

Eine verhängnisvolle Affäre: die Ubiquitinylierung von Proteinen

Markus Biel, Veit Waschowski und Athanassios Giannis*

Stichwörter:

Inhibitoren · Proteasom · Ubiquitin · Wirkstoff-Design

Aktivität, Stabilität und subzelluläre Verteilung von Proteinen können durch verschiedene posttranslationale Modifikationen moduliert werden. Spätestens mit der Vergabe des Chemie-Nobelpreises 2004 an Ciechanover, Hershko und Rose rückte die Ubiquitinylierung in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses, da sie mehr als nur ein Signal für den Abbau überflüssig gewordener Proteine ist und eine wichtige Rolle bei so komplexen Vorgängen wie der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Immunantwort spielt.^[1]

Ubiquitin (Ub) ist ein aus 76 Aminosäuren aufgebautes 8-kDa-Protein, das durch seinen C-Terminus isopeptidisch an Lysinseitenketten anderer Proteine gebunden werden kann (Abbildung 1).^[2] Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 adenyliert hierzu die Carboxyfunktion des C-terminalen Glycins von Ubiquitin und überträgt diese aktivierte Spezies unter Bildung eines Thioesters auf ein internes Cystein des Enzyms. In einem zweiten Schritt wird Ub von E1 auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 umgeestert, von wo aus es anschließend durch eine Ubiquitin-Ligase E3 auf das Zielprotein übertragen werden kann. Da Ubiquitin selbst über interne Lysinreste (z.B. Lysin 48, Lysin 63) verfügt, kann sich die Enzymkaskade wiederholen, sodass

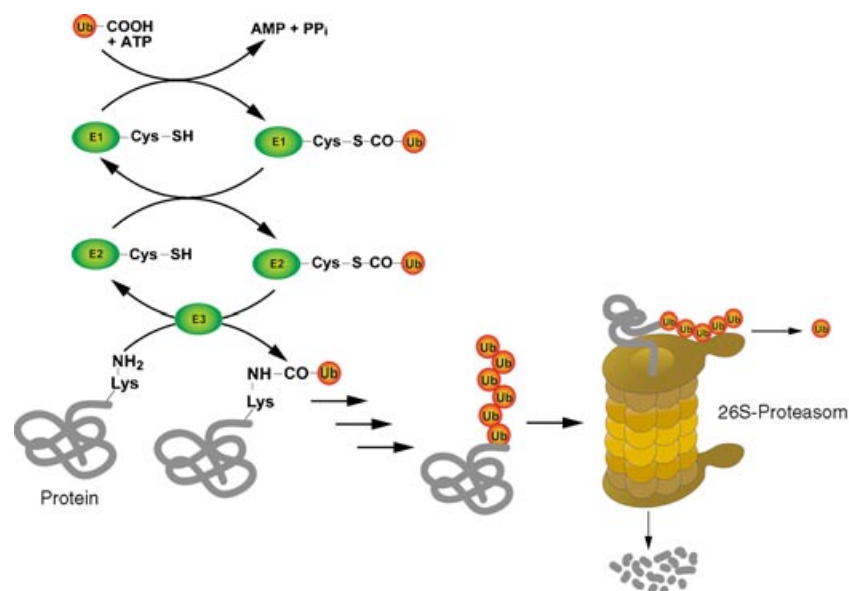


Abbildung 1. Mechanismus der E1/E2/E3-katalysierten Anknüpfung von Ubiquitin-Resten an Proteine; die Ubiquitinylierung kennzeichnet das jeweilige Protein für den Abbau durch das 26S-Proteasom.

mehrere Ub-Einheiten hintereinander gebunden werden.

