-819
- 23 Elagöz, A., Callejo, M., Armstrong, J. and Rokeach, L. A. (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460
- 24 Kowalski, J. M., Parekh, R. N., Mao, J. and Wittrup, K. D. (1998) Protein folding stability can determine the efficiency of escape from endoplasmic reticulum quality control. *J. Biol. Chem.* **273**, 19453-19458

- 25 Conesa, A., Punt, P. J., Van Lujik, N. and Van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet. Biol.* **33**, 155-171
- 26 Robinson, A. S., Bockhaus, J. A., Voegler, A. C. and Wittrup, K. D. (1996) Reduction of BiP levels decreases heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 10017-10022
- 27 Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D. B., van den Hondel, C. A. and Punt P. J. (2002) Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 846-851
- 28 Dorner, A. J., Wasley, L. C. and Kaufman, R. J. (1992) Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* **11**, 1563-1571
- 29 Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* **194**, 795-823
- 30 Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130
- 31 Petersen, C. E., Chung-Eun, H. A., Jameson D. M. and Bhagavan N. V. (1996) Mutations in a specific human serum albumin thyroxine binding site define the structural basis of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *J. Biol. Chem.* **271**, 19110-19117
- 32 Berthold, H., Scanarini, M., Abney, C. C., Frorath, B., Northemann, W. (1992) Purification of recombinant antigenic epitopes of the human 68-kDa (U1) ribonucleoprotein antigen using the expression system pH6EX3 followed by metal chelating affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **3**, 50-56

- 33 Chamberlain, L. H. and Burgoyne R. D. (1997) The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 31420-31426
- 34 Muller, S., Sandal T., Kamp-Hansen, P. and Dalboge, H. (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283
- 35 Ou, W. J., Bergeron, J. J. M., Li, Y., Kang, C. Y. and Thomas, D. Y. (1995) Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* **270**, 18051-18059
- 36 Corbett, E. F., Michalak, K. M., Oikawa, K., Johnson, S., Campbell, I. D., Eggleton, P., Kay, C. and Michalak, M. (2000) The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment. *J. Biol. Chem.* **275**, 27177-27815
- 37 Ihara, Y., Cohen-Doyle, M. F., Saito, Y. and Williams, D. B., (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol. Cell* **4**, 331-341
- 38 Crofts, A. J., Leborgne-Castel, N., Pesca, M., Vitale, A. and Denecke, J. (1998) BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* **11**, 459-470
- 39 Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y., Williams, D. B. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J. Biol. Chem.* **276**, 39779-39787
- 40 Pidoux, A. L. and Armstrong, J. (1992) Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **11**, 1583-1591

- 41 Parodi, A. J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* **348**, 1-13
- 42 Bauser, E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* **209**, 331-336
- 43 Shusta, E. V., Raines, R. T., Pluckthun, A. and Wittrup K. D. (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Biotech.* **16**, 773-777
- 44 Knee, R., Ahsan, I., Mesacli, N., Kaufman, R. J. and Michalak, M. (2003) Compromised calnexin function in calreticulin-deficient cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 661-666
- 45 Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T. And Hendershot, L. M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4456-4469
- 46 Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* **72**, 3851-3858
- 47 Tate, C. G., Whiteley, E. and Betenbaugh, M. J. (1999) Molecular chaperones improve functional expression of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter in insect cells. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 932-936

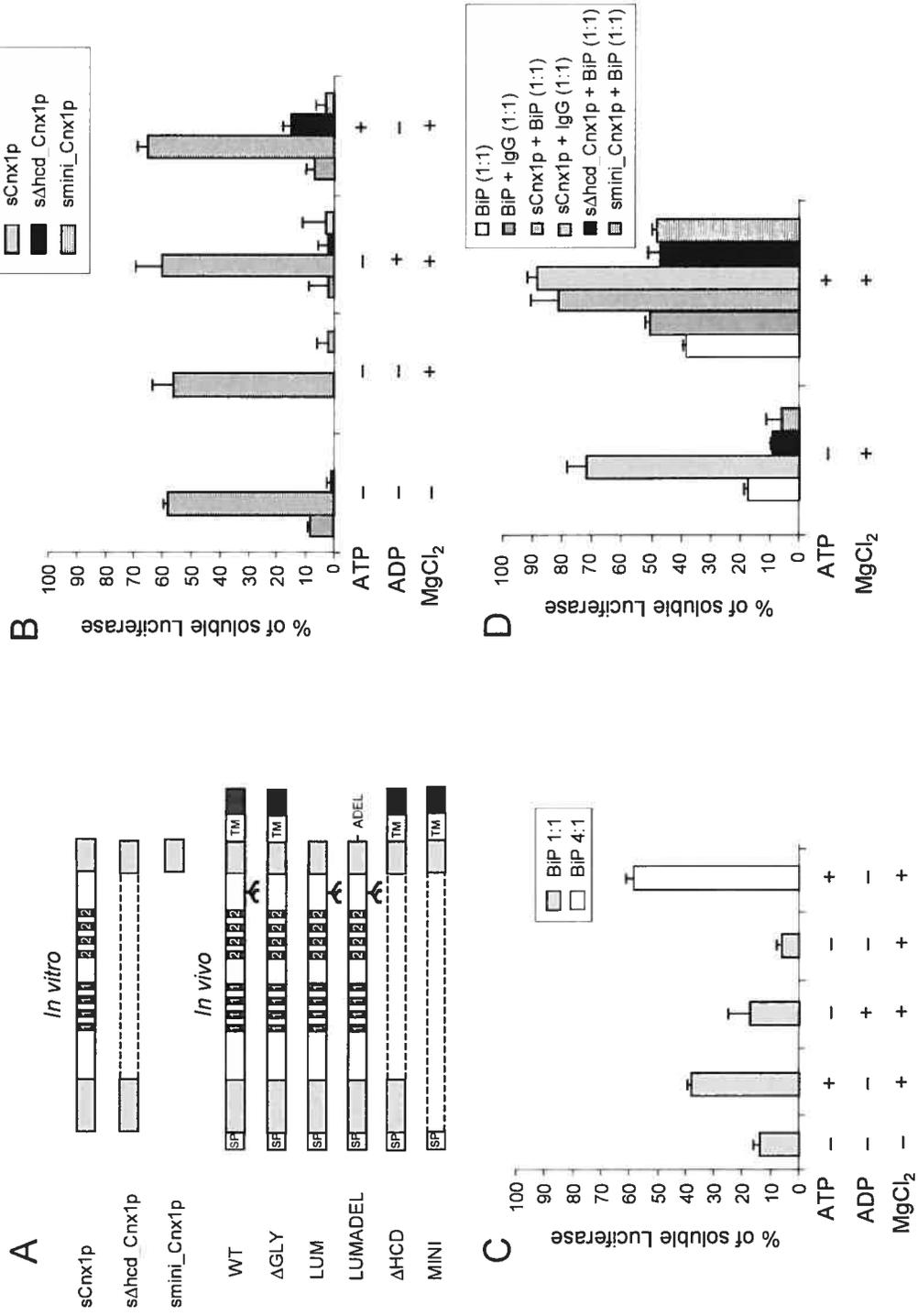
## Figures and Legends

### Figure 1: Absence of chaperone function in hcd-deleted calnexin/Cnx1p mutants

**A)** Schematic representation of calnexin/Cnx1p constructions used in experiments *in vitro* and *in vivo*. The highly conserved central domain (hcd) is indicated as the white box containing the two sets of 4 tandemly repeated motifs (1: I-DPD/EA-KPEDWDD/E; 2:G-W--P-I-NP-Y). SP denotes the signal peptide, the tree symbolizes glycosylation site, and TM the transmembrane domain.

