
1 Einleitung

1.1 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg

Eine eukaroytische Zelle enthält mehrere tausend verschiedene Proteine, die für spezielle biochemische Prozesse verantwortlich sind. Während in den 1950er- und 1960er-Jahren der Fokus auf der Erforschung der Proteinsynthese lag, wurde der Aufklärung des Mechanismus zum Abbau lange wenig Aufmerksamkeit geschenkt. In den 1980er-Jahren entdeckten Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose jedoch den grundlegenden Mechanismus eines Proteinabbaus, der verschiedene Entwicklungsprozesse und Signaltransduktionswege reguliert (Hershko *et al.*, 1980; Hershko und Ciechanover, 1986) Damit wurde ein völlig neuer Aspekt der Kontrolle des Proteoms in den Fokus der Forschung gerückt. Dieser komplexe Mechanismus, der in allen Eukaryoten zu finden ist, ist der Ubiquitin (UBQ) -Proteasom-Weg. Für ihre bahnbrechende Arbeit wurde ihnen 2004 der Nobelpreis für Chemie verliehen.

Durch den Mechanismus der Ubiquitinierung ist es der Zelle möglich, Substratproteine über das 26S-Proteasom selektiv und kontrolliert abzubauen (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Ubiquitinierung wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Enzymaktivitäten erreicht. Das Ubiquitinmolekül ist ein hoch konserviertes Polypeptid aus 76 Aminosäuren. Es wird durch ein UBQ-aktivierendes Enzym (E1) unter Verbrauch von ATP durch eine Thioesterbindung über das carboxyterminale Glycin-76 mit einem Cysteinrest des E1-Enzyms verknüpft. Im nachfolgenden Schritt wird - ebenfalls über das Glycin-76 - das aktivierte Ubiquitin auf ein UBQ-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. UBQ-Protein-Ligasen (E3) ermöglichen dann die räumliche Zusammenführung von spezifischen Substrat- und E2-Proteinen und katalysieren den Ubiquitin-Transfer an einen Lysinrest des Substratproteins (Abb. 1-1) (Schwechheimer und Deng, 2001; Hellmann und Estelle, 2002). Ein auf diese Weise markiertes Protein kann durch das 26S Proteasom, ein etwa 1 MDA großer Proteinkomplex mit Chaperon- und Proteaseaktivität, erkannt und abgebaut werden. Die E3-Ligasen liegen hierbei entweder als Monomere vor, oder sie sind als Proteinkomplexe mit mehreren Untereinheiten aktiv (Jackson *et al.*, 2000). Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Festlegung der selektiven Markierung von abzubauenen Proteinen.

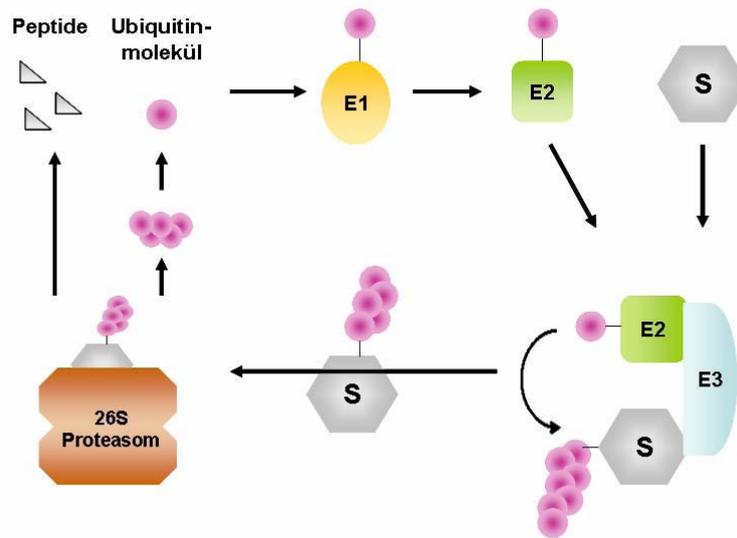


Abb. 1-1: Schema des Ubiquitin-Proteasom-Wegs. E1 aktiviert UBQ (rosa) und überträgt es auf E2. Ein Substrat (S) und das E2-Enzym werden durch eine E3-Ligase in räumliche Nähe zueinander gebracht, das UBQ auf das Substrat übertragen und vom 26S-Proteasom abgebaut.

Die Art der Ubiquitinierung eines Proteins kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen und führt nicht zwangsläufig zu dessen Abbau. Eine Monoubiquitinierung kann zum Beispiel die Endocytose von Plasmamembranproteinen, die Proteinsortierung, aber auch die Regulation der Transkription beeinflussen (Lucero *et al.*; 2000; Dunn und Hicke, 2001). Eine Endocytose kann auch durch die Ubiquitinierung mehrerer, verschiedener Lysinreste des Substratproteins (Multiubiquitinierung) eingeleitet werden (Dikic, 2003; Haglund *et al.*, 2003; Mosesson *et al.*, 2003).

In der Regel entstehen jedoch Polyubiquitinketten, die an einen einzelnen Lysinrest des Substratproteins binden. Ob die markierten Proteine durch das 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden, hängt wesentlich von der Art des Aufbaus dieser Ketten ab. So gibt es verschiedene Varianten der Verknüpfung der UBQ: Die Isopeptidbindung zwischen Glycin-76 (G76) erfolgt entweder mit dem Lysinrest 29 (K29) oder mit einem Lysinrest 48 (K48) eines bereits gebundenen UBQs (Chau *et al.*, 1989; Finley *et al.*, 1994; Dubiel und Gordon, 1999; Thrower *et al.*, 2000). In diesem Fall wird das markierte Substrat vom 26S Proteasom über zwei 19S Untereinheiten erkannt, deubiquitiniert und durch das 20S Hauptmodul in kurze Peptide gespalten (Lam *et al.*, 2002; Pickart, 1997). Im Laufe dieses Prozesses spalten Isopeptidasen die Polyubiquitinketten und stellen dieses Protein dem Kreislauf wieder zur Verfügung (Ciechanover, 1998; Smalle und Vierstra, 2004).

Baut sich die Polyubiquitinkette jedoch über K63-G76 Isopeptidbindungen auf, wird sie nicht vom Proteasom erkannt und initiiert keinen proteolytischen Abbau (Dubiel und Gordon, 1999). Derartig markierte Proteine sind ebenfalls in Prozesse der Endocytose oder der DNA-Reparatur involviert (Pickart, 2000; Hofmann und Pickart, 2001).

Ein wichtiger Aspekt des UBE1-Proteasom-Wegs sind regulatorische Prozesse, welche die Einleitung für die Ubiquitinierung und den Abbau von Proteinen steuern. So können verschiedene kovalente Modifikationen der Substratproteine, entstanden etwa durch Oxidation (Kazuhiro, 2003), Hydroxylierung (Masson *et al.*, 2001), Phosphorylierung (Deshaies, 1999) oder Glycosylierung (Yoshida, 2002; Ciechanover, 1998), den Abbau initiieren. Bei der Substraterkennung ist ein hoher Grad an Selektivität von entscheidender Bedeutung. Dieser wird durch eine große Anzahl unterschiedlicher E3-Ubiquitin-Ligasen erreicht, die sich oft aus Proteinkomplexen mit substratspezifischen Adaptoren zusammensetzen.

