

# Das Ubiquitinsystem im Proteinabbau und einige seiner Aufgaben bei der Steuerung des Zellteilungszyklus (Nobel-Vortrag)\*\*

Avram Hershko\*

## Stichwörter:

Biochemie · Nobel-Vortrag · Proteinabbau · Ubiquitin · Zellteilung

## Aus dem Inhalt

1. Biographische Notizen	6082
2. Einführung	6087
3. Meine erste Begegnung mit dem Proteinabbau	6088
4. Entdeckung der Rolle von Ubiquitin beim Proteinabbau	6089
5. Identifizierung von Enzymen des Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Systems	6090
6. Mechanismen des Abbaus von Cyclin B: Entdeckung des Cyclosoms/ Anaphase-Promotorkomplexes	6090
7. Die Rolle der $Scf^{SKP2}$ -Ubiquitin-Ligase beim Abbau des Cdk-Inhibitors $p27^{Kip1}$	6091

## 1. Biographische Notizen

Ich wurde am 31. Dezember 1937 in Karcag in Ungarn geboren. Karcag ist eine kleine Stadt mit etwa 25000 Einwohnern, ungefähr 150 Kilometer östlich von Budapest. Sie hatte eine jüdische Gemeinde mit annähernd eintausend Mitgliedern. Mein Vater, Moshe Hershko, war Lehrer an der jüdischen Grundschule in Karcag, und die meisten jüdischen Kinder der Stadt besuchten seinen Unterricht. Seine früheren Schüler in Ungarn und später in Israel haben ihn bewundernd als inspirierenden Lehrer und vorbildlichen Erzieher beschrieben.



Meine Mutter Shoshana/Margit („Manci“) war eine gebildete und musikalisch begabte Frau. Sie gab Kindern in Karcag Englisch- und Klavierunterricht. Mein älterer Bruder Chaim wurde 1936, knapp zwei Jahre vor mir geboren. Meine Mutter hätte sehr gern noch ein kleines Mädchen gehabt, aber der Zweite Weltkrieg stand unmittelbar bevor, Hitlers Gebrüll war häufig im Radio zu hören, und aus Sorge

um die Zukunft mochten es meine Eltern bei zwei Kindern belassen. Dennoch habe ich meine frühe Kindheit als eine sehr glückliche Zeit in Erinnerung; ich wuchs mit liebenden Eltern in einem hübschen Haus mit einem wunderschönen Garten auf, den mein Vater, ein begeisterter Hobbygärtner, angelegt hatte. Ein Familienbild aus dieser Zeit mit meinen Eltern, meinem Bruder und mir als Kleinkind zeigt, welche menschliche Wärme meine Familie umgab (Abbildung 1).

Dieses frühe Paradies ging rasch und brutal verloren. Der Zweite Weltkrieg brach aus, und Ungarn trat bald als Verbündeter von Nazideutschland ein. 1942 wurde mein

[\*] A. Hershko  
Unit of Biochemistry  
The B. Rappaport Faculty of Medicine  
and  
The Rappaport Institute for Research in the Medical Sciences  
Technion-Israel Institute for Technology  
Haifa 31096 (Israel)  
Fax: (+ 972) 4-855-2296  
E-mail: hershko@tx.technion.ac.il

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 2004. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.



**Abbildung 1.** Meine Eltern, mein Bruder (Mitte, oben) und ich (Mitte, unten) etwa Ende 1938.

Vater zusammen mit zahlreichen anderen jüdischen Männern von der ungarischen Armee zur Zwangsarbeit eingezogen. Sie wurden an die russische Front geschickt, wo die meisten von ihnen umkamen. Zum Glück für meinen Vater rückte die Sowjetarmee nach der Schlacht von Stalingrad so rasch vor, dass er von den Sowjets gefangen genommen wurde, bevor die Nazis ihn umbringen konnten. Danach wurde er von den Sowjets als Zwangsarbeiter eingesetzt. Er wurde erst 1946 entlassen, sodass wir vier Jahre lang nicht wussten, ob er noch lebte.

Im Frühjahr 1944 erkannte Ungarns Diktator Horthy, dass Deutschland den Krieg verlieren würde, und wollte überlaufen. Die Deutschen ahnten das und besetzten umgehend Ungarn – was folgte war die rasche Vernichtung eines Großteils der jüdischen Bevölkerung Ungarns. Zwischen Mai und Juni 1944 waren die meisten Juden in Ghettos konzentriert und wurden anschließend in die Todeslager nach Polen deportiert. Ich war damals sechs Jahre alt. Wir waren einige Wochen in einem Ghetto am Stadtrand von Karcag und wurden dann in ein schrecklich überfülltes Ghetto in Szolnok, eine größere Stadt im selben Bezirk, gebracht. Von dort wurden die Juden des gesamten Bezirks in Güterzügen weitertransportiert. Man sagte ihnen, dass sie zur Arbeit geschickt würden, aber nach dem Krieg haben wir erfahren, dass die meisten Züge für Auschwitz bestimmt waren. Durch einen Zufall gelangten meine Familie und ich auf einen der wenigen für Österreich bestimmten Züge, wo die Juden tatsächlich zum Arbeiten eingesetzt wurden. Zu dieser Gruppe gehörte meine Mutter mit uns beiden Kindern, meine Großeltern väterlicherseits und meine drei Tanten. In Österreich lebten wir in einem kleinen Dorf nahe Wien, wo die Erwachsenen auf den Feldern und in einer Fabrik arbeiten mussten. Im Frühjahr 1945 wurden wir von der Sowjetarmee befreit. Meine Großeltern mütterlicherseits kamen zusammen mit 360 000 ungarischen Juden und fast zwei Dritteln der jüdischen Bevölkerung von Karcag im Holocaust um. Nach unserem Wiedersehen mit meinem Vater 1946 lebte die Familie drei Jahre in Budapest, wo mein Vater eine Stelle als Lehrer fand. 1950 emigrierte die Familie nach Israel.

In Israel ließen wir uns in Jerusalem nieder, und für mich begann ein neues und ganz anderes Leben. Natürlich hatten

Neueinwanderer Anfangsschwierigkeiten. Wir mussten eine neue Sprache lernen – Hebräisch –, was für Kinder nicht so schwer war (ich war damals noch keine 13), meinen Eltern aber Mühe machte. Dennoch lernte mein Vater Hebräisch und arbeitete bald wieder als Lehrer. (Später unterrichtete er in einem Lehrerseminar und verfasste Mathematiklehrbücher, die in Israel sehr bekannt waren.) Für meine Eltern hatte die Erziehung ihrer Kinder stets höchste Priorität. Obwohl wir damals recht arme Immigranten waren, wurden mein Bruder und ich auf eine teure Privatschule in Jerusalem geschickt. Ich vermute, dass das Gehalt meines Vaters größtenteils für unsere Unterrichtsgebühren ausgegeben wurde.

In der Schule wurde ich von den anderen Kindern gut aufgenommen. Bei der damaligen Einwanderungswelle nach Israel fiel ein neues Immigrantenkind mit einem ungarischen Akzent nicht besonders auf (wie man sagt, habe ich noch immer einen ungarischen Akzent, besonders im Englischen, obwohl mein Ungarisch inzwischen ziemlich schlecht ist). Ich war ein guter Schüler, und mir fielen Fächer wie Mathematik, Physik, Literatur, Geschichte und sogar die Talmudstudien leicht. Dies wurde zu einem Problem, als ich die höhere Schule beendet hatte, denn ich interessierte mich für zu viele Fächer und mir fiel die Entscheidung schwer, wie es weitergehen sollte. Ich wählte das Medizinstudium; vermutlich blieb nichts anderes übrig, weil mein Bruder Chaim bereits Medizinstudent war und ich seine Bücher kostenlos übernehmen konnte! Chaim wollte immer Arzt werden, und heute ist er ein renommierter Hämatologe und eine Autorität auf dem Gebiet des Eisenstoffwechsels.

1956 begann ich das Studium an der Hebrew University–Hadassah Medical School in Jerusalem, der damals einzigen medizinischen Hochschule in Israel (heute gibt es vier). Während der naturwissenschaftlichen Grundausbildung im Rahmen meines Medizinstudiums verliebte ich mich in die Biochemie. Ich studierte Biochemie in drei verschiedenen Kursen: in Organischer Chemie, Grundlagen der Biochemie und in einem Kurs namens „Physiologische Chemie“, hinter dem sich medizinisch orientierte Biochemie verbarg. Ich hatte das große Glück, in allen drei Kursen herausragende Lehrer zu haben. Organische Chemie wurde von dem in Israel legendären Yeshayahu Leibowitz gelehrt, einem überaus kreativen Denker, dessen Kenntnisse die Philosophie, politischen Wissenschaften, die Bibel, den Talmud, Medizin, Chemie und vieles andere umfassten. Er war vermutlich mein bester Lehrer, und es war ein intellektueller Hochgenuss, seine Vorlesungen zu hören. Leibowitz liebte die Biochemie und schmuggelte sie in seine Vorlesungen über organische Chemie ein, wann immer er konnte, und das war oft der Fall. Die Grundlagen der Biochemie wurden von Shlomo Hestrin gelehrt, der es außergewöhnlich gut verstand, seine Begeisterung für die Wissenschaft an seine Studenten weiterzugeben. Physiologische Chemie wurde von Ernst Wertheimer unterrichtet, einem Professor deutsch-jüdischer Herkunft, den wir wegen seines starken deutschen Akzents nur schwer verstehen konnten, der aber einen hervorragenden Blick für die Einbeziehung des Stoffwechsels auf der Gesamtkörperebene und für die physiologischen Zusammenhänge der

Biochemie besaß. Ein anderer Teil des gleichen Kurses wurde von Jacob Mager gelehrt, der ein hervorragender Biochemiker war und über ein enzyklopädisches Wissen verfügte. Allerdings war er sehr schüchtern und machte im Hörsaal keine gute Figur, erwies sich aber in kleiner Runde im Labor als ein ausgezeichnete Lehrmeister, wie ich später erfahren sollte. Seine Vorlesungen hielt er meistens mit dem Gesicht zur Tafel, seinen Studenten den Rücken zugewandt, wobei er ganze Stoffwechselwege ohne irgendwelche Aufzeichnungen an die Tafel schrieb. Dennoch war ich von der Tiefe und dem Umfang seines biochemischen Wissens derart beeindruckt, dass ich mich entschloss, Mager um eine Forschungsarbeit in seinem Labor zu bitten (Abbildung 2).



