

# Intrazellulärer Proteinabbau: von einer ungenauen Vorstellung vom Lysosom und Ubiquitin-Proteasom-System bis hin zu menschlichen Krankheiten und zum Wirkstoff-Targeting (Nobel-Vortrag)\*\*

Aaron Ciechanover\*

**Z**wischen den 50er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts befassten sich Biochemiker und Molekularbiologen in der Hauptsache damit, wie genetische Information der DNA in RNA umgeschrieben und dann in Proteine übersetzt wird – wie diese Proteine abgebaut werden, blieb hingegen eine lange vernachlässigte Frage. Nach der Entdeckung des Lysosoms durch Christian de Duve ging man davon aus, dass zelluläre Proteine in dieser Organelle abgebaut werden. Es gab zwar einige experimentelle Hinweise, dass die intrazelluläre Proteolyse nicht-lysosomal abläuft, der Mechanismus blieb aber unbekannt. Gelöst wurde das Rätsel mit der Entdeckung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Wir wissen heute, dass der Abbau intrazellulärer Proteine an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt ist, darunter Zellzyklus und Zellteilung, Bereitstellung von Transkriptionsfaktoren und zelluläre Qualitätskontrolle. Es überrascht daher nicht, dass Anomalien dieses Systems mit der Pathogenese menschlicher Erkrankungen wie Tumoren und neurodegenerativen Störungen in Verbindung gebracht wurden. Entsprechend intensiviert hat man in der Folge Bemühungen, Wirkstoffe auf Basis dieses Pathogenesemchanismus zu entwickeln.

## Stichwörter:

Lysosom · Nobel-Vortrag · Proteasom · Proteinabbau · Ubiquitin

## Aus dem Inhalt

1. Biographische Notizen	6095
2. Einleitung	6108
3. Das Lysosom und der intrazelluläre Proteinabbau	6109
4. Die Lysosomen-Hypothese wird angefochten	6111
5. Das Ubiquitin-Proteasom-System	6113
6. Schlussbemerkungen	6116

## 1. Biographische Notizen

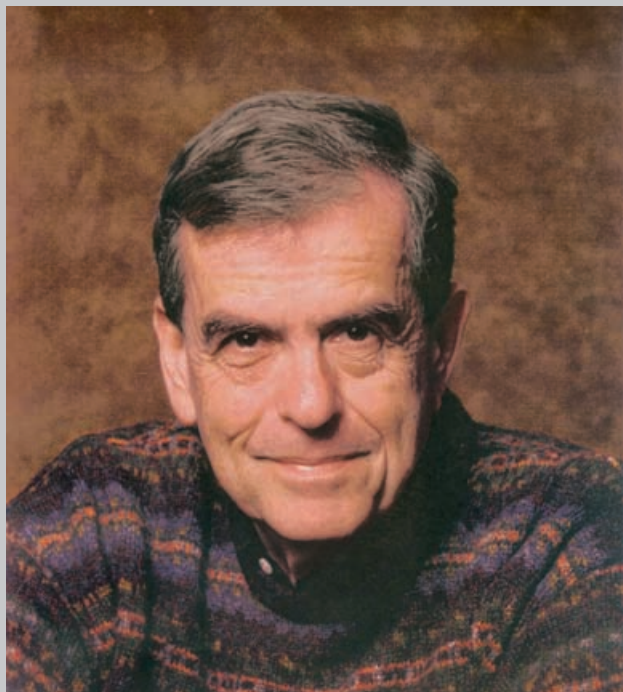
### Prägende Jahre – eine Kindheit im neu gegründeten Staat Israel

Ich wurde im Oktober 1947 in der nordisraelischen Hafenstadt Haifa geboren, einen Monat bevor Israel von den Vereinten Nationen als unabhängiger Staat anerkannt wurde. Es gingen noch einige Monate ins Land, bis die notwendigen staatlichen Einrichtungen aufgebaut waren, die Briten das Land verließen und es dann am 15. Mai 1948 soweit war, dass David Ben-Gurion, der erste Premierminister des Landes, Israel als demokratischen Staat und als Heimat für alle Juden der Welt proklamierte. Die benachbarten, aber auch die weiter entfernten arabischen Länder, zusammen mit mächtigen arabischen Parteien im Innern, akzeptierten die UN-Resolution nicht und beschlossen, mit Gewalt einzugreifen. Ein blutiger und kostspieliger Krieg brach aus, der mehr als ein Jahr dauerte und über 1 % der

Bevölkerung des neu gegründeten und wehrlosen Staates das Leben kostete. Ich glaube, meine ersten beiden Lebensjahre (1947–1949) waren eine ausgesprochen schwierige Zeit für meine Eltern Bluma (geborene Lubashevsky) und Yitzhak, die als Heranwachsende mit ihren Familien Mitte der 20er Jahre aus Polen eingewandert waren. Warum verließen meine

[\*] Dr. A. Ciechanover  
Faculty of Medicine  
Technion–Israel Institute of Technology  
Efron Street, Bat Galim  
P.O. Box 9649, Haifa 31096 (Israel)  
Fax: (+972) 4-852-3947  
and  
(+972) 4-851-3922  
E-mail: c\_tzachy@netvision.net.il

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



Familien Polen, ihr Zuhause und ihre Arbeitsplätze, Verwandte und Freunde, all ihr Hab und Gut, um ihre Heimat in einem Land mit einer unsicheren Zukunft zu suchen, das Teil des Britischen Empires war? Sie waren Idealisten, die begeistert dem Ruf der um die Jahrhundertwende von Benjamin Ze'ev Herzl begründeten zionistischen Bewegung und seiner Vision vom jüdischen Staat folgten: das Land zu besiedeln und es, nach zweitausend Jahren der Diaspora, seit der Zerstörung des zweiten Tempels in Jerusalem, zur Heimat aller Juden zu machen. Nach dem Jüdischen Kongress 1896 in Basel schrieb Herzl, er habe „in Basel den jüdischen Staat gegründet!“ Damals gehörte Israel zum Osmanischen Reich, 1917 wurde es Teil des Britischen Empires. Meine Eltern entstammten religiösen Familien, und die Emigration hatte, so glaube ich, ebenfalls religiöse Wurzeln. Während der Diaspora haben die Juden nie aufgehört, von einem eigenen Land zu träumen, ein Traum, der sich auf eine biblische Verfügung und Verheißung gründet:

„So spricht Gott der Herr: Ich hole die Israeliten aus den Völkern heraus, zu denen sie gehen mussten; ich sammle sie von allen Seiten und bringe sie in ihr eigenes Land“ (Ezechiel 37, 21); „Sie werden in dem Land wohnen, das ich meinem Knecht Jakob gegeben habe und in dem ihre Väter gewohnt haben. Sie und ihre Kinder und Kindeskinde werden für immer darin wohnen“ (Ezechiel 37, 25); „Ich will über Jerusalem jubeln und mich freuen über mein Volk. Nie mehr hört man dort lautes Weinen und lautes Klagen“ (Jesaja 65, 19); „Sie werden Häuser bauen und selbst darin wohnen; sie werden Reben pflanzen und selbst ihre Früchte genießen“ (Jesaja 65, 21).

Der Zeitpunkt der Staatsgründung ergab sich aus den geschichtlichen Ereignissen zu Beginn des 20. Jahrhunderts, denn trotz jahrhundertelanger Verfolgung und Diskriminie-

rung in Europa war die alte Idee, einen jüdischen Staat zu gründen, nur der Traum weniger gewesen. Nur kleine Gruppen von Juden ließen sich während des 18., 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Israel nieder. Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts, mit den Ideen von Herzl und den Einwanderungsbewegungen, die schließlich zur Balfour-Deklaration führten (nach dem britischen Außenminister Balfour, der sich 1917 für die Errichtung einer „nationalen Heimstätte“ des jüdischen Volkes aussprach), begann eine aktive zionistische Bewegung zu entstehen, die später den Traum zur Wirklichkeit werden ließ. Dennoch bedurfte es viel Mutes der europäischen Juden, fast ohne Ressourcen oder Unterstützung eine Heimstatt in einem Land zu errichten, von dem sie zweitausend Jahre lang geträumt hatten, das zu dieser Zeit aber nicht das ihre war. Beschleunigt wurde der Prozess durch die dunklen Wolken, die über Europa aufzogen und im Holocaust endeten. Viele Angehörige meiner Eltern immigrierten noch vor dem Holocaust nach Israel, diejenigen jedoch, die zurückblieben, wurden von den mörderischen Deutschen und ihren polnischen Kollaborateuren umgebracht. Dass die zionistische Bewegung gerade zu jener Zeit zwischen 1947 und 1948 in einen Staat mündete, war ohne Zweifel eine unmittelbare Folge des Holocaust – die jüdische Nation erhob sich symbolisch aus der Asche.

Mein Vater war Angestellter in einer Anwaltskanzlei (später studierte er, so wie auch mein Bruder, Jura und wurde selbst Anwalt), meine Mutter war Hausfrau und Englischlehrerin. Mein Bruder Joseph (Yossi), der 14 Jahre älter ist als ich, leistete bereits seinen Wehrdienst, als ich 4 Jahre alt war, das Alter, in das meine Erinnerung zurückreicht. Ich wuchs in Haifa auf und genoss die wunderbaren Strände und den nahen Karmelberg, der dort in das Mittelmeer ausläuft. Ich erinnere mich, dass meine Eltern mich zuhause von klein an zum Lernen angehalten hatten. Mein Vater arbeitete hart, um uns die beste Ausbildung zukommen zu lassen, die möglich war. Er war zugleich Angehöriger der Haganah, einer vorstaatlichen Miliz, die gegen die Briten und für einen unabhängigen jüdischen Staat kämpfte. Die Kanzlei, in der er arbeitete, lag im arabischen Teil der Stadt, sodass er auf seinem Weg zur Arbeit während der Feindseligkeiten vor dem Krieg und später im Krieg selbst täglich sein Leben aufs Spiel setzte. Mein Bruder Joseph erzählte mir später, dass die Familie täglich auf dem Balkon Ausschau hielt, bis Vater wohlbehalten heimkam. Zuhause verbrachte er jede freie Minute mit klassischer Literatur, jüdischen Religionsgesetzen (Mischnah und Talmud) und modernen Gesetzbüchern. Judentum und Zionismus nahmen einen wichtigen Teil unserer häuslichen Erziehung ein. Bezüglich des Jüdischen erhielten wir eine liberale, moderne orthodoxe Erziehung. Jeden Samstag und an den Feiertagen besuchten wir den Gottesdienst in der Synagoge und begingen alle jüdischen Feiertage. Überflüssig zu sagen, dass meine Mutter eine koschere Küche führte.

Für meine Eltern hatte es eine große Bedeutung, uns als Nachkommen stolzer israelischer Juden in ihrem eigenen unabhängigen Land zu erziehen. Mein Vater hinterließ mir seine Liebe zu Jüdischen Studien und jüdischem kulturellem Leben. Zusammen mit Mediziner- und Wissenschaftlerkolle-

gen besuche ich bis auf den heutigen Tag den Rabbinerunterricht, der uns die Einstellung der jüdischen Gesetze zu moralischen und ethischen Fragen der modernen Medizin und Naturwissenschaften lehrt. Jüdischer Kantor, aus dem die Gebete von Juden aus vielen Jahrhunderten klingen, wurde zu meiner liebsten Musik, und ich suche eifrig nach Aufnahmen auf Flohmärkten, in Gebrauchtläden und bei Auktionen. Auch schmücken viele Judaica mein Studierzimmer.

