



Doctoral Thesis

**Protein folding in the ER
the fate of β -secretase N-glycosylation mutants**

Author(s):

Vanoni, Omar

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005701583> →

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. 17845

**PROTEIN FOLDING IN THE ER:
THE FATE OF β -SECRETASE N-GLYCOSYLATION MUTANTS**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of Doctor of Sciences

presented by

OMAR VANONI

Dipl. Natw. ETH Zurich
born October 22nd, 1980
citizen of Iragna (TI), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner
Dr. Maurizio Molinari, co-examiner

2008

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) houses a quality control machinery for newly synthesized proteins destined to the cellular plasma membrane, to endo- and exocytic compartments and to the extracellular space. About one third of the proteins synthesized in mammalian cells travel through the ER, where molecular chaperones, foldases and sugar-modifying enzymes assist them for the attainment of the native structure. The quality control insures, with rare exceptions, that only native proteins are released from the ER. Folding intermediates, orphan subunits of oligomeric complexes and misfolded polypeptides are retained in the compartment. Cell and organism homeostasis depends on the regulated balance between transport of native proteins to the site of destination and disposal of terminally misfolded structures.

Aim of my work was to better characterize the molecular basis of the events that regulate protein maturation and quality control in the mammalian ER.

To this end, we generated soluble forms of Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACEs) with 4, 3, 2, 1 and 0 N-glycosylation sites and we expressed them in mammalian cells. Analysis of the fate of the five BACEs variants revealed a direct correlation between the number of N-glycans displayed on the nascent polypeptide chains and folding efficiency, folding rate and secretion. The presence of a single N-glycan was sufficient to recruit calnexin. Addition of 1 to 4 N-glycans progressively enhanced the dissociation rate from BiP and reduced the propensity of newly synthesized BACEs to enter aberrant soluble and insoluble aggregates. Finally, inhibition of the proteasome increased the yield of active BACEs secreted from cells. This suggests that a fraction of BACEs undergoes premature degradation that decreases the amount of the enzyme that can attain the native structure.

In a second study, we analyzed chaperone-regulated retention of non-native glycopolypeptides in the mammalian ER. Cycles of de-/re-glycosylation regulated by the counteracting activities of glucosidase II and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGT1) are protracted as long as glycoproteins are un/misfolded.

Substrate cycling in the calnexin chaperone system was thought to be required for efficient ER retention of non-native polypeptides.

Here we compared the fate of a glycoprotein, tsO45 G, expressed in mammalian cells with and without the re-glycosylation enzyme UGT1 (*ugt1^{-/-}* cells). Folding of tsO45 G is characterized by a reversible, temperature-dependent defect. UGT1 is a central player of glycoprotein quality control in the ER. It re-glycosylates non-native glycopolypeptides thus inhibiting their release from the calnexin cycle. We show that the persistently misfolded tsO45 G protein expressed in *wt* and in *ugt1^{-/-}* cells was eventually released from calnexin and entered disulfide-bonded aggregates associated with BiP/GRP78. Deletion of UGT1 did not cause release of non-native G protein from the ER but resulted in faster loss of folding competence upon formation of BiP-associated disulfide-bonded aggregates. Even in cells lacking UGT1, release of misfolded conformers from calnexin occurred after an unexpected long lag period. Thus, the first release from calnexin that initiates the cycling of misfolded glycopolypeptides in the calnexin chaperone system requires persistent glycoprotein misfolding. Our data also showed that misfolded conformers eventually released from calnexin in cells with and without UGT1 were not exported through the secretory pathway. Rather, they were trapped by the BiP chaperone system. We propose that retention-based ER quality control consists in two phases involving two distinct chaperone complexes, the calnexin and the BiP system.