1.1.1 Culline als zentrale Untereinheiten komplexer E3-Ligasen

Eine Reihe multimerer E3-Ligasen enthält Culline als zentrale Untereinheiten (Deshaies, 1999; Pintard *et al.*, 2004). Sie gehören einer Multigenfamilie an, die sich durch Sequenzhomologien, die so genannte „Cullindomäne“, im carboxyterminalen Bereich definiert (Zachariae *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998). Sie sind in Eukaryoten weit verbreitet, während für Prokaryoten bisher keine Culline nachgewiesen wurden. Anhand der Identität zu Cullinen aus Säugetieren, wurden in *A. thaliana* 11 Proteine identifiziert (Shen *et al.*, 2002) (vgl. Abb. 1-2), die eine Cullin-ähnliche Sequenz besitzen.

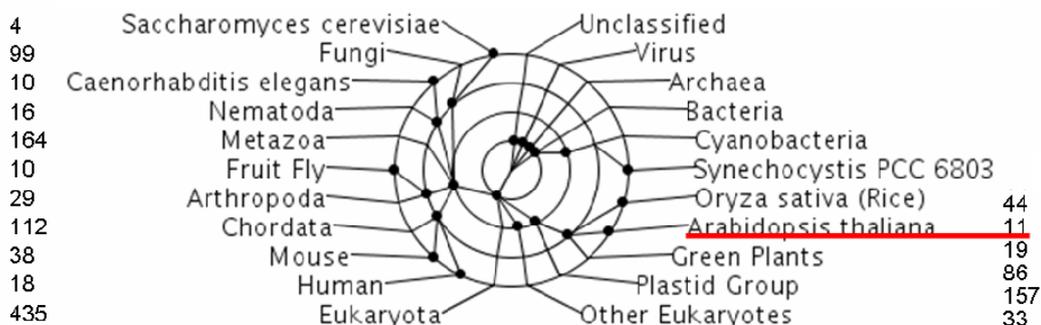


Abb. 1-2: Taxodiagramm der Cullin-Proteinfamilie mit 11 Cullin-ähnlichen Proteinen in *A. thaliana*.

Für Pflanzen wurden bereits verschiedene Culline enthaltende E3-Komplexe beschrieben, hierzu gehören der SCF- (SKP1 (S-phase Kinase-associated Protein 1) – CUL1 – F-Box Protein) Komplex (Gray *et al.*, 1999), bei dem ASK1 (*Arabidopsis*-SKP1-like) als Substratadaptor fungiert und zusätzlich ein F-Box Protein das Substrat rekrutiert. Beim BRC- (BTB – RBX1 – CUL3) Komplex fungieren BTB/POZ- (Broad Complex, Tramtrack, Bric-a-Brac/Pox Virus and Zinc Finger) Proteine als Substratadaptors, die eine zweite Protein-Proteininteraktionsdomäne enthalten (Figuroa *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). Für den erst kürzlich beschriebenen DRC-Komplex (DDB1 – RBX1 – CUL4) konnte eine Interaktion mit DDB1 (Damaged DNA Binding) als möglicher Substratadaptor nachgewiesen werden. Analog zu den F-Box Proteinen des SCF-Komplexes existieren auch hier mögliche sekundäre (DDB2 oder DET1 (De-Etiolated) Substratadaptors (Bernhardt *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Dreher und Callis, 2007). Eine weitere Cullin enthaltende E3-Ligase ist der APC/C- (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) Komplex, der aus mindestens 11 Untereinheiten besteht, und APC2 als Cullinuntereinheit enthält (Peters, 2002).

AtCUL1, AtCUL3 und AtCUL4 interagieren im C-terminalen Bereich mit dem RING- (Really Interesting New Gene) Finger Protein RBX1 (RING Box Protein). APC2 interagiert mit APC11, einem Protein, das ebenfalls eine RING-Domäne enthält. RBX1 ist nötig, um E2 zu binden und so das Substrat in räumliche Nähe zur E3-Ligase zu bringen. Abb. 1-3 zeigt schematisch die generelle Zusammensetzung der Cullin-abhängigen E3-Ligasen.

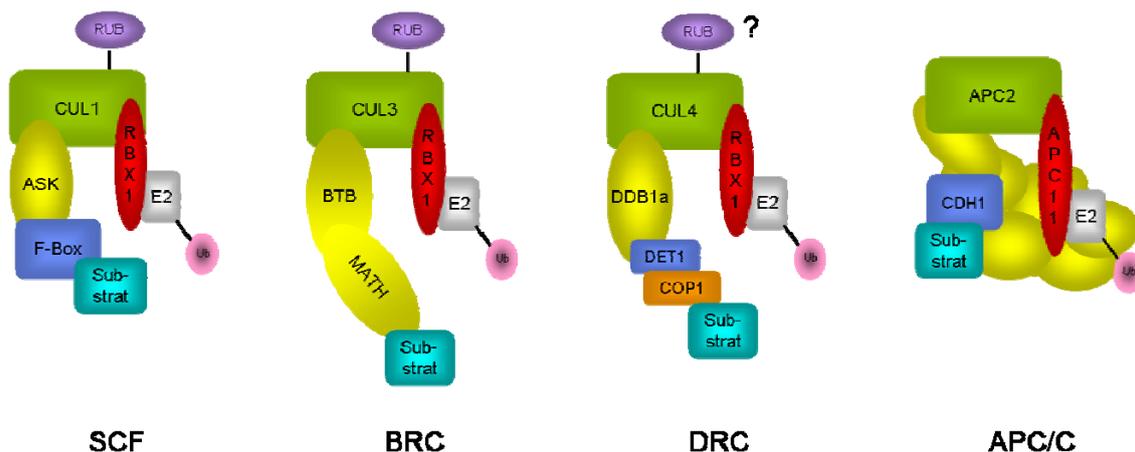


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Cullin-abhängigen E3-Ligasen. Alle Culline erfordern eine RBX1-Untereinheit (rot), die mit dem E2 Enzym (grau) interagiert um die Ubiquitinierung (rosa) zu stimulieren, Jedes Cullin (grün) interagiert mit einem Substratadaptor (gelb und blau, bzw. nur gelb im Fall von BRC) der wiederum spezifisch das Substrat (türkis) rekrutiert. Die RUB-Modifikation ist in Lila dargestellt.