Meine Eltern trugen auch dafür Sorge, dass wir eine exzellente allgemeine Erziehung erhielten. Mein Vater sprach mehrere Sprachen fließend: Hebräisch, Polnisch, Arabisch, Französisch, Englisch, Deutsch und Jiddisch, und ich sollte die gleiche tiefe Liebe zu Büchern entwickeln wie er (unser Haushalt war zwar nicht reich, doch hatten wir eine riesige Bibliothek). Meine Eltern liebten auch klassische Musik und so besaßen wir eine große Sammlung alter Schellack- und Langspielplatten. Ich erinnere mich, dass Bizets *Carmen* mehr als zwanzig 78er RCA-Schellackplatten beanspruchte.

Das scheinbar friedliche Leben unserer Familie in Israel (wenn auch unter britischer Herrschaft) während der Jahre des Holocausts in Europa wurde vom Mord an unseren Verwandten und an den Familien unserer Freunde überschattet, die aus Europa nicht rechtzeitig entkommen konnten. In den Augen meiner Eltern war die Gründung des Staates Israel als ein unabhängiger und souveräner jüdischer Staat die direkte historische Folge des Holocausts in Europa und ein Ausdruck des alten Schwurs „*Nie wieder darf Massada fallen!*“ (Massada war eines der letzten jüdischen Bollwerke während des Römischen Reiches; es fiel den Römern in die Hände, nachdem alle seine Verteidiger Selbstmord begangen hatten). Sie prägten in uns die Vorstellung, dass der jüdische Staat uns nicht nur als ein freies Volk schützt, sondern uns die Möglichkeit gibt, unsere eigene, einzigartige Kultur zu entfalten, statt als Minderheit in der Diaspora, verstreut über viele Länder der Erde zu leben.

### Meine erste Liebe zur Biologie

Von klein an erinnere ich mich an meine große Leidenschaft für die Biologie. Ich weiß noch, wie ich am Karmelberg Blumen pflückte und sie zwischen den Seiten des schweren Babylonischen Talmuds meines Bruders trocknete. Ich werde nie seine Wut vergessen, wie er diesen Ausdruck meiner Naturliebe versteckt zwischen alten jüdischen Abhandlungen fand. Es folgten Schildkröten und Eidechsen und Chlorophyll, das ich mit Alkohol aus Blättern extrahierte. Von einer Reise nach England brachte mir mein Bruder mein erstes Mikroskop mit, als ich elf Jahre alt war. Mit diesem Mikroskop entdeckte ich Zellen in dünnen Zwiebelhäutchen und vollführte mein erstes Experiment zur Osmose, indem ich die Volumenänderung der Zellen beobachtete, nachdem ich das Häutchen in Salzlösungen unterschiedlicher Stärke getaucht hatte. Einmal versuchte ich zusammen mit Freunden, eine selbstangetriebene Rakete abzuschießen. Die Sammlung von Blumen wurde immer größer und teilte sich inzwischen auf mehrere Alben auf, dazu kam eine kleine Sammlung von Skeletten: von Fischen, Fröschen, Kröten, Schlangen, Schild-

kröten; sogar einige menschliche Knochen waren darunter, die ich von einem älteren Freund bekommen hatte, der Medizin studierte.

Nach diesen Jahren der Prägung beschloss ich, meiner Liebe zur Biologie ernsthaft nachzugehen und belegte Biologie als Hauptfach in der High School. Meine Jahre in der Grundschule (1953–1959) und in der Unterstufe (1959–1962) waren weitgehend ereignislos und ohne weitere Gedanken über meine Zukunft an mir vorbeigegangen – nicht so aber die beiden letzten Jahre an der Hugim High School in Haifa (1963–1965), denn ich hatte wunderbare und inspirierende Lehrer in Biologie (Naomi Nof), Chemie (Na'ama Greenspon) und Physik und Mathematik (Harry Amitay). Die Biologie war damals eine hauptsächlich deskriptive Wissenschaft: Während wir zwar durchaus den Mechanismus der Umwandlung von Glucose zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und die Energiegewinnung in Hefen und Säugern studierten (und den gegenläufigen Prozess der Photosynthese in Pflanzen) und uns mit einfachen graphischen Darstellungen mitotischer und meiotischer Zellteilungen vertraut machten, befassten sich die meisten unserer Arbeiten mit der Flora und Fauna der Region, mit vergleichender Zoologie (ich erinnere mich noch gut, welcher Aufwand zu betreiben war, um sich die zwölf Unterschiede zwischen Kröte und Frosch oder dem Kreislaufsystem und dem Skelettaufbau von Katze und Hund einzuprägen) und mit den Grundlagen menschlicher Anatomie und Physiologie (z.B. wie der Skelettaufbau den aufrechten Gang des Menschen ermöglicht). Pathogenesemechanismen waren kein Thema, und die DNA-Struktur und der genetische Code fanden erst gegen Ende meiner Schulzeit 1964/65 Eingang in die Lehrbücher. Auf der anderen Seite schienen mir, etwas naiv vielleicht, die Chemie und Physik als sehr mechanistische Disziplinen, auf solidem mathematischem Fundament ruhend. Von daher rührte mein Gefühl, dass meine Zukunft eher in der Biologie läge. Ich wollte die grundlegenden Mechanismen, über die damals so wenig bekannt war, entschlüsseln. Dann wieder erschienen mir die biologischen und pathologischen Vorgänge so überwältigend komplex, fast jenseits unseres Begriffsvermögens und nachgerade einschüchternd. Ich fühlte mich von den Geheimnissen der Biologie angezogen, spürte zugleich aber Furcht, mich darin zu verlieren. Und ich hatte niemanden, den ich zu Rate ziehen konnte, der mir helfen konnte, meine Gedanken zu ordnen. Zwischen dem weithin Unbekannten in der Biologie und der in meiner naiven Vorstellung wohlfundierten Physik und Chemie schwankend, erschien mir schließlich das Studium der Medizin als ein guter Kompromiss. Die Medizin erschien mir zwar als noch komplexer als die Biologie, bot auf der anderen Seite aber faszinierende Perspektiven. Ich fand großen Gefallen an dem Gedanken, einmal Krankheiten heilen oder zumindest vorübergehend lindern zu können. Hinzu kamen zweckmäßige Überlegungen, da ich zu jenen Jahren beide Elternteile verloren hatte (meine Mutter starb 1958, mein Vater 1964). Ihr Tod bedeutete für mich, dass ich einen Weg finden musste, auf eigenen Füßen zu stehen. Nach dem Tod meiner Mutter lebte ich bei meinem Vater, der sich hingebungsvoll um mich kümmerte. Als er einige Jahre später starb, nahm mich meine inzwischen verstorbene Tante



Miriam (Wishniak, die Schwester meiner Mutter), mit der Unterstützung meines Bruders, in ihrem Zuhause in Haifa auf, sodass ich die Schule ohne Unterbrechung in der gleichen Klasse, und ohne von meinen Freunden getrennt zu werden, abschließen konnte. Die andere Option, zu meinem Bruder nach Tel Aviv zu ziehen, wäre mit sehr viel mehr Umständen verbunden gewesen. Die Unterstützung der beiden war für mich ein großes Glück, denn im nachhinein gesehen wäre der Weg für einen allein gelassenen Sechzehnjährigen in die Jugendkriminalität kürzer gewesen als der zum Schulabschluss.

### ***Von der Liebe zur Biologie zur wissenschaftlichen Laufbahn***

Mit dem nahenden Schulabschluss stand eine Entscheidung über meinen weiteren Weg an: Der normale Lauf der Dinge hätte mich, wie die meisten Israelis, zu den israelischen Streitkräften geführt, ein Dienst am Land, den wir alle gerne erfüllen mochten. Als Alternative zum normalen Wehrdienst bietet die Armee bestimmten Schulabgängern an, ihren Dienst aufzuschieben und zuerst eine universitäre Ausbildung zu absolvieren, vor allem in militärisch wichtigen Fächern, etwa in Medizin und verschiedenen Ingenieurs- und naturwissenschaftlichen Disziplinen. Da ich auf keine finanzielle Unterstützung seitens einer Familie bauen konnte, hielt ich es für das beste, so bald als möglich einen praktischen Beruf zu erlernen. Wie schon erwähnt, bildete das Studium der Medizin in meinen Augen auch einen Kompromiss zwischen der Komplexität und den Geheimnissen der biologischen Mechanismen und den nach meiner Meinung bereits „abgearbeiteten“ Fächern Physik und Chemie. Was mich außerdem an der Medizin faszinierte, war meine damalige Vorstellung, jede Krankheit könne geheilt werden. Als Kinder litten wir unter Erkrankungen, die uns nur kurz beeinträchtigten, wie Grippe und Masern; die tödlichen Krankheiten, denen Ärzte wie Wissenschaftler oft auch heute noch hilflos gegenüberstehen – Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen – waren nicht präsent. Ich hatte damals noch nicht erkannt, um wieviel mehr als die Biologie die Medizin eine beschreibende Wissenschaft ist. Zur Auflösung meines Dilemmas kam der praktische Umstand hinzu, dass ein Studium der Biologie nicht unter die militärische Aufschubregelung fiel.

So wurde ich nach einem harten Auswahlverfahren an der seinerzeit einzigen Medical School Israels, dem Hadassah-Spital der Hebräischen Universität in Jerusalem aufgenommen. Die ersten vier Jahre (1965–1969) waren aufregend. Wir studierten allgemeine und klinische Wissenschaften, und ich freundete mich ernstlich mit dem Gedanken an, mich in Biochemie und Pharmakologie zu vertiefen. Gegen Ende des vierten Jahres, als uns zum ersten Mal Patienten vorgestellt wurden, begann ich zu zweifeln, ob ich die richtige Wahl getroffen hatte und tatsächlich ein praktizierender Arzt werden wollte. Das Missverhältnis zwischen einer weit entwickelten Phänomenologie und den kaum bekannten Pathogenesemechanismen und das Fehlen jeglicher kausaler Therapie für die meisten lebensbedrohlichen Erkrankungen

brachten mich letztlich zu der Überzeugung, dass ich auf dem falschen Weg war. Ich wurde unruhig und erkannte allmählich, wie wenig wir wissen, wie deskriptiv unser Verständnis von Krankheitsmechanismen und Pathologie ist und wie sehr unsere Therapie am Symptom statt an der Ursache ausgerichtet ist. Der Ausspruch „mit Gottes Hilfe“, den ich so oft von Patienten hörte, die um Heilung und Gesundheit beteten, erhielt eine reale Bedeutung. Ich hatte das Gefühl, dass die klinische Medizin mich langweilen würde, und ich entschloss mich ein Jahr auszusetzen, um „echte“ Grundlagenforschung auszuprobieren.

