

Characterization of the substrate properties recognized by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

Doctoral Thesis

Author(s):

Ritter, Christiane

Publication date:

2002

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004378090>

Rights / license:

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

Diss. ETH Nr. 14525

**Characterization of the substrate properties
recognized by the ER folding sensor UDP-
glucose:glycoprotein glucosyltransferase**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Christiane Ritter
Dipl. Biochem. University of Hannover

born on June 14, 1973
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ari Helenius, Referent
Prof. Dr. Markus Aebi, Korreferent
PD. Dr. Ernesto Di Iorio, Korreferent

2002

Summary

The endoplasmic reticulum (ER) is a protein folding compartment that contains a stringent quality control system to prevent the export of incorrectly folded or assembled proteins via the secretory pathway. UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (GT) is a key factor in this system. It is a glycoprotein-specific folding sensor that reglucosylates exclusively glucose-trimmed N-linked glycans in non-native glycoproteins, and mediates thus their association with the chaperone-like lectins calnexin and calreticulin. No structural data on GT are available. To analyze the features that lead to conformation-specific glucosylation, the approach presented here has been to design substrate molecules and to test their recognition in an *in vitro* GT assay.

GT glucosylates N-linked glycans only when they are covalently attached to a misfolded protein. To assess how close the glycan must be to the part of the protein that is recognized as misfolded, heterodimers of the glycoprotein RNase B were constructed consisting of one folded and one misfolded domain. A non-native protein core, RNase BS-Protein, can be generated from RNase B by removal of an N-terminal peptide. Re-addition of this peptide reconstitutes the native protein. Stable heterodimers could be formed by reconstituting RNase BS-Protein instead with full-length, denatured RNase B. Only those glycans became glucosylated that were directly linked to a misfolded, but compact domain. The glycan on the folded domain was not labeled, although the two oligosaccharides were spatially close. The result could be confirmed using two other glycoproteins, soybean agglutinin and thyroglobulin, forming a connected structure of native and non-native molecules. This suggests that GT recognizes the folding status of glycoproteins domain-wise, which is important for the understanding of the quality control of multi-domain proteins and protein assemblies.

Based on non-native RNase B consisting of only a single glycoform ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$), an improved *in vitro* GT-assay was developed that uses for the first time a soluble, well-defined and homogenous substrate. Various misfolded forms of RNase containing either truncated glycans or no glycan at all could inhibit substrate glucosylation in this assay. Thus, GT can interact with misfolded proteins independent

of the presence of a glycan, and it is therefore likely that at least the initial substrate recognition occurs via protein-protein interactions.

To analyze the mechanism that links glucosylation to recognition, we constructed different variants of RNase B containing defined folding defects within one domain. The proteins were synthesized in a cell-free translation/translocation system. Single glycosylation sites were introduced at various sites on the surface of RNase, and these variants were shown to behave identical to wild-type RNase B. The corresponding RNase BS-Proteins were all equally well glucosylated by GT, suggesting that GT recognizes this conformer as globally misfolded. In a three-disulfide mutant of RNase B, only a subset of these N-linked glycans directly attached to a structurally impaired segment were glucosylated. It could be confirmed that GT can sense highly localized folding defects using a set of loop insertion mutants. Recognition was dependent on the presence of secondary structure within the local folding defect. This constraint may be important to prevent GT from recognizing flexible tails or surface loops of native proteins as misfolded.

Zusammenfassung

Das Endoplasmatische Reticulum (ER) ist ein Proteinfaltungskompartiment, das mittels eines stringenten Qualitätskontrollsystems den Export inkorrekt gefalteter Proteine bzw. Proteinkomplexe verhindert. UDP-Glucose:Glykoprotein Glucosyltransferase (GT) ist ein Schlüsselfaktor in diesem System. Sie ist ein Glykoprotein-spezifischer Faltungssensor, der ausschliesslich Glucose-freie N-gekoppelte Oligosaccharide in nicht-nativen Glykoproteinen reglucosyliert und dadurch deren Assoziation mit den Chaperon-ähnlichen Lektinen Calnexin und Calreticulin vermittelt. Da es keine Daten zu der Struktur von GT gibt, wurden in dem hier präsentierten Ansatz Substratmoleküle entworfen und ihre Erkennung in einem *in vitro* GT-Assay getestet, um so die Eigenschaften zu charakterisieren, die zur Konformations-spezifischen Glucosylierung führen.