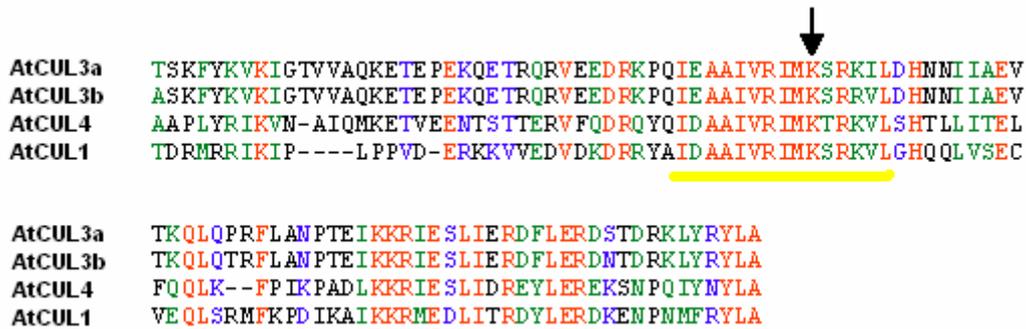
1.1.2 Der RUB-Modifikations-Weg, CSN und das CAND1 Protein

Die meisten Culline, die als Teil eines E3-Ligase-Komplexes beschrieben wurden, zeichnen sich durch ein spezielles Sequenzmotiv nahe dem COOH-Terminus aus. Dieses Motiv, das einen hoch konservierten Lysinrest enthält, ist für die Bindung eines einzelnen so genannten RUB-Proteins (Related to Ubiquitin) in *Arabidopsis*, bzw. NEDD8 (Neural-Precursor-Cell-Expressed and Developmentally Down Regulated) in tierischen Organismen erforderlich.

Im *Arabidopsis*genom finden sich drei Gene, die für ein RUB-Protein kodieren (Callis *et al.*, 1995). Als Zielproteine für einen RUB-Konjugationsweg sind bisher nur Culline beschrieben worden (Hochstrasser, 1998; del Pozo und Estelle, 1999). Vier der Culline aus *A. thaliana* (AtCUL1, 3a, 3b und 4) besitzen eine Sequenz für die RUB-Modifikation (Abb. 1-4) (Shen *et al.*, 2002). Für AtCUL1 (del Pozo und Estelle, 1999), AtCUL3a und AtCUL3b (Figueroa *et al.*, 2005) wurde diese Modifikation in *Arabidopsis* bereits nachgewiesen. Für AtCUL4 fehlt der Beleg bisher, allerdings zeigt es zwei elektrophoretische Formen (Chen *et al.*, 2006), die eine RUB-Modifikation sehr wahrscheinlich machen.

Wie beim UBIQUITIN erfolgt die Anlagerung von RUB über E1-, E2- und E3-ähnliche Enzyme. Das RUB E1 Enzym ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten AXR1 (Auxin Resistant) und ECR1 (E1 C-terminal Related). Dieses Dimer aktiviert RUB und führt es zum RUB-konjugierenden E2 RCE1 (RUB-conjugating Enzyme) (Dharmasiri *et al.* 2003a). In einem weiteren Schritt wird RUB auf das Cullin übertragen, was wahrscheinlich durch ein RBX1-Molekül als E3-Ligase ermöglicht wird (Gray *et al.*, 2002).

Es liegen keine endgültigen Erkenntnisse über die biologische Funktion der RUB-Modifikation vor, eine molekulare Analyse von *axr1-3*- und *axr1-12*-Mutanten zeigte aber, dass durch Punktmutationen erfolgte Änderungen in der Aminosäuresequenz von AXR1 die Thioesterbindung zwischen ECR1 und den RUB-Proteinen verhindert wird (del Pozo *et al.*, 1998; del Pozo *et al.*, 2002). Diese „missense“-Mutation im *AXR1*-Gen ist verantwortlich für eine reduzierte Auxin Antwort der *axr1*-Mutanten und bestätigt einen Zusammenhang zwischen Auxin-Signaltransduktion, der RUB-Modifikation und dem UBIQUITIN-Proteasom-Weg.



| | |
|---------|--|
| AtCUL3a | TSKFYKVKIGTVVAQKETEPEKQETRQRVEEDRKPQIEAAIVRIMKSRKI LDHNMI IAEV |
| AtCUL3b | ASKFYKVKIGTVVAQKETEPEKQETRQRVEEDRKPQIEAAIVRIMKSRRLDHNMI IAEV |
| AtCUL4 | AAPLYRIKVN-AIQMKETVEENTSTTERVFQDRQYQIDAAIVRIMKTRKVL SHTLLITEL |
| AtCUL1 | TDRMRRIKIP----LPPVD-ERKKVVEDVDKDRRYAIDAAIVRIMKSRKVLGHQQLVSEC |
| ↓ | |
| AtCUL3a | TKQLQPRFLANPTEIKKRIESLIERDFLERDSTDRKLYRYLA |
| AtCUL3b | TKQLQTRFLANPTEIKKRIESLIERDFLERDNTDRKLYRYLA |
| AtCUL4 | FQQLK--FP IKPADLKKRIESLIDREYLEREKSNPQIYNYLA |
| AtCUL1 | VEQLSRMFKPD IKAIKKRMEDLITRDYLERDKENPNMFRYLA |

Abb. 1-4: Partieller Sequenzvergleich einiger Culline aus *A. thaliana* mit der Konsensussequenz für eine RUB-Modifikation (gelb unterstrichen). Der Pfeil kennzeichnet den spezifischen Lysinrest für die Bindung eines RUB-Proteins.

Schwechheimer *et al.* (2001) zeigten, dass eine gestörte Modifikation einerseits Zielproteine stabilisiert und andererseits eine Dekonjugation von RUB (De-Rubilierung) genauso wichtig wie die Konjugation ist. Für diesen Prozess ist CSN5, eine Untereinheit des COP9 (Constitutive Photomorphogenesis) Signalosoms (CSN), verantwortlich (Lyapina *et al.*, 2001; Schwechheimer *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006).

Neben der RUB-Modifikation gibt es noch einen weiteren Mechanismus zur Regulierung der Aktivität einer E3-Ligase. Das CAND1-Protein (Cullin Associated and Neddylation-Dissociated) bindet sowohl an den N- als auch an den C-Terminus eines durch CSN5 de-Rubilierten Cullins und konkurriert damit mit der Bindung der Substratadaptoruntereinheit (Alonso-Peral *et al.* 2006). Eine mögliche Erklärung für diesen Vorgang ist, dass auf diese Weise das unmodifizierte Cullin durch CAND1 vom CSN-Komplex abgetrennt wird und eine inaktive E3-Ligase zurückbleibt, die jetzt wieder durch eine RUB-Modifikation des Cullins und dessen erneute Bindung an seine Komplexpartner in eine aktive Ligase umgewandelt werden kann (Cope und Deshaies, 2003). In Pflanzen konnte eine Interaktion von cullinabhängigen E3-Ligasen mit CAND1 bereits für AtCUL1 und AtCUL4 gezeigt werden (Alonso-Peral *et al.* 2006; Moon *et al.* 2007). Da eine Interaktion von CAND1 aber auch schon mit menschlichem CUL3 gezeigt werden konnte (Lo und Hannink, 2006), ist es sehr wahrscheinlich, dass die Aktivität einer AtCUL3-abhängigen E3-Ligase ebenfalls durch CAND1 reguliert wird.