Die medizinische Fakultät bot ein spezielles Einjahresprogramm für die wenigen an, die in die Grundlagenforschung eintauchen wollten. Ich wählte die Biochemie als mein Hauptfach, musste aber noch meinen Bruder davon überzeugen, dass ich das Richtige tat, denn ich benötigte seine Hilfe, um meinen Wehrdienst um ein weiteres Jahr aufzuschieben. Das war nicht einfach, denn auch er hatte einen „Traum“ – er wollte mich auf eigenen Beinen stehen sehen, in einem Beruf, der mir ein Auskommen verschaffte, und das konnte im traditionellen jüdischen Geiste nur der des praktizierenden Arztes sein – trotzdem gelang es mir letztlich, ihn zu überzeugen. Während dieses Jahres (1969/70) untersuchte ich unter der Anleitung erstklassiger Biochemiker wie Jacob Bar-Tana und Benjamin Shapira Mechanismen der  $\text{CCl}_4$ -induzierten Fettleber im Rattenmodell. Ich entdeckte, dass dieser Zustand zumindest teilweise durch eine gesteigerte Aktivität der Phosphatidsäurephosphatase, eines Schlüsselenzyms der Di- und Triglycerid-Biosynthese, hervorgerufen wird. Nach Abschluss dieses Jahres (und dem Erwerb des M.Sc.) wusste ich, dass ich mit der Biochemie eine neue Liebe gefunden hatte. Jacob und Benjamin führten mich durch das aufregende Labyrinth biochemischer Reaktionspfade, und ich war wie mystifiziert. Um mein Versprechen meinem Bruder gegenüber einzuhalten und aufgrund meiner Verpflichtungen gegenüber der israelischen Armee, beendete ich zunächst dennoch die klinische Ausbildung (1970–1972) und machte meinen Abschluss an der Medical School.

Um meine Approbation zu erlangen, musste ich ein weiteres Jahr in wechselnden Abteilungen zubringen. Damals erzählten mir die Kollegen, dass ein junger begabter Biochemiker, Dr. Avram Hershko, gerade seinen Postdoc-Aufenthalt bei Gordon Tomkins an der University of California in San Francisco (UCSF) beendet hatte und vom Dekan und Begründer der neu aufgebauten medizinischen Fakultät am Technion in Haifa, dem inzwischen verstorbenen Professor David Ehrlich, angeworben worden war, um eine biochemische Abteilung aufzubauen. Ich schrieb an Avram mit dem Gedanken, nach Haifa zurückzukehren, dort mein ärztliches Praktikum abzuleisten und meine medizinische Doktorarbeit unter seiner Anleitung anzufertigen. Ich brauchte nur eine kleine Arbeit bei der Medical School vorzulegen, um diesen Teil der Voraussetzungen für den Hochschulabschluss zu erfüllen. Typischerweise schreiben die meisten Medizinstudenten eine statistische Arbeit über laufende Behandlungen und Verfahren; ich selbst wollte aber zurück ins Labor und ein weiteres Forschungsprojekt in Angriff nehmen. Tatsächlich nahm mich Avram als Doktorand an, und so begannen im

Oktober 1972 unsere mehr als drei Jahrzehnte dauernden gemeinsamen Forschungen.

Avram war sich über seine eigene Hauptforschungsrichtung noch nicht endgültig im Klaren, und wir diskutierten zwei Themen für meine Doktorarbeit. Ein naheliegendes Thema war, den ATP-abhängigen Tyrosin-Aminotransferase(TAT)-Proteolyseweg weiter aufzuklären. Avram hatte seine eigene Reise in die Welt der intrazellulären Proteolyse bei Gordon begonnen und entdeckt, dass der Abbau der gluconeogenetischen Enzyme in Zellen energieabhängig ist. Damit bestätigte er einen früheren Befund von Simpson, der in den frühen 50er Jahren nachgewiesen hatte, dass der Abbau der gesamten Population zellulärer Proteine in Leberschnitten Energie benötigt, wobei der Mechanismus dieses thermodynamisch paradoxen Vorgangs noch unklar geblieben war.

Das zweite zur Auswahl stehende Thema war, die an der pleiotropen Antwort der Zelle beteiligten Mechanismen zu untersuchen; die pleiotrope Antwort ist die direkte Reaktion von G0-synchronisierten Zellen unter Serummangel auf die Zugabe von Serum. Während seines Forschungsaufenthaltes bei Gordon hatte Avram herausgefunden, dass die schnelle Aufnahme von Nucleotiden, Aminosäuren und Phosphat zu den vielen stimulierten Vorgängen gehört. Da ich während meiner Untersuchungen an der Fettleber Erfahrungen mit Lipiden gesammelt hatte und Avram der Meinung war, die Aufklärung des TAT-Proteolysemechanismus sei zu kompliziert für eine kurze Dissertation in Medizin, entschlossen wir uns, den Studien zum pleiotropen Effekt ein weiteres Bruchstück hinzuzufügen und den Effekt von Serum auf die Phospholipidsynthese zu analysieren.

Unsere Annahme war, dass sich die Zellmembranen nach Zugabe von Serum stark verändern und dass sich dies im Phospholipid-Stoffwechsel widerspiegelt. Tatsächlich konnten wir wenige Minuten nach Serumzugabe einen drastisch gestiegenen Umsatz der Phosphoinositolgruppe am Diglycerolgerüst nachweisen. Eine Literaturrecherche ergab, dass bei verschiedenen Zellen eine ähnliche Reaktion auf viele unterschiedliche Stimuli auftritt; Beispiele sind parasymphatische sekretorische Zellen, die auf Acetylcholin reagieren, und Schilddrüsenzellen, die auf ihr Hormon, das Thyreotropin (TSH), ansprechen. Das Forschungsjahr 1972/73 überzeugte mich schließlich, eine Laufbahn in der Biochemie einzuschlagen (de facto verbrachte ich kein komplettes Jahr mit diesen Studien, sondern erledigte sie neben meinem Praktikum in den wechselnden Abteilungen des Krankenhauses; im Labor arbeitete ich an meinen freien Abenden, nachts, an Wochenenden und Feiertagen). Zuvor aber hatte ich noch drei Jahre Militärdienst abzuleisten (1973–1976).

#### **Wehrdienst und berufliche Laufbahn – ergab sich ein Interessenskonflikt?**

Nach meiner Promotion war es an der Zeit, meine Schuld am Land zu begleichen und in die israelischen Streitkräfte einzutreten. Ich diente drei Jahre (1973–1976), und ich diente gerne. Der Wehrdienst ist seit jeher ein integraler und

wichtiger Bestandteil im Leben eines Israeli; er gilt als „Eintrittskarte“ für das soziale Leben und gibt einem das Gefühl der Gemeinsamkeit und des Teilens, denn jeder nimmt am Schutz dieses Landes und seiner Einwohner teil. Außerdem war der Dienst selbst ausgesprochen interessant, sowohl technisch gesehen als auch unter sozialen und historischen Eindrücken. Technisch gesehen deshalb, weil ich in interessanten Einheiten diente, und sozial, weil der Militärdienst eine wundervolle menschliche Erfahrung ist, ein Schmelztiegel, in dem wahre Freundschaften in harten Zeiten geschlossen werden, Freundschaften, die tief, echt und dauerhaft sind.

Meine Dienstjahre fielen in eine interessante historische Periode, und zunächst diente ich in der Marine als Arzt bei der Raketenbootflotte. Es war im Jahr 1973, unmittelbar nach dem Yom-Kippur-Krieg, und Israel stand vor dem Problem, seine südlichen Grenzen schützen zu müssen, das Rote Meer und die Meeresenge von Tiran bei Sharm el Sheikh, die zum Hafen von Elat führt. Diese wurden von den arabischen Anrainerstaaten des Roten Meeres bedroht, in erster Linie von Saudi-Arabien und Ägypten, aber auch von Jemen und Somalia, und Israel war gezwungen, den Arm seiner Marine in die Region auszustrecken. Dazu mussten Raketenboote von den Hauptmarinestützpunkten im Mittelmeer zum Roten Meer verlegt werden. Israel hatte seinerzeit noch keine diplomatischen Beziehungen zu Ägypten, und der Suezkanal war außerdem durch Schiffe blockiert, die die Ägypter im Sechstagekrieg im Juni 1967 versenkt hatten. So mussten die Boote aus dem Mittelmeer hinaus und rund um Afrika von Haifa nach Elat gebracht werden. Ich war Schiffsarzt auf der „Reshef“, einem von zwei modernen israelischen Raketenbooten, die man auf diese Mission schickte. Man kann sich vorstellen, dass eine mehrere Wochen lange Reise, die zum großen Teil über offenes Meer führt, für ein kleines Raketenboot schwierig zu bewältigen und aus vielen Gründen risikoreich war. Abgesehen von der Versorgung mit Treibstoff und Verpflegung bewegten wir uns in feindlichen Gewässern, viele Meilen fort von zu Hause und außer Reichweite der israelischen Luftwaffe. Ein anderes Problem war medizinischer Natur: Wie behandelt man Notfälle, angefangen von möglichen Schussverletzungen bis hin zu „banalen“ Alltagsproblemen wie Blinddarmentzündungen auf einem kleinen Schiff, fern jeder medizinischen Einrichtung und mit begrenzten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten. Ich machte mir viele Sorgen – ein junger Arzt fast ohne klinische Erfahrung. Ich nehme an, dass dieses Unternehmen auch für einen viel erfahreneren Arzt als ich es war eine Herausforderung gewesen wäre. Zu meinem Glück verlief die Fahrt aber sehr ruhig.

Den Rest meines dreijährigen Wehrdienstes verbrachte ich in der Forschungs- und Entwicklungseinheit des medizinischen Corps, wo ich eine Reihe von ausgeklügelten Gerätschaften für Soldaten im Felde entwarf. Wegen der vielen Erfahrungen, die ich sammeln konnte, war der Wehrdienst die beste Schule für das „richtige“ Wissenschaftlerleben, das folgen sollte. Während der ganzen Zeit hielt ich engen Kontakt mit Avram und kam meinen Verpflichtungen als „externes“ Mitglied der Abteilung nach, denn während des

Urlaubs vom Militär hielt ich, zusammen mit anderen Kollegen der ständig wachsenden Abteilung, einen Kurs in klinischer Biochemie für Medizinstudenten im dritten Jahr. Ich sollte vor allem Michael „Mickey“ Fry erwähnen, mit dem ich bis heute eng befreundet bin, und meinen guten Freund und Kollegen Erela Gorin, der, viel zu früh, Anfang der 90er Jahre verstorben ist.

Im Jahr 1975, noch während meines Wehrdienstes, heiratete ich Menucha, die ebenfalls Ärztin und Absolventin der Tel Aviv University School of Medicine war und in der Inneren Medizin im Städtischen Hospital von Tel Aviv arbeitete. Die Hochzeit mit Menucha beendete meine rastlosen Jahre und ich hatte wieder das Gefühl, eine Familie und ein Heim zu haben. In all den Jahren seit dem Tod meines Vaters (1963–1975) hatte ich keine feste Bleibe, sondern pendelte zwischen meinem Bruder und meiner Tante in Haifa. Ich suchte nach einem festen Halt in meinem Leben, und Menucha mit ihrer ruhigen Art und ihrem warmherzigen Umgang, dazu unser schönes Appartement, gaben mir die Geborgenheit, die ich brauchte.