GT glucosyliert nur Oligosaccharide, die kovalent an ein missgefaltetes Protein gebunden sind. Um herauszufinden, wie dicht sich ein Oligosaccharid an einem als missgefaltet erkannten Proteinbereich befinden muss, wurden von dem Glykoprotein RNase B Heterodimere konstruiert, die aus einer gefalteten und einer missgefalteten Domäne bestanden. RNase B kann durch Entfernen eines N-terminalen Peptides in das nicht-native RNase BS-Protein überführt werden. Durch Rückgabe dieses Peptides kann das native Protein rekonstituiert werden. Stabile Dimere konnten durch die entsprechende Rekonstituierung von RNase BS-Protein mit denaturierter RNase B generiert werden. Es wurden nur solche Oligosaccharide von GT glucosyliert, die direkt an eine missgefaltete, aber kompakte Domäne gekoppelt waren. Das Oligosaccharid auf der gefalteten Domäne wurde nicht markiert, obwohl sich die beiden Zucker räumlich nahe waren. Mit Hilfe zweier anderer Glykoproteine, Sojabohnen Agglutinin und Thyroglobulin, die eine vernetzte Struktur aus nativen und nicht-nativen Proteinen bilden, konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. GT scheint den Faltungszustand von Glykoproteinen domänenweise zu erkennen, was für das Verständnis der Qualitätskontrolle von multidomänen-Proteinen und von Proteinkomplexen wichtig ist.

Basierend auf nicht-nativer RNase B, die aus einer einzigen Glykoform ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) besteht, wurde ein verbesserter *in vitro* GT-Assay entwickelt, der zum ersten Mal ein lösliches, gut charakterisiertes und homogenes Substrat verwendet.

Verschiedene missgefaltete Formen von RNase, die entweder einen verkürzten, oder gar keinen Zucker trugen, konnten die Glucosylierung des Substrates in diesem Assay inhibieren. Dies zeigt, dass GT mit missgefalteten Proteinen in Abwesenheit eines Zuckers interagieren kann, und es ist dementsprechend wahrscheinlich, dass zumindest der erste Schritt der Substraterkennung über Protein-Protein Interaktionen verläuft.

Um den Mechanismus zu analysieren, der die Glukosylierung an die Erkennung koppelt, wurden verschiedene RNase B-Varianten konstruiert, die definierte Faltungsdefekte innerhalb einer Domäne aufwiesen, und in einem zellfreien Translations-/Translokations-System synthetisiert. An diversen Oberflächenbereichen der RNase wurden Glykosylierungs-Sequenzen eingefuehrt und gezeigt, dass sich diese Proteine identisch zur wildtyp-RNase B verhalten. Da alle entsprechenden RNase BS-Proteine gleichermassen gut von GT glucosyliert wurden, scheint dieses Konformer von GT als global missgefaltet erkannt zu werden. In einer drei-Disulfid-Mutante von RNase B wurden hingegen nur die Oligosaccharide glucosyliert, die direkt an ein strukturell gestörtes Segment gekoppelt waren. Mit Hilfe verschiedener Insertionsmutanten konnte bestätigt werden, dass GT räumlich eng begrenzte Faltungsdefekte erkennen kann, sofern dieser Defekt Sekundärstruktur enthielt. Diese Bedingung könnte wichtig sein, um GT davon abzuhalten, flexible Termini oder Oberflächenschleifen als missgefaltet anzusehen.