Einen weiteren interessanten Punkt für die Rolle von RUB haben Wimuttisuk und Singer (2007) mit menschlichem CUL3 herausgefunden. Sie konnten zeigen, dass CUL3 über NEDD8 Heterodimere bilden kann und solch ein Heterodimer für die Ubiquitinierung des Substratproteins Cyclin E nötig ist. Diese Erkenntnis öffnet neue Perspektiven, bezüglich der Rolle der RUB-Modifikation. So ist zum Beispiel die Ausbildung von E3-Ligasen höherer Ordnung mit gleichen oder unterschiedlichen Cullinen als Komplexbasis denkbar.

1.1.3 Phytohormon- und Stresssignaltransduktion und die Rolle von Cullin-abhängigen E3-Ligasen

Phytohormone sind wesentlich für die Steuerung und Koordination des pflanzlichen Wachstums sowie für die Adaption an wechselnde Umweltbedingungen. Als pflanzeneigene organische Verbindungen, welche in niedrigen Konzentrationen wirken, integrieren sie extrazelluläre Signale in die endogenen Entwicklungsprozesse der Pflanze. Neben den fünf klassischen Phytohormonen Abscisinsäure (ABA), Auxin (IAA), Cytokinin, Ethylen und Gibberellinsäure (GA) werden auch Brassinosteroide (BR), Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA) zu den Pflanzenhormonen gezählt (vgl. Abb. 1-5). Einige von ihnen (ABA, JA, SA und Ethylen) sind wichtige Komponenten bei der Akklimatisierung der Pflanze an eine Stresssituation.

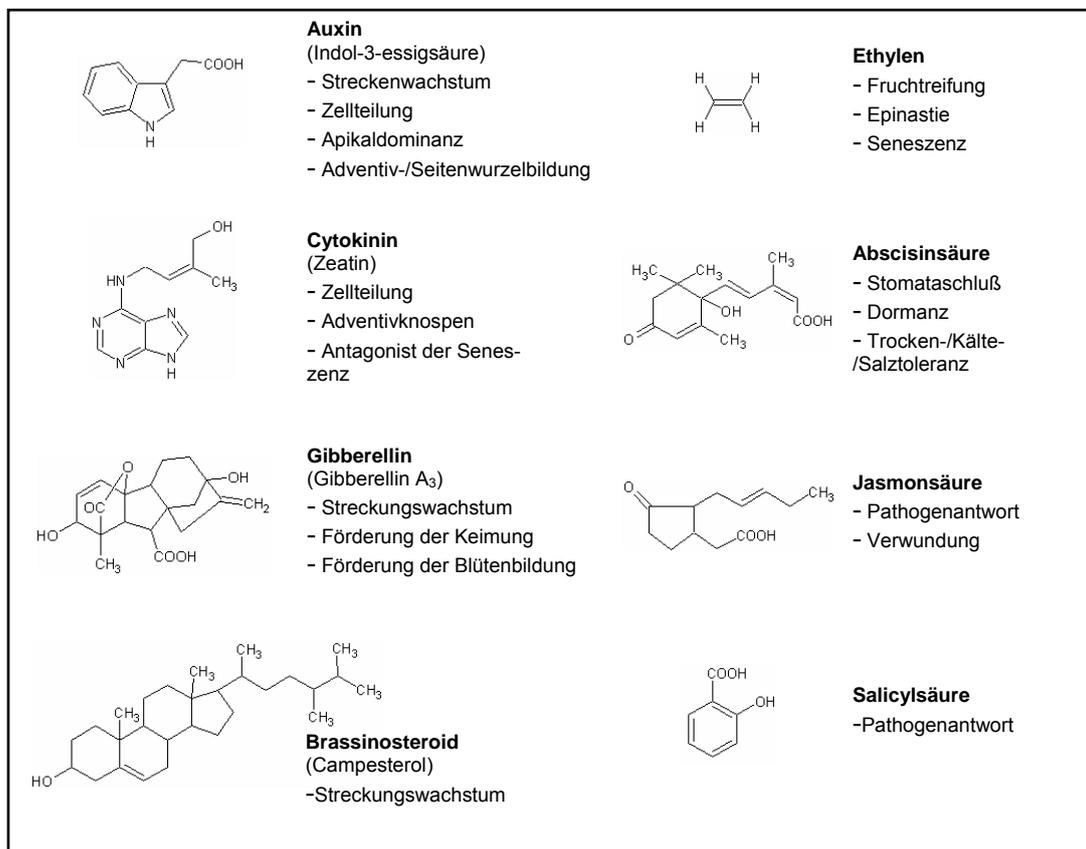


Abb. 1-5: Struktur und Funktion von Phytohormonen (modifiziert nach Iten *et al.*, 1999).

Auxin kommt natürlicherweise hauptsächlich als Indol-3-Essigsäure (IAA) vor. Zu seinen wichtigsten Funktionen gehört die Regulation des Wachstums, der Teilung und der Differenzierung der Zelle (für eine Übersicht siehe Davis, 2004; Paciorek und Friml, 2006). Der SCF^{TIR1}-Komplex stellt einen wichtigen Kontrollpunkt bei der Signaltransduktion von Auxin dar. Loss-of-function Mutationen in den Komponenten des SCF-Komplexes haben

eine Auxinresistenz zur Folge, was auf negative Regulatoren als Substrate dieser E3-Ligase schließen lässt (Gray *et al.*, 1999, 2001; Hellmann *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass Mitglieder der AUX/IAA-Proteinfamilie, kurzlebige Repressoren der Auxinantwort sind und über den SCF^{TIR1}-Komplex abgebaut werden (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2003b; Tian *et al.*, 2003).

Bei **Cytokininen** handelt es sich um N⁶-substituierte Aminopurine, von denen das wichtigste Zeatin ist. Sie sind, wie Auxin auch, an vielen pflanzlichen Differenzierungsprozessen beteiligt, darunter Zellteilung, Morphogenese von Spross und Wurzeln, Chloroplastenteilung, Zellstreckung und Seneszenz (Mok und Mok, 1994). Cytokinine und Auxin agieren oft synergistisch und einige Auxinmutanten zeigen auch eine veränderte Cytokininantwort (Coenen und Lomax, 1997). Es konnte bisher noch kein direkter Zusammenhang der Cytokinin-Signaltransduktion mit einer E3-Ligase nachgewiesen werden, aber Smalle *et al.* (2002) stellten ein verändertes Wachstum auf Cytokininen von *rpn12a* Mutanten fest. In diesen Pflanzen waren cytokinin-induzierbare Gene hochreguliert. Bei RPN12 (19S Regulatory Particle with non-ATPase Subunit) handelt es sich um eine Subuntereinheit der 19S Untereinheit des 26S Proteasoms (Voges *et al.*, 1999, Glickman *et al.*, 1998)

Die **Gibberelline** sind eine große Klasse von diterpenoiden Phytohormonen, die u.a. eine Rolle bei der Samenkeimung, Seneszenz, Blütenbildung, der Elongation des Stängels und des Wurzelwachstums spielen. (Davies, 2004; Swain und Singh, 2005). In der GA-Signaltransduktion sind DELLA-Proteine (benannt nach einer hochkonservierten Region im N-Terminus) negative Regulatoren der Gibberellinantwort (Thomas und Sun, 2004). Diese DELLA-Proteine werden ihrerseits von einem SCF-Komplex reguliert (Swain und Singh, 2005), der die F-box Proteine SLY1 (SLEEPY) oder SNE (SNEEZY) enthält (Sasaki *et al.*, 2003; Strader *et al.*, 2004). Interessanterweise scheinen drei weitere Hormone die Stabilität von DELLA-Proteinen zu regulieren. Auxin verzögert den GA-induzierten Abbau von DELLA-Proteinen (Fu und Harberg, 2003), während Ethylen den gegenteiligen Effekt hat (Achard *et al.*, 2003). Auch ABA verlangsamt den GA-induzierten Abbau von DELLA (Achard *et al.*, 2006).