### Die Entdeckung des Ubiquitinsystems

Gegen Ende des Wehrdienstes hatte ich eine Entscheidung zu treffen, von der ich annehme, dass sie die wichtigste meiner Laufbahn war: Sollte ich mich als Arzt in klinischer Medizin niederlassen, vielleicht als Chirurg, was meine erste Wahl gewesen wäre, oder an die Hochschule zurückkehren und eine Forscherlaufbahn einschlagen? Ich entschied mich für die Wissenschaft, und es war eine klare Entscheidung. Über die klinische Medizin war ich desillusioniert, vor allem darüber, dass Krankheiten nicht mit dem Wissen um die Pathogenesemechanismen geheilt wurden. Zudem übte die Biochemie eine magische Anziehungskraft auf mich aus. Ich erhielt Unterstützung und Ermutigung von meiner Frau, die allmählich begriff, dass sie keinen Arzt mit glänzenden Karriereaussichten und breitem finanziellem Horizont geheiratet hatte, sondern einen Doktoranden mit ungewisser Zukunft.

Nach meiner Entlassung vom Militär im November 1976 und einem zweimonatigen Abstecher in die USA begann ich mit meiner Dissertation bei Avram Hershko. Da ich bereits mit ihm zusammengearbeitet hatte und ihn seit mehreren Jahren kannte, wusste ich, dass er ein ausgezeichnete Mentor sein musste. Seine Arbeitsgruppe befasste sich zu der Zeit vor allem mit der intrazellulären Proteolyse. Die Suche nach Mediatoren und Mechanismen der seruminduzierten pleiotropen Reaktion hatte Avram indessen aufgegeben. Im Mittelpunkt stand der Abbau von abnormem Hämoglobin in Retikulozyten, einem terminal differenzierenden roten Blutkörperchen. Dieses Modellsystem wählten wir deshalb, weil wir nach einem nicht-lysosomalen (und energieabhängigen) proteolytischen System suchten. In vielen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die regulierte Proteolyse intrazellulärer Proteine nicht-lysosomal verläuft, und die Retikulozyten enthalten keine Lysosomen mehr, da diese während der letzten Reifestadien entfernt werden, bevor die Zellen in

den Kreislauf freigesetzt werden. Aus anderen Arbeiten ging klar hervor, dass Retikulozyten ein solches proteolytisches System enthalten.

Im Sommer 1978 begegnete ich Dr. Alex Novikoff von der Yeshiva University School of Medicine in New York bei einer Gordon Conference über Lysosomen. Alex war neben Dr. Christian de Duve einer der Wegbereiter der Lysosomenforschung. Als ich ihm erzählte, dass wir gerade deshalb mit Retikulozyten arbeiteten, weil diese lysosomenfrei waren, reagierte er ärgerlich und wischte jedes Argument beiseite. Er erzählte mir, er habe Organellen in Retikulozyten charakterisiert (wenn auch morphologisch), die auf saure Phosphatase positiv ansprechen. Er händigte mir sogar die Publikation aus, in der er seinen Befund veröffentlicht hatte, und dass, obwohl nicht klar war, ob es sich um proteolytisch funktionelle Organellen handelte.

Ein anderer Grund für die Wahl von Retikulozyten als Modellsystem für die intrazelluläre Proteolyse war, dass während der letzten Reifungsstadien im Knochenmark, bevor die Zellen in den Kreislauf freigesetzt werden, ein massiver proteolytischer Ausbruch einen Großteil der Zellmaschinerie zerstört, was die Existenz eines effizienten proteolytischen Systems belegt. Schon früher hatten Rabinovitz und Fisher gezeigt, dass die Retikulozyten abnormes, durch Aminosäureanaloge verändertes Hämoglobin abbauen, doch der Mechanismus war noch unbekannt geblieben. Wir nahmen an, dass es der gleiche Mechanismus ist, der auch im natürlichen Reifungsprozess wirkt, ebenso wie bei der Entfernung natürlich auftretender Hämoglobinmutanten, die bei Hämoglobinopathien wie Thalassämie und Sichelzellenanämie synthetisiert werden. Diese wichtige Information – die Existenz eines nicht-lysosomalen proteolytischen Systems – machte die Verwendung von Retikulozyten zu einer naheliegenden Entscheidung.

Es war allerdings noch der Nachweis zu erbringen, dass der Prozess Energie benötigt. Nach einer ersten Charakterisierung des energieabhängigen Abbaus von abnormem Hämoglobin in der intakten Zelle (die Ergebnisse wurden 1978 im Tagungsband einer Proteolyse-Konferenz in Buffalo publiziert) war es der nächste Schritt, die Zellen aufzuschließen und die nicht-lysosomalen und ATP-abhängigen proteolytischen Enzyme zu isolieren und zu charakterisieren. Kurz vorher (1977) hatten Dr. Alfred Goldberg und sein Postdoc Dr. Joseph Etlinger von der Harvard Medical School erstmalig ein zellfreies Proteolysesystem aus Retikulozyten charakterisiert; da dies genau der Punkt war, von dem aus wir mit unseren Arbeiten beginnen wollten, übernahmen wir im Wesentlichen ihr System und passten es an unsere Erfordernisse an.

Ich möchte an dieser Stelle nicht im Einzelnen beschreiben, wie wir das Ubiquitinsystem enträtselten, sondern nur zwei entscheidende Entdeckungen während meiner fünfjährigen Doktorarbeit (1976–1981) bei Avram und Irwin A. „Ernie“ Rose hervorheben. Detaillierte Darstellungen finden sich in mehreren Übersichtsartikeln (siehe z. B.: A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 335–364) und im Haupttext dieses Nobel-Vortrages.

Die erste Beobachtung bezieht sich auf die Vielfältigkeit der enzymatischen Komponenten des Systems. Unser erstes Ziel bei der Aufreinigung der ATP-abhängigen „Protease“ war es, das Hauptprotein Hämoglobin aus dem Rohextrakt zu entfernen. Dazu trennten wir den Extrakt über einen Anionenaustauscher, wobei wir bereits die erste aufregende Entdeckung machten. Die proteolytische Aktivität fand sich weder im nicht-adsorbierten Material (der Fraktion I) noch in dem Material, das mit hoher Salzkonzentration eluiert wurde (der Fraktion II). Wir bemerkten jedoch, dass die Aktivität nach Rekonstitution des Systems aus den beiden Fraktionen wieder zurückkehrte. Aus diesem Experiment, das 1978 in den *Biochemical and Biophysical Research Communications* veröffentlicht wurde (nach meinem Dafürhalten die erste Publikation in einer langen Reihe von Arbeiten zum proteolytischen Ubiquitinsystem und eine von zwei oder drei Schlüsselpublikationen auf diesem Gebiet), leiteten wir zwei wichtige Aussagen ab: 1) Die Protease, nach der wir suchten, war kein „klassisches“ einzelnes Enzym, das spezifisch sein Substrat abbaut, sondern bestand aus mindestens zwei Komponenten. Bereits dies widersprach der damals herrschenden Auffassung, dass Proteolysesubstrate – fast ohne Ausnahme – von einzelnen Proteasen mit begrenzten, aber definierten Spezifitäten zumindest teilweise gespalten werden können. Inzwischen wissen wir, dass das Ubiquitinsystem aus mehr als eintausend Komponenten besteht. Nachdem die gültige Lehrmeinung erst einmal erschüttert war, wurde alles denkbar. 2) Die zweite Lehre, die wir zogen, war eher methodischer Natur. Jedesmal wenn wir während der Reinigung der interessierenden Komponenten einen Verlust an Aktivität feststellten, kehrten wir zu den Fraktionen der Chromatographiesäule zurück und versuchten, die Aktivität durch Komplementierung zu rekonstituieren: „klassische“ Biochemie in ihrer besten Form stand uns dabei zur Seite.

Zum weiteren Vorgehen entschlossen wir uns (glücklicherweise, wenn auch mit Bedacht), mit der Reinigung und Charakterisierung der aktiven Komponente in Fraktion I zu beginnen. Grund dafür war, dass die Fraktion I die hämoglobinhaltige Fraktion war, die nicht an das Austauscherharz band; daher erwarteten wir, dass diese Fraktion nicht allzu viele zusätzliche Proteine enthielt. Im Sommer 1977, zehn Monate nach Beginn meiner Arbeiten, reiste Avram zu einem Forschungsaufenthalt bei Irwin Rose am Fox Chase Cancer Centre in Philadelphia ab und ließ mich mit der Aufgabe zurück, die aktive Komponente aus Fraktion I zu reinigen. Nach vielen erfolglosen Versuchen (zusammen mit Yaacov Hod, der ebenfalls bei Avram promovierte) kam Mickey Fry, der meine Doktorarbeit stellvertretend betreute, auf die „verrückte“ Idee, die Fraktion I zu erhitzen, um festzustellen, ob die aktive Komponente hitzestabil sei – und tatsächlich war sie es! Er führte das Experiment aus, da all unsere Versuche, die Aktivität abzutrennen, trotz der deutlich verschiedenen Molekulargewichte des aktiven Proteins ( $\approx 10$  kDa) und des Hämoglobins (65 kDa) scheiterten. Nach 5 bis 10 Minuten bei 90°C fiel das Hämoglobin in Fraktion I aus wie Schlamm, und die Aktivität blieb im Überstand gelöst. Es fiel uns schwer zu glauben, dass es sich um ein Protein handelt, aber Mickey erinnerte sich an eine

Reihe anderer hitzestabiler Proteine. Der Nachweis, dass die aktive Komponente in Fraktion I tatsächlich ein Protein war, folgte schnell, denn die Komponente zeigte sich empfindlich gegen Trypsin und ließ sich mit Ammoniumsulfat fällen. Ihr Molekulargewicht war etwa 8500 Da, und wir bezeichneten sie als ATP-abhängigen Proteolysefaktor-1 (APF-1). Während der ganzen Zeit hielt ich Kontakt mit Avram, schickte ihm die Daten, und noch während seines Forschungsjahres schrieben wir die Publikation für die *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Die zweite entscheidende Entdeckung folgte im Winter 1978/79, ebenfalls in Haifa. Wir reinigten APF-1 bis zur Homogenität und markierten es mit radioaktivem Iod. Wenn das radioaktiv markierte Protein mit dem Retikulozyten-Rohextrakt von Fraktion II in Gegenwart von ATP inkubiert wurde, beobachteten wir einen drastischen Anstieg des Molekulargewichts, das als scharfes Signal im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule wanderte. Über mehrere Monate versuchten wir, den Mechanismus aufzuklären, der dieser Veränderung zugrunde liegt. Wir spekulierten z.B., dass APF-1 ein Aktivator einer Protease sein könnte, der mit dem Enzym einen binären Komplex eingehen muss, um es zu stimulieren, kamen aber zu keinem Erfolg. Ein wichtiger Durchbruch gelang uns im Sommer 1979, als wir einige Monate in Ernies Labor arbeiteten. In einer sehr eleganten Versuchsreihe, bei der uns Ernie mit seinem umfassenden Wissen über Proteinchemie und Enzymologie zur Seite stand, fanden wir heraus, dass APF-1 kovalent an das Substrat bindet und dass die Bindung alle Eigenschaften einer Peptidbindung aufweist. Außerdem zeigte sich, dass gleich mehrere Einheiten von APF-1 an jedes Substratmolekül binden und dass die Reaktion reversibel ist. APF-1 konnte vom Substrat abdissoziieren, allerdings nicht durch Umkehrung der Konjugationsreaktion. So stellten wir die Hypothese auf, dass die kovalente Bindung mehrerer APF-1-Einheiten an das Proteolysesubstrat erforderlich ist, um es für den Abbau durch eine stromabwärts liegende Protease zugänglich zu machen. Die Protease sollte nur markierte Proteine erkennen und APF-1 in wiederverwertbarer Form freisetzen.

