



Doctoral Thesis

The sorting receptor for soluble ER proteins

Author(s):

Semenza, Jan C.

Publication Date:

1991

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000619066> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

2. Dez. 1991

Diss. ETH No.9533

The Sorting Receptor for Soluble ER Proteins

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences
presented by

Jan C. Semenza

Dipl. sc. nat. ETH Zurich

born 17th April, 1962

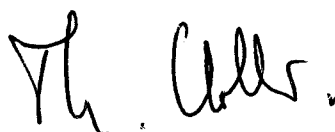
citizen of Zollikon, ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Th. Koller, examiner

Dr. H.R.B. Pelham, co-examiner

Zurich, 1991



ZUSAMMENFASSUNG

Organisation ist (nicht nur) für die Zelle essentiell. Proteine müssen vom Ort ihrer Synthese zu ihrem entsprechenden Arbeitsplatz transportiert werden, den sie nicht verlassen sollten. Ein spezielles Problem stellt sich für lösliche Proteine des Endoplasmatischen Reticulums (ER), die in ihrem Organell zurückgehalten werden müssen. Diese Aufgabe ist eines der quantitativ wichtigsten Sortierungsprobleme einer eukaryotischen Zelle. Alle Proteine, die ins ER transloziert worden sind, müssen aussortiert und von denjenigen unterschieden werden, die im ER zurückgehalten werden sollen. Denn das ER gilt als Quelle eines Flusses, der alle Proteine, löslich oder membrangebunden, durch den Golgi-Apparat aus der Zelle herausschwemmt. Diesem Fluss müssen speziell diejenigen Proteine widerstehen, die im ER in einer löslichen Form zurückgehalten werden müssen. Solche Proteine besitzen an ihrem C-Terminus ein sehr charakteristisches Signal das aus vier Aminosäuren besteht: KDEL für tierische Zellen oder HDEL in *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses Signal ist dafür verantwortlich, dass lösliche, luminaire ER Proteine zurückgehalten werden und nicht vom Sekretionsfluss erfasst werden. Es ist sogar möglich dieses Signal an andere Proteine, die normalerweise ausgeschieden werden, anzuhängen und dadurch ihre Retention zu bewirken. Kleine Änderungen in dieser Sequenz hat eine Inaktivierung des Retentionssignals zur Folge: das Protein wird sezerniert! Die Tatsache, dass mehr und mehr luminaire ER-Proteine mit diesem Signal entdeckt werden, und dass dieses spezifische Signal so exponiert am C-terminus auftritt sowie strikt konserviert ist, suggeriert die Existenz eines Rezeptors, der dieses Signal erkennt und lösliche ER-Proteine zurückbehält. Lösliche Proteine des ER's wie etwa BiP (immunoglobulin binding protein), PDI (protein disulfide isomerase) oder GRP94 (ein Mitglied der 'heat shock proteins' Familie) müssen aber, um ihre Funktion zu erfüllen (sie assistieren die Faltung und Oligomerisierung von neu synthetisierten Proteinen), in einer frei diffundierbaren Form vorkommen und dürfen nicht an der ER Membran immobilisiert werden. Das bedeutet, dass dieser hypothetische Rezeptor das Signal nicht im ER bindet, sondern in einem anliegenden Kompartiment, wie zum Beispiel dem Golgi-Apparat. Von hieraus könnte der Rezeptor lösliche ER Proteine, die aus dem ER entwichen sind und dem Sekretionsfluss gefolgt sind, auffangen und wieder in das ER zurückführen.

Die Isolierung der molekularen Komponenten dieser Retentionsmaschinerie, im speziellen des Rezeptors, ist ein erster Schritt, um diesen Prozess aufzuschlüsseln.

Ich habe einen genetischen Ansatz gewählt, um dieses Problem zu lösen und im Verlauf dieser Arbeit vier Gene kloniert, sequenziert

und analysiert. Hefe Mutanten, die ihre eigenen ER Proteine sezernieren, sind isoliert worden, die entsprechenden Gene habe ich kloniert. Eines dieser Gene (*ERD2*) kodiert für den Rezeptor: Es kontrolliert die Kapazität und Spezifität des Retentionssystems.

Es liegt auf der Hand, all die Fragen aufzuwerfen, die mit diesem Rezeptor in Zusammenhang stehen. Für die Beantwortung dieser Fragen erweist sich die Reverse Genetik als einer der grossen Vorteile der Hefe. Von Interesse wäre, wie der Rezeptor das spezifische Signal mit hoher Präzision bindet, wie der Rezeptor im Golgi-Apparat gehalten wird und wie er von dort zurück zum ER gebracht wird. Weiterhin ist unklar, weshalb der Rezeptor das Retentionssignal nicht schon im ER bindet, sondern erst im Golgi-Apparat. Ich habe versucht die Antwort auf einige dieser Fragen zu finden:

