

Endosomaler Transport

ESCRTs in Pflanzen: die Begleitung der Membranproteine zum Abbau

MARIE-KRISTIN NAGEL, ERIKA ISONO
LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER PFLANZEN,
UNIVERSITÄT KONSTANZ

The regulation of the abundance of plasma membrane proteins is crucial for the survival of plants in an ever-changing environment. Selective protein degradation of plasma membrane proteins occurs via ubiquitin-dependent and ESCRT-mediated endosomal transport. Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) are not only important for plant development, but also for autophagy and pathogen defence in plants. Here we discuss the function of ESCRTs in the regulation of endosomal transport and their physiological implication.

DOI: 10.1007/10.1007/s12268-020-1392-4
© Die Autorinnen 2020

■ Pflanzen sind die Basis unserer Nahrung, produzieren durch Photosynthese den Sauerstoff in unserer Atmosphäre und bilden so eine Grundlage des Lebens auf der Erde. Da sie standortgebundene Lebewesen sind, müssen sie sich ständig an Veränderungen in ihrer Umwelt anpassen. Die Anpassungsmechanismen der Pflanzen aufzuklären, ist wichtig, um die Vielfalt im Pflanzenreich zu verstehen und auf längere Sicht gesehen Teile der Erkenntnisse auch auf ökonomisch wichtige Pflanzenarten übertragen zu können. Eine beliebte Modellpflanze für die Grundlagenforschung ist die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), eine zu den Kreuzblütlern gehörende Art mit einer kurzen Generationszeit von etwa drei Monaten. *Arabidopsis* hat mit 125 Megabasenpaaren ein relativ kleines Genom, das seit dem Jahr 2000 entschlüsselt ist. Somit ist *Arabidopsis* eine ideale Modellpflanze zur Durchführung genomischer, genetischer, proteomischer und metabolomischer Analysen an einem Organismus.

Wie alle eukaryotischen Zellen sind auch Pflanzenzellen von einer Lipiddoppelschicht, der Zellmembran, umgeben. Um auf veränderte äußere Bedingungen rechtzeitig reagieren zu können, durchziehen integrale Membranproteine die Zellmembran und stellen auf diese Weise die Verbindung zwischen

dem Zellinneren und der Umgebung her. Bei diesen Membranproteinen handelt es sich z. B. um Transporterproteine, welche unter anderem den Ionenhaushalt der Zelle regulieren, oder auch um Rezeptoren, die bestimmte extrazelluläre Moleküle wahrnehmen und so Signalkaskaden im Zellinneren auslösen können.

Die Zusammensetzung der Membranproteine in der Zellmembran muss strikt reguliert werden, um eine präzise Anpassung an die Umgebung zu ermöglichen. Proteinmengen werden in der Zelle auf transkriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene reguliert. Die Regulation über die Transkription und Translation kann die vorhandene Proteinmenge nur schwer beeinflussen. Im Gegensatz dazu kann gezielter Proteinabbau vorhandene Proteine schnell beseitigen und somit durch Abbau von Schlüsselproteinen die Signalweiterleitungen sofort reduzieren.

Der Ubiquitin-Code bestimmt den richtigen Pfad

Der selektive Proteinabbau benötigt ein kleines ubiquitär vorhandenes Proteinmolekül namens Ubiquitin, das posttranslational an die Zielproteine konjugiert wird. Bereits die Modifikation mit einem Ubiquitinmolekül kann die Stabilität oder Funktion eines Pro-

teins beeinflussen, meist werden die Zielproteine jedoch durch Ubiquitinpolymere bzw. Ubiquitinketten modifiziert.

