



GRIGORE T. POPA UNIVERSITY OF
MEDICINE AND PHARMACY IASI

Molecular mechanisms of human diseases in the framework of autophagy and immunobiology

Habilitation Thesis

MARIANA PAVEL-TANASĂ, MD, PhD

Senior Lecturer

2023

SUMMARY

The present habilitation thesis summarises the most significant professional, academic and most importantly, the scientific achievements from my post-doctoral period (2016-2023) and outlines some of the research directions that I intend to pursue further.

The thesis is structured based on the guidelines recommended and approved by the National Council for Attestation of Titles, Diplomas and Certificates (CNATDCU) in 3 main sections with corresponding subsections as follows:

- **Section I** – describes the most relevant professional, academic and scientific achievements during the post-doctoral period.
- **Section II** – outlines the perspectives for future academic and research directions.
- **Section III** – indicates the list of bibliographic references cited in this thesis.

Section I. In this section, I included the most significant scientific results of my personal contributions and structured them in two main chapters, each with three subchapters.

Chapter I focuses on one of the most remarkable part of my postdoctoral scientific contribution, in the field of autophagy. Part of the results included here were performed in collaboration with scientists from the University of Cambridge and are a follow-up of the research study conducted for my PhD thesis, entitled *Actin cytoskeleton modulators reveal novel roles for autophagy in health and disease* and completed in March 2016.

Subchapter 1 details the molecular mechanisms of autophagy we identified to be linked to cancer. More precisely, the presented studies outline the role of autophagy in regulating the activity of YAP/TAZ co-transcriptional factors, often mutated and overexpressed in a variety of cancers and point out the dynamics of autophagy process in controlling cell proliferation and survival in different cancer cell lines and at distinct time-points. Here we managed to generate a dynamic mathematical model based on differential equations that reveals the strength of various feedback and forward loops characterising the complex autophagy-YAP/TAZ axis. Nevertheless, other intracellular signalling pathways that monitor cell proliferation and survival may be dissected *via* similar applied mathematical models.

Subchapter 2 details the molecular mechanisms of autophagy we identified to be linked to neurodegeneration. The included **Nature** study describe the role of ataxin 3 in interacting with Beclin-1 (a key component of autophagy machinery) *via* its polyQ domain, and thus, promoting deubiquitination of Beclin-1 and preventing its degradation by proteasome. As a result, reduced ataxin-3 activity or ataxin3/Beclin-1 interaction causes intracellular depletion of Beclin-1 which directly impairs autophagy. N-terminal fragments of HTT containing expanded polyQ domains are found in the brains of Huntington disease patients and cause toxicity in cells and in Huntington disease mouse models. Here we found that, full-length mutant HTT binds Beclin-1 and competes for Beclin-1 binding with ataxin3, and consequently, fibroblasts from Huntington disease patients have impaired autophagy.

Subchapter 3 details the molecular mechanisms of autophagy we identified to be linked to ageing. The results presented here were a follow-up of the data achieved in subchapter 1. Shortly, we identified that increased *SORBS3* expression, via inhibiting YAP/TAZ activity, is an important contributor to autophagic decline in mammalian brain ageing.

My personal contributions to this research were published in prestigious ISI journals: *Nature* (IF 41.577), *Nature Communications* (IF 17.694), *Neuron* (IF 14.319), *Cell Death and Differentiation* (IF 12.073), *Autophagy* (IF 13.391), *Journal of Molecular Biology* (IF 5.469), *Bioessays* (IF 4.653), *FEBS Journal* (IF 4.530).

Chapter II focuses on detailing the postdoctoral research performed within the Laboratory of Immunology and together with collaborators from the Department of Haematology, Oncology, Cardiology, Microbiology etc. from *Grigore T. Popa* University of Medicine and Pharmacy of Iasi. The studies included in this chapter are centred by the role of immune cells and molecules in mediating various pathologies, from cancer to infections.

Subchapter 1 details the research contribution conducted in the field of haematological malignancies. More precisely we investigated the correlation between the expression of molecules involved in antigen presentation and various immune checkpoint ligand/receptors with poor clinical outcome in acute myeloid leukaemia (AML) cases. We also investigated the KIR expression on NK cells of myelodysplastic syndrome (MDS) or AML cases compared to healthy controls, and were able to conclude that, in our study, MDS did not appear to represent a smooth transitional stage towards malignancy, but rather a decisive step in the evolution of the immune response while struggling to choose an efficient path for fighting cancer cells.