Molekulare Aufschlüsselung der Struktur-Funktions-Beziehung des Rezeptors hat die Basis für die Spezifität ergeben. Es ist mir gelungen, auf drei verschiedenen Wegen eine einzige Aminosäure zu identifizieren, welche die HDEL Spezifität determiniert: Ich habe gezeigt, dass *ERD2* ein essentielles Gen ist. Diese Tatsache hat es ermöglicht, UV-induzierte *erd2* Mutanten zu untersuchen, die eine spezifische Bindungsstellenmutation besitzen. Jede Mutation, die den Rezeptor inaktiviert, wird von vornherein ausgeschieden, denn eine solche Mutante wäre nicht lebensfähig. Ich habe vier UV-induzierte *ERD2* Mutanten kloniert, analysiert und die Punktmutationen identifiziert. Eine dieser Mutanten (B25) hat eine spezifische Mutation, welche die spezifitätbestimmende Position im Rezeptor lokalisiert. Diese Tatsache basiert auf strukturellen Überlegungen und den folgenden Experimenten: Chimere zwischen zwei Rezeptoren zweier Hefe Spezies mit unterschiedlicher Spezifität (eine bindet zusätzlich zu HDEL auch noch DDEL), lokalisieren die Spezifität-determinierende Region zu fünf Aminosäuren, von welche eine der Position der B25 Mutation entspricht. Spezifische Mutationen in dieser Region eliminieren die Bindung von HDEL aber nicht von DDEL. Diese erstaunliche Tatsache zeigt, dass die Bindung zum Retentionssignal (HDEL) nicht mehrere Aminosäuren beansprucht, die vielleicht linear getrennt sind aber räumlich interagieren können, sondern sehr lokal erfolgt. Ich habe Sekundärstruktur-Algorithmen genutzt, um die Struktur in dieser Spezifität bestimmenden Region vorauszusagen und ermittelt, dass hier eine amphipatische Helix geformt werden kann. Es ist verlockend zu spekulieren, dass eine solche Helix mit dem polaren Teil eine Bindungstasche (oder Rinne) bildet und den apolaren Teil der Membran zuwendet. Solche detaillierte Fragen können jedoch nur röntgenkristallographisch beantwortet werden. In verschiedenen Experimenten (Fusionsprotein, künstliche Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen) zur Analyse der Membranorientierung

habe ich gezeigt, dass der Rezeptor ein kleines Protein (26kDa) mit sieben Transmembransegmenten ist. Der N-Terminus liegt im Lumen des ER und der C-Terminus ist im Cytoplasma exponiert. Eine solche Orientierung ist im Einklang mit dem Hydrophobizitätsprofil und der Ladungsverteilung (mehr positive Ladungen im Cytoplasma als im ER). Die spezifitätsdeterminierende Region liegt, wie erwartet, im Lumen des ER's, um mit dem Retentionssignal zu interagieren und bestätigt die Membrantopologie des Rezeptors. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Rezeptor eine kompakte, hoch organisierte Struktur bildet, tief eingebettet in der Membran, eine Struktur, die in Anbetracht der verschiedenen hoch spezifischen Funktionen des Rezeptors sehr plausibel ist.

SUMMARY

Organization is an absolute requirement for the eukaryotic cell. In order to establish such an organization, proteins have to be localised from their place of synthesis to their place of action. A particular problem arises for ER proteins which have to be retained in this compartment. All proteins translocated into the ER need to be sorted from the proteins which have to remain in the ER. These resident ER proteins share a conserved tetrapeptide, found at their carboxy-terminus, which is KDEL in animal cells and HDEL or DDEL in yeast. This signal is necessary and sufficient for their retention in the ER. The existence of a receptor which recognizes this signal has been proposed, and the receptor is thought to bind in the Golgi to the signal of ER proteins which have escaped from the ER, returning them to their correct subcellular location.

In an attempt to analyze the system in molecular terms, I have cloned and analyzed four genes. Two of these genes have been isolated from yeast mutants that fail to retain their endogenous ER proteins, and have been cloned by functional complementation. One of these genes has been shown to encode the receptor, based on its ability to control the capacity as well as the specificity of the retention system. I have dissected this receptor on a molecular level in order to understand the basis for its specificity, which led to the identification of a single amino acid which determines the specificity. Three approaches have been used to identify the specificity determining region within the receptor. First, I showed that ERD2 is an essential gene, and based on this finding I took advantage of the existence of viable, UV generated yeast mutants which fail to retain their ER proteins. Such mutants were expected to have a rather specific mutation in their binding site, rather than nonspecific mutations which could destabilise the protein. Lethal mutations which destabilised the protein were excluded from this screen, which selected for viable mutants. One of these mutants has a distinct mutation in the specificity determining region, based on secondary structure predictions as well as two further experiments. Chimeras between two receptors with different specificities were used to localize the specificity determining region. They identify five amino acids which are necessary for specificity (including that changed in the mutation above) and furthermore, 61 amino acids which are sufficient for specificity. Site directed mutations in this region specifically affect the binding. This surprising finding localizes the specificity determining factor to a single amino acid, rather than a cluster, which could be linearly separated but spatially compact. I have used secondary structure algorithms to predict the structure of this potential binding pocket or cleft, and I have determined the potential for the formation of an amphipathic helix, although such a structure can only be confirmed by X-ray crystallography.

I have also determined the orientation of the protein in the membrane, using fusion proteins, artificial glycosylation sites and introduced phosphorylation sites. Compilation of data from these experiments predicts a small protein of 26 kDa with seven transmembrane segments, closely juxtaposed in the membrane. In this model, the amino terminus protrudes into the lumen of the ER and the carboxy terminus into the cytoplasm. This model is consistent with the hydrophobicity plot and charge distribution (there are more positive charges in the cytoplasm than in the ER). The specificity determining region lies as expected in the lumen of the ER where it can interact with the retention signal.