GA und ABA spielen eine antagonistische Rolle bei der Regulation des Transkriptionsfaktors GAMYB (GA-inducible Myb) in Pflanzen. Er wird durch GA hoch- (Gubler *et al.*, 1995) und durch ABA herunterreguliert (Gomez-Cadenas *et al.*, 2001). Woodger *et al.* (2004) haben in einem Yeast-two-hybrid Assay einen potentiellen Regulator von GAMYB in Gerste gefunden, der GMPOZ (GAMYB associated BTB/POZ-Protein) genannt wird

und eine BTB/POZ Domäne enthält. Damit bietet sich eine potentielle Verbindung zu einer CUL3-abhängigen E3-Ligase an.

Das Terpenoid **Abcisinsäure** spielt eine wesentliche Rolle in der Samen- und Knospenruhe. Bei der Reaktion auf abiotische Stressoren wie Kälte und Trockenheit kommt es zu einem Anstieg von ABA (für eine Übersicht siehe Leung und Giraudat, 1998). Den ersten Hinweis auf eine Regulierung der Transkription von ABA-reagierenden Proteinen lieferte ABI5 (ABA Insensitive), ein Transkriptionsfaktor, der ein positiver Regulator der ABA-Antwort ist. Beim Einsatz von Cycloheximid konnte der Abbau von ABI5 durch die exogene Zugabe von ABA blockiert werden (Lopez-Molina *et al.*, 2001). Die Verwendung von Proteasomeninhibitoren führte zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem ABI5 (Lopez-Molina *et al.*, 2003), so dass es wahrscheinlich erscheint, dass ABI5 durch das Proteasom abgebaut wird. Es ist noch nicht klar, auf welche Weise ABA ABI5 stabilisiert, doch es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von AFP (ABI5 binding Protein) zu einem verstärkten Abbau von ABI5 in Abwesenheit von ABA führt (Lopez-Molina *et al.*, 2003).

Ein weiterer positiver Regulator der ABA Transkription ist der Transkriptionsfaktor ABF2 (ABRE (ABA Response Element) Binding Factor). Er interagiert mit der potentiellen E3-Komponente ARIA (ARM (Armadillo) Protein Repeat Interacting with ABF2), ein Protein das neben den Armadillo repeats auch eine BTB Domäne besitzt (Kim *et al.*, 2004a).

Ethylen, das einfachste Olefin, steuert die Fruchtreife und andere Prozesse, die im Zusammenhang mit Seneszenz, Abszission der Frucht, Wurzelhaarbildung, Keimlingswachstum und Öffnen des Hypokotylhakens stehen. Es wird als Antwort auf verschiedene Arten von abiotischem (z.B. Kälte oder Licht) und biotischem Stress durch Pathogene oder Insektenbefall produziert (Übersichten in Klee, 2004; Chen *et al.*, 2005; van Loon *et al.*, 2006). Der U^{BQ}-Proteasom-Weg ist in all diesen ethylenvermittelten Prozessen beteiligt. Der Transkriptionsfaktor EIN3 (Ethylene-Insensitive), der als positiver Regulator die Transkription von z.B. *ERF1* (Ethylene Response Factor) kontrolliert (Solano *et al.*, 1998), wird von einem SCF-Komplex reguliert, dessen Substratspezifität durch die F-Box Proteine EBF1 oder EBF2 (EIN3-binding E-box) vermittelt wird (Potuschak *et al.*, 2003; Gagne *et al.*, 2004; Guo und Ecker, 2004).

Die zweite Verbindung zum Proteasom-Weg wurde durch die Mutante *eto1* (Ethylen Qverproducer) entdeckt. Bei ETO1 handelt es sich um eine BTB-Protein, das mit CUL3 interagieren kann (Wang *et al.*, 2004). Als Substrat für eine BRC^{ETO1}-Ligase könnte eine ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid) Synthase (ACS) in Frage kommen, da in

yeast-two-hybrid (Y2H) Versuchen eine Interaktion von ETO1, ETO-LIKE1 und 2 (EOL) mit ACS5 gezeigt wurde (Übersicht in Chae und Kieber, 2005). Einen weiteren Hinweis auf den UBQ-Proteasom-Weg liefern die Mutanten *eto2* und *eto3*. Diese haben eine Mutation in den Genen *ACS5* und *ACS9* und sind ebenfalls Ethylenüberproduzenten (Vogel *et al.*, 1998; Chae *et al.*, 2003).

Brassinosteroide sind eine Klasse von polyhydroxylierten Steroidhormonen, die einen Effekt auf die Zellteilung und Zellelongation, die Photosynthese und die Differenzierung von vaskulärem Gewebe haben (Bishop und Koncz, 2002). Es existieren nur wenige Erkenntnisse über die Signaltransduktion dieses Phytohormons, trotzdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des UBQ-Proteasom-Wegs. Es hat den Anschein, dass BR eine RING-E3-Ubiquitinligase transkriptionell reguliert. Die Menge an Transkript von BRH1 (Brassinosteroid-Responsive RING-H2) wird durch Zugabe von Brassinolid (BL) in Abhängigkeit von BRI1 (Brassinosteroid Insensitive) verringert. Es konnte zwar noch kein Substrat für diese Ligase identifiziert werden, aber es ist interessant, dass sie von dem Elicitor Chitin hochreguliert wird, womit eine neue antagonistische Verbindung zur Pathogensignalerkennung gegeben sein könnte (Molnar *et al.*, 2002). Weiterhin konnten He *et al.* (2002) zeigen, dass die Proteinkinase BIN2 (Brassinosteroid Insensitive) den positiven Regulator BZR2 (Brassinazole Resistant) phosphoryliert und für einen Abbau durch das Proteasom markiert.