Abbildung 2. Jacob Mager.

Ich begann 1960 mit der Arbeit in Magers Laboratorium. An der Hebrew University gab es damals noch kein offizielles Diplom- und Promotionsprogramm, man konnte aber zwischen den vorklinischen und den klinischen Semestern des Medizinstudiums ein Forschungsjahr absolvieren. Das tat ich, und obwohl ich das Medizinstudium später zu Ende geführt habe, wusste ich am Ende dieses Jahres bereits, dass ich in der Forschung und nicht in der klinischen Praxis arbeiten wollte. Es sollte sich als eine glückliche Wahl herausstellen, dass ich mir Jacob Mager als Mentor und Tutor für die biochemische Forschung ausgesucht hatte. Er war ein Wissenschaftler mit unglaublicher Interessens- und Wissensbreite. Er interessierte sich für jedes Thema in der Biomedizin, wusste nahezu alles über jedes Gebiet, und er arbeitete stets gleichzeitig an drei oder vier völlig verschiedenen Forschungsprojekten. Dies führte zweifellos dazu, dass sein Beitrag zur Wissenschaft sehr zersplittert und fragmentarisch wirkte, verschaffte seinen Studenten aber ein breites Spektrum an Erfahrungen auf verschiedensten Gebieten der Biochemie. Innerhalb weniger Jahre arbeitete ich mit Mager an so unterschiedlichen Themen wie der Wirkung von Polyaminen auf die Protein-

synthese in vitro, dem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel und verschiedenen Aspekten des Purinnucleotid-Stoffwechsels, darunter der Enzymologie und der Regulation. In dieser Zeit beendete ich auch mein Medizinstudium, leistete meinen Militärdienst als Arzt ab (1965–1967) und kehrte danach für weitere zwei Jahre in Magers Laboratorium zurück, um meine Doktorarbeit zu beenden (1967–69). Ich erhielt von Mager nicht nur einen breiten Überblick über die Biochemie, sondern auch eine sehr solide Basis. Er war ein sehr genauer Experimentator, jeder Versuch hatte mit allen möglichen positiven und negativen Kontrollen zu erfolgen, alle Experimente wurden doppelt ausgeführt, und jedes signifikante neue Ergebnis musste mehrmals wiederholt werden, damit es genügend glaubhaft war. Ich verdanke Jacob Mager sehr viel im Hinblick auf ein starkes Grundlagenwissen der exakten Biochemie.

1963 begegnete ich Judith (geb. Leibowitz), wir heirateten am Ende desselben Jahres. Judy war in der Schweiz geboren und aufgewachsen. Nach ihrem Biologiestudium wollte sie ein Jahr in Israel verbringen und arbeitete während dieser Zeit im Hämatologielabor des Hadassah-Spitals in Jerusalem. Als ich eines Tages zum Hämatologielabor hinüberging, um eine Blutprobe zu holen, die ich für meine Forschung brauchte, stießen wir buchstäblich miteinander zusammen. Infolge dieser Kollision blieb sie dann länger als das eine Jahr in Israel, und inzwischen sind wir mehr als 41 Jahre verheiratet. Wir haben drei Söhne: Dan (1964), Yair (1968) und Oded (1975). Dan ist Chirurg, Yair Computeringenieur und Oded ist Medizinstudent. Dazu gesellen sich inzwischen sechs Enkelkinder, nach denen Judy und ich ganz verrückt sind: Maya (1994), Lee, (1997), Roni (1998), Ela (2000) Ori (2002) und Shahrar (2004). In all unseren gemeinsamen Jahren habe ich von Judy enorme Unterstützung erhalten. Obwohl sie aus einem der friedlichsten Länder der Erde in eines der am wenigsten friedlichen und aus einer sehr komfortablen und umsorgenden Umgebung in ein recht einfaches Milieu kam, behauptete sie sich mit sehr viel Energie, Mut und fröhlichem Optimismus. Sie kümmerte sich stets um meine allfälligen Bedürfnisse, ebenso wie um die Bedürfnisse unserer Kinder und Enkelkinder. Judy ist nicht nur eine sehr schöne Frau, sie strahlt auch eine Menge Fürsorglichkeit, Liebe und Mitgefühl aus. Neben der großen Unterstützung zu Hause hat sie mir auch über mehr als 15 Jahre sehr viel im Laboratorium geholfen. Judy ging der Ubiquitin-Forschung auf vielerlei Weise zur Hand (Abbildungen 3 und 4).

Von 1969 bis 1971 war ich als Postdoc bei Gordon Tomkins am Department of Biochemistry and Biophysics der University of California in San Francisco. Ich war Gordon im Jahr zuvor begegnet, als er in Israel einige Vorlesungen hielt. Er war ganz anders als Mager: extrovertiert, lebhaft, er sprudelte vor Ideen (Abbildung 5). Anders als Mager kümmerte sich Gordon nicht viel um Kontrollversuche oder experimentelle Einzelheiten, er war ein menschlicher Vulkan, der ständig großartige Ideen ausstieß, und auch auf die Arbeit vieler anderer Forscher wirkte er erstaunlich stimulierend. Viele hervorragende Wissenschaftler, die Gordon Tomkins damals kannten (leider starb er sehr früh), sprechen von ihm noch immer mit großer Bewunderung. Er verströmte großen





**Abbildung 3.** Judy und Avram Hershko 1977.



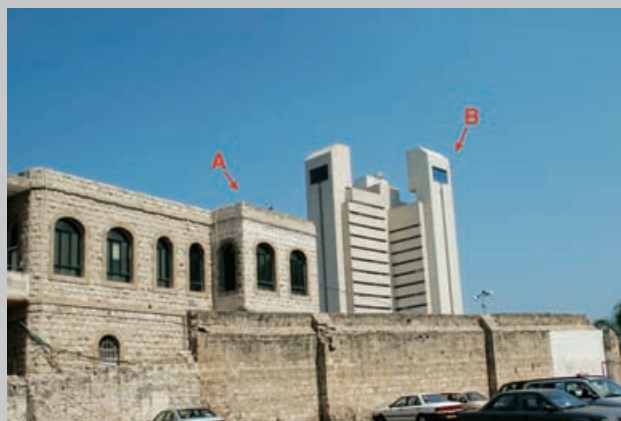
**Abbildung 4.** Judy, Avram und die Familie 2003 (Feier anlässlich Judys 60. Geburtstag). Von links nach rechts, stehend: Vardit, Yair, Avram, Judy; mittlere Reihe: Dan, Ori, Sharon, Oded; sitzend: Lee, Maya, Roni, Ela.



**Abbildung 5.** Gordon Tomkins.

persönlichen Charme und ich mochte ihn sofort. Ich glaubte, dass Gordon meiner wissenschaftlichen Entwicklung viele neue Aspekte hinzufügen könnte, was tatsächlich der Fall war. Ich erhielt von Gordon eine Menge Anregungen, vergaß aber nicht, was mir Mager über die Bedeutung exakter Kontrollen beigebracht hatte. Wie im Haupttext des Vortrages beschrieben ist, erfuhr ich während meiner Arbeit bei Gordon Tomkins vom Proteinabbau und war von diesem Prozess fasziniert.

1971 kehrte ich aus San Francisco nach Israel zurück. Ursprünglich wollte ich an die Hebrew University in Jerusalem zurückgehen, aber in Haifa eröffnete eine neue medizinische Hochschule, und man bot mir dort den Vorsitz der biochemischen Abteilung an. Das klang sehr verlockend, und ich nahm das Angebot an; später stellte sich indes heraus, dass es sich um eine winzig kleine biochemische Abteilung in einer sehr kleinen medizinischen Fakultät am Technion handelte, sodass ich anfangs hauptsächlich mir selbst vorsah. Sie war anfänglich deshalb so klein, weil es nicht genügend Platz gab, um eine große Fakultät zu beherbergen. Die gesamte medizinische Fakultät war – vorübergehend – in einem alten zweistöckigen Kloster untergebracht (Abbildung 6). Diese „vorübergehende“ Situation dauerte über 15 Jahre, bis 1987 das neue Gebäude der medizinischen Fakultät vollendet war. Ich verbrachte jedoch eine sehr schöne Zeit in dem alten Kloster, und die Entdeckung des Ubiquitinsystems fand größtenteils dort statt. Isolation kann manchmal zu Kreativität führen, denn man wird nicht durch das, was andere tun, gestört und fühlt sich nicht gezwungen, an gerade beliebten, „modernen“ Themen zu arbeiten. Ich hatte das Glück, dort ein hochmotiviertes Forschungsteam zu versammeln, zu dem am Anfang Hanna Heller und Dvora Ganoth und später, zu verschiedenen Zeiten, Ety Eytan, meine Frau Judy, Sarah Elias und Clara Segal gehörten. Dvora und Ety arbeiten noch immer mit mir zusammen. Meine ersten Doktoranden waren David Epstein, Yaacov Hod und Michael Aviram. Wir arbeiteten mehrere Jahre an der Herstellung eines zellfreien Systems zur Reproduktion des energieabhängigen Proteinabbaus im Reagenzglas, der für die biochemische Analyse