**B, C, D)** The chaperone activities of WT and mutant calnexin/Cnx1p as well as that of BiP were assessed in a thermal denaturation assay as previously described [33]. WT and mutant calnexin/Cnx1p (1 $\mu$ M), or C) BiP (1 and 4  $\mu$ M) or D) a combination of calnexin/Cnx1p (1 $\mu$ M) and/or BiP (1 $\mu$ M) and/or IgG were incubated with *Photinus pyralis* luciferase (1 $\mu$ M) at 42°C for 10 minutes to provoke thermal denaturation of the substrate. Aggregates were separated from soluble proteins by centrifugation, migrated on a 12% SDS-polyacrylamide gel, stained with Coomassie Blue, and the band intensity was quantified by densitometry. Reactions were carried out in presence or absence of the following factors: ATP or ADP (5mM), and MgCl<sub>2</sub> (5mM). The background solubility of luciferase in the absence of chaperone was subtracted in each case. Results are expressed as the percentage of soluble luciferase with respect to total input, and are the mean of 3 independent experiments.

**Figure 1.**



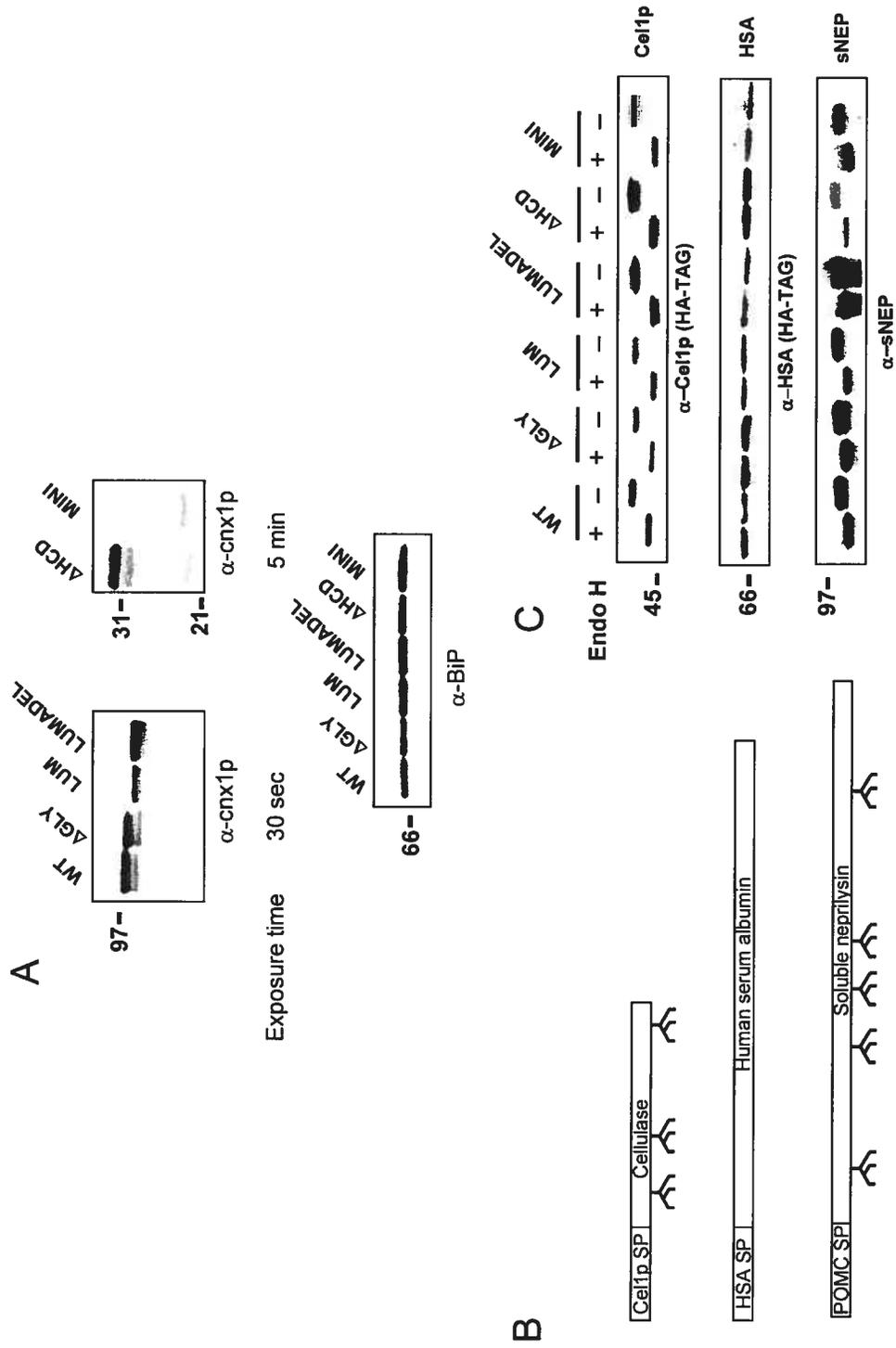
**Figure 2: Quantification of calnexin and BiP and evaluation of the glycosylation state of heterologous proteins in mutant and wild type *cnx1 S. pombe* strains**

**A)** Evaluation of the intracellular amount of calnexin/Cnx1p and BiP. Cell extracts (20  $\mu$ g) were fractionated on a 12% SDS-polyacrylamide gel, and analyzed by immunoblotting with polyclonal antibodies against BiP and calnexin/Cnx1p.

**B)** Schematic representation of secreted model proteins. SP: signal peptide, tree: potential glycosylation sites.

**C)** Analysis of glycosylation of model proteins. Cell extracts (20  $\mu$ g) were either treated or not with endoglycosidase H<sub>f</sub> as described in Experimental. After incubation, the material was resolved by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and subsequently immunoblotted with the corresponding antibodies, as denoted.

