

Bacterial N-glycosylation: a model to study lipid-linked oligosaccharide translocation across the membrane

Doctoral Thesis

Author(s):

Alaimo, Cristina

Publication date:

2006

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005288929>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 16728

**Bacterial N-glycosylation:
a model to study lipid-linked oligosaccharide
translocation across the membrane**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
CRISTINA ALAIMO
Laurea in Scienze Biologiche
Università degli Studi di Palermo
born on April 1, 1973
Italian citizen

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Hubert Hilbi, coexaminer

Zurich 2006

Summary

The work presented in this thesis concerns the N-linked glycosylation pathway of the bacterium *Campylobacter jejuni* and the process of lipid-linked oligosaccharide (LLO) transfer across the membrane, common to every exopolysaccharide biosynthesis and N-glycosylation process.

Lipid-transfer across biological membranes is an essential process for the physiology of bacterial and eukaryotic cells. A special class of proteins, known as translocases or flippases, plays the role of transferring lipids and LLO across membranes, but their features and mechanism are still unknown.

In the first part of this thesis, the membrane protein PglK (formerly WlaB), encoded by the second gene of the recently identified *C. jejuni pgl*-operon, has been shown to be the lipid-linked-oligosaccharide (LLO) translocase of the bacterial N-glycosylation pathway.

The requirement of PglK in the N-glycosylation process was investigated first in a *C. jejuni pglK*-knockout and then in *Escherichia coli* by reconstituting a *pglK*-deficient N-glycosylation pathway.

The similarity between the bacterial N-glycosylation pathway and the lipopolysaccharide biosynthetic pathway was exploited to further characterize the flippase-mediated LLO-translocation. Similarly to the membrane protein Wzx, which has been proposed to mediate the translocation across the plasma membrane of lipopolysaccharide O antigen subunits, PglK has been proposed to mediate the translocation of the undecaprenylpyrophosphate-linked heptasaccharide involved in the *Campylobacter* N-linked protein glycosylation pathway. We provided evidence of the flippase-activity of PglK, showing that it can functionally substitute Wzx in the biosynthesis of lipopolysaccharide. In addition, it has been shown that a Nucleotide Binding Domain (NBD), conserved among ABC-transporters, was required for PglK-activity. Its modification by introduction of specific point mutations was associated with loss of the PglK-dependent glycosylation phenotype. On the basis of these data, we proposed that PglK is an ABC-transporter.

We provided evidence for the existence of two distinct mechanisms for LLO translocation across membranes, catalyzed by distinct proteins, an ABC type and a not-ABC type protein, having a relaxed specificity toward the composition of their substrate and being exchangeable despite the absence of any sequence similarity.

In the second part of this work, the N-glycosylation pathway from *Campylobacter* was combined with the newly discovered and still not investigated N-glycosylation system of *Wolinella succinogenes*. We could show that one of the N-glycosylated proteins of *Campylobacter* can be also glycosylated by the *Wolinella* *pgl* operon, suggesting common requirements of the glycosylation substrate among the two systems. Furthermore, the finding that the LLO-flippase of the *Wolinella* N-glycosylation pathway can functionally substitute the *Campylobacter* protein provided further evidence for the relaxed substrate-specificity of this class of transporters.

In the final part of this thesis, a method for detection and quantification of glycoproteins in biological samples is presented. The assay is ELISA-based and it was conceived in order to facilitate any kind of studies regarding glycoprotein production or inhibition, with the possibility to be applicable to screening procedures. In particular, such a method may be a convenient tool for the glycoengineering facility offered by the bacterial system.

Sommario

Oggetto della presenta ricerca è il processo di N-glicosilazione del batterio *Campylobacter jejuni* e il trasferimento attraverso la membrana del complesso lipide-oligosaccaride, processo condiviso da biosintesi di esopolisaccaridi e N-glicosilazione.

Il trasferimento di lipidi attraverso le membrane è un processo essenziale per la fisiologia di batteri e di eucarioti. Una specifica classe di proteine, denominate translocasi o flippasi, ha il ruolo di trasferire lipidi e complessi lipide-oligosaccaridi attraverso le membrane, ma le caratteristiche e il funzionamento di tali proteine sono tuttora oggetto di studio.

Nella prima parte di questa tesi viene dimostrato che la proteina di membrana PglK (originariamente WlaB), codificata dal secondo gene dell'operone *pgl*, di recente identificato in *C. jejuni*, è la traslocase del complesso lipide-oligosaccaride (LLO) del pathway di N-glicosilazione batterico.

Il coinvolgimento di PglK nel processo di N-glicosilazione è stato inizialmente investigato in un ceppo di *C. jejuni* dove *pglK* era stato mutato, e successivamente in *E. coli*, dopo avere ricostituito in tale batterio il processo di N-glicosilazione mutante in PglK.

La somiglianza tra i processi batterici di N-glicosilazione e di biosintesi dell' lipopolisaccaride (LPS) è stata utilizzata per caratterizzare ulteriormente il processo di traslocazione del LLO mediato dalla flippase. Infatti così come le proteine di membrana Wzx sono candidate al trasferimento attraverso la membrana delle subunità costituenti l'O-antigen, a PglK viene attribuito il ruolo di traslocare il complesso eptasaccaride-undecaprenol-pirofosfato coinvolto nel processo di N-glicosilazione di *Campylobacter*. In questo lavoro vengono fornite prove indirette sull'attività di flippase di PglK attraverso esperimenti di complementazione di Wzx nel processo di sintesi dell' LPS. Inoltre viene dimostrato come il dominio di legame dell'ATP (NBD), conservato tra gli ABC-transporters, sia necessario per l'attività di PglK. Infatti, la sua inattivazione, per introduzione di specifiche mutazioni puntiformi, è stata associata alla perdita di

glicosilazione PglK-dipendente. Sulla base di questi risultati PglK viene proposto quale ABC-transporter.

In conclusione, viene dimostrata l'esistenza di due diversi meccanismi di trasporto dell' LLO attraverso la membrana, svolti da due diverse classi di proteine, ABC-transporter e non, e la loro relativa aspecificità nei confronti del substrato.

Nella seconda parte di questo lavoro, il processo di N-glicosilazione di *Campylobacter* viene combinato con quello, recentemente scoperto, di *Wolinella succinogenes*. Il risultato che una delle glicoproteine di *Campylobacter* può essere glicosilata anche dall'operone *pgl* di *Wolinella* suggerisce che i substrati dei due sistemi di glicosilazione abbiano dei comuni requisiti. Inoltre, il dato che la flippase dell'LLO di *Wolinella* sia stata capace di complementare PglK di *Campylobacter*, fornisce ulteriori evidenze sulla relativa aspecificità di questa classe di translocasi.

Nell'ultima parte di questa tesi, viene presentato un metodo per identificare e quantificare le glicoproteine nel campione biologico. Il metodo esposto si basa sul sistema ELISA ed è stato concepito per essere applicato a studi di screening sulla produzione o l'inibizione di glicoproteine. In particolare, tale sistema risulta un utile strumento nel campo della glico-ingegneria batterica.