Jasmonsäure, ein Derivat der Linolensäure, inhibiert das Wurzelwachstum und ist verantwortlich für die Pollenentwicklung und Blütenorganbildung. Zusätzlich reguliert JA mehrere *PR* Gene (Pathogenesis Related) während der Herbivor- und Pathogenabwehr (Übersicht in Creelman und Mullet, 1997). Die Untersuchung der *coi1* (Coronatine Insensitive) Mutante zeigte eine Insensitivität dieser Pflanze gegenüber Coronatin, einer JA-ähnlichen Substanz, und gegenüber dem Methylester von JA (MeJA) (Feys *et al.*, 1994). *COI1* kodiert für ein F-Box Protein, das zusammen mit CUL1 in einem SCF-Komplex steht (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Allerdings ist noch kein Substrat identifiziert worden, das durch einen SCF^{COI1}-Komplex abgebaut wird. Ein mögliches Substrat könnte RPD3b/HDAC6 (Reduced Potassium Dependency/Histone Deacetylase) sein, da diese in Y2H und *in planta* miteinander interagieren (Devoto *et al.*, 2002). Zusammen mit Ethylen reguliert Jasmonsäure die Transkription von ERF/AP2 Transkriptionsfaktoren, die downstream von EIN3 agieren (Guo und Ecker, 2004). Eine Überexpression von ERF1 in *coi1*-Mutanten ist in der Lage deren Schutzmechanismen bei Pathogenbefall wiederherzustellen (Lorenzo *et al.*, 2003).

Salicylsäure ist ein Derivat der Benzoesäure und ihre prominenteste Rolle hat sie in der Pathogenabwehr. Salicylsäure wird allgemein als das von einer Pathogeninfektionsstelle ausgehende Signal zur Etablierung der SAR (Systemic Aquired Resistance) angesehen (Übersicht in Durrant und Dong, 2004). Hierbei handelt es sich um das Phänomen, dass Pflanzen nach einer erstmaligen Pathogeninfektion eine Resistenz ausbilden und bei einer zweiten Infektion weniger schwere Symptome zeigen (Ross, 1961). Abhängig ist dieser Mechanismus neben SA vor allem von NPR1 (Non-Expressor of PR (Pathogenesis Related) Genes), einem BTB-Protein mit einer Region von vier Ankyrinmotiven im C-Terminus (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Dieses Protein stimuliert die Expression einer Reihe von *PR*-Genen. Da BTB-Proteine als Substratadaptoren in BRC-Komplexen dienen, könnte hierüber eine Verbindung zum UBC-Proteasom-Weg vorliegen. Eine weitere Rolle scheint SA in der Reaktion auf Hitzestress zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage ist *Arabidopsis*, Tomate oder Kartoffel vor Hitzestress und hitzeinduziertem oxidativen Schaden zu schützen (Larkindale und Knight, 2002; Lopez-Delgado *et al.*, 1998; Senaratna *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2004).

1.2 AtCUL3-abhängige E3-Ligasen

Culline verschiedener Organismen lassen sich strukturell miteinander vergleichen. So sind AtCUL3a (At1g26830) und AtCUL3b (At1g69670) zu etwa 88% auf Aminosäureebene identisch und stellen Orthologe der CUL3 Culline aus *Caenorhabditis elegans* (Ce) und *Homo sapiens* (Hs) dar. In Abb. 1-6 ist die Struktur der Cullin-Proteine aus *Arabidopsis* und Mensch gezeigt. AtCUL3a ist zu AtCUL3b im N-terminalen Bereich zu 85% identisch und zu HsCUL3 zu 49%. Eine deutlich höhere Ähnlichkeit zum Menschen ist im Bereich der Cullindomäne (CH) zu verzeichnen.

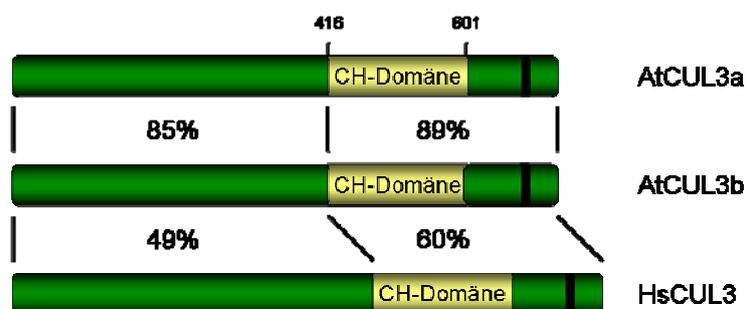
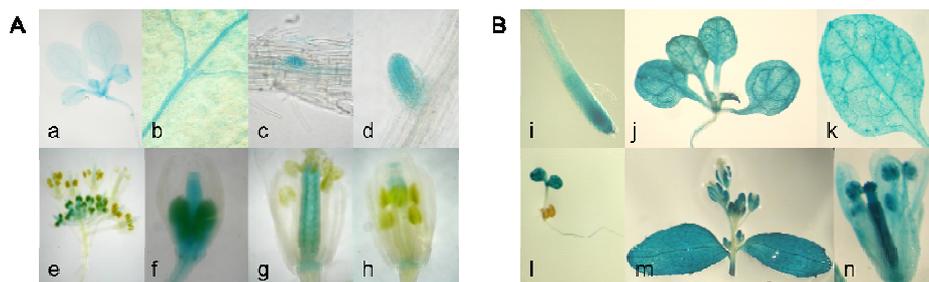


Abb. 1-6: Vergleich von AtCUL3 mit HsCUL3. Der schwarze Balken repräsentiert die Position der RUB-Modifikation. CH-Domäne, Cullinhololge Domäne. Die Zahlen geben die Position der Cullindomäne im Protein von AtCUL3 an.

AtCUL3 wird in allen Organen von *Arabidopsis* exprimiert (Weber *et al.*, 2005). Promotor-GUS Analysen zeigten für *AtCUL3a* eine Expression in sich gerade entwickelnden Lateralwurzeln. Interessanterweise ist die Expression von *AtCUL3a* in der Infloreszenz altersabhängig. In jungen Blütenständen ist *AtCUL3a* über die ganze Blüte verteilt. Mit zunehmender Entwicklung nimmt die GUS-Färbung immer weiter ab und ist in vollständig ausdifferenzierten Blüten nur noch im oberen Bereich des Pistills zu detektieren (Abb. 1-7 A). *AtCUL3b* wird in allen Teilen der Pflanze stark exprimiert (siehe Abb. 1-7 B)



modifiziert nach Weber *et al.*, 2005

Abb. 1-7: Expressionsmuster von *AtCUL3a* und *AtCUL3b*. A: Die *AtCUL3a* Promotor-GUS Linie zeigt eine Expression in allen Organen (a, Keimling; b, Nahaufnahme des vaskulären Gewebes; c und d, Lateralwurzeln; e – f, Infloreszenz). B: Die *AtCUL3b* Promotor-GUS Linie zeigt ein ähnliches Expressionmuster wie *AtCUL3a* (i, Wurzel; j, Rosettenblätter; k, Nahaufnahme Blatt; l, Keimling; m Blütenstand mit Rosettenblättern; n, Blüte).