**Figure 2.**

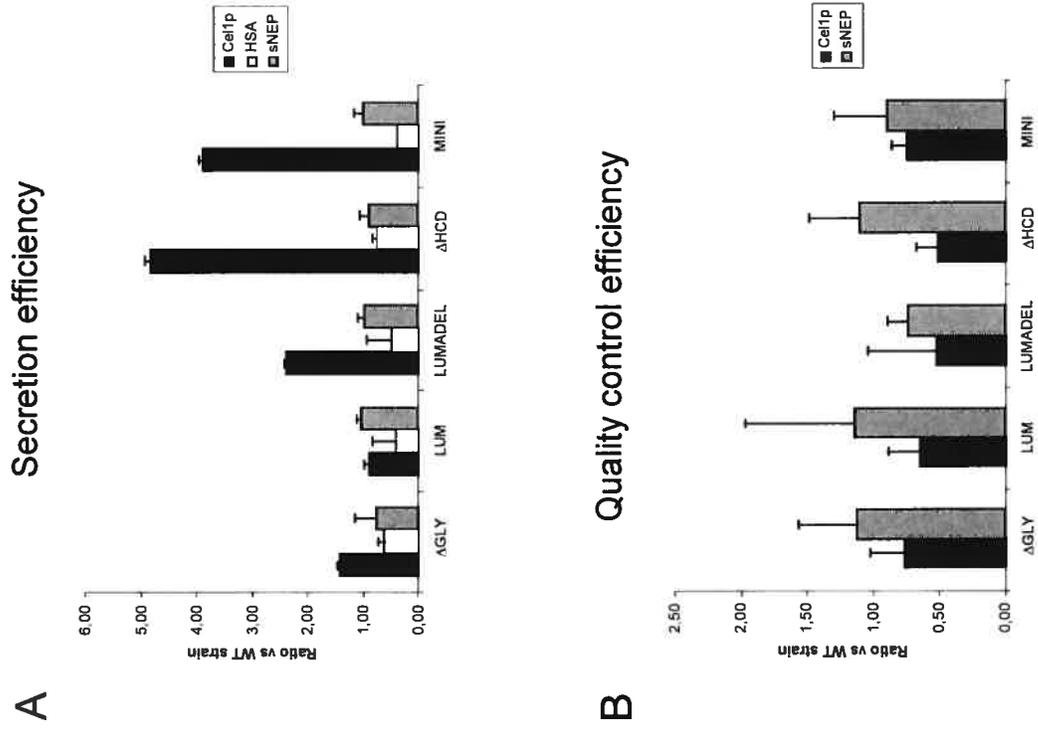


**Figure 3: Secretion and quality control efficiencies of *cnx1* mutants**

**A)** Secretion efficiency was calculated by dividing the amount of secreted proteins by the total amount of produced proteins (intracellular + secreted). A volume of 3 mL of spent medium from exponentially growing cells (0.8 OD) expressing the secreted model proteins was concentrated 30-fold using Microsep 10K Omega columns (PALL Life Sciences). The concentrated supernatant and 20  $\mu$ g of cell extracts were loaded on a 12% SDS-acrylamide gel, and subsequently quantified by Western blotting to evaluate the intracellular and extracellular levels of the model proteins.

**B)** Quality control efficiency was evaluated by dividing the activity of sNEP and cellulase (see Experimental Procedures) by the total amount of secreted model proteins. The secretion and quality control efficiencies of the WT strain were arbitrarily set to 1.0.

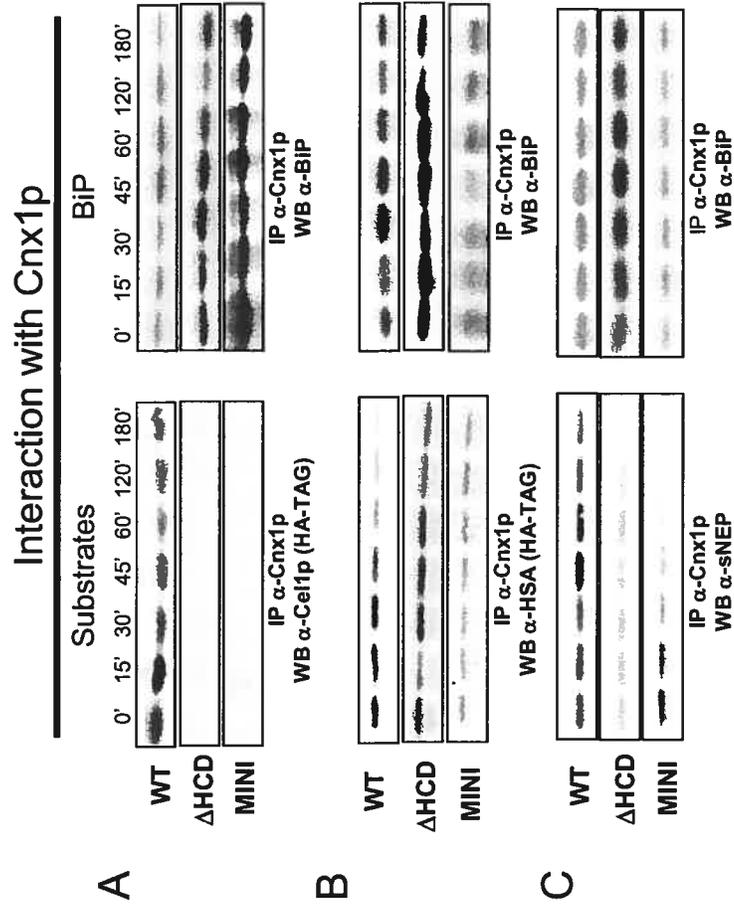
**Figure 3.**



**Figure 4: Interaction of calnexin/Cnx1p with glycosylated and non-glycosylated substrates**

Calnexin/Cnx1p association with **A)** Cellp, **B)** HSA, and **C)** sNEP was evaluated after treating exponentially growing cells (0.8 OD) with 10 mM DTT for 2 hours. Cells were then washed twice and resuspended in fresh medium containing 2mM cycloheximide. Samples were removed at various time points and immunoprecipitations were performed with anti-Cnx1p antibodies, and bound model proteins were detected by immunoblotting using the appropriate antibodies as described in Experimental.

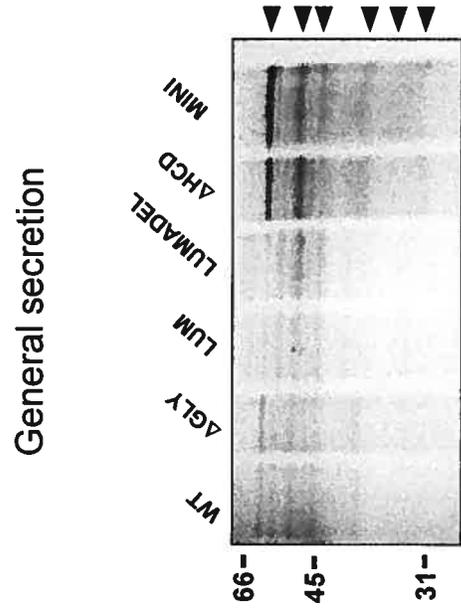
**Figure 4.**



**Figure 5: Secretion of endogenous proteins in *cnxI* mutant strains**

General secretion was evaluated by concentrating the supernatants from exponentially growing cells (0.8 OD) on Microsep 10K Omega columns (PALL Life Sciences). The concentrated material (200-fold) was then separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel colored with Coomassie Blue followed by silver nitrate staining. The arrows point to the major proteins oversecreted in the *hcd*-deletion mutants.

Figure 5.