Riassunto

Il reticolo endoplasmico (ER) è il luogo del controllo di qualità per le proteine sintetizzate dai ribosomi e destinate a raggiungere la membrana plasmatica, compartimenti endo- e esocitici e lo spazio extracellulare. Circa un terzo delle proteine sintetizzate nelle cellule di mammifero transita dall'ER, dove chaperones molecolari, foldasi e enzimi che modificano gli zuccheri sono dedicati al folding delle proteine e le assistono nell'ottenimento della forma nativa. Il controllo di qualità assicura con rare eccezioni che solo proteine native vengano rilasciate dall'ER. Strutture intermedie, subunità singole di complessi oligomericici e polipeptidi mal ripiegati sono ritenuti nel compartimento. L'omeostasi di cellula e organismo dipende dall'equilibrio regolato tra trasporto di proteine native al loro sito di destinazione e lo smaltimento di strutture considerate irreversibilmente mal ripiegate.

L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di caratterizzare maggiormente le basi molecolari degli eventi che regolano maturazione e controllo di qualità delle proteine nell'ER di cellule di mammifero.

Per questo scopo abbiamo generato forme solubili di BACE (Beta-site APP cleaving enzyme 1) con 4, 3, 2, 1 e 0 siti di N-glicosilazione. Analisi riguardanti il destino delle cinque forme solubili di BACE (BACEs) espresse in cellule di mammifero hanno rivelato una correlazione diretta tra il numero di glicani presenti sulle catene polipeptidiche nascenti e l'efficienza di folding, la velocità di folding e la secrezione. La presenza di un singolo glicano è sufficiente per il reclutamento di calnexina. L'aggiunta di 1-4 glicani aumenta progressivamente la dissociazione dal chaperone molecolare BiP e diminuisce la tendenza di BACEs a formare aggregati aberranti. Inoltre l'inibizione del proteasoma promuove la secrezione di BACEs attiva. Questo suggerisce che una frazione di BACEs è sottoposta a una degradazione prematura che diminuisce la quantità di enzima che raggiunge la struttura nativa.

In un secondo studio abbiamo analizzato la ritenzione regolata da chaperones di glicopolipeptidi non nativi nell'ER di mammifero. Cicli di de-/ri-glicosilazione regolati dalle attività opposte di glucosidasi II e UGT1 (UDP-glucose:glycoprotein

glucosyltransferase) vengono protratti finché i substrati mantengono uno stato di mal ripiegamento. Si pensava che i cicli nel sistema di calnexina fossero richiesti per una ritenzione efficiente di polipeptidi non nativi nell'ER.

Qui abbiamo confrontato il comportamento di una glicoproteina, tsO45 G, espressa in cellule con e senza l'enzima di ri-glicosilazione UGT1 (cellule *ugt1^{-/-}*). Il folding di tsO45 G presenta un difetto reversibile dipendente dalla temperatura. UGT1 è un importante membro del controllo di qualità delle glicoproteine nell'ER. Il suo compito è la ri-glicosilazione di polipeptidi non nativi che inibisce il rilascio dal ciclo di calnexina. I dati mostrano che la proteina tsO45 G persistentemente mal ripiegata nelle cellule *wt* e in quelle *ugt1^{-/-}* viene infine rilasciata da calnexina e forma aggregati legati da ponti disolfuro e associati a BiP/GRP78. La delezione di UGT1 non causa il rilascio di proteina G non nativa dall'ER, ma risulta in un'accelerata perdita della capacità di ripiegamento correlata alla formazione degli aggregati associati a BiP. Anche in cellule senza UGT1, il rilascio da calnexina di strutture mal ripiegate avviene dopo un inaspettato lungo periodo di tempo. Quindi il primo rilascio da parte della lectina, quello che inizia i cicli di glicoproteine mal ripiegate nel sistema, richiede uno stato di mal ripiegamento persistente. I nostri dati mostrano anche che polipeptidi mal ripiegati rilasciati da calnexina in cellule con e senza UGT1 non vengono esportati attraverso la via secretoria. Al contrario vengono trattenuti dal sistema di chaperone di BiP. Proponiamo quindi che il controllo di qualità basato sulla ritenzione consiste in due fasi che coinvolgono due complessi distinti di chaperones, il sistema di calnexina e quello di BiP.