**Abbildung 6.** Alt- und Neubau der Faculty of Medicine am Technion in Haifa. A) Altbau; mein Labor befand sich in der rechten Ecke des oberen Stockwerks. B) Neubau.

dieses Systems entscheidend ist. Zu diesem Zweck probierten wir verschiedene Quellen wie Leberhomogenate und Extrakte aus kultivierten Zellen und sogar aus Bakterien. Mit all diesen Versuchen hatten wir keinerlei Erfolg. Ich erinnere mich, dass eine befreundete Biochemikerin aus Jerusalem mein Labor besichtigte und mir am Ende des Besuchs riet, ich solle nicht den größten Teil meiner Mitarbeiter an einem hoffnungslosen Projekt arbeiten lassen. Ich war jedoch sehr hartnäckig und besessen von der Idee, möglicherweise herauszufinden, wie Proteine nur mit einem biochemisch analysierbaren zellfreien System abgebaut werden. Vielleicht war es mein Glück, an einem so abgelegenen und kleinen Ort zu arbeiten; in einer größeren Einrichtung hätten mich meine Doktoranden und Forschungsassistenten vielleicht zugunsten einer weniger frustrierenden Forschung verlassen. Letztlich verwendeten wir für die biochemische Fraktionierung das im Labor von Goldberg hergestellte zellfreie Retikulozytensystem (siehe Haupttext). Zu dieser Zeit stieß Aaron Ciechanover zu meinem Forschungsteam, um seine Doktorarbeit anzufertigen, nachdem er sein Medizinstudium und den Militärdienst beendet hatte. Aaron war der äußerst fleißigste Doktorand, den ich je hatte. Mit seiner ungeheuren Energie hat er erheblich zur Entdeckung des Ubiquitinsystems beigetragen. Darüber hinaus war er bereits als Doktorand der geborene Manager. Ich erinnere mich, Ernie Rose am Ende meines Forschungsaufenthalts in Philadelphia 1978 berichtet zu haben, wie klein israelische Forschungsstipendien waren, und er mir daraufhin vorschlug, ein ausländisches Forschungsstipendium der NIH zur Förderung meiner Arbeit in Israel zu beantragen. Ich wollte lieber noch einige Versuche machen anstatt den Antrag auf ein Stipendium zu schreiben, aber Aaron drückte mich auf einen Stuhl und befahl mir, auf der Stelle den Antrag für das NIH-Stipendium zu schreiben. Ich schrieb ihn, und ich erhielt das Stipendium für den ersten von fünf aufeinander folgenden, durch die NIH geförderten Zeiträumen. Es rettete die Situation im Labor in Haifa in einer sehr schwierigen Zeit. Ich bin den NIH für die Unterstützung meiner Arbeit sehr dankbar und Aaron dafür, dass er mich zwang, den ersten Förderantrag zu schreiben.

Die Entdeckungsgeschichte des Ubiquitinsystems ist in meinem Vortrag beschrieben, ich möchte an dieser Stelle lediglich einige anekdotische Episoden aus dieser Zeit hinzufügen. Die Fraktionierung der Retikulozytlysate in die Fraktionen 1 und 2 beruhte auf einem Trick, den ich von Mager bei der Reinigung von Enzymen des Purinnucleotidstoffwechsels aus Erythrozyten gelernt hatte. Da Hämoglobin etwa 80–90% des Gesamtproteins von Erythrozyten und Retikulozyten ausmacht, besteht die erste Aufgabe bei der Reinigung eines Enzyms aus diesen Zellen darin, diese große Hämoglobinmenge loszuwerden. Dies gelingt am einfachsten mit dem Anionenaustauscherharz DEAE-Cellulose, das die meisten Nichthämoglobin-Proteine bindet, Hämoglobin dagegen nicht. In unserem Fall führte das Verfahren zu einem Verlust der Aktivität, die durch Wiedergabe der Fraktion 1, in der neben Hämoglobin auch Ubiquitin enthalten war, wiederhergestellt werden konnte. Daher nannten wir Ubiquitin im Laborjargon eine Zeit lang „Rot“, wegen der roten

Farbe des Hämoglobins in dieser Fraktion. Nachdem wir entdeckt hatten, dass der Faktor in dieser Fraktion (d.h. Ubiquitin) auch nach 30-minütigem Sieden aktiv bleibt, befragten wir einen Proteinexperten am Technion, der uns erklärte, dass unser Faktor kein Protein sein könne. Dennoch wiesen wir nach, dass es sich bei dem Faktor um ein Protein handeln musste, weil er gegen Proteinasen empfindlich war. Vielleicht lernt man aus dieser Geschichte, dass es riskant ist, Experten um Rat zu fragen.

Nachdem ich sechs Jahre am Technion gearbeitet hatte, stand mir 1977/78 ein freies Forschungsjahr zu, war aber recht unschlüssig, wohin ich gehen sollte. Ich kannte die Forscher auf dem (damals) überschaubaren Gebiet des Proteinabbaus und war nicht sonderlich enthusiastisch. Viele pflegten ihre Lieblingstheorien über die Ursache der hohen Selektivität im intrazellulären Proteinabbau, ohne dafür nennenswerte (oder überhaupt) experimentelle Hinweise zu haben. Ich hatte wieder einmal Glück: 1976 besuchte ich ein Fogarty-Treffen über ein recht allgemeines Thema an den National Institutes of Health. Auch Irwin Rose besuchte dieses Treffen, und eines Morgens traf ich ihn am Frühstückstisch. Ernie war für seine Arbeit über Enzymmechanismen gut bekannt. Im Verlauf unseres Gesprächs fragte ich ihn, welches Gebiet ihn noch interessiere, und er antwortete: „Proteinabbau“. Ich war etwas verblüfft und meinte, dass ich keine Publikation von ihm zum Proteinabbau je gesehen hätte. Seine Antwort war: „Da gibt es nichts, das eine Veröffentlichung über den Proteinabbau lohnt“! Ich mochte seine kritische Einstellung und Ernie als solchen und bat ihn daher, mein Forschungsjahr in seinem Laboratorium verbringen zu dürfen (Abbildung 7). Wie sich herausstellte, war Ernie Rose tatsächlich am Proteinabbau interessiert. Als junges Fakultätsmitglied in den 50er Jahren am Department of Biochemistry der Yale University sprach er mit Melvin Simpson, einem anderen jungen Mitglied der Fakultät, der ihm von seinen Versuchen zur Energieabhängigkeit der Abspaltung von Aminosäuren aus Proteinen in Leberschnitten berichtete (siehe Haupttext). Dies weckte Ernies Interesse, und ab und zu führte er Versuche



Abbildung 7. Irwin Rose am Fox Chase Cancer Center 1992.

durch mit dem Ziel, die Energieabhängigkeit des Proteinabbaus zu verstehen. Er machte mit diesen Experimenten keine wesentlichen Fortschritte und veröffentlichte daher nichts.

Ernie Rose ist neben Mager und Tomkins die dritte Person, die großen Einfluss auf mein wissenschaftliches Leben hatte. Er war wieder ganz anders Mager und auch anders als Tomkins. Ernie liebt es, Probleme zu lösen, und er hat eine stark analytisch geprägte Einstellung zur Wissenschaft. Da ich eher der intuitive Typ bin, ergänzten wir uns sehr gut. Er ist so brillant, dass seine Vorstellungen nicht immer verstanden werden und man ein wenig Angst vor ihm hat. Er ist auch deshalb oft gefürchtet, weil er sehr kritisch sein kann und nicht davor zurückschreckt, seine Kritik zu äußern. Wir sind zwanzig Jahre lang sehr gut miteinander ausgekommen, darunter in vielen Sommeraufenthalten in seinem Laboratorium am Fox Chase Cancer Center in Philadelphia. Gestritten haben wir nur, wenn er sich weigerte, als Mitautor einer Arbeit genannt zu werden, zu der er sehr wohl signifikant beigetragen hatte. Für die wenigen Veröffentlichungen, in denen er als Mitautor genannt ist, musste ich seine Zustimmung erzwingen. Er war bei unserer gemeinsamen Arbeit am selbstlosesten – ein in der heutigen Wissenschaft seltenes Phänomen. Ich fragte ihn einmal, warum er mich immer wieder in sein Laboratorium einlud, und er antwortete: „Ich mag die Aufregung“. Ernie spielte seine Beiträge auf dem Ubiquitingebiet stets herunter. 1995 schrieb er für *Protein Science* einen autobiographischen Beitrag, in dem er das Wort „Ubiquitin“ nicht einmal erwähnte. In unseren Unterhaltungen beschrieb er seine Rolle in der Ubiquitingeschichte immer als lediglich unterstützend, doch das trifft sicherlich nicht zu. Wenn ich in seinem Labor arbeitete war er zwar gelegentlich so mit einem Problem der Enzymmechanismen beschäftigt, dass er meine Anwesenheit für eine oder zwei Wochen vergaß, aber dann kam er plötzlich mit einem glänzenden Vorschlag zu meiner aktuellen Arbeit. Ich kann feststellen, dass Ernies Beitrag an Ideen, Inspiration und hilfreicher Kritik für die Entdeckung des Ubiquitinsystems und für die Beschreibung einiger enzymatischer Hauptreaktionen unentbehrlich war.