Das C-terminale Glycin des Ubiquitins kann mit Lysinen anderer Proteine durch ubiquitylierende Enzyme über eine Isopeptidbindung verknüpft werden. Da Ubiquitin sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) besitzt, können Ubiquitinmoleküle auch untereinander verknüpft werden und topologisch unterschiedliche Ubiquitinketten bilden, die in bestimmten biologischen Prozessen eine Rolle spielen. So werden Zellmembranproteine meist mit K63-Ubiquitinketten für den Abbau markiert [1]. Durch Verknüpfung über das N-terminale Methionin können zusätzlich auch lineare Ketten erzeugt werden [1]. Die Länge und Verknüpfung der Ubiquitinketten sind entscheidend für das Schicksal der modifizierten Proteine. Die Ubiquitin-Modifikationen – bzw. der Ubiquitin-Code – werden von verschiedenen Ubiquitin-bindenden Proteinen, den Ubiquitin-Adaptoren, gelesen, die dafür sorgen, dass die markierten Zielproteine den vorgesehenen Weg nehmen. Die Bildung von diversen Kettentypen macht Ubiquitin einzigartig, da es einem einzigen Molekül ermöglicht, unzählige biologische Prozesse zu steuern.

Die endosomal sorting complexes required for transport(ESCRT)-Maschinerie koordiniert den endosomalen Transport

Da sich integrale Zellmembranproteine in der Zelle nicht aus der Lipiddoppelschicht lösen lassen, werden die Proteine samt der sie umgebenden Zellmembran endocytiert und in Endosomen zur Vakuole transportiert, in welcher der Abbau stattfindet. Während der Endocytose bildet sich um den sich einstülpenden Bereich eine Clathrinhülle, die nach der Abschnürung wieder zerfällt, um eine Verschmelzung des Vesikels mit anderen Endosomen zu gewährleisten (**Abb. 1**).

Für den Transport der Frachtproteine zur Vakuole ist die Funktion der ESCRTs notwendig. Dabei handelt es sich um Membran-

lokalisierte Proteinkomplexe, die ubiquitinylierte Frachtproteine an den Endosomen erkennen und deren Transport zur Vakuole begleiten. ESCRTs findet man in einzelligen Archaea bis hin zu mehrzelligen Eukaryoten, wobei die Zusammensetzung ihrer Unter-einheiten variiert [2]. Zusätzlich gibt es Ubiquitin-Adapter, die der Ubiquitin-Erkennung dienen und durch Interaktion mit nachgeschalteten ESCRTs die ubiquitinylierten Frachtproteine dem endosomal Transport zuführen [3]. Die Frachtproteine werden auf späten Endosomen in die intraluminalen Vesikel eingestülpt und geben den späten Endosomen damit ihre spezifische Struktur, wegen der sie auch *multivesicular bodies* (MVBs) genannt werden (**Abb. 1**). Für diese Einstülpung ist ESCRT-III und dessen filamentöse Polymerstruktur verantwortlich. Anschließend verschmelzen die MVBs mit der Vakuole und entlassen so ihren Inhalt in die Vakuole (**Abb. 1**, [3]).

Unter den ESCRT-assoziierten Proteinen sind auch deubiquitinylierende Enzyme, wie z. B. AMSH, zu finden [4]. Die Abspaltung der Ubiquitinkette vom Frachtprotein ist zum

einen wichtig, um den Abbau des Ubiquitins in der Vakuole zu verhindern. Zum anderen könnte das Entfernen von Ubiquitin dazu führen, dass die Frachtproteine nicht mehr von Ubiquitin-Adaptoren und ESCRTs gebunden werden und somit zurück an die Zellmembran geleitet werden. Die Regulation der Ubiquitinylierung an den Endosomen ist wichtig für die Feinabstimmung des endosomal Transports und der Proteinabundanz an der Zellmembran.

Die Zellmembran und die endosomalen Membranen haben unterschiedliche Phospholipidzusammensetzungen, die sich fortlaufend auf dem Weg zur Vakuole ändern [5]. ESCRT sowie die Ubiquitin-Adapter binden bestimmte Phosphoinositide in den Membranen, was deren Rekrutierung auf diese verstärkt.

