

Diss. ETH No. 16155

**IDENTIFICATION OF NOVEL MECHANISMS IN ERAD:  
Genetic and biochemical characterization of the YOS9 protein  
and  
Genetic screens to identify novel genes in ERAD**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**REKA SZATHMARY**

Dipl. zoology, University of Veterinary Sciences, Hungary  
born 07.04. 1974 in Budapest, Hungary  
citizen of Hungary

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Markus Aebi, examiner  
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner  
Dr. Claude A. Jakob, co-examiner

Zurich 2005

## Summary

In eukaryotes newly synthesized secretory and membrane proteins enter the secretory pathway via the Endoplasmic Reticulum (ER). If they are correctly folded, they are transported to their final destinations. Misfolded proteins are selectively recognized and degraded by the cytosolic proteasome in processes defined as ER-associated degradation (ERAD). This thesis focuses on mechanisms involved in ERAD, in particular, on the recognition and degradation of misfolded glycoproteins.

The first chapter of the thesis characterizes YOS9, an ER resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, genetically and biochemically. Yos9p has a domain similar to the carbohydrate-binding region of the mannose-6-phosphate receptors (MRH) in higher eukaryotes, suggesting that Yos9p functions as a lectin. The presence of an MRH domain in Yos9p is particularly important in light of the critical role that substrate glycosylation plays in protein degradation. Analysis of Yos9p and related sequences together with the structure of the MRH domain complexed with mannose suggested that the sugar binding site is present in Yos9p. Moreover, this sugar-binding domain is required for Yos9p function, as conservative mutations of residues known to be critical for sugar recognition abrogate the ability of *YOS9* mutant strains to degrade CPY\*. Yeast strains defective in N-glycan assembly were used to demonstrate that an epitope-tagged form of Yos9p associates only with CPY\* when Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> or Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> side is attached to CPY\*. This Yos9-CPY\* interaction appears to depend on the presence of the *HTMI* gene since Htm1p absence reduced Yos9p binding to CPY\*. Although the data indicate that Yos9p and Htm1p/Mnl1p function within the same pathway, their precise relationship remains unclear. Both proteins exhibit characteristics expected of lectin-like receptor proteins. However, they are structurally distinct and do not share a common ancestor. Perhaps reflecting these differences, they have non-redundant functions in ERAD.

The following two chapters of the thesis describe two genetic screens conducted in order to identify new genes involved in ERAD. The first screen uses a method of systematic construction of double mutants, termed synthetic genetic array (SGA) analysis, in which a query mutation is crossed to an array of ~4700 deletion mutants in an automated process. In this synthetic lethal

## Summary

---

screen inviable or sick double-mutant meiotic progeny can identify functional relationships between genes. SGA analysis with *YOS9* as query mutation was carried out, and four candidate genes identified.

The second screen was carried out using a transposon mutagenesis approach where temperature-sensitive growth phenotype caused by a point mutation in the oligosaccharyltransferase subunit coding *STT3* gene was suppressed by second site mutagenesis. This approach was based on the finding that mutations or deletions of ERAD genes can overcome the temperature-sensitivity of the *stt3-7* mutant cells. This enabled us to link altered growth phenotype of *stt3-7* mutant cells with protein degradation and allowed for the identification of novel genes required in the process of protein degradation.

## Zusammenfassung

In Eukaryoten gelangen neu synthetisierte lösliche und Membranproteine über das Endoplasmatische Retikulum (ER) in den sekretorischen Weg, von wo sie vollständig und korrekt gefaltet zu ihrem Zielort transportiert werden. Falsch gefaltete Proteine werden selektiv erkannt ins Cytsol transportiert und durch das Proteasom abgebaut. Diese Vorgänge sind definiert als ER-assoziiertes Abbau (ERAD). Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit den, im ERAD beteiligten, Vorgängen, und im Speziellen mit der Erkennung und dem Abbau von falsch gefalteten Glykoproteinen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird Yos9, ein ER-Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, biochemisch und genetisch charakterisiert. Yos9p besitzt eine Domäne, die Ähnlichkeit zur Bindungsregion des Mannose-6-Phosphatrezeptors (MRH) in höheren Eukaryoten aufweist. Dies deutet für Yos9p eine Funktion als Lektin hin. Die MRH-Domäne in Yos9p ist insbesondere wichtig wegen der kritischen Rolle, die die Zuckerstruktur auf Glykoproteinen im Proteinabbau spielt. Sequenzanalysen von Yos9p und verwandten Proteinen, weisen stark darauf hin, dass die Zuckerbindungsstelle in Yos9p intakt und konserviert ist. Des Weiteren ist diese Zuckerbindungsdomäne für die Funktion von Yos9p notwendig, denn konservative Mutationen von Resten in dieser Domäne sind kritisch für die Zuckrererkennung und die Fähigkeit CPY\* abzubauen. In Hefestämmen mit defekter Biosynthes von *N*-verknüpften Zuckern konnte gezeigt werden, dass Yos9 Protein nur mit CPY\* assoziiert, wenn CPY\* Oligosaccharide mit einer Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> oder Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> Struktur aufweist. Diese Yos9-CPY\* Interaktion tritt bevorzugt in Anwesenheit des *HTMI* Gens auf, denn seine Abwesenheit führt zu einer reduzierten Yos9p-Bindung an CPY\*. Obwohl die Ergebnisse nahe legen, dass Yos9p und Htm1 Protein im selben Prozess wirken, ist deren genaue Verbindung zueinander nach wie vor unklar. Beide Proteine zeigen für lektin-artige Rezeptorproteine typische Charakteristiken, sind aber strukturell verschieden. Vielleicht spiegeln diese Unterschiede wieder, dass ihre Rolle im ERAD nicht überlappend ist.

Im zweiten und letzten Teil dieser Arbeit sind zwei unabhängige genetische Screens aufgeführt, in welchen neue am ERAD beteiligte Gene identifiziert werden sollten. Der erste Screen

## Zusammenfassung

---

beschreibt eine Methode für die systematische Konstruktion von Doppelmutanten, „synthetic genetic array“ (SGA) genannt, in welchem eine Mutation von Interesse mit ca. 4700 Deletionsmutanten gekreuzt wird. In diesem synthetisch-lethal Screen werden funktionelle Verwandtschaften zwischen Genen durch nicht lebensfähige oder kranke meiotische Nachkommen mit Doppelmutation identifiziert. In einer SGA Analyse mit *yos9* konnten vier Kandidatengene identifiziert werden, die genetisch mit *YOS9* interagieren.

Der zweite Screen erfolgte mittels Transposon-Mutagenese. Hierbei wurde ein temperatursensitiver Wachstumsphänotyp, verursacht durch eine Punktmutation in der Oligosaccharyltransferase-Untereinheit kodiert durch *STT3*, mittels „second site“ Mutagenese supplemiert. Dieser Ansatz basiert auf der Beobachtung, dass Mutationen oder Deletionen von ERAD Genen die Temperatur-Sensitivität von *stt3-7* Hefezellen überwinden. Dies ermöglicht es einen geänderten Wachstumsphänotyp von *stt3-7* Hefezellen mit dem Proteinabbau zu verbinden und erlaubt die Identifikation von neuen Genen, die für Prozesse des Proteinabbaus benötigt werden. Mit dieser Methode sind zwei neue Gene identifiziert worden, die mit ERAD in Beziehung stehen.