Aus dem APF-1-Zyklus ließ sich zweifelsfrei die Existenz von drei völlig neuen Aktivitäten ableiten: 1) ein oder mehrere an APF-1 konjugierende Enzyme, 2) eine Protease, die spezifisch die markierten Substrate erkennt und sie abbaut, und 3) Enzyme, die das APF-1 rezyklisieren. Alle diese Enzyme wurden später von uns (die drei konjugierenden Enzyme E1, E2 und E3) und von anderen (die Konjugat abbauende Protease, bekannt als 26S-Proteasom-Komplex, und die Ubiquitin rezyklierenden Enzyme, die Isopeptidasen) identifiziert. Die Ergebnisse, mit denen wir die kovalente Markierung des Proteolysesubstrats mit APF-1 als Abbausignal belegten, veröffentlichten wir 1980 in zwei Publikationen in den *Proceedings of the National Academy of Sciences*, zusammen mit dem ersten Modell des neu entdeckten proteolytischen Systems.

Während unseres Aufenthalts in Ernies Laboratorium kam es noch zu einer weiteren wichtigen Entdeckung, und ich bin nicht sicher, ob es reines Glück oder Fügung war – vermutlich beides. Wir kannten kein anderes Beispiel dafür,



dass ein Protein durch ein anderes Protein modifiziert wurde. In den Nachbarlabors von Martin Nehmer untersuchten Alfred Zweidler und Leonard Cohen am Seeigel die Dynamik von Histon-Varianten während der Entwicklungsphase. Sie machten uns auf das Protein A24 (uH2A) aufmerksam, das Ida Goldknopf und Harris Busch entdeckt hatten. Es handelte sich um ein kovalentes Konjugat zwischen zwei Proteinen, dem kleinen, etwa 8.5 kDa schweren Protein Ubiquitin und dem Histon2A (H2A). Goldknopf und Busch, und parallel dazu Margaret Dayhoff, identifizierten den Bindungstyp zwischen den beiden Proteinteilen des Konjugats und fanden heraus, dass es sich bei der Ubiquitin-Histon-Bindung um eine verzweigte Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Gly<sup>76</sup>-Rest des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe von Lys<sup>119</sup> des Histons handelt. Die Funktion dieses Konjugats war damals unklar; man wusste, dass sich seine Konzentration während der Differenzierung, wenn der Histonrest ubiquitiniert oder deubiquitiniert wird, ändert.

Aufgrund dieser Befunde zum Ubiquitin-Histon-Addukt und der Tatsache, dass sich APF-1 und Ubiquitin in ihren allgemeinen Eigenschaften, im Molekulargewicht und in der Aminosäurezusammensetzung offenbar ähnelten, begannen Keith Wilkinson und Arthur „Art“ Haas aus Ernies Gruppe zusammen mit Michael Urban aus Zweidlers Gruppe mit einer Serie von Experimenten, die zweifelsfrei nachwiesen, dass APF-1 tatsächlich Ubiquitin war. Mit den Arbeiten von Wilkinson, Haas und Urban auf der einen und unseren Studien zur Charakterisierung von APF-1 auf der anderen Seite wurden zwei Forschungsfelder, das der Histon- und das der Proteolyseforschung, zusammengeführt. Wichtiger noch war ihr Vorschlag, dass die Bindung zwischen Ubiquitin und dem Proteolysesubstrat identisch mit der Bindung zwischen Ubiquitin und dem Histon sein könnte, was wir später auch belegen konnten. Diese Befunde ebneten zweifellos den Weg für die spätere Identifizierung der konjugierenden Enzyme und ihres Wirkmechanismus. Die beiden Versuchsreihen zum APF-1, unsere und die von Wilkinson und Mitarbeitern, wurden gemeinsam im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht.

Das Ubiquitin wurde in den 70er Jahren von Gideon Goldstein (am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York) als kleines, 76 Aminosäuren langes Polypeptidhormon des Thymus identifiziert, das die T-Zell-Differenzierung durch Aktivierung der Adenylatcyclase stimuliert. Aufgrund weiterer Untersuchungen hatte Goldstein vermutet, dass es bei Prokaryoten und Eukaryoten gleichermaßen verbreitet sei, weshalb er ihm den Namen Ubiquitin – vom Lateinischen „ubique“ (überall) – verlieh. In nachfolgenden Experimenten konnte Allan Goldstein zeigen, dass die thymopoetische Aktivität auf eine Endotoxin-Verunreinigung im Proteinpräparat zurückging und nicht auf das Ubiquitin selbst. Durch funktionelle Tests konnten wir (und ich denke auch andere) nachweisen, dass Ubiquitin nur bei Eukaryoten vorkommt. Sein scheinbares Auftreten in Bakterien war durch eine Kontamination des bakteriellen Extraktes mit Hefeextrakt, in dem die Bakterien gezogen wurden, zu erklären. Züchtete man die Bakterien in einem

synthetischen Medium, „verschwand“ das Ubiquitin aus dem Präparat. Die später folgende Sequenzierung der bakteriellen Genome ergab in allen Fällen, dass das Ubiquitin-Markierungssystem in Prokaryoten nicht existiert, obwohl es gewisse Ähnlichkeiten zwischen dem Proteasom und bestimmten bakteriellen proteolytischen Komplexen gibt. So wandelte sich die Rolle des Ubiquitins in relativ kurzer Zeit von der eines ubiquitären thymopoetischen Hormons zu der eines eukaryotischen Proteolysesignals. Obwohl die Bezeichnung Ubiquitin nicht mehr gerechtfertigt war, da es eindeutig nicht „allgegenwärtig“ vorkommt, behielten wir unsere Bezeichnung APF-1 nicht bei, sondern übernahmen den Begriff Ubiquitin für das modifizierende Protein des neu entdeckten Proteolysesystems. Manchmal wiegen Gewohnheiten und Tradition schwerer als wissenschaftliche Stichhaltigkeit und Nomenklaturlogik. Entsprechend machten wir es uns in Fragen der Terminologie zum Grundsatz, stets Namen so zu verwenden, wie sie vom Entdecker eines neuen Proteins geprägt wurden.

Von da aus war es nur noch ein kurzer Weg bis zur Identifizierung und Charakterisierung des Konjugationsmechanismus und der drei Enzyme, die daran beteiligt sind. Bei der Entschlüsselung des Mechanismus orientierten wir uns oft an den Arbeiten Fritz Lipmanns, der 1953 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Entdeckung von Coenzym A erhalten hatte. Zu seinen vielen späteren Entdeckungen gehörte der Mechanismus der nichtribosomalen (und daher auch nicht genetisch codierten) Bildung von Peptidbindungen bei der Biosynthese bakterieller Oligopeptide wie Gramicidin S. Wir lernten, dass die prinzipiellen Mechanismen grundlegender biochemischer Reaktionen, etwa die Erzeugung energiereicher Zwischenprodukte, die bei der Bildung von Peptidbindungen eine Rolle spielen, im Laufe der Evolution konserviert wurden, ganz gleich, ob die Bindung genetisch codiert ist oder nicht oder ob sie zwei Aminosäuren oder zwei Proteine verknüpft. Zunächst klärten wir den allgemeinen Mechanismus der Aktivierung von Ubiquitin im Rohextrakt auf. Später reinigten wir durch „kovalente“ Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Ubiquitin und schrittweise Elution die drei konjugierenden Enzyme, die nacheinander in einem kaskadenähnlichen Mechanismus wirken. Diese sind: 1) das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das erste Enzym in der Kaskade des Ubiquitin-systems, 2) das Ubiquitin-Trägerprotein E2, auf welches das aktivierte Ubiquitin von E1 übertragen wird, und 3) die Ubiquitin-Proteinligase E3, die letzte und entscheidende Komponente in dem dreistufigen Konjugationsmechanismus, die das Proteolysesubstrat spezifisch erkennt und mit dem Ubiquitin konjugiert. Die Bindung von E1 und E2 wurde über den Aktivierungsmechanismus vermittelt. E3 adsorbierte ebenfalls an das Harz, allerdings nach einem anderen Mechanismus als E1 und E2.

Spätere Untersuchungen durch Avram ergaben Ende der 80er Jahre, dass es sich bei dem E3, das an die Säule adsorbiert, um ein E3 $\alpha$  handelt, das die Substrate über ihre N-terminalen Reste erkennt. An diesem Punkt hatten wir ohne es zu wissen riesiges Glück gehabt, dass wir als Modellsubstrate kommerziell erhältliche Proteine wie BSA, Lysozym



und RNaseA einsetzten, die alle von dieser Ligase durch das gleiche Erkennungsmotiv, ihren N-terminalen Rest, erkannt werden. Hätten wir beispielsweise Globin verwendet, das wir als Modellsubstrat in unseren ersten Experimenten einsetzten, wäre uns das an die Säule adsorbierte E3 $\alpha$  möglicherweise entgangen, denn es ist nicht typisch, dass E3-Enzyme an Ubiquitin adsorbieren. Gleichzeitig und unabhängig davon verwendete ich dieses Enzym auch in den späten 80er Jahren, um eine spezielle Gruppe von Proteinen zu charakterisieren, die über dieses Signal erkannt werden (siehe unten). Schließlich fanden wir mit Antikörpern gegen Ubiquitin, die wir mit der Hilfe von Arthur Haas herstellten, dass das Ubiquitinsystem am Abbau abnormer, kurzlebiger Proteine in Hepatomzellen beteiligt ist; damit wiesen wir nach, dass das System nicht auf Retikulozyten am Ende ihrer Differenzierungsphase beschränkt ist, sondern wahrscheinlich universeller in kernhaltigen Säugerzellen vorkommt und eine Rolle bei der zellulären Qualitätskontrolle spielt.

Während meiner Doktorarbeit bei Avram arbeitete ich mit Hannah Heller zusammen, einer begabten und sachkundigen wissenschaftlichen Assistentin, die sich manchmal unseren Forschungssommern bei Ernie in Philadelphia anschloss, und mit Yaacov Hod, der damals ebenfalls bei Avram promovierte. Viel Unterstützung erhielt ich auch von anderen Laborkollegen, darunter Dvorah Ganoth, Sarah Elias und Esther Eythan, die wissenschaftliche Assistenten von Avram waren, und Clara Segal und Bruria Rosenberg, zwei begnadeten technischen Assistentinnen.