Im Gegensatz zum gut charakterisierten SCF-Komplex ist über CUL3-abhängige E3-Ligasen in Pflanzen nur wenig bekannt. Die ersten Hinweise auf die Zusammensetzung dieses Komplexes haben ihren Ursprung aus den Forschungen in *C. elegans*. Hier fungiert das BTB/MATH- (Meprin and TRAF Homology) Protein MEL26 (Maternal Effect Lethality) als Substratadaptor für eine CUL3-basierende E3-Ligase (Furukawa *et al.* 2003; Pintard *et al.* 2003; Xu *et al.* 2003; für eine Übersicht siehe van den Heuvel, 2004). Im Anschluss an diese Entdeckung wurden auch in Pflanzen diverse BTB-Proteine identifiziert, die mit CUL3 interagieren können. Sie enthalten entweder nur die BTB Domäne oder zusätzlich eine zweite Proteininteraktionsdomäne wie z.B. die bereits erwähnte MATH-Domäne oder auch TPR- (Tetratricopeptid) und Arm-Motive. (Weber *et al.*, 2007; Dieterle *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2005; Gingerich *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). Allerdings gibt es nur sehr wenige Erkenntnisse über die Substratadaptoren eines BRC-Komplexes. Der einzige bisher bekannte gute Kandidat ist ACS5, die den letzten Schritt in der Ethylenbiosynthese katalysiert. ACS5 interagiert mit dem

BTB-Protein ETO1 über dessen TPR-Wiederholungen und über die BTB-Domäne mit AtCUL3 (vgl. 1.1.3) (Wang *et al.*, 2004).

Neben der Beteiligung an der Kontrolle der Ethylenbiosynthese wurde AtCUL3a mit der Phytochrom-A-abhängigen Antwort auf Rotlicht in Zusammenhang gebracht. AtCUL3a-Nullmutanten zeigen eine Hemmung des Hypokotylwachstums unter Rotlichtbedingungen mit einer veränderten Expression von *COP1*. Sie blühen etwas später und haben zu Beginn der Blüte mehr Rosettenblätter als der Wildtyp (Dieterle *et al.*, 2005).

Zwar hat das Ausschalten eines einzelnen AtCUL3 nur geringe Auswirkung auf den Phänotyp, der Verlust von AtCUL3a und AtCUL3b zusammen führt jedoch zu einem Abbruch der Embryogenese im Herzstadium und einer Störung der Entwicklung des Endosperms (Figueroa *et al.*, 2005, Thomann *et al.*, 2005). Diese Doppelmutanten sind embryolethal.

1.3 BTB/POZ-Proteine als Substratadaptoren in BRC-Komplexen

Ursprünglich wurde die BTB/POZ-Domäne als Proteininteraktionsdomäne in Poxviren und in Transkriptionsregulatoren von *Drosophila melanogaster* identifiziert. Sie ist aber auch in Pflanzen, Nematoden, Pilzen, Insekten und Säugetieren sehr häufig, während sie in Bakterien kaum zu finden ist. Laut InterPro Datenbank (www.ebi.ac.uk/interpro) enthält *Arabidopsis* 76 BTB-Proteine, deren Aufbau die elf Klassen definiert nach denen sie unterteilt werden (Gingerich *et al.*, 2005). Allen gemeinsam ist eine einzelne BTB/POZ-Domäne, die in acht Fällen am N-Terminus lokalisiert ist. Die beiden Ausnahmen sind BPMs (BTB/POZ-MATH) und BTB-Arm-Proteine, deren BTB-Domäne am C-Terminus liegt. Gefolgt wird diese von einer Linkerregion und einem zweiten Proteininteraktionsmotiv, das häufig als Tandemwiederholung auftritt (Zusammenfassung in Stogios *et al.*, 2005). Abb. 1-8 zeigt eine schematische Zusammenfassung des Aufbaus von BTB-Proteinen.

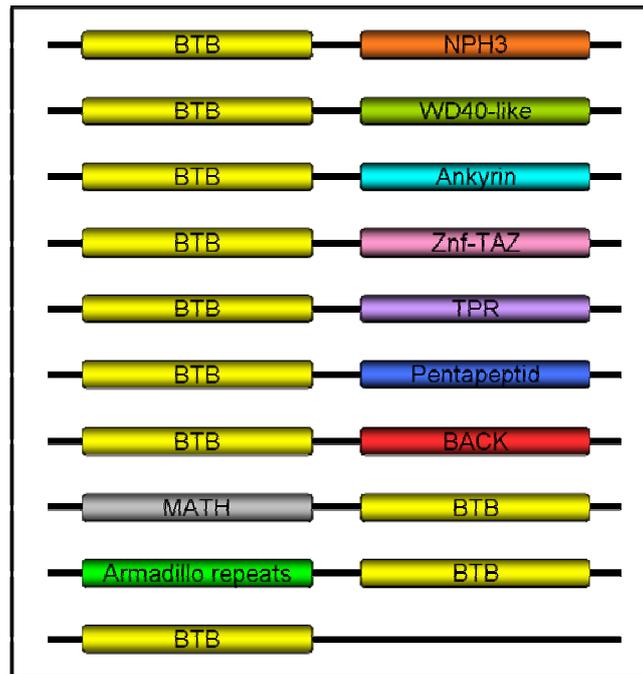


Abb. 1-8: Schematische Darstellung der BTB/POZ-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* mit ihren möglichen Sekundärdomänen. NPH3, Non-Phototropic Hypocotyl; Znf-TAZ, Zinkfinger TAZ; TPR, Tetratricopeptid Repeat; BACK, BTB and C-terminal Kelch.

Einigen BTB-Proteinen konnte bereits eine biologische Funktion in *Arabidopsis* zugeordnet werden. Dazu gehört NPH3 (Non-Phototropic Hypocotyl), das mit einem Photorezeptor für Blaulicht interagiert (Motchoulski und Liscum, 1999), das bereits beschriebene ETO1 (Wang *et al.*, 2004), RPT2 (Root Phototropism), das eine Rolle beim Phototropismus und der Stomataöffnung spielt (Inada *et al.*, 2004). Ein weiteres BTB-Protein ist ARIA, das mit ABF2, einem Transkriptionsfaktor der die Expression von ABA-abhängigen Genen kontrolliert, interagiert (Kim *et al.*, 2004a). BOP (Blade On Petiole) ist ein wichtiges Protein in der Entwicklung von lateralen Organen (Norberg *et al.*, 2005), BT (BTB TAZ) kontrolliert die Telomeraseaktivität (Ren *et al.* 2007) und NPR1 hat eine zentrale Funktion in der SAR (Rochon *et al.*, 2006). Bei all diesen BTB-Proteinen, außer ETO1, fehlen Hinweise auf eine Interaktion mit AtCUL3 oder auf einen Abbau von Substraten durch den UBQ-Proteasom-Weg.

