



Doctoral Thesis

N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum focus on the RFT1 flippase

Author(s):

Neupert, Christine

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006318535> →

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 Nr. 19118

N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum:
focus on the *RFT1* flippase

A dissertation submitted to
ETH ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
CHRISTINE NEUPERT
Dipl. Biol., Friedrich Schiller University of Jena,
Germany

born on August 21th, 1980
in Jena, Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Ari Helenius, co-examiner

2010

Summary

N-linked protein glycosylation is one of the most frequent protein modifications characterized by the addition of a branched deca-tetrasaccharide on an asparagine residue of nascent proteins. The transferred oligosaccharide is composed of two *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), nine mannose (Man) and three glucose (Glc) residues. Along the secretory pathway *N*-linked glycans can undergo major changes in their composition depending on the organism.

The assembly of the lipid-linked oligosaccharide (LLO) starts on the cytoplasmic side of the ER membrane with synthesis of the Man₅GlcNAc₂ glycan linked to dolichyl pyrophosphate (-PP-Dol). This structure is then translocated across the ER membrane for further addition of hexose subunits to result in the Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Biosynthesis of LLOs is mediated by ALG-glycosyltransferases, located at the membrane of the ER. The oligosaccharyl transferase recognizes the complete oligosaccharide and transfers it to the asparagine in the NXS/T sequon of polypeptide translocating into the ER.

In the central part of this thesis genetic evidence for the function of the *RFT1* protein in the translocation of the Man₅GlcNAc₂ oligosaccharide is presented. A high copy suppressor screen using a yeast genomic library revealed complete or truncated transmembrane proteins acting as artificial Man₅GlcNAc₂-PP-Dol flippases with relaxed specificity. The same phenotype was observed by blocking the yeast ER-associated degradation (ERAD) in cells lacking Rft1p: improved *N*-linked glycosylation suggested that inhibition of ERAD resulted in the accumulation of orphan subunits of protein complexes or non-native membrane proteins that acted as unspecific flippases and directed the translocation of membrane lipids. In addition, Rft1p and one of the *rft1* suppressors acted as LLO flippases in *Escherichia coli* and replaced the bacterial LLO flippase PglK in the *Campylobacter jejuni* *N*-glycosylation pathway.

The *N*-linked protein glycosylation pathway is highly conserved in eukaryotes, making yeast an excellent model system to study the molecular defects of congenital disorders

of glycosylation (CDG), a group of diseases caused by mutations of genes involved in this pathway.

Cells of a young patient carrying a homozygous missense mutation in the *RFT1* gene showed accumulated $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ and displayed a reduced level of protein glycosylation. The human RFT1 protein expressed in yeast was able to complement the lack of the yeast Rft1p which leads to improved glycosylation.

In another study we presented a second CDG patient with a deficiency in the ALG9 α 1,2-mannosyltransferase. This female infant suffered from a wide range of symptoms caused by the defective enzyme which resulted in the accumulation of $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-}$ and $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ and hypoglycosylation of proteins. Expressing the patients ALG9 cDNA in yeast also resulted in reduction of protein glycosylation.

A decreased *N*-linked protein glycosylation not only leads to various symptoms in humans. In a mutational screen directed at maternal factors involved in *Drosophila melanogaster* embryo patterning an ALG5 UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase deficiency was identified that led to reduced protein *N*-glycosylation. Due to the protein hypoglycosylation the unfolded protein response was triggered, resulting in phosphorylation of the eIF2 α translation factor. This affects a few maternal mRNAs sensitive to eIF2 α phosphorylation like the transcription factor Caudal and a specific patterning defect was observed during the embryo development. The *D. melanogaster* ALG5 partially complemented the yeast ALG5, whereas the mutant forms failed to do so.

Zusammenfassung

N-gebundene Proteinglykosylierung ist eine der am häufigsten beobachteten Proteinmodifizierungen. Sie ist charakterisiert durch die Verknüpfung eines verzweigten Decatetrasaccharides mit einem Asparagin im neu synthetisierten Protein. Das übertragene Oligosaccharid setzt sich aus zwei *N*-actylglukosaminen (GlcNAc), neun Mannosen (Man) und drei Glukosen (Glc) zusammen. Abhängig vom Organismus vollziehen sich entlang des sekretorischen Weges drastische Veränderungen in der Zusammensetzung des Oligosaccharids.

