

Diss. ETH No. 12996

**The oligosaccharyltransferase complex of
*Saccharomyces cerevisiae***

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

presented by
URS SPIRIG
Dipl. Natw. ETH
born on February 3, 1969
citizen of Widnau (SG)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Thomas Leisinger, co-examiner

Zurich 1999

Summary

The work described in this thesis pertains to the process of N-linked glycosylation in eukaryotes focusing on the oligosaccharyltransferase (OTase), the key enzyme of this process. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model organism.

N-linked glycosylation is an essential and highly conserved process in eukaryotic cells. The oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ is assembled in a stepwise process on a dolichylpyrophosphate carrier at the membrane of the endoplasmic reticulum and transferred *en bloc* onto selected asparagine residues of polypeptide chains. This transfer reaction is catalyzed by the multimeric enzyme complex oligosaccharyltransferase.

An active oligosaccharyltransferase complex was purified and shown to consist of six proteins: Ost1p (64/62 kDa), Wbp1p (45 kDa), Ost3p (34 kDa), Swp1p (30 kDa), Ost2p (16 kDa), and Ost5p (9 kDa). The genes encoding these subunits have been cloned. *OST1*, *WBPI*, *SWP1*, and *OST2* are essential, whereas *OST3* and *OST5* are dispensable for growth but required for optimal glycosylation *in vivo*. Genetic screens have identified two other loci, *STT3* and *OST4*, which are required for full oligosaccharyltransferase activity *in vivo*. Most recently, a protein termed Ost6p, showing significant similarity to the *OST3* protein, was revealed in a homology search in the database. However, it was not clear whether or not this protein represented a further subunit of the yeast OTase.

The *STT3* gene product has a molecular weight of 78 kDa and is essential for vegetative growth of yeast. It is highly conserved in eukaryotic cells and proteins with significant similarity have been found in both archaeal and eubacterial genomes. Although Stt3p is required for OTase activity *in vivo*, it was not present in highly purified OTase preparations. In the first part of this his thesis project, using affinity purification with a tagged *STT3* protein, other known components of the complex specifically copurified

with the *STT3* protein. Additionally, different conditional *stt3* mutations could be suppressed by overexpression of either *OST3* or *OST4* in an allele specific manner. These genetic and biochemical data demonstrated that Stt3p is a structural component of the yeast OTase. With regard to suppression of mutations in different OTase subunits by overexpression of other components of the OTase, the subunits of the OTase were grouped into three subcomplexes.

In a further part of this work, the *S. cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex was analyzed using the recently described technique of blue native gel electrophoresis that allows the separation of proteins and protein complexes under native conditions according to their molecular weight. Using this analytical method in combination with a set of yeast mutant strains, defined subcomplexes of the OTase were visualized. In addition, it was demonstrated that the *OST6* protein indeed represented an additional subunit of the OTase complex.

OST4 codes for a very small, 3.4 kDa hydrophobic protein. Its deletion leads to a temperature-sensitive phenotype and a marked hypoglycosylation of N-glycoproteins. Using blue native gel electrophoresis in combination with high copy number suppression studies with $\Delta ost3$ and $\Delta ost4$ mutant strains, it was demonstrated that Ost4p was required for incorporation of either Ost3p or Ost6p into the complex suggesting that this small protein functions as an assembly factor. Furthermore, it was demonstrated that two distinct fully assembled oligosaccharyltransferase complexes existed in yeast which contained, in addition to a set of shared proteins, either Ost3p or Ost6p. Finally, a model was proposed which describes an ordered stepwise *in vivo* assembly pathway of the yeast OTase with defined subcomplexes.