Substratmoleküle, auf die nur eine einzelne Ub-Einheit übertragen wird, können möglicherweise durch Proteine mit einer speziellen Ubiquitin-Bindungsdomäne erkannt werden. So dient die Monoubiquitinylierung des Histons H2B im Rahmen des postulierten Histon-Codes als Signal zur Aktivierung der Transkription,^[3] während sie bei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) zu deren Endocytose und dem nachfolgenden Transport zum Lysosom dient. Polyubiquitinylierte Spezies mit über Lysin 63 verknüpften Ub-Einheiten, sind für die Vermittlung von nichtproteolytischen, reversiblen Ereignissen verantwortlich.^[4] Hierzu gehört die Modulation von Proteineigenschaften wie Aktivität, subzelluläre Verteilung und Protein-Protein-Interaktion. Erfolgt die Po-

lyubiquitinylierung hingegen über durch Lysin 48 verknüpfte Ub-Einheiten, so werden die gebildeten Ketten durch das 26S-Proteasom erkannt und die markierten Proteine durch dieses 2.4 MDa große Multiuntereinheiten-Enzym abgebaut.^[5]

Das Proteasom kommt sowohl im Kern als auch im Cytoplasma der Zelle vor und hat die Form eines Zylinders. Es besteht aus einer katalytischen 20S-Komponente, die an beiden Seiten durch eine regulatorische 19S-Komponente abgeschlossen wird. Die 19S-Einheit erkennt und bindet polyubiquitinylierte Proteine, deren Ub-Einheiten über Lysin 48 miteinander verknüpft sind, und leitet diese nach Entfernung der Ubiquitinkette und Entfaltung der Struktur unter ATP-Verbrauch an die katalytische 20S-Einheit weiter. Deren Katalysiemechanismus^[6] geht allerdings

[*] M. Biel, V. Waschowski,
Prof. Dr. A. Giannis
Institut für Organische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29
04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-973-6599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de

nicht auf die sonst übliche katalytische Triade zurück, sondern stützt sich auf ein einziges hochkonserviertes, N-terminales Threonin als Nucleophil. Die Abbauprodukte des Proteasoms sind letztlich Peptide mit einer Restlänge von 3 bis 25 Aminosäuren.

Inzwischen ist das Proteasom zum interessanten Target für die Entwicklung von Medikamenten geworden, da es neben der Expressionskontrolle einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Konzentration bestimmter Proteine repräsentiert.^[7] So sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) Regulatoren der Zellzyklus-Progression,^[8] deren Aktivität von Cyclinen, Phosphatasen wie CDC25 und zelleigenen Inhibitoren (WAF1, KIP1) abhängt. Das Proteasom ist für den gezielten Abbau der Cycline und CDK-Inhibitoren verantwortlich und wird mit der Stabilisierung von CDC25 während der Zellzyklus-Progression in Zusammenhang gebracht.^[9] Die Inhibierung des im Proteasom vermittelten Abbaus dieser Regulatoren ist eine wichtige Möglichkeit zur Induktion eines Zellzyklusstopps und damit von klinischer Relevanz z. B. bei der Behandlung maligner Tumore.

Weiterhin werden auch die Signalwege von p53,^[10,11] das als Signal für zahlreiche zelluläre Antworten wie die DNA-Reparatur, den Zellzyklusstopp, die Differenzierung oder die Apoptose

