

DISS. ETH NO. 22208

PROTEIN DEGRADATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Studying connections between degradation, N-glycosylation
and protein complexes using mass spectrometric tools**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SUSANNE LESLIE MUELLER

MSc. In Biology, University of Zurich, Switzerland
MSc. In Proteomics and Bioinformatics, University of Geneva, Switzerland

born on 05.01.1984

citizen of Ossingen ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Aepli
Dr. Robert Gauss
Prof. Dr. Thierry Hennet
Prof. Dr. Paola Picotti

2014

Summary

Protein degradation is crucial for many cellular processes, e.g. signal transduction, cell cycle regulation, and cell differentiation. Consequently, it fulfills several tasks: It eliminates misfolded proteins, regulates amounts of cell cycle proteins, and might even ensure correct ratios for the subunits of multi-protein complexes. The aim of this thesis was to analyze protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae* and its connection to several cellular processes, such as asparagine-linked glycosylation (N-glycosylation) and protein complex assembly. To this end we developed and used mass spectrometric methods.

The first chapter gives an overview of protein degradation in the yeast endoplasmic reticulum (ER). This process is termed ER-associated degradation (ERAD) and eliminates misfolded, mutated, and unassembled proteins from the ER. It is part of the stress response that ensures ER homeostasis. Furthermore, the fundamentals of N-glycosylation, the role of the oligosaccharyl transferase complex (OST), and dynamics of protein complexes are explained. In a last part, an overview of different mass spectrometry methods and fragmentation techniques is given.

In the second chapter we coupled a selected reaction monitoring (SRM) method to stable isotope labelling (SILAC) to measure protein degradation of medium- to low-abundant yeast proteins. We focused on protein complexes located in the ER membrane, especially the OST complex. Using our SILAC-SRM method we discovered that, while constitutive levels of ERAD were low, excess complex subunits were degraded. Furthermore, using a SILAC approach we were able to derive an assembly model for the OST complex and to propose a potential evolutionary role for protein degradation.

Our studies of the OST complex brought about important findings on complex dynamics. We discovered that overexpressed subunits did not disturb complex assembly while deletion of

essential subunits destabilized the complex. Chapter 3 focused on extending those findings and investigating if the same principles applied also for other protein complexes. To this end we analyzed datasets from several global overexpression and deletion studies for enrichment in complex subunits. Our results were in agreement with the basic principles discovered for yeast OST. In the same chapter, we further extended our studies of OST, confirming that the *stt3-7* mutation affected complex formation and presenting an approach to determine which subunits mainly stabilized each other.

In the fourth chapter we assessed if a defect in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis (*Alg3*), or in the unfolded protein response (*Ure1*) or elevated temperatures would lead to global changes in protein levels. Decreased protein levels might indicate an increase in degradation rates. However, protein levels remained largely constant under the conditions tested, indicating that protein degradation was not increased globally. Furthermore, we conducted a pilot study to determine if a data-independent mass spectrometry approach could be implemented for future degradation rate measurements.

Chapter 5 presents the PTM MarkerFinder software. This software relies on the detection of low-mass HCD-fragments to pinpoint MS/MS spectra of post-translationally modified peptides. Manual annotation of such spectra is often requested when publishing post-translational modification studies. PTM MarkerFinder not only facilitates retrieval of promising spectra, but also their annotation.

The thesis is concluded by Chapter 6 which summarizes the results gathered from the different projects, discusses the conclusions drawn and provides an outlook on potential research directions.

Zusammenfassung

Proteinabbau ist in viele zelluläre Prozesse involviert, z.B. Signaltransduktion, Regulation des Zellzyklus und Zelldifferenzierung. Dementsprechend erfüllt der Abbau von Proteinen verschiedene Aufgaben: er eliminiert missgefaltete Proteine, reguliert die Menge von Zellzyklusproteinen und garantiert möglicherweise sogar, dass Untereinheiten von Multi-Proteinkomplexen in den korrekten Verhältnissen in der Zelle vorhanden sind. Das Ziel dieser Dissertation war den Proteinabbau in *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen in Beziehung zu verschiedenen zellulären Prozessen, z.B. der Glykosylierung von Asparaginen (N-Glykosylierung) und der Bildung von Proteinkomplexen. Um dies zu erreichen wendeten wir verschiedene massenspektrometrische Methoden an.

