

Targeting of membrane proteins to the inner nuclear membrane

Doctoral Thesis

Author(s):

Ungricht, Rosemarie

Publication date:

2015

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010494154>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 22578

Targeting of membrane proteins to the inner nuclear membrane

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Rosemarie Ungricht
Master of Science in Biochemistry, University of Zurich
born November 2nd, 1985
Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Ulrike Kutay, examiner
Prof. Wolfram Antonin, co-examiner
Prof. Daniel Gerlich, co-examiner
Prof. Thomas Schwartz, co-examiner

2015

Summary

The inner nuclear membrane (INM) represents a specialized subdomain of the endoplasmic reticulum (ER) that harbors a unique set of integral membrane proteins. These proteins perform key functions in the organization of intranuclear architecture, control of gene expression and coupling of the nucleus to the cytoskeleton. However, the molecular mechanism of membrane protein sorting from the ER to the INM is only poorly understood. Newly synthesized INM proteins are inserted into the ER from where they diffuse laterally through ER cisternae and tubules to the outer nuclear membrane (ONM). On their journey from the ONM to the INM proteins pass nuclear pore complexes (NPC), large macromolecular assemblies that regulate exchange between nucleus and cytosol. Different modes of NPC translocation have been proposed ranging from undirected movement by passive diffusion to facilitated transport, similar to import of soluble cargo. In the case of undirected diffusion, enrichment at the INM over the ER is supposed to rely on retention of INM proteins on nuclear binding partners such as chromatin or the lamina.

To gain a deeper understanding of how membrane proteins are sorted to the INM, we employed two approaches: On the one hand, we delineated sequence elements that are required for INM targeting of human SUN2. On the other hand, we established a visual *in vitro* assay that uncouples protein synthesis from transport to the INM. This assay enabled us to identify cellular components necessary for INM targeting and monitor trafficking dynamics of the natural human INM proteins SUN2, LBR and LAP2 β .

In this study, we demonstrate that sorting of membrane proteins to the INM differs from transport of soluble cargo into the nucleus. INM proteins, like LBR and SUN2, contain nuclear localization signals (NLSs) that are well characterized for their role in nuclear import of soluble proteins. However, we demonstrate that trafficking of NLS containing INM proteins is independent of receptor-mediated

transport. In a comprehensive series of RNAi-mediated knockdown experiments, we confirmed that the NPC translocation pathway of INM proteins and soluble cargo differs. Further, this analysis revealed that the Nup53-93 subcomplex and the transmembrane nucleoporin NDC1 confine the lateral passageways between NPCs and nuclear membrane. In line with diffusion through narrow passageways, we observe that NPC translocation is the rate-limiting step in membrane protein import.

The existence of retention at the INM has long been recognized; yet its importance for sorting of INM proteins has remained controversial. Our analysis reinforces that retention on binding partners determines the enrichment level at the INM. We could demonstrate that both nuclear and luminal domains of SUN2 contribute to retention. Moreover, the construction of an artificial membrane protein without any natural sorting signals substantiated that retention is sufficient for INM targeting.

Interestingly, our *in vitro* reconstitution approach revealed that targeting of all analyzed reporters (SUN2, LBR and LAP2 β) was energy-dependent. In the absence of NTPs we observed structural changes and a reduced diffusional mobility in the ER. Indeed, we could confirm by a mathematical simulation that targeting defects observed upon energy depletion arise as a consequence of structural changes in the ER.

In conclusion, our study reveals that nuclear retention, diffusional mobility in the ER as well as the number and architecture of NPCs are major determinants for targeting from the ER to the INM. Therewith, our data support a diffusion-retention model. The diffusion-retention based targeting of NLS containing INM proteins, like LBR and SUN2, opens up the possibility that a unifying mechanism for sorting of membrane proteins to the INM may exist.