Der Rest meiner Geschichte ist eine Menge mehr Arbeit, aber auch eine Menge mehr Begeisterung und Spaß an der

Wissenschaft. Ich blieb eigensinnig und tat weiterhin das, was viele in den 80er Jahren, als die effizienten Techniken der Molekularbiologie verfügbar wurden, als altmodische Biochemie betrachteten. Diese biochemische Arbeit führte zur Entdeckung der drei an der Ubiquitin-Protein-Verknüpfung beteiligten Enzymarten (E1, E2 und E3) sowie einiger anderer Enzyme dieses Systems. Später interessierte ich mich für die Aufgaben des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus im Zellteilungszyklus. So kam ich zum Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole, weil dort das zellfreie System aus Muscheloozyten zur Verfügung stand, das die am Zellzyklus teilnehmenden Ereignisse zuverlässig im Reagenzglas reproduziert. Wie im Vortrag beschrieben ist, hatte dieses System Bedeutung für die Entdeckung des Cyclosoms/Anaphase-Promotorkomplexes. In den letzten zehn Jahren habe ich die Sommer aus dem gleichen Grund am MBL verbracht wie die Sommer zuvor am Fox Chase Cancer Center – um beinahe meine ganze Zeit Versuchen in einer ruhigen Umgebung widmen zu können. Laborarbeit ist mein großes Hobby; ich arbeite zwar auch in Haifa im Labor, komme aber viel zu selten dazu. Ich habe immer sehr gern eigenhändig experimentiert, sowohl für meine innere Ruhe als auch wegen des Reizes. Darüber hinaus waren meine eigenen Experimente für fast jeden signifikanten Fortschritt unserer Gruppe von Bedeutung. Es gibt keinen schöneren Ort zum Experimentieren als das MBL: die großartige Naturschönheit der Landschaft, die Ruhe und das herausragende wissenschaftliche Umfeld machen das MBL zu einem wunderbaren Ort für sommerliche Forschungsarbeiten.

Wenn ich auf mein bisheriges Leben zurückblicke, bin ich erstaunt, wieviel Glück ich im privaten wie im wissenschaftlichen Leben hatte. Nachdem meine Eltern dem Holocaust entkommen waren, erreichten beide in Israel ein hohes Alter. Ich bin mit meiner Frau und unseren Kindern und Enkelkindern sehr glücklich. Ich hatte das große Glück, in der Wissenschaft hervorragende Mentoren zu haben und mit den erworbenen Kenntnissen einen wichtigen Beitrag leisten zu können. Wenn es nur etwas Frieden in der Welt gäbe, auch zwischen Israel und seinen Nachbarn – ich wäre vollends zufrieden.

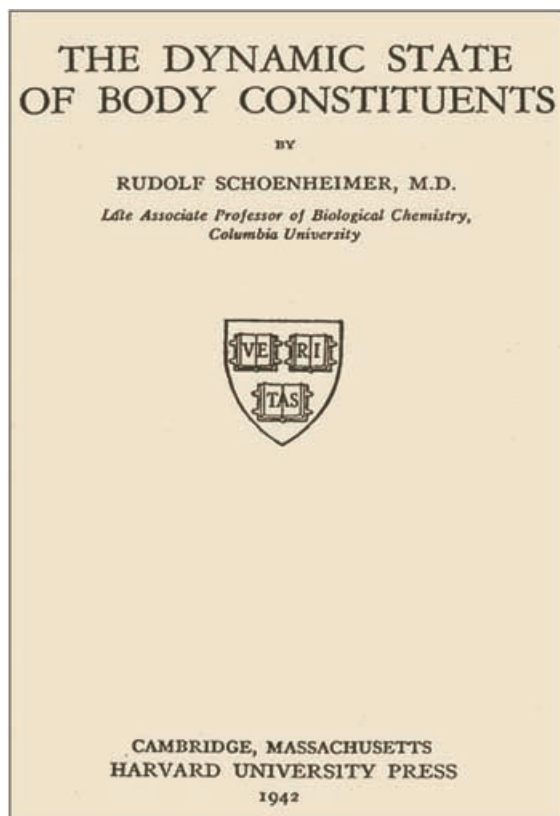
## 2. Einführung

Alle lebenden Zellen enthalten tausende verschiedener Proteine, von denen jedes einen bestimmten chemischen oder physikalischen Prozess ausführt. Die Bedeutung von Proteinen für grundlegende Zellfunktionen machte die Frage nach ihrer Synthese besonders interessant. Durch die Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA und die Entschlüsselung des genetischen Codes richtete sich in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts die Aufmerksamkeit auf die Mechanismen, nach denen die Basenfolge in der DNA die Sequenz der Aminosäuren im Protein bestimmt, und auf weitere molekulare Mechanismen zur Steuerung der Expression bestimmter Gene. Die intensiven Forschungsaktivitäten

auf dem Gebiet der Proteinsynthese hatten zur Folge, dass man dem raschen Abbau vieler Proteine zu Aminosäuren damals nur wenig Aufmerksamkeit widmete. Diese dynamische Umwandlung von Zellproteinen war bereits durch die wegweisenden Arbeiten von Schoenheimer und Mitarbeitern bekannt, die zu den ersten gehörten, die isotoptenmarkierte Verbindungen in biologischen Untersuchungen verwendeten. Sie verabreichten adulten Ratten  $^{15}\text{N}$ -markiertes L-Leucin und untersuchten die Verteilung des Isotops in Körpergeweben und Ausscheidungen. Dabei stellten sie fest, dass weniger als ein Drittel des Isotops mit dem Urin ausgeschieden und der größte Teil in Gewebeproteine eingebaut wurde.<sup>[1]</sup> Da das Gewicht der Tiere während des Versuchs konstant blieb, konnte man annehmen, dass sich auch die Masse und die



Zusammensetzung der Körperproteine nicht geändert hatte. Demzufolge mussten neu eingebaute Aminosäuren die in den Gewebeproteinen vorhandenen in einem dynamischen Proteinumwandlungsprozess ersetzt haben.<sup>[1]</sup> Schoenheimers Untersuchungen zum dynamischen Zustand von Proteinen und einigen anderen Bausteinen des Körpers wurden 1942, kurz nach seinem frühen Tod, in einem kleinen Büchlein veröffentlicht (Lit. [2], siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Titelblatt von Schoenheimers gesammelten Vorlesungen, herausgegeben von seinen Mitarbeitern kurz nach seinem Tod.

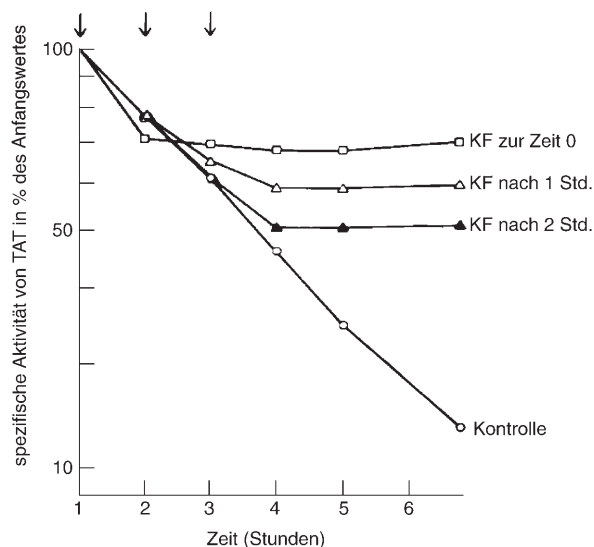
In den folgenden Jahrzehnten wurde die Forschung zum Proteinabbau hauptsächlich wegen des bereits erwähnten großen Interesses an den Mechanismen der Proteinsynthese vernachlässigt. Allerdings häuften sich nach und nach experimentelle Hinweise auf einen umfangreichen und selektiven intrazellulären Proteinabbau mit grundlegend wichtigen Zellfunktionen. So beobachtete man, dass abnorme, durch den Einbau von Aminosäure-Analoga erhaltene Proteine selektiv erkannt und in den Zellen rasch abgebaut werden.<sup>[3]</sup> Der intrazelluläre Proteinabbau wurde aber nicht als reines „Abfallbeseitigungssystem“ zur Eliminierung abnormer oder beschädigter Proteine verstanden, denn Ende der 60er Jahre erkannte man, dass auch normale Proteine hochselektiv abgebaut werden. Die Halbwertszeiten verschiedener Proteine lagen zwischen einigen Minuten und mehreren Tagen, wobei rasch abgebaute Proteine gewöhnlich wichtige Regulatorfunktionen hatten. Diese Eigenschaften des intrazellulären Proteinabbaus und seine Rolle bei der Regulierung bestimmter Proteinspiegel wurden 1970 von Schimke und

Doyle in einer ausgezeichneten Übersicht zusammengefasst.<sup>[4]</sup> Demnach wusste man damals, dass der Proteinabbau wichtige Aufgaben hat, es war aber nicht bekannt, welches biologische System diesen Prozess mit einem so hohen Maß an Selektivität und Perfektion ausführt.

### 3. Meine erste Begegnung mit dem Proteinabbau

Mein Interesse am Abbau von Proteinen in Zellen wurde während meines Postdoc-Aufenthalts 1969–1971 im Labor von Gordon Tomkins an der University of California in San Francisco geweckt. Zu dieser Zeit beschäftigte sich Gordon hauptsächlich mit den Mechanismen, nach denen Steroidhormone die Synthese bestimmter Proteine induzieren. Hierfür verwendete er als Modellsystem die Synthese des Enzyms Tyrosin-Aminotransferase (TAT) in Hepatomzellkulturen. Bei meiner Ankunft fand ich ein großes Forschungsteam mit vielen Postdoktoranden vor, die an verschiedenen Aspekten der TAT-Synthese forschten. Mir erschien das etwas zu überlaufen, und ich bat Gordon um ein anderes Projekt. Er schlug mir vor, den Abbau von TAT zu untersuchen, der auch die Konzentration dieses Enzyms steuert. Auf diese Weise kam ich mit dem Proteinabbau in Berührung, einem Problem, das mich seither nicht mehr losgelassen hat.

