

DISS. ETH NO. 20529

Eukaryotic oligosaccharyltransferases - A functional study of the central enzymes in N-linked protein glycosylation

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
JÖRG ANDREAS BREITLING

Dipl. Biol. t.o., University of Stuttgart, Germany

born on October 25, 1980
in Biberach a.d. Riss, Germany

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner
Prof. Dr. Andreas Conzelmann, co-examiner

2012

Summary

Protein glycosylation of asparagines is a highly conserved, essential posttranslational modification in eukaryotes. In animals, plants and fungi an oligosaccharide consisting of two N-acetylglucosamine, nine mannose and three glucose residues is transferred to asparagine residues of nascent polypeptide substrates that are localised within a conserved sequon. The sequon contains asparagine, a second amino acid (any but proline) and threonine or serine (NxT/S, x ≠ P). The oligosaccharide is built up on the lipid carrier dolichol at the membrane of the endoplasmic reticulum (ER). The biosynthesis pathway of the lipid-linked oligosaccharide (LLO) is bipartite with early steps taking place at the cytosolic face of the ER membrane while late steps are carried out in the lumen of the ER. The oligosaccharide is then transferred by the oligosaccharyltransferase (OST) to asparagine residues of nascent polypeptide chains.

The first chapter provides an overview of the N-linked protein glycosylation pathway. The biosynthesis of the various components needed for the production of LLOs is described. Furthermore, enzymes involved in the assembly of the LLO are discussed with respect to their function and specificity. The second part of chapter one outlines several aspects of OST, the central enzyme in N-linked protein glycosylation. The structural diversity of OSTs from different organisms, as well as the known functions of OST subunits together with the implications for substrate specificity and the glycosylation process itself are highlighted. In addition, features of both the LLO donor substrate and the polypeptide acceptor substrate which are important for efficient glycosylation are discussed.

Trypanosoma brucei encodes three STT3 paralogues which function as OST without the help of additional subunits found in OST complexes from animals, plants and fungi. The investigation of the substrate specificity of OST isoforms from *T. brucei* is reported in chapter two. The effect of different oligosaccharide substrate structures on OST function was studied in the heterologous expression host *Saccharomyces cerevisiae* using genetic manipulations of the asparagine-linked glycosylation (ALG) genes that encode the glycosyltransferases involved in the LLO biosynthesis. Additionally, structure-function analyses were performed to identify regions in the OST proteins that influence the specificity of STT3 paralogues for the LLO as well as for the polypeptide substrate.

Chapter three addresses the question, whether OST isoforms from other protozoan organisms also display a distinct preference for small or large oligosaccharide substrate structures as it was observed for STT3 paralogues from *T. brucei*. Therefore, LLO specificities of STT3 proteins from *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* were tested.

The OST of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex that consists of eight non-identical proteins. Apart from the catalytic *STT3* protein the OST complex contains seven additional non-catalytic subunits. Chapter four summarises the attempts to identify the function of the two essential OST complex subunits *OST1* and *WBP1*. Screenings for dominant negative alleles was performed with randomly mutagenized, plasmid encoded *OST1* and *WBP1* alleles were performed. Subsequent steps to further characterise candidate mutants are summarised in chapter four.

Concluding remarks and future perspectives complete the thesis in chapter five.

Zusammenfassung

Die Glykosylierung von Asparaginen ist eine hoch konservierte, essentielle posttranslationalen Modifikation von Proteinen. In Tieren, Pflanzen und Pilzen wird ein Oligosaccharid, das aus zwei N-Acetylglucosaminen, neun Mannosen und drei Glukosen besteht, auf Asparagine übertragen, die in einem konservierten Sequenzmotiv liegen. Dieses Motiv enthält Asparagin, eine zweite, beliebige Aminosäure (ausser Prolin) und Threonin oder Serin (N_xT/S, x ≠ P). Das Oligosaccharid wird auf dem Trägerlipid Dolichol an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) aufgebaut. Der Biosyntheseweg des lipidgebundenen Oligosaccharids (LLO) ist zweigeteilt. Die ersten Schritte finden im Cytosol statt, wohingegen spätere Schritte im Lumen des ER ausgeführt werden. Das Oligosaccharid wird dann von der Oligosaccharyltransferase (OST) auf ein Asparagin eines in der Synthese befindlichen Polypeptids übertragen.

Das erste Kapitel bietet einen Überblick über Asparagin-gebundene Proteinglykosylierung. Die Biosynthese der verschiedenen Komponenten die zur Herstellung des LLO notwendig sind wird hier beschrieben. Darüber hinaus wird die Rolle der Enzyme die am Aufbau des LLO beteiligt sind im Hinblick auf deren Funktion und Substratspezifität diskutiert. Im zweiten Teil des Kapitels werden verschiedene Aspekte der OST, dem zentralen Enzym Asparagin-gebundener Proteinglykosylierung, ausgeführt. Die strukturelle Diversität von OSTs aus unterschiedlichen Organismen sowie die bekannten Funktionen verschiedener OST Untereinheiten werden im Zusammenhang mit den sich daraus ergebenden Implikationen für die OST Substratspezifität und den Glykosylierungsprozess im Allgemeinen vorgestellt. Des Weiteren werden Eigenschaften sowohl des LLO Donorsubstrats als auch des Polypeptid Akzeptorsubstrats hervorgehoben, die für die Effizienz der Glykosylierung wichtig sind.

Trypanosoma brucei kodiert drei *STT3* Paraloge, welche die Funktion einer OST ohne die Hilfe zusätzlicher Untereinheiten, die in OSTs von Tieren, Pflanzen und Pilzen vorkommen, ausüben. Kapitel 2 berichtet über die Untersuchung der Substratspezifität der OST-Isoformen aus *T. brucei*. Der Effekt unterschiedlicher Oligosaccharid-Substratstrukturen auf die OST Funktion wurde im heterologen Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae* erforscht. Hierfür wurden genetische Manipulationen an den *ALG* Genen, welche die an der Biosynthese des LLOs beteiligten Glycosyltransferasen kodieren, vorgenommen. Zusätzlich wurden Struktur-Funktions-Analysen durchgeführt um Regionen in den *T. brucei* *STT3* Proteinen zu identifizieren, welche die Substratspezifität sowohl für das LLO Substrat als auch für das Polypeptidsubstrat beeinflussen.

Kapitel 3 befasst sich mit der Frage, ob OST Isoformen anderer Protozoa ebenfalls unterschiedliche Präferenzen für kleine und grosse LLO Strukturen aufweisen, wie es bei STT3 Proteinen von *T. brucei* der Fall ist. Dafür wurde die LLO Spezifität von STT3 Proteinen aus *Leishmania braziliensis* und *Leishmania infantum* getestet.

Die OST von *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Komplex aus acht nicht-identischen Proteinen. Abgesehen vom katalytischen *STT3* Protein enthält der Komplex sieben weitere nicht-katalytische Untereinheiten. Kapitel 4 fasst die Bestrebungen zusammen die Funktion der zwei essentiellen OST-Komplex Untereinheiten *OST1* und *WBP1* zu charakterisieren. Dafür wurden Screenings von zufällig mutagenisierten *OST1* und *WBP1* Allelen zur Identifizierung von dominant negativen Allelen durchgeführt. Dies und die nachfolgenden Schritte zur weiteren Charakterisierung der Mutanten werden in Kapitel 4 beschrieben.

Die Arbeit endet mit abschliessenden Bemerkungen und einem Ausblick auf mögliche zukünftige Forschung in Kapitel fünf.