In the final part of this thesis, suppression of oligosaccharyltransferase assembly mutations by different mechanisms was investigated. Multicopy suppression screens

using either *stt3* or Δ *ost4* strains revealed that both overexpression of other OTase subunits and of integral ER membrane proteins not part of the OTase, rescued the temperature sensitive phenotype. The high copy number suppression by OTase subunits was explained by a shift of the assembly equilibrium towards fully assembled complex. High copy number suppression by the *ALG7* protein that catalyzes the first step in the biosynthesis of the lipid linked oligosaccharide, was explained by an elevation of the substrate level overcoming the defective OTase. Overexpression of the *UBC6* protein that is a part of the ubiquitin-dependent proteasomal protein degradation pathway as well as a *UBC6* deletion both resulted in suppression of the *stt3* mutation. It was shown that non-assembled OTase subunits were rapidly degraded in *stt3* mutant strains and a block in the ubiquitin-dependent proteasomal protein degradation pathway prevented this degradation. Moreover, a deletion of the *MNS1* locus that is involved in the trimming of N-linked oligosaccharides in the ER was able to suppress the *stt3* mutation, suggesting that degradation of ER-located membrane glycoproteins was controlled by N-linked oligosaccharide trimming, as it is known for soluble glycoproteins. In conclusion, it was demonstrated that oligosaccharyltransferase assembly mutations could be suppressed by an inhibition of protein degradation.

Zusammenfassung

Das Thema dieser Doktorarbeit ist die N-Glykosylierung von Proteinen in Eukaryonten mit Schwerpunkt auf der Oligosaccharyltransferase (OTase), dem Schlüsselenzym dieses Prozesses. Die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* diente dabei als Modell-Organismus.

N-Glykosylierung ist ein essentieller und hochkonservierter Prozess, der in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Das Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ wird dabei in einem schrittweisen Prozess an einem Dolicholpyrophosphat-Träger an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums assembliert und anschließend *en bloc* auf spezifische Asparagin-Reste von Polypeptid-Ketten übertragen. Diese Transfer-Reaktion wird vom multimeren Enzym-Komplex Oligosaccharyltransferase katalysiert.

Ein aktiver gereinigter Oligosaccharyltransferase Komplex besteht aus sechs Proteinen: Ost1p (64/62 kDa), Wbp1p (45 kDa), Ost3p (34 kDa), Swp1p (30 kDa), Ost2p (16 kDa), und Ost5p (9 kDa). Die für diese Untereinheiten codierenden Gene wurde kloniert. *OST1*, *WBP1*, *SWP1* und *OST2* sind essentiell, während *OST3* und *OST5* für das Wachstum nicht benötigt, jedoch für eine optimale Glykosylierung *in vivo* gebraucht werden. Auf genetischem Weg wurden zwei weitere Gene identifiziert, *STT3* und *OST4*, die für eine vollständige *in vivo* Oligosaccharyltransferase-Aktivität benötigt werden. Vor kurzem wurde zudem in einer Suche nach Ost3p ähnlichen Proteinen in der Datenbank ein weiteres Protein, Ost6p, identifiziert, das signifikante Ähnlichkeit zum *OST3* Protein aufweist. Es war jedoch nicht klar, ob dieses Protein eine weitere Untereinheit des OTase Komplexes ist oder nicht.

Das *STT3* Gen-Produkt hat eine molekulare Masse von 78 kDa und ist essentiell für das vegetative Wachstum von Hefe. Es ist hochkonserviert in eukaryotischen Zellen, und

Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit wurden in den Genomen von Archaea und Eukarya gefunden. Obwohl es für die *in vivo* Aktivität der OTase benötigt wird, war es dennoch in gereinigten OTase Präparationen nicht nachweisbar. Unter Anwendung von Affinitätsreinigung eines markierten *STT3* Proteins wurden in einem ersten Teil dieser Doktorarbeit andere bekannte Komponenten des Komplexes mit dem *STT3* Protein spezifisch mitgereinigt. Zudem konnten verschiedene konditionelle *stt3* Mutationen auf eine allel-spezifische Art durch *OST3* oder *OST4* supprimiert werden. Diese genetischen und biochemischen Daten zeigten, dass Stt3p eine strukturelle Komponente der Hefe-OTase darstellt. In Anbetracht der Suppressionsdaten von Mutationen in verschiedenen OTase Untereinheiten durch Überexpression von anderen OTase Komponenten wurden die Untereinheiten der OTase in drei Subkomplexe gruppiert.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Oligosaccharyltransferase-Komplex von *S.cerevisiae* mit Hilfe der neulich beschriebenen Technik "Blue Native Gel Elektrophoresis" analysiert, die eine Auftrennung von Proteinen und Protein-Komplexen unter nativen Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht erlaubt. Unter Verwendung dieser analytischen Technik in Kombination mit einer Reihe von Hefe-Mutanten wurden definierte Subkomplexe der OTase visualisiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass das *OST6* Protein tatsächlich eine weitere Komponente des OTase-Komplexes darstellt.