### **3. Discussion**

### 3.1 La calnexine : une chaperone classique

Notre laboratoire avait déjà démontré que la calnexine minimale pouvant conférer la viabilité à la levure *S. pombe* possédait les 123 derniers acides aminés dont seulement 52 sont dans la lumière du RE [97]. Également, notre laboratoire a été parmi les premiers à démontrer que la calnexine peut interagir *in vivo* avec des substrats de façon indépendante de la reglucosylation et de la maturation des glycanes [64,124]. Il était connu que la calnexine de mammifères agit *in vitro* et *in vivo* comme une chaperone classique, bien que cette caractéristique demeure controversée [87-90]. Par exemple, le groupe de Williams a démontré *in vitro* que la calnexine de mammifère pouvait prévenir l'agrégation thermique de la citrate synthase (CS), une protéine non-glycosylée et de l' $\alpha$ -mannosidase et des IgY, deux protéines monoglucosylées [126]. Dans cette étude, la calnexine était aussi efficace que BiP pour prévenir l'agrégation de la CS et plus efficace dans le cas de la mannosidase et de IgY. Dans notre cas, à l'aide d'expériences semblables, nous voulions étudier la fonction chaperone de la calnexine de *S. pombe* *in vitro*. Ainsi, nous avons montré à la Figure 1 que la calnexine de *Schizosaccharomyces pombe* est une chaperone classique et qu'elle peut prévenir l'agrégation de la protéine modèle luciférase de *Photinus pyralis*. De plus, nous avons démontré que dans le cas de cette protéine modèle, Cnx1p est plus efficace que BiP pour prévenir son agrégation thermique. C'est le premier cas rapporté dans lequel la calnexine performe mieux que BiP dans un essai semblable et c'est une preuve supplémentaire que la calnexine n'agit pas seulement à titre de lectine pour les glycoprotéines monoglucosylées.

### 3.2 La quête de la fonction essentielle de la calnexine

Dans l'expérience décrite à la Figure 1, nous avons montré que la fonction essentielle encodée par les deux mutants de délétion n'est pas l'activité chaperone puisque, *in vitro*, ils ne sont pas capables de prévenir la formation d'agrégats de luciférase. Jusqu'à présent, il a été démontré que la calnexine était une chaperone classique et qu'elle peut faire

des interactions peptide-peptide afin de prévenir l'agrégation des protéines. Il est également bien accepté qu'elle agit comme une lectine pouvant lier les oligosaccharides monoglucosylés. Bien que nous n'ayons pas démontré que Mini\_Cnx1p et  $\Delta$ hcd\_Cnx1p ne possède pas d'activité lectine, il est possible de penser que ce n'est pas cette fonction qui soit encodée par les mutants. En effet, le cristal de la calnexine a été trempé dans une solution de 50mM  $\alpha$ -D-Glucose afin d'identifier des résidus potentiellement impliqués dans la liaison aux carbohydrates [73]. Les auteurs ont déterminé que le corps de la molécule de glucose était en contact avec l'acide aminé Met189 et que les groupements hydroxyles étaient liés via des ponts hydrogènes aux acides aminés Tyr165, Lys167, Tyr186, Glu217, et plus faiblement à Glu426. Ces résidus sont localisés dans le domaine globulaire et non pas dans le domaine épingle à cheveux, comme il avait été rapporté [127]. Lorsqu'on aligne les séquences de la calnexine de *S. pombe* et des mammifères, on peut constater que les résidus correspondants de Cnx1p, soit Tyr136, Lys138, Tyr154, Glu185 et Glu391, ne sont pas présents dans les mutants  $\Delta$ hcd\_Cnx1p et Mini\_Cnx1p [64]. De plus, des essais de liaison d'oligosaccharides avec des mutants de délétion de la calnexine ont démontré que le domaine globulaire était le lieu principal de liaison aux oligosaccharides, alors que le domaine central hautement conservé n'était que faiblement impliqué dans la liaison [84]. Notons que ces expériences sont un peu plus appropriées que le fait de tremper un cristal dans une solution d'un ligand non-physiologique. Les chercheurs ont démontré qu'une région nommée boîte C (388-441) avait un rôle important dans la liaison du polysaccharide, puisqu'une délétion de cette région provoque une perte de 43% d'affinité au  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . Il est à noter que cette boîte n'est pas présente dans nos mutants de délétion étudiés et que les aa en C-terminal de la calnexine de mammifères ne sont pas homologues à ceux de Cnx1p. De plus, l'ensemble des acides aminés 1-257 en N-terminal est également important, alors que ceux-ci sont complètement absents dans le cas de Mini\_Cnx1p et seulement les aa 1-86 sont présents dans  $\Delta$ hcd\_Cnx1p.

Elagöz *et al.* ont montré que les mutants  $\Delta$ hcd\_Cnx1p et Mini\_Cnx1p interagissent avec la chaperone BiP [97]. Dans l'article présenté ici, nous montrons à la figure 4 que ces

complexes sont stables et maintenus en absence de traduction de protéines pendant 3 heures. On peut donc penser que la fonction essentielle de la calnexine serait de former un complexe avec BiP et ainsi jouer un rôle de « protéine d'échaffaudage ». Le complexe calnexine-BiP joue certainement un rôle important dans le RE de la levure. Dans le but de mieux comprendre comment ce complexe est formé et quel est le rôle de celui-ci, il faudrait faire appel à une combinaison de mutants de chacune des chaperones.

Une des fonctions possibles encodées par la Mini\_Cxn1p pourrait être d'interagir avec une protéine formant le pore de translocation Sec61. Il a été démontré dans une étude chez la levure *Yarrowia lipolytica*, que la calnexine interagissait avec la protéine Sbh1p du pore de translocation Sec61 [51]. Chez *S.pombe*, l'homologue de la Sbh1p, une sous-unité de Sec61  $\beta$ 2, n'a jamais été étudié mais la séquence est maintenant connue grâce au projet de séquençage du génome. Par une approche de double hybride utilisant des mutants de délétion, Boisrame *et al.* ont démontré que la région de Sbh1p nécessaire pour l'interaction avec la calnexine était localisée au niveau des 13 derniers acides aminés en C-terminal. Dans le tableau I, on peut donc voir un alignement de ces acides aminés des protéines des deux organismes. Les acides aminés des extrémités C-terminal sont identiques à 38% et similaires à 92%. On peut donc spéculer que cette région de la sous-unité du pore de translocation Sec61 possède la même fonction chez les deux levures.

**Tableau I Alignement des séquences des acides aminés en C-terminal de la protéine Sbh1p de *Y. lipolytica* et d'une sous-unité de Sec61  $\beta$ 2 de *S. pombe***

Organismes	Séquences	% identité	% similarité
Y. lipolytica	L H I l A k v s T K l l g	38	92
S. pombe	L H I v A r i l K K f a s E		

Les résidus surlignés sont ceux identiques et ceux en minuscule sont similaires

En utilisant la même approche les auteurs ont déterminé que les acides aminés 460-473 de la calnexine de *Y. lipolytica* sont requis pour interagir avec la sous-unité  $\beta$  du pore de translocation. L'interaction entre les deux protéines se produirait vraisemblablement via leur domaine luminal et non via leur domaine transmembranaire et cytosolique. Ces résidus 460-473 sont présents dans Mini-Cnx1p et  $\Delta$ hcd\_Cnx1p, et on peut voir l'alignement de séquence de cette région dans le Tableau II. Cette séquence de 14 aa possède 29% d'identité et 50% de similarité entre les deux calnexines.