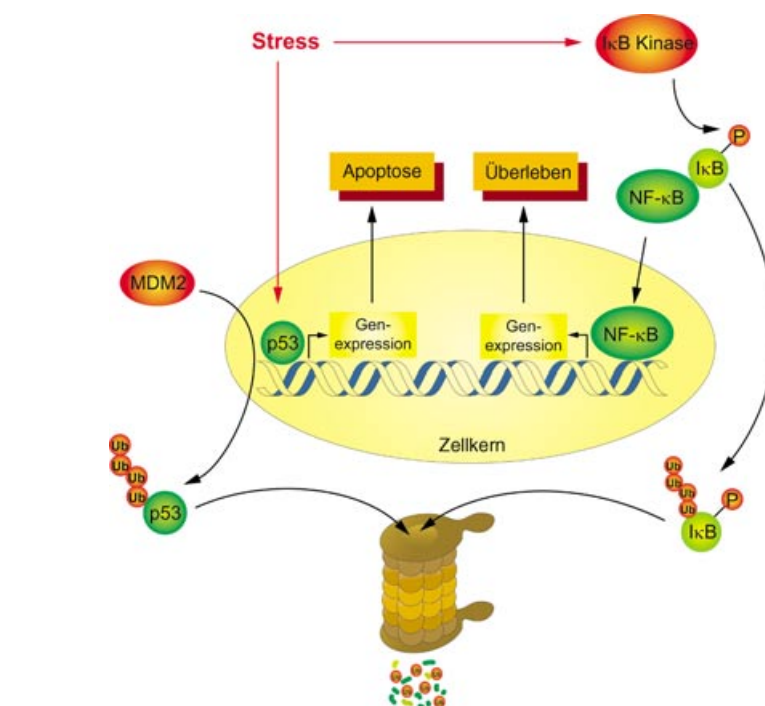
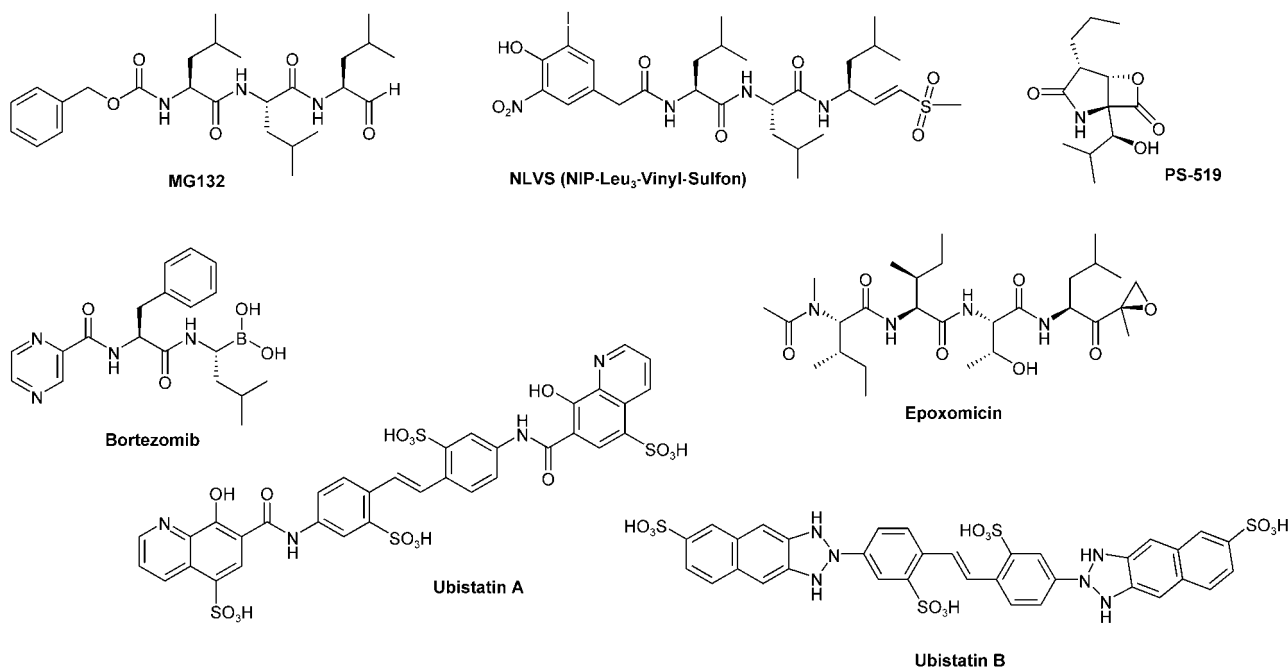