Subchapter 2 details the personal contribution given to the study of immune responses in solid tumours, while investigating the side-effects consequently to the use of monoclonal antibody-based therapies. More precisely, we found that the development of proteinuria during the first-line treatment with bevacizumab and chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer was an independent prognostic factor for overall survival, and correlated with a better clinical outcome.

Subchapter 3 explores the main findings of the study investigating the humoral immune responses achieved following vaccination anti-SARS-CoV-2. Here we were able to show that adipokine serum levels, and not vitamin D, correlate with the magnitude of humoral immune responses after dual vaccination, but only in younger individuals than 60 years old. The older vaccinated individuals showed reduced anti-SARS-CoV-2 antibody titres irrespective of their infection status or adipokine serum levels.

My personal contributions to this research were published in prestigious ISI journals, such as: *Frontiers of Immunology* (IF 8.787), *Frontiers of Oncology* (IF 6.244), *Immunobiology* (IF 3.152) *Current Oncology* (IF 3.109), *Vaccines* (IF 4.961).

Section II. This section covers the future research projects I intend to develop. Firstly, I am planning to continue and finish the current projects, and then, start new promising ones. One research direction will investigate the role of autophagy in regulating the expression of various plasma membrane molecules involved in controlling the activity of various immune cells (e.g., peripheral blood lymphocytes) in the context of both haematological and solid cancers. Another research direction would involve studying the role of mechanical cues in facilitating cytokine secretion and production by both immune and cancer cells.

Section III. This section comprises the list of bibliographic references used to conduct this thesis.

REZUMAT

Această teză de abilitare cuprinde cele mai semnificative realizări profesionale, academice și, cel mai important, științifice din perioada mea post-doctorală (2016-2023) și conturează câteva dintre direcțiile de cercetare pe care intenționez să le investighez în continuare.

Teza este structurată, conform ghidurilor recomandate și aprobate de Consiliul Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor (CNATDCU) în 3 secțiuni principale cu subsecțiuni, după cum urmează:

- **Secțiunea I** – descrie cele mai relevante realizări profesionale, academice și științifice din perioada post-doctorală.
- **Secțiunea II** – conturează perspectivele viitoarelor direcții academice și de cercetare.
- **Secțiunea III** – indică lista referințelor bibliografice citate în această teză.

Secțiunea I. În această secțiune am inclus cele mai semnificative rezultate științifice ale contribuțiilor personale și le-am structurat în două capitole principale, fiecare cu 3 subcapitole.

Capitolul I se concentrează pe contribuțiile mele științifice postdoctorale cele mai remarcabile din domeniul autofagiei. O parte din rezultatele incluse aici au fost realizate în colaborare cu oameni de știință de la Universitatea din Cambridge și sunt, în parte, o continuare a studiului de cercetare efectuat pentru teza mea de doctorat intitulată *Modulatori ai citoscheletului de actină dezvăluie roluri noi pentru autofagie în sănătate și boală* și finalizată în martie 2016. Capitolul I cuprinde la rândul său 3 subcapitole.

Subcapitolul 1 detaliază mecanismele moleculare ale autofagiei relevante în contextul cancerului. Mai precis, studiile prezentate subliniază rolul autofagiei în reglarea activității factorilor co-transcripționali YAP/TAZ, adesea supraexpresați într-o varietate de cancere și subliniază dinamica procesului de autofagie în controlul proliferării și supraviețuirii celulare în diferite linii celulare și la perioade de timp distincte. Astfel, am reușit să generăm modele matematice bazate pe ecuații diferențiale dependente de timp care dezvăluie importanța diferitelor bucle de feedback care caracterizează complexitatea axei autofagie-YAP/TAZ. Mai mult, și alte căi de semnalizare intracelulară, care monitorizează proliferarea și supraviețuirea celulară, pot fi disecate prin modele matematice similare.

Subcapitolul 2 detaliază mecanismele moleculare ale autofagiei în relație cu bolile neurodegenerative. Studiul publicat în *Nature* descrie rolul ataxinei-3 în interacțiunea sa cu Beclin-1 (o componentă cheie a procesului de autofagie) prin intermediul domeniului său poliQ ce favorizează deubiquitinarea moleculei Beclin-1, împiedicând astfel degradarea acesteia de către proteazom. Ca urmare, activitatea redusă a ataxinei-3 sau scăderea interacțiunii dintre ataxina-3 și Beclin-1 duce la scăderea nivelului intracelular de Beclin-1, ceea ce conduce la reducerea procesului de autofagie. Fragmentele N-terminale ale HTT care conțin domenii poliQ extinse se găsesc în creierul pacienților cu boala Huntington și provoacă toxicitate în celule și în modelele murine de boală. Aici am arătat că molecula HTT mutantă poate lega Beclin-1, concurând pentru legarea la Beclin-1 cu ataxina-3 și, în consecință, fibroblastele de la pacienții cu boala Huntington (caracterizați de HTT mutant) au procesul autofagic afectat.