OST4 kodiert für ein sehr kleines hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 3,4 kDa. Die Deletion dieses Locus führt zu einem temperatur-sensitiven Phänotyp und einer starken Unterglykosylierung von N-Glykoproteinen. Unter Verwendung der "Blue Native Gel Elektrophoresis" in Kombination mit Suppressions-Studien mit $\Delta ost3$ and $\Delta ost4$ Mutanten-Stämmen wurde gezeigt, dass Ost4p für die Inkorporierung von Ost3p oder Ost6p in den Komplex benötigt wird. Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass Ost4p als Assemblierungs-Faktor funktioniert. Weiter wurde gezeigt, dass in Hefe zwei verschiedene vollständig assemblierte Oligosaccharyl-transferase-Komplexe existieren, die

zusätzlich zu einer gemeinsamen Anzahl Proteine entweder Ost3p oder Ost6p enthalten. Schliesslich wurde ein Modell vorgeschlagen, das eine geordnete und schrittweise *in vivo* Assemblierung der Hefe-OTase mit definierten Subkomplexen beschreibt.

Im letzten Teil dieser Doktorarbeit wurde durch verschiedene Mechanismen verursachte Suppression von Oligosaccharyltransferase-Assemblierungsmutationen untersucht. "High Copy Number Suppression Screens", bei denen *stt3* und Δ *ost4* Stämme verwendet wurden, zeigten, dass sowohl eine Ueberexpression anderer OTase-Untereinheiten als auch die Ueberexpression von integralen ER-Membranproteinen, die nicht Teil der OTase sind, den temperatur-sensitiven Phänotyp supprimieren konnten. Die Suppression durch OTase-Untereinheiten wurde durch eine Verschiebung des Assemblierungs-Gleichgewichts auf die Seite des voll-assemblierten Komplexes erklärt. Die Suppression durch das *ALG7* Protein, das den ersten Schritt in der Biosynthese des Lipid-gebundenen Oligosaccharides katalysiert, wurde durch eine Erhöhung des Substrat-Spiegels erklärt, was die Aktivität der schadhafte OTase positiv beeinflusste. Ueberexpression des *UBC6* Proteins, das am Ubiquitin-abhängigen proteosomalen Protein-Abbau-Weg beteiligt ist, sowie eine *UBC6* Deletion resultierten ebenfalls in einer Suppression der *stt3* Mutation. Es wurde gezeigt, dass nicht-assemblierte OTase Untereinheiten in *stt3* Stämmen rasch abgebaut werden. Eine Blockierung des Ubiquitin-abhängigen proteosomalen Protein-Abbau-Weg konnte diesen Abbau verhindern. Ueberdies konnte auch eine Deletion des *MNS1* Lokus, der am Trimming der N-gebundenen Oligosaccharide im ER beteiligt ist, die *stt3* Mutation supprimieren. Dies wies darauf hin, dass der Abbau von ER Membran-Glykoproteinen - wie schon für lösliche Proteine bekannt - durch das Trimming der N-gebundenen Oligosaccharide kontrolliert wird. Es wurde also gezeigt, dass Oligosaccharyltransferase-Assemblierungsmutationen durch eine Verhinderung von Protein-Abbau supprimiert werden konnten.