Zusammenfassung

Die innere Kernmembran ist eine spezialisierte Region des endoplasmatischen Retikulums, die sich durch eine spezifische Komposition an Proteinen auszeichnet. Diese Proteine erfüllen essentielle Aufgaben bei der Etablierung der Architektur der Kernhülle und bei der Regulierung der Genexpression. Wie diese Membranproteine jedoch spezifisch zur inneren Kernmembran sortiert werden, ist bis heute nur schlecht verstanden. Während der Synthese werden Membranproteine in das endoplasmatische Retikulum inseriert, von wo sie durch Zisternen und Tubuli zur äusseren Kernmembran diffundieren können. Um von der äusseren zu inneren Kernmembran zu gelangen, müssen Membranproteine Kernporenkomplexe passieren. Kernporenkomplexe sind supramolekulare Strukturen, die den bidirektionalen Transport von Molekülen zwischen dem Cytosol und dem Zellkern kontrollieren. Für den Transfer von Membranproteinen durch Kernporenkomplexe wurden zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen vorgeschlagen: ein auf passiver Diffusion beruhender und ein aktiv gesteuerter Mechanismus, vergleichbar mit dem Transport von löslichen Proteinen. Im Falle von ungerichteter Diffusion würde die Anreicherung an der inneren Kernmembran durch starke Wechselwirkungen mit nukleären Bindungspartnern erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ansätze angewandt, um ein besseres Verständnis zu erlangen, wie Membranproteine zur inneren Kernmembran sortiert werden. Einerseits grenzten wir ein, welche Sequenzelemente des humanen Membranproteins SUN2 für die Anreicherung an der inneren Kernmembran nötig sind. Andererseits, entwickelten wir einen experimentellen Ansatz, der es uns ermöglichte, die Proteinsynthese vom Transport zur inneren Kernmembran zu entkoppeln. Dieser Ansatz erlaubte uns den Transport dreier Membranproteine (SUN2, LBR und LAP2 β) visuell zu verfolgen und die für den Prozess essentiellen zellulären Voraussetzungen zu identifizieren.

Wir zeigen in dieser Studie, dass sich der Transport von Membranproteinen und löslichen Proteinen durch die Kernpore unterscheidet. In löslichen wie auch in membrangebundenen Proteinen sind Kernlokalisationssignale vorhanden, so zum Beispiel in SUN2 und LBR. Durch die Rekonstruktion des Transport-Prozesses *in vitro* konnten wir jedoch eindeutig zeigen, dass gerichteter Transport unterstützt durch Transportrezeptoren und RanGTP nicht für die Anreicherung von Membranproteinen an der inneren Kernmembran benötigt wird. Eine umfassenden Reihe von RNA-Interferenz Experimenten bestätigte uns, dass sich der Transportweg von Membranproteinen und löslichen Proteinen unterscheidet. Diese Analyse lässt zudem den Schluss zu, dass die Durchgänge, durch welche Membranproteine die Kernpore passieren, vom Nup53-93 Kernporensubkomplex und durch NDC1 in der Membran der Kernpore begrenzt werden. Die Passage durch den Kernporenkomplex scheint ausserdem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Transportweges zu sein, was für Diffusion durch enge Kanäle sprechen könnte.

Das Membranproteine an der inneren Kernmembran Wechselwirkungen eingehen, die sie immobilisieren, ist schon lange bekannt, dennoch war deren Bedeutung für den Transport umstritten. Unsere Studie unterstreicht die Wichtigkeit dieser Wechselwirkungen und zeigt auf, dass die Stärke der Bindungen den Grad der Anreicherung bestimmt.

Interessanterweise zeigte unser *in vitro* Rekonstruktionsansatz, dass für einen effizienten Transport zur inneren Kernmembran Energie benötigt wird. Ohne Energie beobachteten wir strukturelle Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums und eine reduzierte Mobilität der darin enthaltenen Proteine. Wir bestätigten durch eine mathematische Simulation, dass bei Energiemangel, strukturelle Änderungen im endoplasmatischen Retikulums den Transport zur inneren Kernmembran beeinträchtigen.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass ungehinderte Diffusion im ER, die Anzahl und Zusammensetzung der Kernporen und Retention an der inneren Kernmembran zur effizienten und korrekten Sortierung von Membranproteinen

beiträgt. Damit unterstützen unsere Daten das vor Jahren vorgeschlagene Diffusion-Retentions Modell. Zudem scheint die retentionsgesteuerte Anreicherung von Membranproteinen die Kernlokalisierungssignale enthalten, wie LBR und SUN2, die Möglichkeit eines einheitlichen Sortier-Mechanismus für alle Membranproteine der inneren Kernmembran zu eröffnen.