Abbildung 9 zeigt das Resultat eines der ersten Versuche, die ich als Postdoktorand in Tomkins Labor durchführte. Der Abbau von TAT ließ sich recht einfach verfolgen: Zuerst wurden die Hepatomzellen mit einem Steroidhormon inkubiert, wodurch die Konzentration dieses Proteins stark anstieg. Danach wurde das Hormon durch Austausch des Kulturmediums entfernt, was zum Abbau und damit zu einem raschen Abfall des Proteinspiegels führte. Die Abbaugeschwindigkeit für dieses Protein war wie bei anderen Regulatorproteinen verhältnismäßig hoch, die Halbwertszeit betrug etwa 2–3 h. Außerdem stellte ich fest, dass der Abbau von TAT durch Kaliumfluorid, einen Inhibitor der Energiegewinnung in der Zelle, vollständig zum Stillstand gebracht



**Abbildung 9.** Energieabhängigkeit des Abbaus von Tyrosin-Aminotransferase; aus Lit. [5].

wurde (Lit. [5] und Abbildung 9). Dieser Effekt war nicht spezifisch für Fluorid, denn mit anderen Inhibitoren der zellulären Energieproduktion erhielt ich ähnliche Ergebnisse. Sie bestätigten und ergänzten frühere Resultate von Simpson, wonach die Freisetzung von Aminosäuren aus Proteinen in Leberschnitten energieabhängig war.<sup>[6]</sup> Diese Beobachtung wurde später angegriffen und als indirekter Effekt abgetan, der angeblich darauf zurückgeht, dass die Energie zur Aufrechterhaltung des aciden pH-Werts innerhalb der Lysosomen benötigt wird (beschrieben in Lit. [7]). Im Fall von TAT wurde jedoch Energie zum selektiven Abbau eines bestimmten Enzyms gebraucht, sodass es unvernünftig erschien anzunehmen, der hochselektive Abbau bestimmter Zellproteine erfolge durch Phagozytose in Lysosomen. Da ein ATP-Mangel auch die Inaktivierung der Enzymaktivität von TAT verhindert, ging man davon aus, dass die Energie für eine frühe Stufe des Proteinabbauprozesses benötigt wird.<sup>[5]</sup>

Mich faszinierte die Energieabhängigkeit des intrazellulären Proteinabbaus. Normalerweise wird Energie zur Synthese einer chemischen Bindung benötigt und nicht, um sie aufzubrechen. So ist die Wirkung der extrazellulären Proteinasen des Verdauungssystems ein exergonischer Prozess, d.h., er setzt eigentlich Energie frei. Das ließ den Schluss zu, dass im Zellinnern ein neues, bisher unbekanntes proteolytisches System existiert, das vermutlich Energie braucht, um die hohe Selektivität beim Abbau von Zellproteinen zu erreichen.

#### 4. Entdeckung der Rolle von Ubiquitin beim Proteinabbau

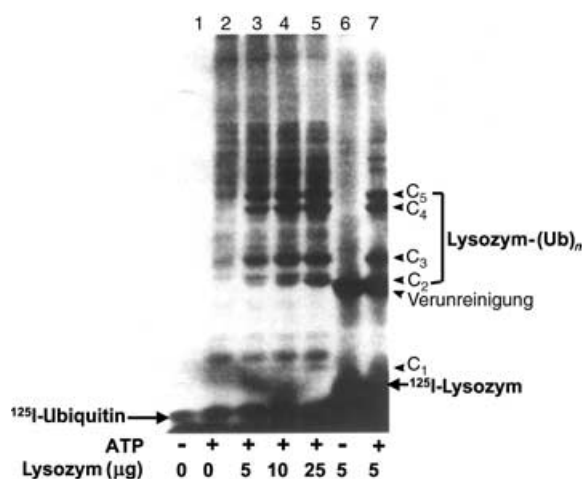
Die Entdeckungsgeschichte des Ubiquitinsystems ist teilweise bereits beschrieben worden.<sup>[7–9]</sup> Nach meiner Rückkehr nach Israel und der Gründung meines eigenen Labors am Technion in Haifa ging ich weiterhin der Frage nach, wie Proteine in Zellen abgebaut werden und warum dieser Prozess Energie erfordert. Für mich stand fest, dass der einzige Weg um herauszufinden, wie ein völlig neues System funktioniert, über die klassische Biochemie führt. Dies beinhaltet die Verwendung eines zellfreien Systems, das den Prozess im Reagenzglas zuverlässig reproduziert, die Fraktionierung zur Trennung der Bestandteile, die Reinigung und Charakterisierung jeder Komponente und die Wiederherstellung des Systems aus isolierten und gereinigten Komponenten. Etlinger und Goldberg hatten erstmals ein zellfreies ATP-abhängiges Proteolysesystem aus Retikulozytlysaten hergestellt.<sup>[10]</sup> Wir fraktionierten dieses System, um seine Bestandteile zu isolieren und deren Wirkungsweise zu untersuchen. Einen Großteil dieser Arbeit erledigte Aaron Ciechanover, der von 1976 bis 1981 Doktorand in meiner Arbeitsgruppe war. Auch Aaron erhielt dabei große Unterstützung, wichtige Ratschläge und hilfreiche Kritik durch Irwin Rose, in dessen Labor am Fox Chase Cancer Center ich während eines Forschungsjahres 1977/78 und viele Sommer danach arbeitete.

In den ersten Versuchen trennten wir Retikulozytlysate an DEAE-Cellulose in zwei Rohfraktionen: Fraktion 1 enthielt die nicht an das Harz adsorbierten Proteine, Fraktion 2

dagegen alle Proteine, die an den Träger adsorbiert und mit konzentrierter Salzlösung eluiert worden waren. Ursprünglich sollte durch diese Fraktionierung das bekanntermaßen in Fraktion 1 enthaltene Hämoglobin entfernt werden, zugleich wussten wir, dass die meisten Nichthämoglobin-Proteine in Fraktion 2 enthalten sein werden. Wie wir feststellten, war keine der beiden Fraktionen für sich allein aktiv, durch Vereinigen der beiden Fraktionen ließ sich der ATP-abhängige Proteinabbau aber wiederherstellen.<sup>[11]</sup> Die aktive Komponente in Fraktion 1 war ein kleines hitzestabiles Protein; seine Stabilität gegenüber einer Wärmebehandlung nutzten wir, um es bis zur Homogenitätsgrenze zu reinigen. Wir nannten dieses Protein damals APF-1, für ATP-abhängiger Proteolysefaktor 1. Wilkinson et al. wiesen später nach, dass APF-1 mit Ubiquitin identisch war.<sup>[12]</sup> Zuvor hatten wir entdeckt, dass es kovalent an Proteinsubstrate bindet, wie nachfolgend beschrieben wird. Ubiquitin wurde ursprünglich von Goldstein et al. bei der Suche nach Thymushormonen isoliert, später wurde es in allen Geweben und eukaryotischen Organismen nachgewiesen und erhielt daher seinen Namen.<sup>[13]</sup> Die Aufgaben von Ubiquitin waren unbekannt, Goldknopf und Busch entdeckten aber, dass Ubiquitin über eine Isopeptidbindung an Histon 2A bindet.<sup>[14]</sup>

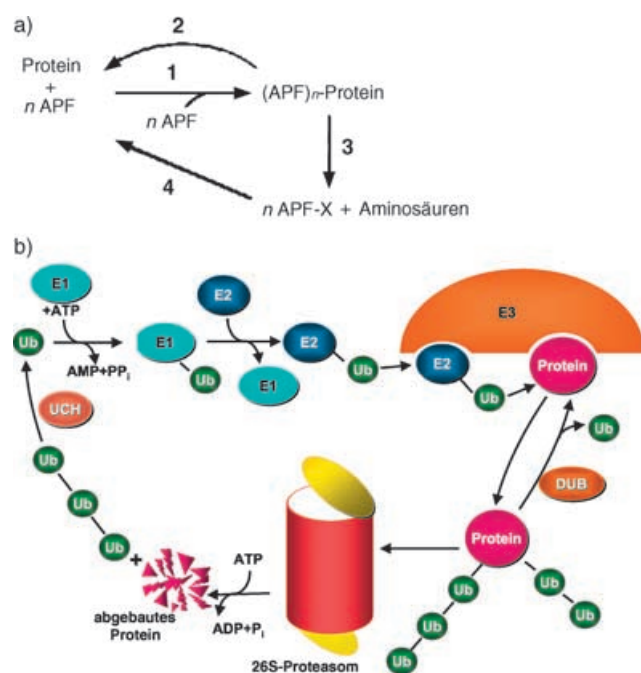
Die Reinigung von APF-1/Ubiquitin aus Fraktion 1 war der entscheidende Schritt zur Aufklärung seiner Wirkungsweise im proteolytischen System. Da es kleiner zu sein schien als die meisten Enzyme, hielten wir es zunächst für die regulatorische Untereinheit eines in Fraktion 2 enthaltenen Enzyms (z.B. einer Proteinkinase oder einer ATP-abhängigen Protease). Um dies zu prüfen, suchten wir nach der Verknüpfung von APF-1/Ubiquitin mit einem Protein in Fraktion 2. Zu diesem Zweck wurde gereinigtes, radioaktiv markiertes APF-1/Ubiquitin mit Fraktion 2 und mit oder ohne ATP inkubiert und anschließend durch Gelfiltrationschromatographie getrennt. Dabei wurde eine markierte, ATP-abhängige Verknüpfung von APF-1/Ubiquitin mit hochmolekularem Material nachgewiesen.<sup>[15]</sup> Besonders überraschend war jedoch die Entdeckung, dass Ubiquitin über eine kovalente Amidbindung gebunden war, wie die Stabilität des hochmolekularen Derivats gegen Alkali, Hydroxylamin und Sieden mit SDS (Natriumdodecylsulfat) in Gegenwart von Mercaptoethanol belegte.<sup>[15]</sup> Die Analyse der Reaktionsprodukte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, dass Ubiquitin mit zahlreichen endogenen Proteinen verknüpft war. Da die Rohfraktion 2 aus Retikulozyten nicht nur Enzyme, sondern auch endogene Substrate des proteolytischen Systems enthielt, kam uns der Gedanke, dass Ubiquitin an Proteinsubstrate und nicht an ein Enzym gebunden sein könnte. Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass Proteine, die gute (wenn auch künstliche) Substrate des ATP-abhängigen proteolytischen Systems sind, z.B. Lysozym, an Ubiquitin binden.<sup>[16]</sup> Abbildung 10 zeigt das Resultat unseres ursprünglichen Versuchs: Bei der Inkubation von <sup>125</sup>I-markiertem Ubiquitin mit unmarkiertem Lysozym bildeten sich ähnliche hochmolekulare Derivate (Abbildung 10, Spuren 3–5) wie nach der Inkubation von <sup>125</sup>I-markiertem Lysozym mit nicht markiertem Ubiquitin in Gegenwart von ATP (Abbildung 10, Spur 7). Aufgrund dieser Beobachtungen nahmen wir an, dass Proteine durch kovalente Bindung