Tableau II **Alignement des séquences des acides aminés 460-473 des calnexines de *Y. lipolytica* et *S. pombe***

Organismes	Séquences	% identité	% similarité
<i>Y. lipolytica</i>	v <b>D</b> m f L <b>A</b> d P V S F <b>V</b> I <b>E</b>	29	64
<i>S. pombe</i>	y <b>D</b> i i K <b>A</b> k L P P N <b>V</b> a <b>E</b>		

Les résidus surlignés sont ceux identiques et ceux en minuscule sont similaires

De plus, nous avons observé que les domaines cytosolique et transmembranaire ne sont pas essentiels dans la fonction de la Mini\_Cnx1p (nos résultats non publiés). Dans des études de délétion, nous avons construit des mutants de la Mini\_Cnx1p sans domaine cytosolique (Mini-TM) et sans domaine transmembranaire et cytosolique (Mini-luminal).

Lors d'expériences d'échanges plasmidiques ces deux mutants ont été capables de conférer la viabilité à la levure. On peut donc penser un modèle dans lequel la calnexine, via une séquence d'acides aminés contenue dans les 52 aa de Mini\_Cnx1p, se lie au translocon et/ou rétrotranslocon et rapproche BiP qui se lie également à la Mini\_Cnx1p. Dans ce modèle on aurait un complexe tripartite BiP-Mini\_Cnx1p- Sec61. Il a été démontré chez *S. cerevisiae* que Kar2p est lié au complexe Sec61 et chez *Y. lipolytica*, Kar2p, interagit avec Sls1p, une protéine du RE impliquée dans la translocation des

protéines et qui est située à proximité du complexe Sec61 [128,129]. Si BiP de *S. pombe* interagit également avec des protéines du pore de translocation, alors le rôle de la Mini\_Cnx1p pourrait être de maintenir solidement en place BiP près du pore pour interagir rapidement avec les chaînes naissantes ou encore pour mieux livrer les protéines à l'extérieur du RE vers le protéasome.

Considérant les ressemblances entre la voie de sécrétion des mammifères et de *S. pombe*, cette levure est un organisme de choix pour préciser le rôle de la calnexine dans la dégradation des protéines associées au RE (ERAD). En fait, la compréhension du rôle de la calnexine dans ce processus est très minime [98]. Avec la banque de mutants disponibles dans le laboratoire du Dr Rokeach, il serait possible d'apporter de nombreuses précisions sur cette fonction possible de la calnexine. Une expérience classique pour étudier la dégradation associée au RE fait appel à l'utilisation de microsomes purifiés. En purifiant des microsomes de souches contenant des mutants de délétion, des mutants luminaux, ou des mutants sans région cytosolique et en utilisant le pro-facteur  $\alpha$  non glycosylé ( $\Delta$ Gp $\alpha$ F), on pourrait obtenir plusieurs indices sur la fonction de Cnx1p dans l'ERAD. De plus, par des expériences semblables, il serait possible de vérifier le rôle de la calnexine dans la translocation des protéines néo-synthétisées.

### **3.2 *S. pombe*, une usine productrice de protéines**

Dans notre article, nous avons montré que *in vitro* des mutants de la calnexine sans région centrale hautement conservée n'ont plus de fonction chaperone et *in vivo*, ces mutants permettent la sursécrétion de cellulase. Ces souches de *S. pombe* dans lesquelles la calnexine n'a plus de fonction chaperone pouvaient sécréter 4 à 5 fois plus de cellulase d'*Aspergillus aculeatus* qu'une souche sauvage pour la calnexine. De façon plus générale, à la Figure 5 de l'article, nous montrons que plusieurs protéines endogènes de masses moléculaires différentes sont également sursécrétées dans ces mêmes deux mutants. Il est donc tentant d'avancer que la calnexine chez *S. pombe* retient les protéines de façon

excessive et que le contrôle de qualité de la levure est le facteur limitant dans la sécrétion des protéines. Nous avons également montré que le contrôle de qualité dans le réticulum endoplasmique (que nous avons mesuré en faisant le ratio activité de protéines / protéines sécrétées) n'est pas affecté considérablement dans les souches mutantes. Ceci démontre que ce mécanisme est très efficace et qu'il peut tolérer des changements dans ces composantes. Sans doute qu'un tel contrôle de qualité du repliement des protéines dans le RE permet à la levure de mieux s'adapter dans les situations de stress élevé, dans lesquelles les levures se retrouvent constamment, et dans lesquelles la cellule ne pourrait survivre à l'accumulation de protéines mal repliées.

Finalement, nous avons pu observer que des trois protéines modèles que nous avons exprimées (sNEP, HSA, Cellp), seulement la cellulase a été sursécrétée dans le milieu extracellulaire. Puisque c'est une protéine d'*Aspergillus*, donc de champignon, nous avons émis l'hypothèse que c'était la mieux adapté aux conditions de repliement retrouvé dans le RE de *S. pombe*. À partir de ceci, il serait intéressant de vérifier si effectivement l'origine de la protéine hétérologue a un effet sur son niveau d'expression. Pour ce faire, il faudrait étudier l'expression de protéines qui ont des caractéristiques semblables à la sNEP et HSA mais qui proviennent de d'autres levures. En effet, la sNEP est une grande protéine de 90kDa avec cinq sites de glycosylation alors que la HSA n'a aucun site de glycosylation et a une masse moléculaire de 68kDa. Si un consensus au niveau des caractéristiques des protéines qui sont sursécrétées se dégage, alors il serait envisageable de modifier génétiquement les protéines en conséquence afin de favoriser leur production.

Les souches sécrétant plus de cellulase que la souche sauvage sont très intéressantes du point de vue biotechnologie appliquée à la production de protéines recombinantes. En effet, la cellulase trouve plusieurs applications très utiles et importantes dans différents types d'industries. Tout d'abord, elle est utilisée couramment dans la production laitière et l'élevage bovin. En effet, on répend la cellulase dans des mélanges d'engrais dans les

paturâges afin d'aider la digestion de la cellulose des végétaux. Ainsi, les vaches obtiennent un meilleur apport énergétique qui favorise la production laitière et la croissance [130]. Dans l'industrie du textile, on utilise la cellulase et d'autres hydrolases pour changer la texture des tissus, les rendre plus doux, améliorer leur aspect et même donner l'aspect « lavé à la pierre » au denim [131]. Une dernière utilisation de la cellulase qui est très innovatrice est la production de bioéthanol à partir de papier, de résidus végétaux ou d'autre matière, comme le bois. Les produits de la dégradation sont des sucres fermentescibles qu'on peut utiliser pour faire de l'éthanol et utiliser comme carburant dans les automobiles [132].