#### **Zusammenarbeit mit Irwin Rose**

Wie schon erwähnt, verbrachte ich einen wichtigen Teil meiner Promotionszeit in Ernies Laboratorium. Avram legte 1977/78 ein Forschungsjahr bei ihm ein, und ich kam zum ersten Mal im Sommer 1978 für ein paar Monate nach Fox Chase, nachdem ich in Haifa die erste Charakterisierung von APF-1 abgeschlossen hatte. Die folgenden drei Sommer verbrachte ich ebenfalls dort. Während des Aufenthaltes im Sommer 1979 klärten wir die Struktur der hochmolekularen „Verbindung“ auf, die entsteht, wenn APF-1 in Gegenwart von ATP mit Fraktion II inkubiert wird. Die Veränderung des Molekulargewichts von APF-1 hatten wir einige Monate vorher in Haifa beobachtet, konnten die „Verbindung“ aber nicht entschlüsseln – hierzu waren wir auf Ernies umfangreiches Wissen angewiesen. In einer bahnbrechenden Studie fanden wir, dass mehrere APF-1-Moleküle das Proteolyse-substrat kovalent modifizieren und es auf diese Weise anfällig für einen Abbau machen. Dies war eine neue Art einer posttranslationalen Modifikation und führte zu einem neuen biologischen Prinzip, dessen Aufklärung – wie ich es heute rückblickend einschätze – eines unabhängigen wissenschaftlichen Hintergrunds und eines anderen experimentellen Herangehens bedurft hatte. Ohne Ernie und seine tiefen Kenntnisse der Enzymologie und Proteinchemie, dazu sein unvoreingenommenes, originelles Denken, wäre dies alles nicht möglich gewesen. Aufgrund dieser Entdeckungen kommt Ernie und seinen Mitarbeitern (besonders Keith

Wilkinson und Arthur Haas) eine zentrale Rolle in der historischen Entwicklung zu, die zur Entdeckung des Ubiquitinsystems führte. Interessanterweise hatte Ernie schon vor dem Kontakt mit Avram zum Thema Proteolyse geforscht, aber nie auf diesem Gebiet publiziert.

#### **Postdoc am MIT und Beginn eigener Studien zum Ubiquitinsystem**

Die fünf Jahre an der Hochschule hatten einen wichtigen Einfluss auf meine künftige Laufbahn. Nicht nur, dass ich eine aktive Rolle bei solch einer wichtigen Entdeckung wie dem Ubiquitinsystem spielte; vielleicht noch wichtiger war, dass ich lernte, wie man an wissenschaftliche Fragestellungen heranzugehen hat. Von meinen Mentoren, allen voraus Avram und Ernie, nahm ich zwei wichtige Grundsätze mit: Erstens, ein wichtiges biologisches Problem aufzugreifen, sich dabei aber zu vergewissern, dass es kein „Modethema“ ist – auch um scharfen Konkurrenzsituationen aus dem Weg zu gehen. Zweitens sicherzustellen, dass für die geplanten Experimente auch die geeigneten Instrumente zur Verfügung stehen.

Von Avram lernte ich, an meine Forschungen wie an das Schreiben eines Romans heranzugehen und keine Kurzgeschichten abzufassen: Ich lernte, nicht opportunistisch zu sein, sondern einem Projekt anzuhängen, sich tief in das Problem zu vergraben, es mechanistisch aufzulösen, komplexe Zusammenhänge zu entflechten – sie wie eine Zwiebel Schicht für Schicht zu enthüllen. Ich lernte, auf kleine Details zu achten und Hinweisen sorgfältig nachzugehen, denn die wichtigen Befunde sind oft versteckt und nicht sofort als solche zu erkennen. Ich lernte verbissen zu sein, mich Schwierigkeiten zu stellen und – am allerwichtigsten – kritisch zu sein: Ich glaube, dass ich ein gutes Gespür entwickelt habe, um Richtiges von Falschem, Artefakte von bedeutsamen Ergebnissen zu unterscheiden.

All diese Grundsätze lernte ich nicht durch Frontalunterricht oder formale Präsentationen, sondern als ein Lehrling, der in Verhalten und Denkart dem Vorbild seiner Mentoren folgte. Ich lernte aber auch, Dinge infrage zu stellen, zu zweifeln und zu diskutieren, wenn nötig auch meinem Gefühl zu folgen, nicht alle Ratschläge ungeprüft anzunehmen und auch mir selbst zu vertrauen. Dies hat mir bei vielen Gelegenheiten auf meinem Weg geholfen, manchmal schwamm ich damit auch gegen den Strom. Im Ganzen fügte sich alles zu einer Philosophie zusammen, die meine Einstellung zur Naturwissenschaft prägte und die ich auch meinen eigenen Studenten zu vermitteln versuche, denn ich glaube fest, dass diese Art zu forschen der einzige Weg ist, Wirkung zu erzielen und Eindruck zu hinterlassen.

Gegen Ende meiner Promotionszeit hatte ich über die nächsten Schritte nachzudenken, über eine Postdoc-Stelle und die Planung meines künftigen Werdegangs als unabhängiger Wissenschaftler. Ich befand mich in einem Dilemma: Einerseits wusste ich, dass es wichtig war, irgendwo anders meine Ausbildung fortzusetzen, mit einem anderen Mentor in einer anderen Umgebung, einer anderen wissenschaftlichen

Kultur. Andererseits war ich mir sicher, dass das Ubiquitin-system extrem wichtig war und dass wir erst die Spitze des Eisberges gesehen hatten. Ich wollte daher meine Forschung in einem verwandten Gebiet fortsetzen, um mehr über die regulierte Proteolyse zu lernen, gleichzeitig aber auch meine eigenen Untersuchungen am Ubiquitin weiterführen zu können.

Ich hatte mehrere Möglichkeiten im Sinn, wohin ich gehen könnte. Die Auswahl war recht überschaubar und auch mit Risiken behaftet, denn ich wusste vorher nicht, wieviel Eigenständigkeit ich als Postdoc haben würde. Mickey Frys Ratschlag befolgend suchte ich nach einer Arbeitsgruppe, die sich mit regulierter Proteolyse befasste. Ich schrieb an Günter Blobel an der Rockefeller University, der zu der Zeit über die Translokation von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum arbeitete, ein Vorgang, bei dem die Spaltung des Signalpeptids durch eine spezifische Signalpeptidase eine wichtige Rolle spielt, außerdem an Jeffrey Roberts in Cornell, der über die Spaltung des Phagen- $\lambda$ -Repressors durch das *E.-coli*-RecA-Protein und seine Abhängigkeit von Polynucleotiden forschte, und an Harvey Lodish am MIT, der unter anderem an der Prozessierung viraler Polyproteine arbeitete. Ich weiß nicht, ob Harvey damals so besonders beeindruckt vom Ubiquitinsystem war, aber er war der einzige, von dem ich eine positive Antwort erhielt. Typisch für seine Etikette war, dass er umgehend und direkt antwortete; er lud mich zu einem Gespräch ein, und anschließend nahm er mich an seinem Laboratorium auf. Günter war freundlich und teilte mir mit, dass er zu der Zeit keinen Platz im Labor hatte, und Jeffrey antwortete nie.

Mit zwei Stipendien, einem von der amerikanischen Leukämie-Gesellschaft und einem vom israelischen Krebsforschungsfonds (ICRF), begann ich 1981 einen dreijährigen Forschungsaufenthalt an Harveys Laboratorium am Department of Biology am MIT. Harvey ließ mir bei der Wahl meiner Forschungsthemen völlig freie Hand. Ich hatte mir vorgestellt, Harveys einmalige Expertise in Zellbiologie zu nutzen, parallel dazu aber meine eigenen Studien zum Ubiquitinsystem fortzuführen.

Nachdem ich festgestellt hatte, dass Harvey nicht länger an der Prozessierung viraler Proteine interessiert war, begann ich, zusammen mit Alan Schwartz, einem Gastwissenschaftler von der Harvard Medical School, den Transferrinrezeptor auf einer menschlichen Hepatomzelllinie zu charakterisieren. Ein weiter entfernt liegendes Ziel war es, den Mechanismus des durch Transferrin und den Transferrinrezeptor vermittelten Eisentransports in Zellen zu untersuchen. Zusammen mit einer weiteren Kollegin, Alice Dautry-Varsat vom Pasteur-Institut, gelang es uns, den faszinierenden Mechanismus aufzuklären, mit dem Eisen in Zellen transportiert wird. Beim neutralen pH-Wert des Wachstumsmediums bindet das mit Eisen beladene Holotransferrin mit hoher Affinität an seinen Rezeptor und wird durch Endocytose in die Zelle aufgenommen. Beim niedrigen endosomalen pH-Wert wird die Affinität zwischen Eisen und Transferrin drastisch gesenkt, und das Eisen-Ion wird freigesetzt. Das Apotransferrin, das hoch affin zum Rezeptor ist, bleibt im sauren pH-Bereich hingegen gebunden und wird zusammen mit dem Rezeptor auf die

Zelloberfläche rezykliert. Beim neutralen pH-Wert des Wachstumsmediums verliert das Apotransferrin seine hohe Affinität zum Rezeptor und wird in das extrazelluläre Fluid freigesetzt, wo es erneut Eisen-Ionen aufladen und daraufhin mit hoher Affinität wieder an den Rezeptor binden kann.

Dieser vom pH-Wert und von der Eisenbeladung abhängige Transferrin-Transferrinrezeptor-Zyklus wurde zu einem Klassiker auf dem Gebiet der rezeptorvermittelten Endocytose. Auf der Grundlage dieses Mechanismus konnten andere Phänomene, die mit der Rezyklisierung von Rezeptoren und Liganden auf Zelloberflächen oder ihrem Transport zum Lysosom zusammenhängen, erklärt werden, denn diese Prozesse beruhen ebenfalls auf einem pH-Gefälle zwischen der äußeren Umgebung und dem Inneren der endocytischen Vesikeln.

Trotz dieser Erfolge ließ mich der Gedanke nicht los, dass wir bei der Entschlüsselung des Ubiquitinsystems erst am Anfang standen und nur die grundlegenden Prinzipien aufgedeckt hatten. Mein Gefühl sagte mir, dass ich wieder zu dem alten Thema meiner Doktorarbeit zurückkehren musste. Ich war während meiner Doktorarbeit in Haifa auf einen rätselhaften Befund gestoßen, dem ich seinerzeit nicht weiter nachgegangen war und an dem ich nun alleine weiterarbeitete: Als wir das APF-1/Ubiquitin reinigten, fanden wir eine große Diskrepanz zwischen dem Trockengewicht und der mit der Lowry-Methode bestimmten Proteinmasse. Avram vermutete, dass es sich bei dem Protein um ein Ribonucleoprotein (RNP) handeln und die verbleibende Masse von einer Nucleinsäurekomponente stammen könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, versetzten wir den ATP- und Ubiquitin-haltigen Rohextrakt mit DNase und verfolgten den Abbau von Rinderserumalbumin (BSA), einem unserer Modellsubstrate. Das Enzym hatte keinen Einfluss. Wir setzten RNaseA zu, und zu unserer Überraschung wurde die Proteolyse selbst mit nur wenigen Nanogramm vollständig gehemmt: Es sah aus, als ob das Enzym katalytisch wirken würden – ein RNA-Abbau.