**Abbildung 10.** Entdeckung der kovalenten Bindung von Ubiquitin an das Substratprotein. Näheres siehe Text; aus Lit. [16].

an APF-1/Ubiquitin für den Abbau markiert werden.<sup>[16]</sup> Unsere ursprüngliche, 1980 gemeinsam mit Irwin Rose formulierte Hypothese ist in Abbildung 11 a zusammengefasst. Demnach bindet ein vermutetes Enzym, das wir „APF-1-Proteinamid-Synthetase“ nannten, mehrere Ubiquitinmoleküle an das Proteinsubstrat (Schritt 1); ein anderes Enzym baut anschließend die mit mehreren Ubiquitinmolekülen verknüpften Proteine ab (Schritt 3), und schließlich wird freies, wiederverwendbares Ubiquitin abgespalten (Schritt 4). Diesem Vorschlag zufolge ist Ubiquitin im Wesentlichen eine Markierung, die an ein Protein bindet und es dadurch für den Abbau festlegt.



**Abbildung 11.** Das Ubiquitinsystem früher und heute. A) Ursprünglicher Vorschlag für die Ereignissequenz beim Proteinabbau. Näheres siehe Text; aus Lit. [16]. B) Die enzymatischen Hauptreaktionen im Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau aus heutiger Sicht. Näheres siehe Text. Ub = Ubiquitin, DUB = Ubiquitin absplattendes Enzym, UCH = Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase.

## 5. Identifizierung von Enzymen des Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Systems

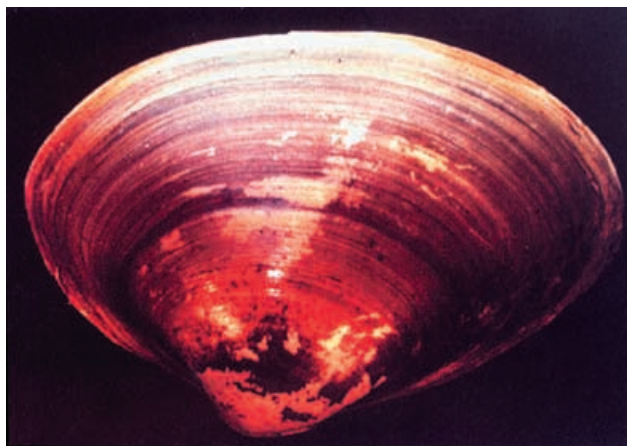
Aufbauend auf diesen ersten Ergebnissen wollten wir auch die Enzyme des Ubiquitin-Stoffwechsels mit dem gleichen biochemischen Verfahren aus Fraktionierung und Wiederherstellung isolieren und identifizieren. Der ursprüngliche Mechanismusvorschlag (Abbildung 11 a) erwies sich als im Kern richtig, aber ein sehr wichtiges Detail kam hinzu. Unser heutiges Wissen über die enzymatischen Hauptschritte im Ubiquitin-vermittelten Proteolysemechanismus zeigt Abbildung 11 b (beschrieben in Lit. [17]). Dieses Schema fasst etwa zehn Jahre (1980–1990) unserer Forschungsarbeit und die Ergebnisse einiger anderer Wissenschaftler zusammen. So konnten wir nachweisen, dass Ubiquitin nicht durch ein Enzym, sondern durch die sequenzielle Wirkung von drei Enzymen an Proteine gebunden wird: das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1,<sup>[18]</sup> ein Ubiquitin-Trägerprotein E2<sup>[19]</sup> und eine Ubiquitin-Protein-Ligase E3.<sup>[19]</sup> E1 bewirkt die ATP-abhängige Aktivierung des Carboxy-terminalen Glycinrestes von Ubiquitin<sup>[20]</sup> durch Bildung von Ubiquitinadenylyat und nachfolgende Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf eine Thiolgruppe von E1 unter Bildung einer Thiolesterbindung.<sup>[18,21]</sup> Durch Transacylierung wird das aktivierte Ubiquitin zunächst auf eine Thiolgruppe von E2 und danach in einer E3-vermittelten Reaktion auf die Aminogruppe des Proteinsubstrats übertragen.<sup>[19]</sup> Dabei hat E3 die Aufgabe, spezifische Proteinsubstrate zu binden.<sup>[22]</sup> Ausgehend von dieser Beobachtung nahmen wir an, dass die Selektivität des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus hauptsächlich durch die Substratspezifität verschiedener E3-Enzyme bestimmt wird.<sup>[23]</sup> Diese Annahme wurde in der Folgezeit in vielen Laboratorien durch Untersuchung der selektiven Wirkung vieler verschiedener E3-Enzyme auf ihre spezifischen Proteinsubstrate verifiziert. An Polyubiquitinketten gebundene Proteine werden durch einen (von anderen Forschern entdeckten) großen 26S-Proteasomkomplex abgebaut, und das freie Ubiquitin wird durch die Aktivität von Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen oder Isopeptidasen abgespalten (beschrieben in Lit. [17]).

## 6. Mechanismen des Abbaus von Cyclin B: Entdeckung des Cyclosoms/Anaphase-Promotorkomplexes

Alle unsere Untersuchungen zur Biochemie des Ubiquitin-Stoffwechsels hatten wir im Retikulozytsystem mit synthetischen Modellproteinen als Substraten durchgeführt. Obwohl unser Wissen über die biochemischen Grundprozesse des Ubiquitinsystems noch viele Lücken aufwies, hielt ich es um 1990 für wichtig, der Frage nachzugehen, wie es dem Ubiquitinsystem gelingt, Zellproteine selektiv und geregelt abzubauen. Auf diese Weise begann ich mich für die Aufgaben des Ubiquitinsystems im Zellteilungszyklus zu interessieren, denn im Zellzyklus schwanken die Konzentrationen vieler seiner Regulatorproteine. Ich beschäftigte mich zunächst mit den biochemischen Mechanismen des Abbaus von Cyclin B im frühen embryonalen Zellzyklus. Hunt et al.

wiesen nach, dass Cyclin B ein Protein ist, das am Ende jeder Mitose abgebaut wird.<sup>[24]</sup> Später stellte man fest, dass es sich um eine bestimmte Regulator-Untereinheit der Proteinkinase Cdc2/Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) handelt (beschrieben in Lit. [25]). Cyclin B wird in den frühen embryonalen Zellzyklen während der Interphase synthetisiert und anschließend im Metaphase-Anaphase-Übergang rasch abgebaut. Die aktive Proteinkinase Cdk1-Cyclin B (auch MPF, M phase-promoting factor) wird zu Beginn der Mitose gebildet und unterstützt den Eintritt der Zellen in die Mitose. Der Abbau von Cyclin B führt zur Inaktivierung von MPF, der wiederum für den Austritt aus der Mitose erforderlich ist. Wir fragten uns nun: Welches System baut Cyclin B ab, und warum wirkt es nur am Ende der Mitose?

Ich habe mich dieser Frage erneut über die Biochemie genähert, und hierbei führte mich die Suche nach einem zellfreien System zur Meeresbiologie und zur Dickschaligen Trogmuschel, *Spisula solidissima* (Abbildung 12). Diese



**Abbildung 12.** Die nordatlantische Dickschalige Trogmuschel, *Spisula solidissima*.

große Muschel produziert große Mengen von Oozyten. Luca und Ruderman<sup>[26]</sup> hatten aus befruchteten Muscheloozyten ein zellfreies System hergestellt, das den in der Zellzyklusphase den spezifischen Abbau von mitotischen Cyclinen zuverlässig reproduzierte. Bei diesen Forschungen erhielt ich zuerst von Robert Palazzo und Leonard Cohen und danach durch Zusammenarbeit mit Joan Ruderman sehr große Unterstützung. Die erste Fraktionierung des Systems ergab,<sup>[27]</sup> dass die Verknüpfung von Cyclin B mit Ubiquitin neben E1 zwei neue Komponenten erforderte: Dies waren ein als E2-C bezeichnetes spezifisches E2 und eine E3-ähnliche Aktivität, die in den Muschelextrakten zusammen mit dispergierten Feststoffen enthalten war. Wir solubilisierten die E3-ähnliche Aktivität und identifizierten sie als großen Komplex (ca. 1500 kDa) mit Ubiquitin-Ligase-Wirkung auf mitotische Cycline. Die Aktivität dieses Enzyms wird im Zellzyklus reguliert: Es ist in der Interphase inaktiv und wird am Ende der Mitose aktiv, wobei die Wirkung von Cdk1/Cyclin B erforderlich ist.<sup>[28]</sup> Wir bezeichneten diesen

Ubiquitin-Ligase-Komplex wegen seiner Größe und seinen wichtigen Aufgaben bei der Regulation des Zellzyklus als Cyclosom.<sup>[28]</sup> Etwa zur gleichen Zeit isolierten Kirschner et al. aus Extrakten von *Xenopus*-Eiern einen ähnlichen Komplex und nannten ihn Anaphase-Promotorkomplex.<sup>[29]</sup> Durch parallel durchgeführte genetische Arbeiten an Hefe konnten Nasmyth et al. mehrere Untereinheiten des Anaphase-Promotorkomplexes/Cyclosoms (jetzt APC/C genannt) als Produkte von Genen identifizieren, die für den Austritt aus der Mitose erforderlich sind.<sup>[30]</sup> Die Entdeckung von APC/C war demnach einer Kombination biochemischer und genetischer Forschungen zu verdanken. Nachfolgende Arbeiten anderer Forscher haben gezeigt, dass APC/C auch am Abbau von mehreren anderen wichtigen Regulatoren des Zellzyklus beteiligt ist, z. B. von Securin, das den Beginn der Anaphase inhibiert (beschrieben in Lit. [31,32]). Darüber hinaus ist APC/C das Angriffsziel des Kontrollsystems für den Aufbau des Spindelapparats. Dieser wichtige Kontrollmechanismus sorgt dafür, dass die Schwesterchromatiden erst dann getrennt werden, wenn alle richtig mit der mitotischen Spindel verknüpft sind (beschrieben in Lit. [33]).

