



## Doctoral Thesis

# **The role of Cullin3 based ubiquitin ligase complexes in endocytic trafficking and endosome maturation**

**Author(s):**

Gschweidl, Michaela

**Publication Date:**

2015

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010481207> →

**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. 22611

**The role of Cullin-3 based ubiquitin ligase complexes in  
endocytic trafficking and endosome maturation**

A thesis submitted to  
attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MICHAELA GSCHWEITL

Mag. rer. nat.  
University of Vienna

born on 01.05.1986  
citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter (examiner)  
Prof. Ari Helenius (co-examiner)  
Prof. Anne Spang (co-examiner)

2015

## Summary

Ubiquitination not only marks proteins for proteasomal degradation, but is furthermore essential for membrane trafficking processes in the endocytic pathway and lysosomal degradation. Here, ubiquitin serves as internalization signal at the plasma membrane and induces sorting of cargo and formation of intra-luminal vesicles (ILVs) in multi-vesicular bodies (MVBs). These processes are crucial for lysosomal degradation and implicated in a plethora of disease pathologies, i.e. in progression of cancer or neurodegenerative diseases.

Cullin-3 (Cul3) serves as backbone for various Cullin-based E3 RING ligase (CRL) complexes and is responsible for the ubiquitination of an ever-growing number of substrates. However, its physiological functions remain poorly described.

In a functional screen Cul3 was found to be involved in Influenza A virus trafficking (IAV). In Cul3 depleted cells, IAV uncoating in late endosomes is severely impaired, inhibiting viral infection. Surprisingly, not only IAV progression but also the endocytic trafficking of endogenous cargo such as epidermal-growth factor (EGF) and Transferrin are highly defective upon Cul3 depletion, reflecting a global perturbation of the endocytic system. Indeed, late endosomes depict a severe distortion and are highly increased in size.

We wondered which substrate-specific adaptors for Cul3 would account for its functions in the endocytic system. Through a series of siRNA screenings, we indeed identified 2 potential BTB (Bric-a-brac, Tramtrack and Broad Complex) domain containing adaptor proteins showing similar phenotypes to Cul3 depletion: ZBTB39 and SPOPL.

Out of these two, SPOPL emerged as a new CRL3 adaptor, participating in the regulation of endocytic trafficking. Subsequently, we were interested in the identification of Cul3-SPOPL specific substrates and could indeed identify Eps15 as a substrate for this complex. Eps15 is an adaptor protein involved in endocytic

trafficking and cargo sorting in the MVB formation process. Eps15 is highly stabilized upon SPOPL depletion and conversely decreased upon SPOPL overexpression.

We propose that by ubiquitinating Eps15, a Cul3-SPOPL E3 ligase complex influences ILV formation and, as a consequence, affects endocytic trafficking and endosome maturation.

Overall, the data presented in this thesis led us to the following conclusions: Cul3 E3 ligase complexes directly influence ILV formation on MVBs and those processes are not only essential for faithful endogenous cargo trafficking and degradation, but they are indispensable for IAV entry into host cells.

## Zusammenfassung

Ubiquitinierung markiert nicht nur Proteine für den proteasomalen Abbau, sondern ist auch wesentlich für endozytische Membran-Transportvorgänge und lysosomale Degradation. Dabei dient Ubiquitin als Sortierungssignal für Internalisierungsprozesse an der Plasmamembrane und induziert die Sortierung von Frachtgut und Bildung von intra-luminalen Vesikeln (ILVs) in Multivesikuläre Körper. Diese Prozesse sind äußerst wichtig für den lysosomalen Abbau und daher nicht selten in verschiedene Krankheitsbilder impliziert, wie zum Beispiel der Entwicklung von Krebs oder neurodegenerativen Krankheiten.

Cullin-3 (Cul3) dient als Stützgerüst für verschiedene Ubiquitin E3 Ligase-Komplexe und ist verantwortlich für die Ubiquitinierung einer immer weiter wachsenden Zahl von Substraten. Trotzdem bleibt die physiologische Funktion von Cul3 unzureichend charakterisiert.

In der hier präsentierten Studie haben wir die Rolle von auf Cul3 basierenden Ubiquitin E3 Ligase-Komplexen in der endozytischen Aufnahme von Frachtgut und der Reifung von Endosomen, die diese Fracht transportieren, untersucht.

Wir fanden heraus, dass Cul3 im endozytischen Transport von Influenza A Virus involviert ist. Wenn man die Cul3 Proteinmenge in der Zelle verringert, dann ist das Entpacken des IAV Partikels speziell in den späten Endosomen stark gestört. Weiters zeigen Zellen mit verringerter Cul3 Menge fehlerhafte Transportvorgänge von endogenem Frachtgut, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF oder Transferrin. Das macht deutlich, dass das endozytische Aufnahmesystem einer globalen Störung unterliegt. Tatsächlich weisen späte Endosomen eine weitgreifende Verformung auf und sind zudem stark vergrößert.

Wir haben uns gefragt, welche Substrat-spezifischen Adaptoren für diese Effekte von Cul3 Ligase Komplexen verantwortlich sein könnten. Durch eine Serie von siRNA Screens gelang es uns, zwei BTB Domäne besitzende Proteine zu identifizieren, die dieselben Phänotypen hervorbringen, wie bei einer Reduktion der Cul3-Mengen.

Diese Proteine sind ZBTB39 und SPOPL.

Wir konnten zeigen, dass SPOPL tatsächlich ein neuer Cul3 Adaptor ist und in der Regulation von endozytischen Transportvorgängen teilnimmt.

Folglich waren wir an der Identifikation von Cul3-SPOPL spezifischen Substraten interessiert und konnten zeigen, dass Eps15 ein Substrat für diesen Komplex ist.

Eps15 ist ein regulatorisches Protein, das eine entscheidende Rolle im endozytischen Transport und im Sortieren von Fracht für die Multivesikulären Körper spielt. Die Proteinmengen von Eps15 sind stark erhöht, wenn die SPOPL Mengen reduziert wurden. Im Gegenzug dazu sinken die Eps15 Menge signifikant bei Überexpression von SPOPL.

Wir vermuten, dass durch die Ubiquitinierung von Eps15 ein SPOPL-Cul3 Komplex starken Einfluss auf die Bildung von intra-luminalen Vesikeln hat und daher auf endozytische Transportvorgänge und Maturationsprozesse der Endosomen wirkt.

Im Grossen und Ganzen haben die Daten, die in dieser Studie präsentiert werden, die folgenden Schlussfolgerungen hervorgebracht: Cul3 E3 Ligase Komplexe beeinflussen direkt die Bildung von intra-luminalen Vesikeln in Multivesikulären Körpern und dieser Prozess ist nicht nur ein wesentlicher Bestandteil eines genauen Transportes von endogenem Frachtgut und dessen Abbau, sondern dieser Prozess ist unentbehrlich für den Influenza A Virus, um in die Zelle eindringen zu können.