Das erste Kapitel enthält eine Übersicht über Proteinabbau im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Hefe. Dieser Prozess, ER-assoziiertes Abbau (ERAD) genannt, eliminiert missgefaltete und mutierte Proteine, aber auch einzelne Untereinheiten von Proteinkomplexen vom ER. ERAD ist Teil der Stressantwort die ER Homöostase gewährleistet. Ausserdem werden in diesem Kapitel die Grundlagen der N-Glykosylierung, der Oligosaccharyl-Transferase (OST) und der Dynamik von Proteinkomplexen erklärt. Ein letzter Teil gibt einen Überblick über verschiedene Massenspektrometrie-Methoden und Techniken zur Fragmentierung von Peptiden.

Im zweiten Kapitel koppelten wir stabile Isotopen-Markierung von Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) mit einer selektiven Reaktions-Monitoring (Selected Reaction Monitoring, SRM) Methode und entwickelten so ein Verfahren um die Abbauraten von Proteinen zu messen. Unsere Methode erlaubte es Proteine zu untersuchen die nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden waren. Wir konzentrierten uns auf Untereinheiten von Proteinkomplexen in der ER-Membran, und auf den OST-Komplex im Speziellen. Mittels unserer SILAC-SRM Methode entdeckten wir, dass die ERAD-Aktivität in exponentiell wachsenden Wildtyp-Zellen zwar

gering war, dass aber überschüssige Komplex-Untereinheiten abgebaut wurden. Ausserdem wendeten wir einen SILAC-Ansatz an mit dem es uns gelang ein Modell für die Assemblierung des OST-Komplexes aufzustellen und eine mögliche evolutionäre Rolle für Proteinabbau aufzudecken.

Unsere Untersuchungen des OST-Komplexes führten zu Erkenntnissen über die Dynamik von Komplexen. Wir entdeckten, dass überexprimierte Untereinheiten die Bildung des Komplexes nicht störten während die Deletion von essentiellen Komponenten den Komplex destabilisierten. Kapitel 3 erweitert diese Resultate und untersucht ob die gleichen Prinzipien auch für andere Proteinkomplexe gelten. Um dies herauszufinden analysierten wir, ob Daten von mehreren globalen Überexprimierungs- und Deletions-Studien einen höheren Anteil an Komplex-Untereinheiten enthielten. Unsere Resultate waren vereinbar mit der Hypothese, dass die für OST gefunden Gesetze auch für viele andere Proteinkomplexe zutreffen. Im selben Kapitel führten wir die Analyse des OST-Komplexes weiter. So bestätigten wir, dass eine Mutation der Stt3p-Untereinheit, *stt3-7*, die Komplexbildung beeinträchtigt, und präsentierten ein Vorgehen um festzustellen welche Untereinheiten sich hauptsächlich gegenseitig stabilisieren.

Im vierten Kapitel untersuchten wir, ob ein Defekt der Biosynthese der lipid-gebundenen Oligosaccharide (LLO, *Δalg3*), oder der ungefalteten Protein-Antwort (UPR, *Δire1*), oder erhöhte Temperaturen zu globalen Veränderungen der zellulären Proteinmengen führten. Gemäss unserer Annahmen könnten verringerte Proteinmengen auf höhere Abbauraten hinweisen. Es wurden jedoch keine weitreichenden Veränderungen der Proteinlevel festgestellt und nur einzelne Proteine waren in reduzierten Mengen vorhanden. Das könnte ein Hinweis sein, dass der Proteinabbau unter den getesteten Bedingungen nicht zugenommen hatte. Des Weiteren führten wir eine Pilotstudie durch um festzustellen ob eine Daten-unabhängige Massenspektrometrie-Methode implementiert werden könnte um in Zukunft Abbauraten von Proteinen zu messen.

Im fünften Kapitel stellen wir die PTM MarkerFinder Software vor. Dieses Programm erkennt MS/MS Spektren von posttranslational modifizierten Peptiden anhand von Fragmenten mit kleiner Masse die bei HCD-Fragmentierung entstehen. Manuelle Annotierung solcher Spektren ist oft nötig um die Ergebnisse globaler Massenspektrometrie-Studien von posttranslationalen Modifikationen veröffentlichen zu können. PTM MarkerFinder erleichtert nicht nur das Auffinden vielversprechender Spektren, sondern auch deren Annotierung.

Die Dissertation endet mit Kapitel 6 das die Resultate der verschiedenen Projekte zusammenfasst. Ausserdem werden die Schlussfolgerungen diskutiert und es wird ein Überblick gegeben über mögliche zukünftige Forschungsschwerpunkte.