## 7. Die Rolle der *Scf*<sup>SKP2</sup>-Ubiquitin-Ligase beim Abbau des Cdk-Inhibitors *p27*<sup>Kip1</sup>

In jüngerer Zeit habe ich mich zusammen mit Michele Pagano mit der Frage befasst, auf welche Weise der Säugetier-Cdk-Inhibitor *p27*<sup>Kip1</sup> abgebaut wird. Dieser Inhibitor liegt in G0/G1 in hohen Konzentrationen vor und verhindert die Wirkung von Cdk2/Cyclin E und Cdk2/Cyclin A, die die Zellen in die S-Phase treiben. Nach der Wachstumsanregung durch mitogene Stoffe wird *p27* rasch abgebaut, sodass diese Kinasen den Eintritt in die S-Phase unterstützen können (beschrieben in Lit. [34]). Man hat nachgewiesen, dass *p27* durch das Ubiquitinsystem abgebaut wird.<sup>[35]</sup> Wir wollten das Ubiquitin-Ligase-System identifizieren, das *p27* für den Abbau markiert. Zunächst erkannten wir, dass sich die Verknüpfung von *p27* mit Ubiquitin in vitro in Extrakten von HeLa-Zellen zuverlässig reproduzieren lässt. So war die Verknüpfung von *p27* mit Ubiquitin in Extrakten aus wachsenden Zellen wesentlich schneller als in Extrakten aus G1-wachstumsgehemmten Zellen. Außerdem zeigte sich, dass die *p27*-Ubiquitin-Verknüpfung eine Phosphorylierung von *p27* an T187 durch Cdk2/Cyclin E in vitro<sup>[36]</sup> ebenso erfordert wie in vivo.<sup>[37]</sup> Nachdem wir bewiesen hatten, dass das zellfreie System die Charakteristik der *p27*-Ubiquitylierung in Zellen exakt wiedergibt, nutzten wir es zur Identifizierung der an diesem Prozess beteiligten Ubiquitin-Ligase (E3-Enzym). Da das *p27*-Substrat phosphoryliert werden muss, vermuteten wir, dass eine Ubiquitin-Ligase vom SCF-Typ (Skp1-Cullin1-F-box protein) beteiligt sein könnte. SCF-Komplexe bilden eine große Gruppe von Ubiquitin-Protein-Ligasen, deren unterschiedliche F-Box-Proteinuntereinheiten eine Vielzahl phosphorylierter Proteinsubstrate erkennen (beschrieben in Lit. [38]). Aufgrund der folgenden biochemischen Befunde haben wir nachgewiesen, dass Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) die spezifische F-Box-Protein-komponente eines SCF-Komplexes ist, der *p27* ubiquityniert.

liert: 1) Der Immunmangel von Extrakten aus proliferierenden Zellen mit einem Antikörper gegen Skp2 brachte die p27-Ubiquitin-Verknüpfungsaktivität zum Erliegen; 2) durch Zugabe von rekombiniertem, gereinigtem Skp2 zu diesen immunarmen Extrakten wurde die p27-Ubiquitin-Verknüpfung vollständig wiederhergestellt; 3) die spezifische Bindung von p27 an Skp2 hängt von der Phosphorylierung von p27 an T187 ab und konnte in vitro nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse, zusammen mit weiteren Beweisen, die Pagano und Mitarbeiter aus In-vivo-Studien erhalten hatten, ermöglichten den Nachweis, dass Skp2 die spezifische und geschwindigkeitsbestimmende Komponente eines SCF-Komplexes ist, der p27 für den Abbau markiert.<sup>[39]</sup> Bemerkenswerterweise schwankt auch die Konzentration von Skp2 im Zellzyklus; sie ist in G1 sehr niedrig, steigt beim Eintritt der Zellen in die S-Phase an und nimmt später wieder ab.<sup>[40]</sup> Diese Schwankungen des Skp2-Spiegels sind ein wichtiger Mechanismus zur phasenspezifischen Regulierung des p27-Abbaus im Zellzyklus.

Als nächstes haben wir versucht, aus gereinigten Komponenten das SCF<sup>Skp2</sup>-System zu rekonstituieren, das p27 an Ubiquitin bindet. Dabei entdeckten wir, dass neben den bekannten Bestandteilen (Cullin 1, Skp1, Skp2, Roc1, Cdk2/Cyclin E, E1 und das E2-Enzym Cdc34) ein weiterer Proteinfaktor für diese Reaktion erforderlich ist. Wir haben den fehlenden Faktor aus Extrakten von HeLa-Zellen gereinigt und durch massenspektrometrisches Sequenzieren sowie durch funktionelle Rekonstitution mit rekombiniertem Cks1-Protein als Cks1 (cyclin kinase subunit 1) identifiziert.<sup>[41]</sup> Cks1 gehört zur hochkonservierten Familie der Suc1/Cks-Proteine, die an manche Cyclin-abhängige Kinasen und phosphorylierte Proteine binden und für mehrere Übergänge im Zellzyklus von Bedeutung sind.<sup>[42]</sup> In einem vollständig gereinigten System stellte menschliches Cks1 im Gegensatz zu anderen Proteinen dieser Familie die p27-Ubiquitin-Bindung wieder her. Alle Proteine der Suc1/Cks-Familie haben zwar Cdk-bindende und Anion-bindende Stellen, aber nur Säugetier-Cks1 bindet an Skp2 und unterstützt die Assoziation von Skp2 mit dem an T187 phosphorylierten p27.<sup>[41]</sup> Eine andere Forschungsgruppe erhielt unabhängig davon ähnliche Ergebnisse.<sup>[43]</sup> In einer neueren Arbeit haben wir die Skp2-bindende Stelle von Cks1 durch ortsgerichtete Mutagenese kartiert und festgestellt, dass sie sich – gut getrennt von den beiden anderen Cks1-Bindungsstellen – in einer Region befindet, zu der auch die  $\alpha 2$ - und  $\alpha 1$ -Helices gehören. Alle drei Bindungsstellen von Cks1 werden für seine Wirkung als Promotor der p27-Ubiquitin-Verknüpfung und für die Assoziation von Skp2 mit T187-phosphoryliertem p27 benötigt.<sup>[44]</sup> Auf der Basis dieser und anderer Beobachtungen wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem Cks1 als ein für die Enzym-Substrat-Wechselwirkung erforderlicher Adapter fungiert: Der Skp2-Cks1-Komplex bindet an phosphoryliertes p27, hierfür wird die Anion-Bindungsstelle von Cks1 benötigt. Verstärkt wird die Affinität von Skp2 zum Substrat zudem durch Assoziation der Cdk-Bindungsstelle von Cks1 mit Cdk2/Cyclin E, an das phosphorylierte p27 fest gebunden ist.<sup>[44]</sup> Anzumerken ist, dass auch die Expression von Cks1 mit dem Zellzyklus schwankt<sup>[45,46]</sup> und damit einen zusätzlichen Mechanismus zur Regulierung des p27-Abbaus bietet.

## Schlussbemerkungen

Die Erforschung des Ubiquitinsystems hat seit ihren bescheidenen Anfängen einen langen Weg zurückgelegt, der hier beschrieben ist. Der Ubiquitin-vermittelte Abbau von positiv oder negativ wirkenden Regulatorproteinen betrifft zahlreiche Zellprozesse wie die Kontrolle der Zellteilung, die Signaltransduktion, die Transkriptionssteuerung, Immun- und Entzündungsreaktionen, die embryonale Entwicklung, die Apoptose und Zirkadianrhythmen, um nur einige zu nennen. Inzwischen zeigt sich auch, dass Fehlfunktionen Ubiquitin-vermittelter Prozesse an Erkrankungen wie bestimmten Karzinomen beteiligt sind, woraus sich auch eine therapeutische Rolle ableitet. Ich bin überzeugt davon, dass wir von den zahlreichen Funktionen des Ubiquitinsystems in der Gesunderhaltung und bei Krankheit bis jetzt erst die Spitze des Eisberges erkennen. Die wichtigste Lehre aus der Entdeckungsgeschichte des Ubiquitinsystems, die ich insbesondere jungen Forschern vermitteln möchte, ist die anhaltende Bedeutung der Biochemie in der modernen biomedizinischen Forschung. In seinem Buch *For the Love of Enzymes* teilte Arthur Kornberg die Geschichte der biomedizinischen Forschung in vier wichtige Zeitabschnitte ein. Am Anfang standen die „Mikrobenjäger“, die großen Mikrobiologen des 19. Jahrhunderts. Ihnen folgten die „Vitaminjäger“, die Entdecker der Vitamine. Danach kamen die „Enzymjäger“, d.h. die Biochemiker, gefolgt von den „Genjägern“ – den Molekulargenetikern. Allerdings sind die Zeiten der Enzym- (oder Protein-)jagd noch längst nicht vorbei. Mit dem Abschluss des menschlichen Genomprojekts sind zwar alle Gene „aufgespürt“, von nur etwa einem Drittel davon kennen wir aber die Aufgaben. Wenn wir wissen wollen, welche Rollen unsere übrigen Gene bei der Gesunderhaltung und bei Erkrankungen spielen, müssen wir auch in Zukunft von der Biochemie, in Verbindung mit der funktionellen Genetik, Gebrauch machen. Unsere Geschichte zeigt, dass das Ubiquitinsystem ohne biochemische Methoden nicht hätte entdeckt werden können. Durch die Genetik allein oder durch die Gensequenz des Ubiquitinsystems hätten wir keinen Hinweis auf die Markierungsmechanismen von Ubiquitin bekommen. Erst nachdem die zugrunde liegende Biochemie bekannt war, waren molekulargenetische Methoden für die Entdeckung der zahlreichen Funktionen des Proteolysestoffwechsels von Ubiquitin unentbehrlich. Mein Rat an junge Forscher in biomedizinischen Wissenschaften lautet daher: Wenn Sie ein Problem haben, das sich mit der Molekulargenetik allein nicht lösen lässt, scheuen Sie sich nicht, die Biochemie anzuwenden, zögern Sie nicht, den Kühlraum zu betreten, und haben Sie keine Angst, sich dem FPLC-Gerät zu nähern!

