



Doctoral Thesis

Bulk flow transport and quality control in the secretory pathway

Author(s):

Thor, Friederike

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005706563> →

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. 17999

Bulk flow transport and quality control in the secretory pathway

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

presented by

Friederike Thor

Dipl.-Biochem., Ruhr-Universität Bochum

born on April 5th, 1979
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner
Prof. Dr. Markus Aebi, co-examiner
Prof. Dr. Nenad Ban, co-examiner

2008

Summary

In eukaryotic cells, secretory proteins are transported from their site of synthesis, the endoplasmic reticulum (ER), through the secretory pathway to their correct final destination. Quality control (QC) mechanisms in the ER ensure that only correctly folded and oligomerized proteins are allowed to leave the ER in transport vesicles targeted to the Golgi complex. ER export of a protein is either receptor-mediated or occurs via bulk flow where retention is selective and cargo proteins exit at their prevailing luminal concentration. Proteins that traverse the secretory pathway more slowly than the bulk flow transport rate are likely to be retarded by retention signals or by interactions with their processing enzymes.

We employed two soluble proteins, that are well characterized *in vitro*, to investigate intracellular bulk flow transport and to provide new insights into QC processes in the ER.

In order to measure the intracellular bulk flow transport rate in the secretory pathway, we translocated the autocatalytic protease domain (Cp) of the Semliki Forest virus capsid protein into the ER of Chinese hamster ovary (CHO) cells and analyzed its folding and secretion behavior. Being of cytoplasmic origin, the Cp has not been adapted to the eukaryotic secretory pathway and should therefore not contain any binding signals for receptors. Using pulse chase analysis we could observe that the acquisition of its native conformation occurred rapidly at the same time as translation, which is comparable with Cp folding in the cytosol. The Cp was transported through the constitutive secretory pathway as transport was blocked by brefeldin A and ATP depletion. Cp transport was fast and asynchronous, but not 100% efficient. We showed that secretion of the Cp was concentration independent, which is consistent with bulk flow transport. The first molecules were secreted within 15 min, which is the fastest transport of a protein so far recorded in mammalian cells. The secretion velocity was 1.2% per min. It was not altered in the presence of tunicamycin or dithiothreitol.

In order to analyze QC and protein secretion, we employed bovine pancreatic ribonuclease (RNase). Pulse chase analysis and size exclusion chromatography showed that in the ER of CHO cells folding of bovine RNase and its human homologue resulted in two major products: monomers and dimers. The monomers were secreted, whereas the dimers accumulated in the ER. Dimers were likely formed by domain swapping. Consistent with our observations in

tissue cells, the secreted RNase in the bovine pancreatic juice was predominantly monomeric whereas the tissue contained oligomers.

In summary our data provide the first measurement of bulk flow transport of a soluble protein in the mammalian secretory pathway. In addition, we demonstrated that domain-swapped RNase oligomers were formed and retained in the ER of mammalian cells.

Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen werden sekretorische Proteine von dem Ort ihrer Synthese, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), durch den Sekretionsweg zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Ein Qualitätskontrollsystem im ER stellt sicher, dass nur richtig gefaltete und oligomerisierte Proteine das ER in Transport-Vesikeln in Richtung Golgi-Apparat verlassen. Der ER Export von Proteinen erfolgt entweder mit Hilfe von Rezeptoren oder durch den „bulk flow“-Transport, bei dem Retention selektiv ist und sekretorische Proteine in ihrer vorherrschenden lumenalen Konzentration exportiert werden. Der Transport von Proteinen, deren Sekretion langsamer ist als beim „bulk flow“-Transport, wird wahrscheinlich durch Retentionssignale oder durch Wechselwirkungen mit modifizierenden Enzymen verlangsamt.

Zwei lösliche Proteine, deren *in vitro* Eigenschaften sehr gut erforscht sind, wurden verwendet, um den intrazellulären „bulk flow“-Transport zu untersuchen und neue Einblicke in die Qualitätskontrollprozesse im ER zu erlangen.

Um die Geschwindigkeit des intrazellulären „bulk flow“-Transports zu messen, wurde die autokatalytische Protease-Domäne des Semliki Forest Virus Capsid proteins (Cp) in das ER von CHO-Zellen transloziert und dessen Faltungs- und Sekretionsverhalten untersucht. Aufgrund der cytoplasmatischen Herkunft hat sich das Cp nicht an den eukaryotischen Sekretionsweg angepasst und sollte daher keine Bindungssignale für Rezeptoren besitzen. In „pulse chase“-Experimenten wurde beobachtet, dass die native Konformation rasch und zeitgleich mit der Translation erlangt wurde. Dies ist vergleichbar mit der Faltung des Cp im Cytosol. Das Cp Protein wurde durch den konstitutiven Sekretionsweg transportiert, da Brefeldin A und Depletion von ATP den Transport blockierten. Der Transport des Cp war schnell und asynchron, allerdings nicht hundertprozentig effizient. Wir konnten die Konzentrationsunabhängigkeit der Sekretion des Cp zeigen, die in Einklang mit dem „bulk flow“-Transport steht. Die ersten Moleküle wurden innerhalb von fünfzehn Minuten sezerniert. Dies ist der schnellste bisher berichtete Transport eines Proteins in Säugerzellen. Die Geschwindigkeitskonstante der Sekretion betrug 1,2 % pro Minute. Diese änderte sich nicht in Gegenwart von Tunicamycin oder Dithiothreitol.

Um Qualitätskontrollprozesse und die Sekretion von Proteinen zu untersuchen, wurde bovine pankreatische Ribonuklease (RNase) verwendet. „Pulse chase“-Experimente und Gelfiltrations-Chromatographie zeigten, dass im ER von CHO-Zellen zwei Hauptprodukte bei der Faltung der bovinen RNase und ihres humanen Homologs entstanden: Monomere und Dimere. Die Monomere wurden sezerniert, wohingegen Dimere im ER akkumulierten. Die Dimere entstanden vermutlich mittels Domänenvertauschung (domain swapping). Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen in Gewebekulturzellen bestand die sezernierte RNase im bovinen pankreatischen Saft hauptsächlich aus Monomeren, das Gewebe enthielt dagegen Oligomere.

Insgesamt liefern unsere Daten die erste Messung des „bulk flow“-Transports eines löslichen Proteins im Sekretionsweg von Säugerzellen. Zudem zeigten wir, dass die pankreatische RNase „domain-swapped“-Oligomere bildet und diese im ER von Säugerzellen zurückgehalten werden.