Avram schlug vor, den RNase-Effekt auch mit Lysozym, unserem zweiten Modellsubstrat, zu testen. Hier erhielten wir keinen Effekt, was ebenfalls überraschend war, denn bislang hatten sich BSA und Lysozym in unseren Proteolyseversuchen gleichartig verhalten. Der Abbau beider Proteine benötigte ATP sowie alle anderen Faktoren, die wir aus dem Rohextrakt identifiziert hatten. Avram argwöhnte, dass der RNase-Effekt ein Artefakt sei. Unterdessen hatten Keith Wilkinson und Mitarbeiter den APF-1 als Ubiquitin identifiziert, und die Aminosäuresequenz und -zusammensetzung des Ubiquitins verrieten das Geheimnis der Massendiskrepanz: Das Molekül besitzt einen einzelnen Tyrosinrest, was die niedrigen Messwerte bei 280 nm und in den Lowry-Tests erklärte. So entschlossen wir uns, diese Sache nicht weiter zu verfolgen, und der selektive hemmende Effekt von RNaseA auf den Abbau von BSA blieb ein ungelöstes Rätsel – zumindest vorerst.

Ich war allerdings meinen Verdacht nie losgeworden, dass hinter diesem Befund ein echtes biologisches Phänomen steckte, und so entschied ich mich während meines Aufenthaltes bei Harvey, die Daten des Jahres 1970 wieder hervor-

zuholen, um dem RNase-Effekt auf den Grund zu gehen. Mit einigen Ratschlägen von Alexander „Alex“ Varshavsky (MIT) und viel Unterstützung von Joan Steitz (Yale), Harvey Lodish und Uttam RajBhandary (MIT) kam ich zu einigen Fortschritten. Ich entdeckte, dass der Abbau von BSA von spezifischen tRNAs (für Arg und His) abhängt und dass die Zerstörung der tRNAs die Reaktion hemmt. Der Mechanismus, mit dem die tRNA in die Reaktion eingreift, und die Frage, warum der Abbau von Lysozym nicht auf RNase anspricht, blieben ein Rätsel, dessen Lösung ich erst finden sollte, nachdem ich nach Israel zurückgekehrt war und meine eigene Arbeitsgruppe aufgebaut hatte.

Einer zweiten Frage zum Ubiquitinsystem ging ich in Zusammenarbeit mit Alex Varshavsky und seinem damaligen Doktoranden Daniel „Dan“ Finley nach. Alex untersuchte damals die Aufgabe der Monoubiquitinierung des Histons H2A zum Histon-Ubiquitin-Addukt (Protein A24 oder uH2A) und verfasste eine Reihe von Veröffentlichungen über die temperaturempfindliche Zellzyklusstopppmutante ts85 der Maus, die von der Gruppe um M. Yamada erzeugt und beschrieben worden war. Bei nicht-permissiver Temperatur verlor die Zelle das H2A-Ubiquitin-Addukt. Dieser Verlust konnte durch zwei Defekte hervorgerufen werden, entweder durch Ausfall der Ubiquitinierung oder durch aktivierte Deubiquitinierung. Alex bat mich, zusammen mit ihm und Dan die Mutation zu identifizieren. Wir nahmen an, dass der Defekt in den Zellen eher durch den Ausfall als durch den Gewinn einer Funktion entstand und versuchten, den Defekt zu analysieren. Die Idee war, dass der gleiche Defekt vielleicht auch den Proteinabbau beeinträchtigen könnte, obwohl klar war, dass eine einzelne Modifikation des Histons mit Ubiquitin das Molekül nicht für eine Proteolyse markiert.

Die Identifizierung des Defektes in den Zellen war nicht sehr schwer; wir nutzten die Isolierungstechnik, die wir in Haifa für die Konjugationsenzyme entwickelt hatten, und zeigten, dass der Defekt von dem temperaturempfindlichen Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1, dem ersten Enzym in der Kaskade des Ubiquitinsystems, herrührt. Wichtig war, dass die Inaktivierung des Enzyms eine allgemeine Hemmung der Ubiquitin-Konjugation zellulärer Proteine nach sich zog und nicht auf die Hemmung des H2A-Konjugats beschränkt blieb. Entsprechend wurde auch der Abbau kurzlebiger Proteine gehemmt, was bestätigte, dass das gleiche Enzym, das an der Aktivierung des Ubiquitins für die Histon-Modifikation beteiligt ist, auch an der Aktivierung des Ubiquitins für die Protein-Markierung zur Proteolyse beteiligt ist. Die Identifizierung und Charakterisierung des Zelldefektes bestärkte unsere frühere, indirekt getroffene Hypothese, dass die Ubiquitinierung Proteine für den Abbau markiert und dass dies auch in kernhaltigen Zellen geschieht. Da die ts85-Zelle eine Zellzyklusstopppmutante war, nahmen wir an, ohne es seinerzeit experimentell beweisen zu können, dass das System an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein könnte, eine Hypothese, die sich später als zutreffend herausstellte.

### Die Rückkehr nach Israel – unabhängige Forschungen

Nach drei Jahren am MIT (1981–1984) war es an der Zeit, sich nach einer unabhängigen akademischen Position umzusehen. Trotz attraktiver Angebote in den USA zu bleiben, fasste ich letztlich den Entschluss, nach Israel zurückzukehren. Mit Avrams Hilfe erlangte ich eine unabhängige akademische Stelle am Technion und kehrte Ende 1984 in meine Heimat zurück. Wichtig war, dass ich mir bereits ein Forschungsthema zurechtgelegt hatte, das ich verfolgen wollte: der Effekt von RNase auf die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse.

Die Jahre nach meiner Postdoc-Zeit (1984 bis heute) waren sehr erfolgreich. Ich war glücklich, zu Familie und Freunden nach Israel zurückkehren zu können, wo ich meinem Gefühl nach auch hingehörte. Ich baute meine eigene unabhängige Arbeitsgruppe und ein Labor auf, erhielt Drittmittel und setzte meine Forschungen zum Ubiquitinsystem fort. Insbesondere hatte ich das Glück, während all der Jahre viele sehr talentierte Doktoranden und Postdocs in meiner Gruppe aufnehmen zu können.

In unserer ersten Serie von Versuchen klärten wir die Rolle der tRNA bei der Proteolyse auf, ein Thema, auf das ich schon als Doktorand gestoßen war und am MIT weiter untersucht hatte. Zusammen mit einer meiner ersten Doktorandinnen, Sarah Ferber, gelang der Nachweis, dass Proteine mit sauren N-Termini, wie Asp oder Glu, an diesem N-Terminus arginyliert werden, wodurch der negativ geladene Rest an dieser Stelle in einen positiv geladenen Rest umgewandelt wird. Die Reaktion wird von der Arginin-tRNA-Proteintransferase katalysiert, einem bekannten Protein mit einer bis dahin unbekannten Funktion. Das Enzym verwendet die beladene tRNA<sup>Arg</sup> als Quelle für aktiviertes Arg. Somit hemmt der Verdau der RNA des Zellextrakts mit RNaseA diese Reaktion. Die Ergebnisse erklärten auch, warum RNase selektiv den Abbau von BSA hemmt, nicht aber den von Lysozym: BSA trägt am N-Terminus einen Asp-Rest, Lysozym hingegen einen Lysin-Rest. Die beteiligte Ligase war E3 $\alpha$ , die ich während meiner Doktorarbeit entdeckt hatte. Sie erkennt nur Proteine mit basischen, nicht aber solche mit sauren N-Termini. Was zuerst wie ein Artefakt ausgesehen hatte, stellte sich nun als Teil des ersten spezifischen Erkennungssignals in einem Zielsubstrat heraus.

Während wir an dem RNase-Effekt arbeiteten, charakterisierten Avram und sein Doktorand Yuval Reiss die E3 $\alpha$ -Ligase und identifizierten drei verschiedene Substratbindstellen: 1) für basische N-Termini (diese Stelle ist an der Erkennung basischer und Arginin-modifizierter saurer N-Termini beteiligt); 2) für voluminöse hydrophobe N-Termini; 3) für Erkennungsstellen, die weiter entfernt vom N-Terminus im Protein-Inneren liegen. Parallel dazu, und gestützt auf einen systematischen genetischen Ansatz mit der Hefe *S. cerevisiae*, formulierten Alex Varshavsky und Mitarbeiter eine allgemeine Regel („N-Terminus-Regel“), die den Zusammenhang zwischen der N-terminalen Aminosäure eines Proteins und seiner Halbwertszeit beschreibt.

Davon abgesehen entwickelten sich meine Forschungen auch in andere Richtungen. Wir konnten zeigen, dass an Na



acetylierte Proteine ebenfalls durch das Ubiquitinsystem markiert werden. Aus diesem wichtigen Ergebnis mussten wir folgern, dass die Gruppe der N-terminal modifizierten Proteine, die den überwiegenden Anteil zellulärer Proteine ausmacht, über andere Signale als den N-terminalen Rest erkannt wird – solche weiter im Inneren des Proteins. Diese Proteine haben keinen freien N-Terminus und können deshalb auch nicht über die N-terminale Aminosäure erkannt werden. Daraus, und mit der Entdeckung der Bindestelle für Regionen im Protein-Inneren in E3 $\alpha$ , zogen wir den Schluss, dass die Erkennung des N-Terminus eine untergeordnete physiologische Bedeutung hat und eher die Ausnahme denn die Regel ist und dass die Art, wie die zahlreichen Substrate des Systems erkannt werden, vielgestaltig ist.