Dans l'industrie de la production de grande quantité de protéines, on cherche énormément à modifier des souches de différents microorganismes afin de diminuer les coûts de production des protéines. Parmi les microorganismes couramment utilisés on retrouve les espèces des genres *Trichoderma* et *Aspergillus*, des champignons filamenteux qui permettent la sécrétion de protéines jusqu'à l'ordre de 40g/L [133]. Une autre levure fréquemment utilisée est *Pichia pastoris*, une méthanolotrophe, dans laquelle la sécrétion la plus élevée a été de 14,8g/L de gélatine [134]. Plusieurs modifications dans la voie de sécrétion ont été ingénérées dans le but d'augmenter la production de protéines. Il a été montré que de changer le peptide signal d'une protéine hétérologue contre celui d'une protéine endogène pouvait augmenter la sécrétion. De plus, dans certains cas, des chercheurs ont augmenté la sécrétion d'une protéine en la fusionnant avec une protéine endogène fortement sécrétée. La capacité de glycosylation de la voie de sécrétion peut également être limitante dans la production de protéines hétérologues. Ainsi, en surexprimant des enzymes de la glycosylation, on peut arriver à augmenter la sécrétion de certaines protéines. Plusieurs modifications ont été apportées au niveau des chaperones moléculaires, puisque celles-ci aident au repliement et par conséquent à la sécrétion. Cependant, bien des résultats sont contradictoires et la situation varie selon la protéine surproduite et la chaperone dont le niveau varie. Par exemple, la surexpression de BiP

diminue la sécrétion de certaines protéines, alors que si BiP est moins exprimée, le niveau de protéines sécrétées augmente [135]. Dans certains cas, le niveau de protéines sécrétées est directement proportionnel avec le niveau de BiP. Par exemple, la sécrétion de prochymosine est augmentée quand le niveau de Kar2p est augmenté et le niveau de trois protéines recombinantes diminue si Kar2p est moins présent [135]. Les effets d'altération des niveaux d'expression de la calnexine sur la sécrétion de protéines ont aussi été rapportés. Dans le champignon *A. niger*, la surexpression de la calnexine résulte en une augmentation de la quantité extracellulaire de la manganèse peroxidase [136]. Par contre, chez les mammifères, il a été montré que la surexpression de la calnexine n'avait aucun effet sur la sécrétion de protéines de l'enveloppe du virus de l'hépatite C [137]. Dans notre cas, il s'agit du premier article démontrant qu'il est possible de changer le niveau d'expression d'une protéine hétérologue, non pas en variant la quantité d'une chaperone mais en la mutant. On peut facilement penser qu'en modifiant génétiquement les chaperones moléculaires du RE des levures couramment utilisées (*Pichia*, *Aspergillus* et *Trichoderma*), on pourrait grandement améliorer leur efficacité de sécrétion.

## Bibliographie

1. Voeltz, G.K., Rolls, M.M. & Rapoport, T.A. (2002) *Structural organization of the endoplasmic reticulum*. EMBO Rep. **3**, 944-950
2. Sheckman, R. & Orci, L. (1996) *Coat proteins and vesicle budding*. Science **271**, 1526-1533
3. Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H. & Hirschberg, K. (2000) *Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**, 557-589
4. Lippincott-Schwartz, J. & Zaal, K.J. (2000) *Cell cycle maintenance and biogenesis of the Golgi complex*. Histochem. Cell Biol. **114**, 93-103
5. Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. & Walter, P. (2000) *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation*. Cell **101**, 249-258
6. Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S. & Brodsky, J.L. (2001) *The action of the molecular chaperones in the early secretory pathway*. Annu. Rev. Genet. **35**, 149-191
7. Ellgaard, L. & Helenius, A. (2003) *Quality control in the endoplasmic reticulum*. Nature rev. **4**, 181-191
8. Stroud, R.M. & Walter, P. (1999) *Signal sequence and recognition and protein targeting*. Cur. Opin. Struct. Biol. **9**, 754-759
9. Johnson, A.E. & van Waes M.A. (1999) *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **15**, 799-842

10. VanValkenburgh, C., Chen, X., Mullins, C., Fang, H. & Green, N. (1999) *The catalytic mechanism of endoplasmic reticulum signal peptidase appears to be distinct from most eubacterial signal peptidases*. J. Biol. Chem. **274**, 11519-11525
11. Parodi, A.J. (1999) *Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells*. Biochim. Biophys. Acta **1426**, 287-295
12. Dempski, R.E. & Imperiali, B. (2002) *Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway*. Cur. Opin. Chem. Biol. **6**, 844-850
13. Parodi, A.J. (2000) *Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing in glycoprotein folding and degradation*. Biochem. J. **348**, 1-13
14. Helenius, A. & Aebi, M. (2001) *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science **291**, 2364-2369
15. Spiro, R.G. (2000) *Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides*. J. Biol.Chem. **257**, 35657-35660
16. Hauri, H.P., Kappeler, F., Andersson, H. & Appenzeller, C. (2000) *ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway*. J. Cell Sci. **113**, 587-96
17. Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. (2003) *Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**, 202-212
18. Shaw, P.E. (2002) *Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription*. EMBO Rep. **3**, 521-6

19. Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M. (1999) *Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum*. *Structure* **7**, 173-182
20. Partaledis, J.A. & Berlin, V. (1993) *The FKB2 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding the immunosuppressant-binding protein FKBP-13, is regulated in response to accumulation of unfolded protein in the endoplasmic reticulum*. *PNAS* **90**, 5450-5454
21. Goldberg, R.F., Epstein, C.J. & Anfisen, C.B. (1963) *Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme*. *J. Biol. Chem.* **238**, 1406-1410
22. Frand, A.R., Cuozzo, J.W. & Kaiser, C.A. (2000) *Pathways for protein disulfide bond formation*. *Trends Cell Biol.* **10**, 203-210
23. Noiva, R. (1999) *Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Seminars Cell Dev. Biol.* **10**, 481-493
24. Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de la Cruz, F.J. & Romisch, K. (1999) *Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase*. *J. Cell Biol.* **147**, 1443-1456
25. Wang, L., Fast, D.G. & Attie, A.D. (1997) *The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion*. *J. Biol. Chem.* **272**, 27644-27651

26. Freedman, R.B., Klappa, P. & Ruddock, L.W. (2002) *Protein disulfide isomerase exploits synergy between catalytic and specific binding domain*. EMBO Rep. **3**, 136-140
27. Pollard, M.G., Travers, K.J. & Weissman, J.S. (1998) *Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum*. Mol. Cell **1**, 171-182
28. Cuozzo, J.W. & Kaiser, C.A. (1999) *Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation*. Nat. Cell Biol. **1**, 130-135
29. Wearsch, P.A. & Nicchitta, C.V. (1996) *Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain*. Biochemistry **35**, 16760-16769
30. Argon, Y. & Simen, B.B. (1999) *GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties*. Semin. Cell & Devel. Biol. **10**, 495-505
31. Melnick, J., Dul, J.L. & Argon, Y. (1994) *Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum*. Nature **370**, 373-375
32. Gething, M.-J. (1999) *Role and regulation of the ER chaperone BiP*. Cell & Dev. Biol. **10**, 465-472 (36)
33. Pouyssegur, J., Shiu, R.P.C. & Pastan, I. (1977) *Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation*. Cell **11**, 941-947

34. Haas, I.G. & Wabl, M. (1983) *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature **306**, 387-389
35. Munro, S. & Pelham, H.R.B. (1987) *A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins*. Cell **48**, 899-907
36. Rose, M.D., Misra L.M. & Vogel, J.P. (1989) *KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene*. Cell **57**, 1211-1221
37. Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething M.-J. & Sambrook J. (1989) *S.cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP*. Cell **57**, 1223-1236
38. Pidoux, A.L. & Armstrong, J. (1992) *Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. **11**, 1583-1591
39. Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C. & McKay, D.B. (1990) *Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein*. Nature **346**, 623-628
40. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E. & Hendrickson, W.A. (1996) *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. Science **272**, 1606-1614
41. Clarke, A.R. (1996) *Molecular chaperones in protein folding and translocation*. Curr. Opin. Struct. Biol. **6**, 43-50
42. Brightman, S.E., Blatch, G.L. & Zetter, B.R. (1995) *Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins*. Gene **153**, 249-54

43. Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E.C. & Blond, S.Y. (2000) *Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1*. J. Biol.Chem. **275**, 19620-19627
44. Skowronek, M.H., Rotter, M. & Haas, I.G. (1999) *Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog*. Biol. Chem. **380**, 1133-1138
45. Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. & Zimmermann, R. (1999) *A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes*. Biol. Chem. **380**, 1175-1182
46. Yu, M., Haslam, R.H. & Haslam, D.B. (2000) *HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells*. J. Biol. Chem. **275**, 24984-24992
47. Shen, Y., Meunier, L. & Hendershot, L.M. ( 2002) *Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress*. J. Biol. Chem. **277**, 15947-15956
48. Scidmore, M.A., Okamura, H.H. & Rose, M.D. (1993) *Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum*. Mol. Biol. Cell **4**, 1145-1159
49. Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. & Silver, P.A. (1995) *A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s*. J. Cell. Biol. **129**, 979-988

50. Nishikawa, S. & Endo, T. (1997) *The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion.* J. Biol. Chem. **272** 12889-12892
51. Boisrame, A., Beckerich, J.M. & Gaillardin, C. (1996) *Sls1p, an endoplasmic reticulum component, is involved in the protein translocation process in the yeast Yarrowia lipolytica.* J. Biol. Chem. **271**, 11668-11675
52. Kabani, M., Beckerich, J.M. & Gaillardin, C. (2000) *Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum.* Mol. Cell Biol. **20**, 6923-6934
53. Tyson, J.R. & Stirling, C.J. (2000) *LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum.* EMBO J. **19**, 6440-645
54. Chung, K.T., Shen, Y. & Hendershot, L.M. (2002) *BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP.* J. Biol. Chem. **277**, 47557-47563
55. Gething, M.J. & Sambrook, J. (1992) *Protein folding in the cell.* Nature **355**, 33-45
56. McClellan, A.J., Endres, J.B., Vogel, J.P., Palazzi, D, Rose, M.D. & Brodsky, J.L. (1998) *Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation in the yeast ER.* Mol. Bio. Cell **9**, 3533-3545

57. Hamman, B.D., Hendershot, L.M. & Johnson, A.E. (1998) *BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation.* Cell **92**, 747-758
58. Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B. & McCracken, A.A. (1999) *The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct.* J. Biol. Chem. **274**, 3453-3460
59. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. & Ron, D. (2000) *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.* Nature **2**, 326-332
60. Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J. (1991) *SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane.* J. Biol. Chem. **266**, 19599-19610
61. Huang, L., Franklin, A.E. & Hoffman, N.E. (1993) *Primary structure and characterization of an Arabidopsis thaliana calnexin-like protein.* J. Biol. Chem. **268**, 6560-6566
62. Tjoelker, L.W., Seyfried, C.E., Eddy, R.L. Jr, Byers, M.G., Shows, T.B., Calderon, J., Schreiber, R.B. & Gray, P.W. (1994) *Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5.* Biochemistry **33**, 3229-36

63. Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J. & Thomas, D.Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus.* J. Biol. Chem. **270**, 244-253
64. Jannatipour, M. & Rokeach, L.A. (1995) *The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability.* J. Biol. Chem. **270**, 4845-4853
65. Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J. & Thomas, D.Y. (1995) *The calnexin homologue *cnx1*<sup>+</sup> in Schizosaccharomyces pombe, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain.* EMBO J. **14**, 3064-3072
66. Christodoulou, S., Lockyer, A.E., Foster, J.M., Hoheisel, J.D. & Roberts, D.B. (1997) *Nucleotide sequence of a Drosophila melanogaster cDNA encoding a calnexin homologue.* Gene **191**, 143-148
67. Boisrame, A., Chasles, M., Babour, A., Beckerich, J.M. & Gaillardin, C. (2002) *Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast Yarrowia lipolytica.* J. Cell Sci. **115**, 4947-4956
68. Wang, H., Entwistle, J., Morlon, E., Archer, D.B., Peberdy, J.F., Ward, M. & Jeenes, D.J. (2003) *Isolation and characterisation of a calnexin homologue, *clxA*, from Aspergillus niger.* Mol. Genet. Genomics **268**, 684-691
69. Ahluwalia, N., Bergeron, J.J., Wada, I., Degen, E. & Williams, D.B. (1992) *The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein calnexin.* J. Biol. Chem. **267**, 10914-10918

70. Degen, E. & Williams, D.B. (1991) *Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules*. J. Cell Biol. **112**, 1099-1115
71. Trombetta, E.S. & Helenius, A. (1998) *Lectins as chaperones in glycoprotein folding*. Curr. Opin. Struct. Biol. **8**, 587-592
72. Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Guntert, P., Braun, D., Helenius, A. & Wuthrich, K. (2001) *NMR structure of the calreticulin P-domain*. PNAS. **98**, 3133-3138
73. Schrag, J.D., Bergeron, J.J.M., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D.Y. & Cygler, M. (2001) *The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding*. Mol. Cell **8**, 633-644
74. Jakob, C.A., Chevet, E., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J. (2001) *Lectins of the ER quality control machinery*. Results Probl. Cell Differ. **33**, 1-17
75. Wong, H.N., Ward, M.A., Bell, A.W., Chevet, E., Bains, S., Blackstock, W.P., Solari, R., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J. (1998) *Conserved in vivo phosphorylation of calnexin at casein kinase II sites as well as a protein kinase C/proline-directed kinase site*. J. Biol. Chem. **273**, 17227-17235
76. Chevet, E., Wong, H.N., Gerber, D., Cochet, C., Fazel, A., Cameron, P.H., Gushue, J.N., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J. (1999) *Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes*. EMBO J. **18**, 3655-3666
77. Roderick, H.L., Lechleiter, J.D. & Camacho, P. (2000) *Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b*. J. Cell Biol. **149**, 1235-48

78. Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J. (1993) *Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation*. *Nature* **364**, 771-776
79. Hammond, C., Braakman, I. & Helenius, A. (1994) *Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control*. *PNAS*. **91**, 913-917
80. Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A. & Parodi, A.J. (1992) *Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase*. *Biochemistry* **31**, 97-105
81. Ritter, C. & Helenius, A. (2000) *Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 278-80
82. Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J. & High, S. (1997) *Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins*. *Science* **275**, 86-88
83. Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H. & High, S. (1999) *ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2573-2582
84. Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y. & Williams, D. B. (2002) *Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin*. *J. Biol. Chem.* **277**, 29686-29697
85. Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A. & Williams, D.B. (1995) *The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2*

- oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. J. Biol. Chem.* **270**, 4697-4704
86. Williams, D.B. (1995) *The Merck Frosst Award Lecture 1994/La conference Merck Frosst 1994. Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. Biochem. Cell Biol.* **73**, 123-132
87. Carreno, B.M., Schreiber, K.L., McKean, D.J., Stroynowski, I. & Hansen, T.H. (1995) *Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecules are associated with calnexin. Evidence implicating the class I-connecting peptide segment in calnexin association. J. Immunol.* **154**, 5173-5180
88. Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A. J., Armstrong, J. and Rokeach, L. A. (1998) *Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in Schizosaccharomyces pombe. Biochemistry* **37**, 17253-17261
89. Danilczyk, U. G. & Williams, D. B. (2001) *The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. J. Biol. Chem.* **276**, 25532-25540
90. Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F. & Williams, D. B., (1999) *Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. EMBO J.* **18**, 6718-6729
91. Ou, W. J., Bergeron, J. J. M., Li, Y., Kang, C. Y. & Thomas, D. Y. (1995) *Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca<sup>2+</sup>. J. Biol. Chem.* **270**, 18051-18059

92. Corbett, E. F., Michalak, K. M., Oikawa, K., Johnson, S., Campbell, I. D., Eggleton, P., Kay, C. & Michalak, M. (2000) *The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment*. J. Biol. Chem. **275**, 27177-27815
93. Ihara, Y., Cohen-Doyle, M. F., Saito, Y. & Williams, D. B., (1999) *Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro*. Mol. Cell **4**, 331-341
94. Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L.A. & Parodi, A.J. (1996) *A new stress protein: synthesis of Schizosaccharomyces pombe UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability*. EMBO J. **15**, 705-713
95. Fanchiotti, S., Fernandez, F., D'Alessio, C. & Parodi, A.J. (1998) *The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for Schizosaccharomyces pombe viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress*. J. Cell Biol. **143**, 625-635
96. Site internet: <http://biochemistry.utoronto.ca/williams/lab/chaperone.html>
97. Elagöz, A., Callejo, M., Armstrong, J. & Rokeach, L.A. (1999) *Although calnexin is essential in S. pombe, its highly conserved central domain is dispensable for viability*. J. Cell Sci. **112**, 4449-4460
98. McCracken, A.A. & Brodsky, J.L. (1996) *Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP*. J. Cell Biol. **132**, 291-298

99. Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Pesca, M., Vitale, A. & Denecke, J. (1998) *BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress*. *Plant Cell* **10**, 813-824
100. Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T. & Hendershot, L.M. (2002) *A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4456-4469
101. Dimcheff, D.E., Portis, J.L. & Caughey, B. (2003) *Prion proteins meet protein quality control*. *Trends Cell Biol.* **13**, 337-340
102. Thompson, A.J. & Barrow, C.J. (2002) *Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and Prion diseases*. *Curr. Med. Chem.* **9**, 1751-1762
103. Plemper, R. K. & Wolf, D.H. (1999) *Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease*. *TIBS.* **24**, 266-270
104. Pind, S., Riordan, J.R. & Williams, D.B. (1994) *Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. *J. Biol. Chem.* **269**, 12784-12788
105. Le, A., Steiner, J.L., Ferrell, G.A., Shaker, J.C. & Sifers, R.N. (1994) *Association between calnexin and a secretion-incompetent variant of human alpha 1-antitrypsin*. *Biol. Chem.* **269**, 7514-7519
106. Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I. & Ron, D. (2002) *Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response*. *Annu. Rev. Cell* **18**, 575-599

107. Hampton, R.Y. (2002) *ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation*. *Curr. Opin. Cell* **14**, 476-482
108. Mori, K., Ma, W., Gething, M.-J. & Sambrook, J. (1993) *A transmembrane protein with a cdc2<sup>+</sup>/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to nucleus*. *Cell* **74**, 743-756
109. Cox, J., Shamu, C.E. & Walter, P. (1993) *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. *Cell* **73**, 1197-1206
110. Spear, E. & Ng, D.T. (2001) *The unfolded protein response: no longer just a special teams player*. *Traffic* **2**, 515-523
111. Chapman, R., Sidrauski, C. & Walter, P. (1998) *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 459-485
112. Wang, X.-Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M. & Ron, D. (1998) *Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses*. *EMBO J.* **17**, 5708-5717
113. Tirasophon, W., Welihinda, A.A. & Kaufman, R.J. (1998) *A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional kinase-endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells*. *Genes Dev.* **12**, 1812-1824
114. Ma, Y. & Hendershot, L.M. (2001) *The unfolding tale of the unfolded protein response*. *Cell* **107**, 827-830
115. Harding, H.P., Zhang, Y. & Ron, D. (1999) *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. *Nature* **397**, 271-274

116. Kostova, Z. & Wolf D.H. (2003) *For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection*. EMBO J. **22**, 2309-2317
117. Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. & Aebi, M. (2001) *Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast*. EMBO Rep. **2**, 423-430
118. Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A. & Nagata, K. (2001) *A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation*. EMBO Rep. **2**, 415-422.
119. Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. & Paganetti, P. (2003). *Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle*. Science **299**, 1397-1400
120. Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. & Nagata, K. (2003) *EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexine*. Science **299**, 1394-1397
121. Pilon, M., Schekman, R. & Römisch, K. (1997) *Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation*. EMBO J. **16**, 4540-4548
122. Adams J. (2003) *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat. Rev. **29**, 3-9
123. Bochlter, M., Ditzel, B., Groll, M., Hartmann, C. & Huber R. (1999) *The proteasome*. Annu. Rev. Bio. Struct. **28**, 295-317

124. Beaulieu, H., Elagoz, A., Crine, P. & Rokeach, L.A. (1999) *Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* **340**, 813-819
125. Wood, V. et al. (2002) *The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880
126. Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y. & Williams, D. B. (2001) *Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates*. *J. Biol. Chem.* **276**, 39779-39787
127. Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. & Williams, D.B. (1998) *Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin*. *Biochemistry* **37**, 3480-3490
128. Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B. & Rapoport, T.A. (1997) *Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes*. *Science* **277**, 938-941
129. Boisrame, A., Kabani, M., Beckerich, J.M., Hartmann, E. & Gaillardin, C. (1998) *Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **273**, 30903-30908
130. Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. & Rode, L.M. (1999) *Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows*. *J. Dairy Sci.* **82**, 391-403

131. Miettinen-Oinonen, A. & Suominen, P. (2002) *Enhanced production of Trichoderma reesei endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric*. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 3956-3964
132. Lawford, H.G. & Rousseau, J.D. (2003) *Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant Zymomonas mobilis*. Appl. Biochem. Biotechnol. **105**, 457-469
133. Jeenes, D.J., Mackenzie, D.A., Roberts, I.N. & Archer, D.B. (1991) *Heterologous protein production by filamentous fungi*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **9**, 327-367
134. Werten, M.W., van den Bosch, T.J., Wind, R.D., Mooibroek, H. & de Wolf, F.A. (1999) *High-yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris*. Yeast **15**, 1087-1096
135. Conesa, A., Punt, P. J., Van Lujik, N. & Van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001) *The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view*. Fungal Genet. Biol. **33**, 155-171
136. Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D. B., van den Hondel, C. A. & Punt P. J. (2002) *Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 846-851
137. Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998) *Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins*. J. Virol. **72**, 3851-3858