



## Doctoral Thesis

# Endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and unfolded protein response (UPR) genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae*

**Author(s):**

Parsaienassab, Farnoush

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005368351> →

**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](#).

DISS. ETH No. 16772

**Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)  
and Unfolded Protein Response (UPR):**

**Genetic Studies in  
*Saccharomyces cerevisiae***

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
Farnoush Parsaienassab  
M.Sc Microbiology, Azad University of Tehran, Iran  
born 06.06.1970 in Tehran, Iran  
citizen of Iran

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

**Zurich 2006**

## Summary

The endoplasmic reticulum (ER) coordinates synthesis and processing of resident and passenger proteins through the secretory pathway. The folding status of proteins in the ER lumen is monitored by a “quality control system” that allows only properly folded and assembled proteins to reach their final destinations. Misfolded proteins are subjected to proteolytic elimination in a process called ER-associated degradation (ERAD). Upon accumulation of misfolded proteins in the ER, a stress signaling pathway termed the unfolded protein response (UPR) is activated. This in turn leads to the upregulation of UPR target gene expression and finally relieves the ER from the stress caused by increased unfolded protein load either by assisting protein folding or by promoting ERAD.

Two screens for *Saccharomyces cerevisiae* mutant strains were conducted to identify additional genes involved in this process using the known link between the conditional growth phenotype of *stt3-7* mutant cells and the ERAD pathway. Mutant forms of Stt3p, an essential component of the oligosaccharyltransferase complex, are subjected to ERAD, and accordingly, the temperature sensitive phenotype of cells carrying the specific *stt3-7* allele can be suppressed by reducing ERAD efficiency. From the second site suppressor screen the *STE24*, *RER2* and *YNL080c* loci were identified to be important for efficient degradation of misfolded proteins. In the second screen, *YET1* was identified as a high copy number suppressor of *stt3-7* mutant cells. The highly conserved protein Yet1p is a putative molecular chaperone in the process of membrane protein folding.

The *STE24* gene, which encodes an ER membrane embedded metalloprotease, was further studied. These studies indicated that *STE24* was required for efficient ERAD of mutant ER luminal proteins. Mutation in the HEXXH metalloprotease motif of Ste24p inactivated the ERAD function of the protein. The *STE24* gene was essential in the absence of many genes encoding ERAD and UPR components. In addition, we observed that Ste24p protease activity was required in the absence of a functional UPR, suggesting a role for this protein in ER homeostasis. We also found that in *ste24* null mutant strain, induction of heat shock element (HSE)-mediated gene expression was reduced.

Finally, the existence of a novel signaling pathway from the ER lumen into the nucleus was shown, activation of which resulted in upregulation of genes encoding proteasomal subunits and genes involved in retro-translocation. This enables the ER to deal with the accumulation of misfolded or unfolded proteins in the ER lumen by increasing protein retro-translocation and proteasome capacity.

## Zusammenfassung

Das endoplasmatische Retikulum (ER) koordiniert die Synthese und die Prozessierung sowohl lokaler als auch für den Export bestimmter Proteine. Im Lumen des ER wird die Faltung der Proteine durch ein Qualitätskontrollsystem überwacht. Dieses erlaubt es, dass lediglich korrekt gefalteten und vollständig assemblierten Proteinen ihren Zielort zu erreichen. Fehlgefaltete Proteine werden durch den Prozess der ER-assoziierten Degradierung (ERAD) proteolytisch abgebaut. Eine Anreicherung fehlgefalteter Proteine innerhalb des ER verursacht die Aktivierung eines Stress-signalisierenden Stoffwechselweges, genannt UPR (unfolded protein response). Es kommt zu einer verstärkten Expression der UPR- Zielgene und schliesslich zur Befreiung des ER von der Last ungefalteter Proteine. Dies geschieht sowohl durch eine Förderung des Faltungsprozesses als auch durch die verstärkte Aktivierung des ERAD- Systems.

Unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*- Mutanten wurden zwei Screenings durchgeführt, um zusätzliche Gene zu identifizieren, die an diesem Prozess beteiligt sind. Ausgenutzt wurde hierbei die bekannte Korrelation zwischen dem konditionellen Wachstumsverhalten der *stt3-7* Mutante und dem ERAD Stoffwechselweg. Mutierte Varianten von Stt3p, einer essentiellen Komponente des Oligosaccharyltransferase-Komplex, sind der ERAD unterworfen. Folglich kann der temperaturabhängige Phänotyp derjenigen Zellen, die das spezifische *stt3-7* Allel tragen, durch eine Reduktion der ERAD-Effizienz unterdrückt werden. Mittels diesem „second site suppressor“-Screening konnten die Genloci *STE24*, *RER2* und *YNL080c* als bedeutend für die effiziente Degradierung fehlgefalteter Proteine identifiziert werden. In einem zweiten Screening wurde *YET1* als „high copy“-Suppressor der *stt3-7* Mutante identifiziert; beim hochkonservierten Yet1p handelt es sich um ein putatives Chaperon, welches am Faltungsprozess von Membranproteinen beteiligt ist.

Weitergehend wurde das *STE24* Gen untersucht, welches eine Metalloprotease kodiert, die in die Membran des ER eingebettet ist. Es zeigte sich, dass *STE24* an der effizienten ERAD mutierter Proteine im ER-Lumen beteiligt ist. Mutationen innerhalb des für Metalloproteasen spezifischen HEXXH Motivs, inaktivierte die ERAD- Funktion von Ste24p. Das *STE24* Gen war essentiell in Abwesenheit einer Vielzahl von Genen des ERAD- sowie des UPR- Systems. Wir konnten beobachten, dass in Abwesenheit eines funktionellen UPR- Systems, die Proteaseaktivität von Ste24p erforderlich ist. Somit kann für dieses Protein eine Beteiligung an der ER- Homeostase vorgeschlagen werden. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass in der *ste24* Nullmutante, die Induktion der HSE (heat shock element)-vermittelten Genexpression reduziert war.

---

Schliesslich konnte die Existenz eines neuen Signaltransduktionsweges zwischen dem Lumen des ER und dem Zellkern aufgezeigt werden. Die Aktivierung desselben resultierte in einer erhöhten Synthese von Proteasom- Untereinheiten und einer Hochregulation von Genen, die an der Retro-Translokation beteiligt sind. Die verstärkte Retro-Translokation als auch die erhöhte Kapazität des Proteasoms erlaubt es dem ER der Anhäufung fehl-, bzw. ungefalteter Proteine zu begegnen.