Subcapitolul 3 detaliază mecanismele moleculare ale autofagiei în relație cu procesul de îmbătrânire. Rezultatele prezentate aici au fost o continuare a rezultatelor detaliate în subcapitolul 1. Pe scurt am identificat că expresia moleculei SORBS3 este crescută cu înaintarea în vârstă și contribuie la declinul autofagic prin inhibarea activității YAP/TAZ.

Contribuțiile mele personale la această cercetare au fost publicate în reviste prestigioase ISI, precum: *Nature* (IF 41.577), *Nature Communications* (IF 17.694), *Neuron* (IF 14.319), *Cell Death and Differentiation* (IF 12.073), *Autophagy* (IF 13.391), *Journal of Molecular Biology* (IF 5.469), *Bioessays* (IF 4.653), *FEBS Journal* (IF 4.530).

Capitolul II se concentrează pe detalierea cercetărilor postdoctorale efectuate împreună cu cercetători din cadrul Laboratorului de Imunologie și din cadrul Departamentelor de Hematologie, Oncologie, Cardiologie, Microbiologie etc. de la Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa din Iași. Studiile incluse în acest capitol sunt centrate pe rolul celulelor și moleculelor imune în mediarea diferitelor patologii, de la cancer la infecții.

Subcapitolul 1 detaliază rezultatele cercetării științifice efectuate în domeniul afecțiunilor maligne hematologice. Mai precis, am investigat corelația dintre expresia moleculelor implicate în prezentarea antigenică și a diversilor liganzi/receptori de reglare imună cu prognosticul clinic în leucemia acută mieloidă (LAM). De asemenea, am investigat expresia receptorilor KIR pe celulele NK în cazurile de sindrom mielodisplazic (SMD) sau LAM și am putut concluziona că, în studiul nostru, SMD nu pare să reprezinte o etapă de tranziție lină spre malignitate, ci mai degrabă un pas decisiv în evoluția răspunsului imun în căutarea unei căi eficiente de combatere a celulelor canceroase.

Subcapitolul 2 detaliază contribuția personală din studiului răspunsurilor imune la cazurile cu tumori solide, și anume investigarea efectele secundare ale utilizării terapiilor bazate pe anticorpi monoclonali. Astfel, am constatat că dezvoltarea proteinuriei în timpul tratamentului de primă linie cu bevacizumab și chimioterapie în cazul pacienților cu cancer colorectal metastatic a fost un factor de prognostic independent pentru supraviețuirea globală.

Subcapitolul 3 explorează principalele rezultate ale studiului ce a avut ca scop investigarea răspunsurilor imune umorale obținute în urma vaccinării anti-SARS-CoV-2. Aici am putut arăta că amploarea răspunsurilor imune umorale după vaccinare se corelează cu nivelurile serice ale adipokinelor, dar nu al vitaminei D la indivizii mai tineri de 60 de ani.

Contribuțiile mele personale la această cercetare au fost publicate în reviste prestigioase ISI, precum: *Frontiers of Immunology* (IF 8.787), *Frontiers of Oncology* (IF 6.244), *Immunobiology* (IF 3.152) *Current Oncology* (IF 3.109), *Vaccines* (IF 4.961).

Secțiunea II. Această secțiune acoperă viitoarele proiecte de cercetare pe care intenționez să le dezvolt. În primul rând, plănuiesc să continui și să termin proiectele actuale, apoi să încep altele noi promițătoare. O primă direcție de cercetare va investiga rolul autofagiei în reglarea expresiei diferitelor molecule de la nivelul membranei plasmatică implicate în reglarea activității celulelor immune (ex. limfocitele periferice) în contextul cancerelor hematologice și solide. O altă direcție de cercetare ar implica studiul rolului stimulilor mecanici în controlul secreției și producției de citokine, atât de către celulele imune, cât și de cele canceroase.

Secțiunea III. Această secțiune cuprinde lista referințelor bibliografice citate în teză.