Abbildung 2. Zelluläre Signalwege, die mit dem Proteasom verknüpft sind. Stress, z. B. Strahlung oder Chemikalien, induziert DNA-Schäden und führt zur Akkumulation des Tumorsuppressors p53 und nach aktivierter Genexpression zur Induktion von Apoptose. Die Ubiquitin-Ligase MDM2 inhibiert die Wirkung von p53 durch Ubiquitinylierung und Abbau im Proteasom. Proteasom-Inhibitoren könnten bei Tumorzellen mit MDM2-Überexpression den schädlichen Abbau von p53 unterbinden. Ebenso führen Chemotherapie, Strahlung, Viren und Cytokine zur Phosphorylierung des Inhibitors von NF-κB (IκB) und damit zu dessen Abbau. Nachfolgend wird NF-κB freigesetzt und verstärkt verschiedene Signalwege, die das Überleben der Zelle sichern. Dadurch wird NF-κB zum wichtigen Target für antineoplastische Wirkstoffe.

dient, und die Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie^[12,13] mit dem Ubiquitin-Proteasom-Abbau in Verbindung gebracht (Abbildung 2).



Schema 1. Ausgewählte Strukturen von Inhibitoren des Proteasom-Abbaus.

Proteasom-Inhibitoren werden bisher in fünf Klassen unterteilt: Peptid-Aldehyde (MG132), Peptid-Vinyl-Sulfone (NLVS), Peptid-Boronate (Bortezomib), Peptid-Epoxyketone (Epoxy-mycin) und β -Lactone (PS-519) (Schema 1).^[5a,6] Sie enthalten alle eine elektrophile Gruppe, die mit dem Thr-Rest im aktiven Zentrum des Proteasoms reagiert. Wegen der metabolischen Instabilität und fehlender Enzymspezifität gelangten allerdings nur zwei Proteasom-Inhibitoren in die klinische Prüfung: PS-519 (auch bekannt als MLN519) beeinflusst antiinflammatorische Prozesse; Bortezomib (PS-341, Velcade) – inzwischen als Medikament zugelassen – zeigt signifikante antineoplastische Effekte bei einer Vielzahl von Tumorzelllinien. Der exakte Wirkungsmechanismus und die Spezifität der einzelnen Proteasom-Inhibitoren sind immer noch nicht vollständig erforscht, jedoch ist viel über die Rolle der Inhibitoren in der Tumorentwicklung, der Angiogenese und der Metastasierung bekannt. Infolge der Proteasom-Inhibierung kann es zu Apoptose, erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Chemo- und Strahlentherapie und einer erniedrigten Resistenz gegenüber diesen Therapieformen kommen.^[5a,6,7]

Kürzlich konnten durch einen chemisch-genetischen Ansatz in *Xenopus*-Extrakten mit Ubistatin A und B zwei Inhibitoren des Proteasom-abhängigen Proteinabbaus identifiziert werden (Schema 1), denen ein völlig neuartiger Wirkungsmechanismus zugrunde liegt.^[14] So binden die Ubistatine nicht an das aktive Zentrum des Proteasoms, sondern interagieren mit den einzelnen, über Lysin 48 verknüpften Ub-Einheiten und verhindern die Erkennung des zum Abbau markierten Proteins durch die regulatorische 19S-Einheit des Proteasoms. Die Ubistatine bilden damit eine neue Klasse von Proteasom-Inhibitoren und gehören zu den wenigen Modulatoren, deren Wirkprinzip auf der Störung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht.^[15]

Experimentelle Grundlage dieser Arbeit ist das in Abbildung 3 dargestellte Screeningsystem. Der Abbau von Cyclin B infolge der Ubiquitinierung durch die E3-Ligase APC/C (anaphase-