Der Zusammenbau des lipidgebundenen Oligosaccharids (LLO) beginnt auf der zytoplasmatischen Seite der ER Membran mit der Synthese des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ Zuckers gebunden an den Dolichylpyrophosphat-Anker (-PP-Dol). Diese Struktur wird dann über die ER Membran in das Lumen transloziert um dort bis zu dem $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ aufgebaut zu werden. Die Biosynthese des LLOs wird durch in der Membran sitzende ALG-glykosyltransferasen (asparagine linked glycosylation) katalysiert. Die Oligosaccharyltransferase erkennt das vollständige Oligosaccharid und transferiert es auf Asparagin in der Erkennungssequenz NXS/T.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit genetischen Daten, die darauf hinweisen, dass Rft1p für den Translokationprozess notwendig ist. Desweiteren wurde eine Viel-Kopien-Suppressor-Suche mit einer Hefegenombibliothek durchgeführt. Dabei wurden vollständige und unvollständige Transmembranproteine als artifizielle $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ Flippasen mit verminderter Spezifität entdeckt. Die Blockade des ER-assoziierten Proteinabbaus (ERAD) in Zellen ohne Rft1p führte zu einer verbesserten *N*-gebundenen Glykosylierung. Dies legt nahe, dass ERAD die Anhäufung von ungepaarten Untereinheiten aus Proteinkomplexen oder nicht natürlichen Membranproteinen verhindert. Eine Anhäufung solcher unnatürlichen Proteine kann zu unspezifischen und ungerichteten Translokationen von Membranlipiden führen. Rft1p und eines dieser artifiziellen Transmembranproteine komplementierten in *Escherichia coli* die bakterielle LLO Flippase PglK aus der *Campylobacter jejuni* *N*-Glykosylierung.

N-gebundene Glykosylierung ist innerhalb der Eukaryoten streng konserviert. Deshalb ist die Bäckerhefe ein ausgezeichnetes Modell um Congenitale Störungen der Glycosylation (CDG) zu untersuchen. CDG ist eine Gruppe von Erkrankungen verursacht durch Mutationen in Genen der *N*-gebundenen Glykosylierung.

Zellen eines jungen Patienten mit einer homozygoten Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch im *RFT1* Gen führt, zeigten Anhäufungen von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und eine verminderte Proteinglykosylierung. Die Expression des menschlichen *RFT1* Protein in Hefe ermöglichte die Komplementation des Hefe *Rft1p* was zu einer verbesserten Glykosylierung führte.

In einer weiteren Studie konnten wir einen zweiten CDG Patient mit einem *ALG9* α 1,2-mannosyltransferase Defekt vorstellen. Dieses Mädchen litt an einem breiten Spektrum von Symptomen, die durch das defekte Enzym verursacht wurden. Der Enzymdefekt führte zur Akkumulation von $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-}$ und $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ sowie zur Hypoglykosylierung der Proteine. Die Expression der *ALG9* cDNA aus der Patientin in Bäckerhefe führte ebenfalls zur Verminderung der Proteinglykosylierung.

Eine verringerte *N*-gebundene Proteinglykosylierung führt nicht nur in Menschen zu verschiedensten Symptomen. In einem Mutationsscreen, auf der Suche nach mütterlichen Faktoren beteiligt an *Drosophila melanogaster* Embryosegmentierung wurde ein *ALG5* UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferasedefekt gefunden. Dieser verursachte die Hypoglykosylierung von Proteinen. Das wiederum aktivierte die ER-Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR), was zur Phosphorylierung des eIF2 α Translationsfaktors führte. Dies beeinflusste einige maternale mRNAs, welche sensitiv gegenüber der eIF2 α Phosphorylierung sind, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor Caudal. Die Reduktion von Caudal führt zu spezifischen Segmentierungsdefekten während der Embryoentwicklung. In Hefe konnte eine teilweise Komplementation durch das *D. melanogaster* *ALG5* erreicht werden, wohingegen das mutierte *ALG5* keinen Effekt hatte.