*In experimentellen Wissenschaften, einschließlich der Biochemie, werden Entdeckungen nicht von einer Einzelperson gemacht, sondern erfordern die Unterstützung durch engagierte Forschungsteams und die Hilfe von Freunden, Kollegen und Mitarbeitern. Ich hatte das große Glück, in meinem Laboratorium am Technion in Haifa über einen Zeitraum von mehr als 30 Jahren zu unterschiedlichen Zeiten von Dvora Ganoth, Hanna Heller, Esther Eytan, Sarah Elias, Clara Segal und von*



meiner Frau Judith mit Hingabe unterstützt zu werden. Von meinen früheren Doktoranden bewältigte Aaron Ciechanover während der spannenden Zeit der Entdeckung der Ubiquitin-Protein-Verknüpfung vor 25 Jahren ein enormes Pensum. Viele andere Doktoranden (zu viele, um hier alle zu nennen) haben später wichtige Beiträge zur grundlegenden Biochemie des Ubiquitinsystems und, in neuerer Zeit, über einige Aufgaben dieses Systems bei der Steuerung des Zellzyklus geleistet. Von meinen hier genannten befreundeten Kollegen spielte Irwin Rose eine ganz besondere Rolle. Meine Freundschaft zu Ernie begann während eines Forschungsjahres 1977/78 in seinem Laboratorium im Fox Chase Cancer Center in Philadelphia (siehe auch die biographischen Notizen am Beginn des Aufsatzes). In diesem Jahr am Fox Chase setzte ich meine in Haifa begonnenen Versuche zur Fraktionierung des Retikulozytensystems und zur Reinigung von Ubiquitin fort. Im folgenden Sommer 1979 lud Ernie mich zusammen mit meinem Doktoranden Aaron Ciechanover und meiner Forschungsassistentin Hanna Heller erneut in sein Laboratorium ein. Als wir dorthin kamen, wussten wir durch unsere Arbeiten in Haifa bereits, dass Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Prozess an Proteine bindet. Aber die Entdeckung, dass zwischen Ubiquitin und dem Substratprotein eine kovalente Amidbindung entsteht, machten wir zusammen mit Ernie Rose in jenem Sommer in Philadelphia. Ein am Ende dieses denkwürdigen Sommers 1979 am Fox Chase Center aufgenommenes Gruppenfoto zeigt die beteiligten Personen (Abbildung 13). Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Lit. [16] beschrieben.



**Abbildung 13.** Sommer 1979 am Fox Chase Cancer Center, Philadelphia. Sitzend von links nach rechts: Avram Hershko, Sandy Goldman, Jessie Warms, Hanna Heller. Stehend von links nach rechts: Zelda Rose, Arthur Haas, Aaron Ciechanover, Mary Williamson, Irwin Rose, Keith Wilkinson und Leonard Cohen (die anderen drei rechts stehenden Personen sind nicht namentlich bekannt).

Eingegangen am 19. Mai 2005

Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] R. Schoenheimer, S. Ratner, D. Rittenberg, *J. Biol. Chem.* **1939**, 130, 703–732.
- [2] R. Schoenheimer, *The Dynamic State of Body Constituents*, Harvard University Press, Cambridge, **1942**.
- [3] M. Rabinowitz, J. M. Fisher, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 91, 313–322.
- [4] R. T. Schimke, D. Doyle, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, 39, 929–976.
- [5] A. Hershko, G. M. Tomkins, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 710–714.
- [6] M. V. Simpson, *J. Biol. Chem.* **1953**, 201, 143–154.
- [7] A. Hershko, A. Ciechanover, A. Varshavsky, *Nat. Med.* **2000**, 6, 1073–1081.
- [8] A. Hershko, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 445–449.
- [9] K. D. Wilkinson, *Cell* **2004**, 119, 741–745.
- [10] J. D. Etlinger, A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 54–58.
- [11] A. Ciechanover, Y. Hod, A. Hershko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 81, 1100–1105.
- [12] K. D. Wilkinson, M. K. Urban, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 7529–7532.
- [13] G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, E. A. Boyse, D. H. Schlesinger, H. D. Niall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 11–15.
- [14] I. L. Goldknopf, H. Busch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 864–868.
- [15] A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1365–1368.
- [16] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, I. A. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1783–1786.
- [17] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425–479.
- [18] A. Ciechanover, H. Heller, R. Katz-Etzion, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 761–765.
- [19] A. Hershko, H. Heller, S. Elias, A. Ciechanover, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8206–8214.
- [20] A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1525–1528.
- [21] A. L. Haas, J. V. Warms, A. Hershko, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 2543–2548.
- [22] A. Hershko, H. Heller, E. Eytan, Y. Reiss, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11992–11999.
- [23] A. Hershko, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15237–15240.
- [24] T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Distel, T. Hunt, *Cell* **1983**, 33, 289–396.
- [25] M. Dorée, T. Hunt, *J. Cell Sci.* **2002**, 115, 2461–2464.
- [26] F. C. Luca, J. V. Ruderman, *J. Cell Biol.* **1989**, 109, 1895–1909.
- [27] A. Hershko, D. Ganioth, V. Sudakin, A. Dahan, L. H. Cohen, F. C. Luca, J. V. Ruderman, E. Eytan, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 4940–4946.
- [28] V. Sudakin, D. Ganioth, A. Dahan, H. Heller, J. Hershko, F. C. Luca, J. V. Ruderman, A. Hershko, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 185–198.
- [29] R. W. King, J. M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, M. W. Kirschner, *Cell* **1995**, 81, 279–288.
- [30] S. Irmiger, S. Piatti, C. Michaelis, K. Nasmyth, *Cell* **1995**, 81, 269–277.
- [31] W. Zachariae, K. Nasmyth, *Genes Dev.* **1999**, 13, 2039–2058.
- [32] J. M. Peters, *Mol. Cell* **2002**, 9, 931–943.
- [33] R. Bharadwaj, H. Yu, *Oncogene* **2004**, 23, 2016–2027.
- [34] J. Slingerland, M. Pagano, *J. Cell. Physiol.* **2000**, 183, 10–17.
- [35] M. Pagano, S. W. Tam, A. M. Theodoras, P. Beer-Romano, G. Del Sal, V. Chau, P. R. Yew, G. F. Draetta, M. Rolfe, *Science* **1995**, 269, 682–685.
- [36] A. Montagnoli, F. Fiore, E. Eytan, A. C. Carrano, G. F. Draetta, A. Hershko, M. Pagano, *Genes Dev.* **1999**, 13, 1181–1189.
- [37] J. Vlach, S. Hennecke, B. Amati, *EMBO J.* **1997**, 16, 5334–5344.
- [38] R. J. Deshaies, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, 15, 435–467.
- [39] A. Carrano, E. Eytan, A. Hershko, M. Pagano, *Nature Cell Biol.* **1999**, 1, 193–199.
- [40] J. Lisztwan, A. Marti, H. Sutterluti, M. Gstaiger, C. Wirbelauer, W. Krek, *EMBO J.* **1998**, 17, 368–383.
- [41] D. Ganioth, G. Bornstein, T. K. Ko, B. Larsen, M. Tyers, M. Pagano, A. Hershko, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 321–324.

- [42] J. W. Harper, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, R431–R435.  
 [43] C. Spruck, H. Strohmaier, M. Watson, A. P. L. Smith, A. Ryan, W. Krek, S. I. Reed, *Mol. Cell* **2001**, *7*, 639–650.  
 [44] D. Sitry, M. A. Seeliger, T. K. Ko, D. Ganeth, S. E. Breward, L. S. Itzhaki, M. Pagano, A. Hershko, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42233–42240.  
 [45] H. E. Richardson, C. S. Stueland, J. Thomas, P. Russel, S. I. Reed, *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1332–1344.  
 [46] T. Bashir, N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, M. Pagano, *Nature* **2004**, *428*, 190–193.

# Quality counts...

The best of chemistry every week



**Wiley-VCH**

P.O. Box 10 11 61  
 69451 Weinheim  
 Germany

Phone +49 (0) 6201–606-400  
 Fax +49 (0) 6201–606-184  
 e-mail: [angewandte@wiley-vch.de](mailto:angewandte@wiley-vch.de)

[www.angewandte.org](http://www.angewandte.org)

**Angewandte Chemie International Edition** is a journal of the GDCh, the German Chemical Society

**GDCh**

**WILEY-VCH**