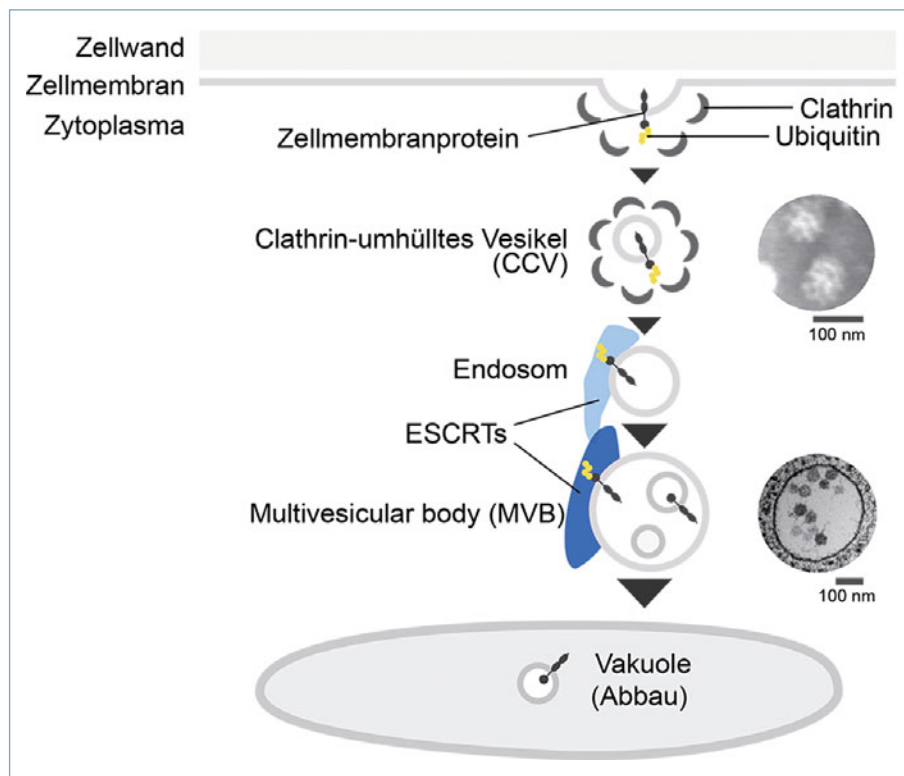
Unsere Arbeitsgruppe hat in den letzten Jahren ESCRT-assoziierte Proteine in *Arabidopsis* identifiziert und ihre molekulare und physiologische Funktion erforscht. So konnten wir zeigen, dass die ESCRT-Maschinerie und viele ihrer assoziierten Proteine essenziell für die Entwicklung der Pflanze sind

(**Abb. 2A**). Wir konnten auch pflanzenspezifische Ubiquitin-Adapterproteine in *Arabidopsis* identifizieren, die bevorzugt K63-Ubiquitinketten binden und mit der ESCRT-Maschinerie interagieren [6].

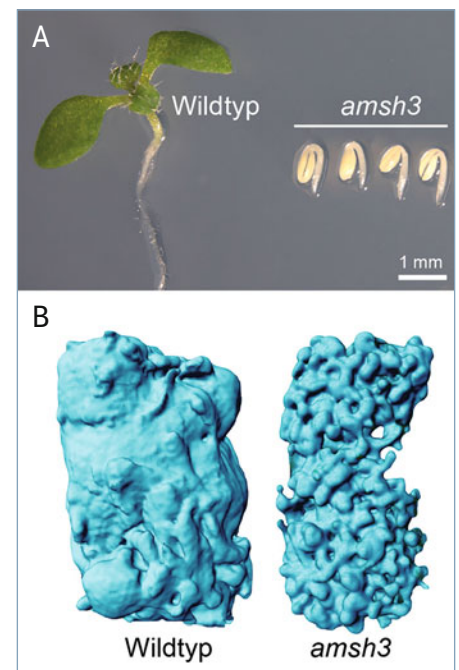
Intrazellulärer Membrantransport ist auch für die Biogenese der Vakuole notwendig. Verschiedene Mutanten, die Defekte in endosomal lokalisierenden Faktoren haben, weisen erhebliche Missbildungen der zentralen Vakuole auf. So besitzen Mutanten wie *amsh3*, *fyve1* und *alix* statt einer zentralen Vakuole eine tubulär geformte Vakuolenstruktur (**Abb. 2B**, [6]).

Mutanten der ESCRT-Komponenten zeigen Defekte im autophagosomalen Abbau [7]. Autophagie ist ein Mechanismus der Zelle, durch den sowohl Proteine als auch ganze Zellbestandteile abgebaut werden können, um Ressourcen wiederaufzubereiten. Ein intakter Autophagieweg ist unter anderem wichtig für die pflanzliche Pathogenabwehr.