1.4 NPR1: Ein BTB-Protein als potentieller Substratadaptor

NPR1 (At1g64280) ist ein BTB-Protein, dessen BTB/POZ-Domäne am N-Terminus lokalisiert ist. Nach einer Linkerregion folgen im C-Terminus vier Ankyrinmotive (Cao *et al.*, 1997). NPR1 ist für die Etablierung der SAR in *Arabidopsis thaliana* von entscheidender Bedeutung. Es liegt unter normalen Bedingungen als inaktives über Disulfidbrücken verknüpftes Oligomer im Cytosol der Zelle und als Monomer im Kern vor. Nach einer Pathogeninfektion kommt es in der Zelle zu einer Anreicherung von Salicylsäure und zur Reduktion der Disulfidbrücken. Cytosolisches NPR1 liegt nun als aktives Monomer vor, das in den Kern wandert und dort mit TGA Transkriptionsfaktoren (benannt nach der Konsensussequenz TGA) interagiert (Mou *et al.*, 2003). Diese lagern sich nun verstärkt an die Promotoren von *PR*-Genen an und induzieren deren Expression (Abb. 1-9).

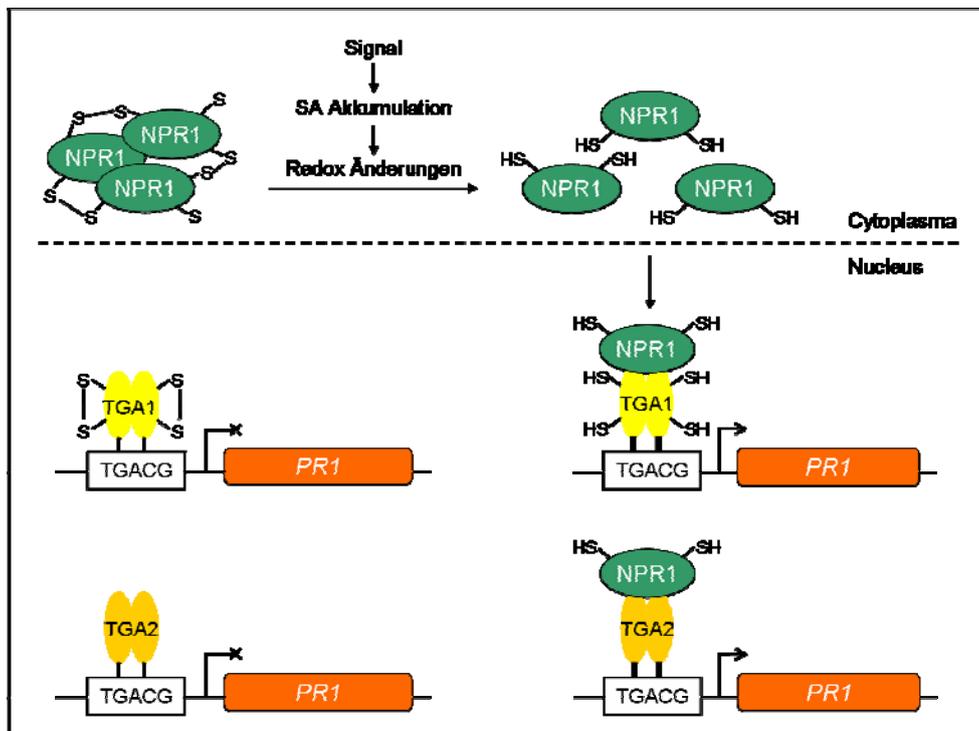


Abb. 1-9: Modell der Wirkungsweise von NPR1 (Pieterse und Van Loon, 2004). In nichtinduziertem Zustand liegt NPR1 als Oligomer im Cytosol vor. Nach einem Signal kommt es zur Akkumulation von SA, dies führt wiederum zur Reduktion von NPR1, das nun in aktiven Monomeren vorliegt und in den Kern wandert. Hier bindet es an TGA, so dass die Transkription von *PR1* starten kann. Im Fall von TGA1 werden die intramolekularen Disulfidbrücken zunächst durch SA reduziert, sodass daraufhin NPR1 an den Transkriptionsfaktor binden kann.

Neben der Regulation der Expression von *PR*-Genen im Kern, spielt NPR1 eine Rolle bei SA- und JA-abhängigen Verteidigungsmechanismen im Cytosol. Spoel *et al.* (2003),

haben gezeigt, dass durch SA aktiviertes NPR1 die Expression von JA-induzierbaren Genen unterdrückt wird. Im Gegensatz zur Ausbildung der SAR ist hierbei eine Kernlokalisierung nicht notwendig. Eine wichtige Funktion bei dem antagonistischen Mechanismus zwischen Salicylsäure und Jasmonsäure hat der Transkriptionsfaktor WRKY70 (benannt nach der Konsensussequenz). Er ist ein Aktivator von SA-abhängigen und ein Repressor für JA-abhängige Gene (Li *et al.*, 2004) und wird wahrscheinlich durch NPR1 kontrolliert (Li *et al.*, 2006).

1.5 Ziel der Arbeit

Der Ubiquitin-Proteasom-Weg als Mittel zum regulatorischen Abbau von Proteinen hat eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung lebender Organismen. Ein wichtiger Bestandteil des UBE1-Proteasom-Wegs sind die E3-Ligasen, die Culline als zentrale Unter-einheit haben können. Für AtCUL1 konnte eine wichtige Rolle in der Auxinsignaltrans- duktion bereits gezeigt werden, während von den Cullinen AtCUL3a, AtCUL3b und At- CUL4 nur relativ wenig bekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Culline AtCUL3a und AtCUL3b. Weiter- hin sollte ihnen eine biologische Funktion in *Arabidopsis thaliana* zugeordnet werden. Als Grundlage für die Untersuchungen dienten Mutanten, bei denen die Expression komplett ausgeschaltet war, die aber keinen sichtbaren Phänotypen zeigten. Mit diesen Nullmutanten sollte ein Screen durchgeführt werden, bei dem verschiedene Wachs- tumsbedingungen getestet werden, die mutante Phänotypen erzeugen. Die auf diese Weise gefundenen Bedingungen sollten molekularbiologisch mittels Northern- bzw. RT- PCR- und Westernanalysen näher untersucht werden.

Da der Verlust beider Culline embryonal ist, sollte eine andere Doppelmutante erzeugt werden, die sowohl in AtCUL3a als auch in AtCUL3b beeinträchtigt ist. Es sollte die Mut- ante *axr1-12*, die im RUB-Modifikationsweg gestört ist, in eine Knockoutmutante einge- kreuzt werden und die entstandenen Pflanzen im Hinblick auf durch den Screen gefun- dene Bedingungen phänotypisch und molekularbiologisch analysiert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte nach Proteinen gesucht werden, die mit AtCUL3 in ei- nem Komplex stehen und als Substratadaptor fungieren können. Es ist bekannt, dass AtCUL3 mit BTB/POZ-MATH-Proteinen in Y2H Ansätzen interagieren kann. Mit den aus dem Screen gewonnenen Erkenntnissen sollten Rückschlüsse auf die biologische Funk- tion von AtCUL3 gezogen werden. Dies sollte für die Suche nach weiteren BTB- Proteinen genutzt werden, die mit AtCUL3 interagieren. Die Interaktion sollte mit Pull- down-Experimenten nachgewiesen werden.