

Zusammenfassung

Das Arabidopsis Protein EAL1 ist eine aktive RING-E3-Ligase, die mit dem ESCRT-I Protein ELCH an der endosomalen Membran kolokalisiert. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der möglichen regulatorischen Funktion von EAL1 in der Ubiquitin-vermittelten Proteinsortierung, dem ERAD (ER assoziierte Degradation) Signalweg und dem programmierten Zelltod (PCD).

Zunächst wurde die durch EAL1 vermittelte Ubiquitylierung durch in vitro Autoubiquitylierungsversuche untersucht, da sich über die Ubiquitinverkettung am Substrat Rückschlüsse auf eingeleitete Signalwege ziehen lassen. EAL1 bildet bevorzugt K48 Ketten in Zusammenarbeit mit dem E2 Enzym UBC8. Dies unterstützt die Hypothese, dass EAL1 als negativer Regulator fungiert, indem es Proteine dem proteasomalen Abbau zuführt. Zudem konnte in Y2H-Studien mit Ubiquitin-Mutanten gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen EAL1 und Ubiquitin durch den C-terminalen, vor der RING-Domäne befindlichen Bereich vermittelt wird.

Die Lokalisation von EAL1 ergab Hinweise auf dessen mögliche Substrate. Die Überexpression von EAL1 und seiner Myristoylanker mutante G2A in Arabidopsis zeigte, dass der N-terminale Myristoylanker die endosomale Lokalisation vermittelt. Zusätzlich wurde in bioinformatischen Sequenzanalysen eine potentielle PH-Domäne identifiziert, die in zukünftigen Forschungsarbeiten auf ihre Funktion für eine unspezifische Bindung von EAL1 an membranständige Phospholipide untersucht werden sollte. Das mit EAL1 kolokalisierende ELCH Protein interagiert in Y2H Studien mit den ankyrin repeats von EAL1. Die Inkubation von aus Pflanzen aufgereinigtem ELCH Protein mit GST-EAL1 führt zu einer verstärkten Ubiquitylierung von ELCH. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ELCH ein Substrat der E3-Ligase EAL1 ist. Über die Regulation von ELCH könnte EAL1 an der vakuolären Sortierung von Membranproteinen beteiligt sein. Ein weiterer Proteinsortierungsweg ist der Vesikeltransport von löslichen Cargoproteinen. Untersuchungen des Transportes von α -Amylase-Sporamin zeigten, dass die Überexpression von EAL1 eine Hemmung des vakuolären Transportes bewirkt. Darüber hinaus konnte durch diese Untersuchung gezeigt werden, dass dieser Effekt von der RING-Ligase-Aktivität und der korrekten zellulären Lokalisation abhängt. Die Funktion von EAL1 im ERAD Signalweg wurde aufgrund zwei identifizierter Interaktoren untersucht, die eine Rolle bei der durch ERAD vermittelten Überwindung von ER Stress spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EAL1 in Arabidopsis zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Tunicamycin-induziertem ER Stress führt. In seiner Funktion als E3-Ligase könnte EAL1 ein Regulator im ERAD Signalweg sein.

Als weiteres potentielles Substrat von EAL1 fand sich das ESCRT-III assoziierte Protein AtALIX, mit dem es sich mehrere Interaktoren teilt, die bekannte Funktionen in der Proteinsortierungsmaschinerie und dem programmierten Zelltod (PCD) haben. Die Interaktionsdaten deuten auf eine Beteiligung von EAL1 sowohl beim Salizylsäure vermittelten Zelltod über ACD11 als auch beim Calcium vermittelten Zelltod über AtALIX hin. Die Überexpression von AtALIX in Arabidopsis führt zu einem PCD-Phänotyp, der der *acd11* knockout Linie ähnelt.

Abstract

The Arabidopsis protein EAL1 is an active E3 ligase colocalizing with the ESCRT-I protein ELCH at the endosomal membrane. Aim of this thesis was to investigate the putative regulatory function of EAL1 in the ubiquitin-mediated protein sorting, the ERAD (ER associated degradation) and the programmed cell death (PCD).

The ubiquitination via EAL1 was studied by autoubiquitination assays, in order to conclude the induced pathways from the ubiquitin linkage at the substrate. EAL1 prefers the formation of K48 chains in cooperation with the E2 enzyme UBC8. This supports the hypothesis that EAL1 is a negative regulator of proteins by directing them to proteasomal degradation. Moreover, Y2H studies with ubiquitin mutants exhibited that interaction between EAL1 and ubiquitin is mediated by the C-terminal pre-RING domain region of EAL1.

The cellular localization of EAL1 points to potential substrates. The overexpression of EAL1 and its myristoyl anchor mutant G2A indicates that the N-terminal myristoyl anchor is responsible for the endosomal localization. Additionally a potential PH domain in EAL1 was identified by bioinformatic sequence analyses that could explain the unspecific binding to membrane situated phospholipids. The colocalizing ELCH protein interacts in Y2H studies with the ankyrin repeats of EAL1. The incubation of plant purified ELCH protein with GST-tagged EAL1 led to an increased ubiquitination of ELCH. These results suggest an enzyme-substrate connection between EAL1 and ELCH. EAL1 could participate in vacuolar sorting of membrane proteins via the regulation of ELCH. One further sorting pathway is the vesicle trafficking of soluble cargo proteins. Studies of the reporter construct α -amylase-sporamin showed that the overexpression of EAL1 leads to an inhibition of the vacuolar trafficking. This effect depends on the RING ligase activity and the correct localization of EAL1.

The function of EAL1 in the ERAD pathway has been triggered due to two identified interactors which play a role in the ERAD mediated overcoming of ER Stress. The overexpression of EAL1 in Arabidopsis led to an increased resistance to Tunicamycin-induced ER stress. As an active E3 ligase EAL1 could function as a regulator in the ERAD pathway.

Another possible substrate of EAL1 is the ESCRT-III associated protein AtALIX. Both have many interactors in common that have known functions in protein sorting and programmed cell death (PCD). The interaction data suggest an involvement of EAL1 in both the salicylic acid mediated cell death via ACD11 and the calcium mediated cell death via AtALIX. Overexpression of AtALIX in Arabidopsis reveals a PCD phenotype that is similar to the PCD phenotype of the *acd11* knockout line.