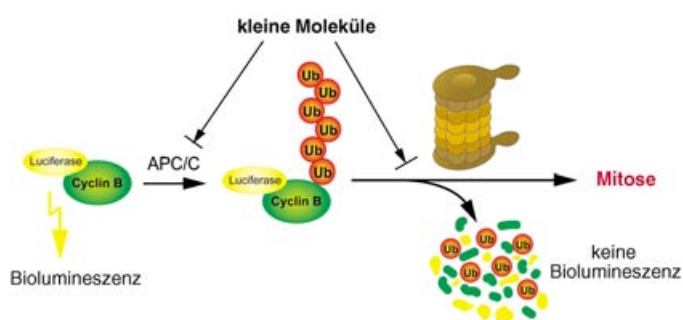


Abbildung 3. Schematische Darstellung des chemisch-genetischen Ansatzes zur Identifizierung der Ubistatine A und B. Als Indikator für das Vorhandensein von Cyclin B dient hierbei die Lumineszenz der Luciferase: Verbindungen, die den Abbau von Cyclin B inhibieren, führen im Testsystem weiterhin zur Lumineszenz.

promoting complex/cyclosome) ist die Voraussetzung für die Beendigung der Mitose und den Übergang in die nächste Zellzyklus-Phase. Durch den Einsatz eines Cyclin-B-Luciferase-Fusionsproteins konnten so Substanzen identifiziert werden, die den Abbau von Cyclin B hemmen und als Folge den Fortschritt des Zellzyklus beeinflussen. Die potentesten Verbindungen wurden im weiteren Verlauf durch zahlreiche Kontroll-experimente auf ihren genauen Wirkungsmechanismus hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Ubistatine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen mit über Lysin 48 verknüpften Ub-Ketten eingehen und deren Erkennung am Proteasom verhindern. NMR-Untersuchungen an über Lysin 48 verknüpften Ubiquitin-Dimeren belegen, dass sich bei der Titration mit den Inhibitoren definierte, spezifische Veränderungen an der hydrophoben Seitenfläche der Ubiquitin-Einheiten ergeben. Für die weitere Verwendung dieser Inhibitoren in zellulären Assays dürfte ihre äußerst hohe Polarität und somit niedrige Membranpermeabilität hinderlich sein. Gleichwohl unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung von chemisch-genetischen Ansätzen zur Auffindung neuartiger Leitstrukturen, die mit Methoden des strukturbasierten Wirkstoff-Designs und Computer-Modelings kaum erschlossen worden wären.

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425–479.
- [2] L. A. Passmore, D. Barford, *Biochem. J.* **2004**, 379, 513–525.

- [3] M. Biel, V. Waschowski, A. Giannis, *Angew. Chem./Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
- [4] J. D. Schnell, L. Hicke, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 35857–35860.
- [5] a) J. Adams, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 349–360; b) D. Voges, P. Zwickel, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 1015–1068.
- [6] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 739–758.
- [7] J. Adams, *Cancer Cell* **2004**, 5, 417–421.
- [8] A. Huwe, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2170–2187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2122–2138.
- [9] M. Shirane, Y. Harumiya, N. Ishida, A. Hirai, C. Miyamoto, S. Hatakeyama, K. Nakayama, M. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13886–13893.
- [10] N. Sunder-Plassman, A. Giannis, *ChemBioChem* **2004**, 5, im Druck.
- [11] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren, *Nature* **1997**, 387, 296–299.
- [12] a) M. L. Schmitz, I. Mattiolo, H. Buss, M. Kracht, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1348–1358; b) M. Karin, Y. Cao, F. R. Greten, Z. W. Li, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 301–310.
- [13] E. E. Varfolomeev, M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannilkulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai, D. Wallach, *Immunity* **1998**, 9, 267–276.
- [14] R. Verma, N. R. Peters, M. D'Onofrio, G. P. Tochtrop, K. M. Sakamoto, R. Varadan, M. Zhang, P. Coffino, D. Fushman, R. J. Deshaies, R. W. King, *Science* **2004**, 306, 117–120.
- [15] L. Pagliaro, J. Felding, K. Audouze, S. J. Nielsen, R. B. Terry, C. Krog-Jensen, S. Butcher, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 442–449.