Ergebnisse aus unserem Labor zeigen, dass sowohl ESCRT als auch ESCRT-assoziierte Proteine in *Arabidopsis* eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung des endosomal Transportweges. Das Frachtprotein wird durch Einstülpung der Zellmembran in einen Clathrin-umhüllten Vesikel endocytisiert. Nach dem Auflösen der Clathrinhülle können die Endosomen miteinander verschmelzen. ESCRT-III internalisiert die Frachtproteine in die intraluminalen Vesikel des multivesicular body (MVB). Rechts oben: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Clathrin-umhüllten Vesikels; rechts unten: Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme eines MVBs.



▲ **Abb. 2:** *Arabidopsis*-Keimlinge mit einer Mutation im *AMSH3*-Gen zeigen einen stark veränderten Phänotyp. **A**, Links: ein sieben Tage alter wildtypischer *Arabidopsis*-Keimling; rechts: deutlich unterentwickelte *amsh3*-Mutanten, die in diesem Keimlingsstadium absterben. **B**, Links: dreidimensionale Wiedergabe einer zentralen Vakuole in einer wildtypischen Zelle; rechts: die tubuläre Vakuole der *amsh3*-Mutante.

spielen [7]. Pflanzen besitzen Zellmembranrezeptoren, die Bestandteile von Phytopathogenen erkennen und durch die Erkennung eine Salicylsäure-induzierte Abwehrreaktion auslösen können [8]. In Mutanten von ESCRT und ESCRT-assoziierten Komponenten werden Salicylsäure-induzierte Abwehrgene fehlreguliert, was dazu führt, dass diese Mutanten nicht mehr korrekt auf Infektionen reagieren können [7].

Unsere und andere Arbeiten haben in den letzten Jahren stark dazu beigetragen, das molekulare Netzwerk um die ESCRTs in *Arabidopsis* aufzuklären. Ein zukünftiger Fokus unserer Gruppe liegt auf dem Zusammenspiel der verschiedenen Proteine, die Rolle der posttranslationalen Modifikationen und die physiologische Bedeutung des ESCRT-abhängigen Transportweges in Pflanzen.

Danksagung

Wir bedanken uns recht herzlich bei unserem Kollegen Niccolò Mosesso für die Bereitstellung der Elektronenmikroskop-Aufnahmen des Clathrin-umhüllten Vesikels und des MVBs. ■

Literatur

- [1] Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81:203–229
- [2] Leung KF, Dacks JB, Field MC (2008) Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9:1698–1716
- [3] Paez Valencia J, Goodman K, Otegui MS (2016) Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annu Rev Plant Biol* 67:309–335
- [4] Isono E, Katsiarimpa A, Muller IK et al. (2010) The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for intracellular trafficking and vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22:1826–1837
- [5] Noack LC, Jaillais Y (2017) Precision targeting by phosphoinositides: how PIs direct endomembrane trafficking in plants. *Curr Opin Plant Biol* 40:22–33
- [6] Kalinowska K, Isono E (2017) All roads lead to the vacuole-autophagic transport as part of the endomembrane trafficking network in plants. *J Exp Bot* 69:1313–1324
- [7] Katsiarimpa A, Kalinowska K, Anzenberger F et al. (2013) The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:2236–2252
- [8] Qi G, Chen J, Chang M et al. (2018) Pandemonium breaks out: disruption of salicylic acid-mediated defense by plant pathogens. *Mol Plant* 11:1427–1439

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Erika Isono
Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10
D-78464 Konstanz
erika.isono@uni-konstanz.de
www.bio.uni-konstanz.de/isono

AUTORINNEN



Erika Isono

1997–2003 Studium an der Universität Tokio, Japan. 2003–2006 Promotion an der Universität Tokio. 2006–2010 Postdoktorandin an der Universität Tübingen und an der TU München. 2006–2009 JSPS-Stipendiat. 2010–2016 Gruppenleiterin an der TU München. 2015 Habilitation. Seit 2017 Professorin für Biochemie und Physiologie der Pflanzen an der Universität Konstanz.



Marie-Kristin Nagel

2003–2010 Biologiestudium an der Universität Freiburg. 2011–2018 Promotion an der TU München. Seit 2018 Postdoktorandin am Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen der Universität Konstanz.