An diesem Punkt, gegen Ende der 80er Jahre, hielten wir es für an der Zeit, unsere Modellsubstrate durch native zelluläre Substrate zu ersetzen. Wir konnten zeigen, dass eine wichtige Gruppe zellulärer Regulatorproteine – Tumorsuppressoren wie p53 und Wachstumsfaktoren wie c-Myc – durch das Ubiquitinsystem im zellfreien Test markiert wird und vermuteten, wie sich später herausstellte zurecht, dass dies auch in vivo stattfindet. Entgegen der damals gängigen Auffassung, dass der Abbau von Proteinen in den Lysosomen unabhängig vom Ubiquitinsystem sei, wiesen wir nach, dass die beiden Proteolysewege miteinander verknüpft sind und dass die Ubiquitinierung für den stressinduzierten lysosomalen Abbau zellulärer Proteine notwendig ist. Dieses Gebiet hat sich später gewaltig weiterentwickelt; unter anderem wurde eine Beteiligung des Ubiquitinsystems an der rezeptorvermittelten Endocytose und Autophagie nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen wurden die Mechanismen der zweistufigen Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Aktivierung des Transkriptionsregulators NF- $\kappa$ B aufgeklärt. Außerdem wurde gezeigt, dass das Hitzeschockprotein bei der Markierung mancher Proteinsubstrate eine Rolle spielt, und ein unbekannter Ubiquitinierungsmodus, am N-terminalen Rest des Proteolysesubstrats, wurde entdeckt. Diese Art der Modifizierung unterscheidet sich markant von der Erkennung des Substrats durch E3 $\alpha$  an der N-terminalen Aminosäure. In diesem Fall wird der N-Terminus durch die Ligase gebunden, während die Ubiquitinierung an einer im Inneren befindlichen Lysin-Seitenkette erfolgt. Bei der N-terminalen Ubiquitinierung hingegen wird der N-Terminus modifiziert, während die Ligase höchstwahrscheinlich eine Sequenz im Inneren des Zielmoleküls bindet. Diese überraschende Entdeckung widerlegte eine weitere Lehrmeinung, die ausgesagt hatte, dass die Ubiquitinierung auf Lysinreste im Inneren des Substrats beschränkt ist. Wir zeigten außerdem, und dies wurde von anderen später bestätigt, dass das Phänomen nicht auf das eine Protein beschränkt ist, das wir zunächst identifiziert hatten (den muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD) und fanden eine große Gruppe von Proteinen, die N-terminal ubiquitiniert werden. Viele dieser Proteine enthalten Lysinreste im Inneren, die allerdings aus irgendwelchen Gründen nicht markiert werden können. Es befindet sich aber auch eine große Gruppe von Proteinen darunter, die kein Lysin enthalten (wie p16<sup>INK4a</sup>, das für die Regulation des Zellzyklus

wichtig ist). Damit sie über das Ubiquitinsystem abgebaut werden können, müssen sie N-terminal modifiziert werden.

Trotz der Forschungserfolge waren diese Jahre nicht einfach gewesen. Das Technion war traditionell eine Schule für Ingenieurwissenschaften; vielen der älteren Fakultätsmitglieder waren Lebenswissenschaften und Biomedizin fremd. Wir wurden nicht selten wie Stiefkinder behandelt, und es gab zu manchen Zeiten Überlegungen, die Abteilung zu schließen. Diese tief verwurzelte Haltung, die sich erst jetzt langsam ändert, hat die Entwicklung in diesen Forschungsbereichen, mit einer Infrastruktur an der Existenzgrenze, ernstlich behindert. Dank eines Netzwerks von wunderbaren Kollegen in der ganzen Welt (allen voran mein Freund Alan Schwartz von der Harvard Medical School, dann Washington University in St. Louis) und vieler fruchtbarer Zusammenarbeiten war es dennoch möglich, eine aktive Arbeitsgruppe einzurichten und ein meiner Meinung nach gutes und originelles Forschungsprogramm zu führen, auch wenn die Bedingungen nicht optimal, manchmal sogar indiskutabel waren. Dies war wichtig, um meinen Wunsch, in Israel zu leben, mit der Möglichkeit in Einklang zu bringen, bei der Erforschung des Ubiquitins weiter eine tragende Rolle zu spielen – auf einem Gebiet, das immer wichtiger geworden war, aber auch zunehmend umkämpft wurde.

#### *Dank, den ich schulde*

Bei vielen Menschen, die mir in schwierigen Phasen meines Lebens beigestanden haben, stehe ich tief in der Schuld: Bei meiner Tante Miriam, die mich nach dem Tode meines Vaters bei sich aufnahm und mir damit die Möglichkeit gab, die Schule ohne Unterbrechung zu Ende zu bringen; bei meinem Bruder Yossi und meiner Schwägerin Atara, deren Tür während der unsicheren Zeiten meiner medizinischen Ausbildung für mich immer offen stand, und die mich emotional, aber auch finanziell auf meinem Weg unterstützten. Und schließlich bei meiner wundervollen Frau Menucha und mein Sohn Tzachi (Yitzhak, Isaac; nach meinem kurz zuvor verstorbenen Vater), die mich mit Liebe, Fürsorge und tiefem Verständnis überschütteten, immer für mich da waren, auch wenn ich sie, verloren in meinen Träumen, manchmal nicht wahrnahm und nicht bei ihnen war, ob nun körperlich oder im Geiste. Ohne all diese wundervollen Gefährten hätte ich in meinem Leben nichts erreichen können.

Zu besonderem Dank bin ich auch allen meinen Mentoren verpflichtet, von denen jeder auf seine eigene Weise dazu beitrug, mich zum Wissenschaftler zu formen. Ich danke Jacob Bar-Tana und Benjamin Shapira, die mir den Weg zur Biochemie geebnet haben. Ihr Enthusiasmus brachte mich an einem entscheidenden Punkt meines Lebens dazu, den Weg in die biologischen Wissenschaften einzuschlagen. Großen Dank schulde ich meinem Mentor Avram Hershko, mit dem ich bei der Entdeckung des Ubiquitinsystems einen langen Weg gemeinsam zurückgelegt habe, und von dem ich lernte, wie man ein wissenschaftliches Problem angeht. Nicht zu vergessen Ernie Rose, der mir bewies, dass geordnetes Denken in der Wissenschaft nicht immer nötig ist, dass es

manchmal sogar stört und dass Sprunghaftigkeit, Unordnung und Geistesabwesenheit, das Aufsammeln von Gedankenblitzen von überall her wunderbare Ideen und Ergebnisse hervorbringen kann. Ebenfalls riesiger Dank geht an Harvey Lodish, der nicht nur ein bedeutender Zellbiologe ist, sondern auch ein wundervoller intellektueller Mentor, wenn auch auf andere Art als wir uns Mentoren meist vorstellen. Er gab mir völlige Freiheit, meinen eigenen Weg zu suchen, aber er ließ mich nicht fallen. Er hörte stets genau zu und half mir, meine Daten zu analysieren; in meinem Meer von Zahlen und graphischen Analysen fand er immer neue Straßen und Stoffwechselwege, die mir entgangen wären oder an die ich niemals gedacht hätte. Er pflegte meine Ansätze freundlich

zu kommentieren, wenn er glaubte, dass ich vom Weg abkam und half, mich neu auszurichten. Danken möchte ich auch all meinen Kollegen, besonders Alan Schwartz, Iasha Sznajder und Kazuhiro Iwai, die mir in vielerlei Hinsicht geholfen haben. Ich möchte auch die wissenschaftlichen Assistentinnen meines Labors nicht vergessen, zunächst Sarah Elias, dann Hedva Gonen und Beatrice Bercovich, die meine Augen und Hände waren. Zu guter Letzt will ich noch meine wunderbaren Doktoranden, Assistenten und Gastwissenschaftler nennen, mit denen ich neue und aufregende Wege in dem sich schnell entwickelnden Gebiet der Ubiquitin-Forschung entdeckte habe.

**Tabelle 1:** Tabellarischer Lebenslauf Aaron Ciechanover.

Geburtstag und -ort	1. Oktober 1947	Haifa, Israel
Schule und Ausbildung		
Grundschule	1953–1956	„Hashiloach“-Grundschule, Haifa
High School	1959–1965	„Hugim“ High School, Haifa
Universität (Grundstudium)	1965–1972	„Hadassah“ und Hebrew University School of Medicine, Jerusalem (M.Sc., M.D.)
Klinisches Praktikum	1972–1973	„Rambam“ Medical Center, Haifa
Militärdienst	1973–1976	Medizinisches Corps, Israelische Streitkräfte (Militärarzt)
Universität (Hauptstudium)	1976–1981	Faculty of Medicine, Technion, Haifa (D.Sc.). Doktorvater: Dr. Avram Hershko
Postdoc	1981–1984	Department of Biology und Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (bei Dr. Harvey F. Lodish)
Fakultätsstelle	1984–heute	Faculty of Medicine, Technion, Haifa
Akademische Grade		
M.Sc.	1970	Medical Sciences. Faculty of Natural Sciences und Department of Biochemistry, „Hadassah“ und Hebrew University School of Medicine, Jerusalem
M.D.	1974	„Hadassah“ und Hebrew University School of Medicine, Jerusalem
D.Sc.	1981	Faculty of Medicine, Technion, Haifa
Akademische Anstellungen		
1977–1979	Forscher	Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Technion, Haifa
1979–1981	Lecturer	
1984–1987	Senior Lecturer	
1987–1992	Associate Professor	
1992–	Full Professor	
2002–	Distinguished Research Professor	
Verwaltungspositionen		
1993–2000	Direktor	The Rappaport Family Institute for Research in the Medical Sciences, Technion, Haifa
Militärdienst		
1974–1977		Militärarzt der israelischen Marinestreitkräfte und Dienst in der Forschungs- und Entwicklungseinheit des medizinischen Corps; Entlassung im Range eines Majors
Gastaufenthalte		
1978, 1979, 1980, 1981	Gastwissenschaftler	The Institute for Cancer Research, The Fox Chase Cancer Center, Philadelphia (bei Dr. Irwin A. Rose)
1985–	Gastprofessor	The Dana Farber Cancer Institute und Harvard Medical School, Boston; Washington University School of Medicine, St. Louis; University of Kyoto School of Medicine; Northwestern University School of Medicine, Chicago; STINT Fellow, Microbiology and Tumor Biology Center, The Karolinska Institute, Stockholm; City University of Osaka School of Medicine, Osaka; Rockefeller University, New York

## 2. Einleitung

Die Vorstellung, dass Proteine umgesetzt werden, ist kaum sechzig Jahre alt. Zuvor betrachtete man die Strukturproteine als im Wesentlichen stabile Zellbestandteile, die nur in geringem Umfang einem nutzungsbedingten Verschleiß unterworfen sind. Ernährungsproteine hielt man in erster Linie für energieliefernden Brennstoff, der völlig unabhängig von den strukturellen und funktionellen Proteinen des Körpers umgesetzt wird. Das Problem war schwierig anzugehen, da keine geeigneten experimentellen Methoden zur Verfügung standen. Was vor allem fehlte, waren stabile Isotope zur Isotopenmarkierung. Zwar hatte George de Hevesy radioaktive Isotope als Markierungssubstanzen eingeführt (*Nobel Lectures in Chemistry 1942–1962*, World Scientific, 1999, S. 5–41), diese waren aber meist instabil und konnten nicht zur Untersuchung von Stoffwechselwegen genutzt werden.

Das Konzept, dass Strukturproteine statisch sind und Nahrungsproteine lediglich als Energielieferanten dienen, wurde erstmals durch Rudolf Schoenheimer an der Columbia University in New York infrage gestellt. Schoenheimer war, wie viele andere jüdische Wissenschaftler, nach der Machtergreifung der Nazis aus Deutschland geflohen und gelangte an das von Hans T. Clarke geleitete Department of Biochemistry an der Columbia.<sup>[1–3]</sup> Dort traf er auf Harold Urey vom Department of Chemistry, der das schwere Wasserstoffisotop Deuterium entdeckt hatte, das die Herstellung von schwerem Wasser, D<sub>2</sub>O, ermöglichte. David Rittenberg, der kurz zuvor in Ureys Arbeitsgruppe promoviert hatte, schloss sich Schoenheimer an. Beide fanden Gefallen an der Idee, „ein stabiles Isotop als Markierung in organischen Verbindungen zu verwenden, die für Experimente zum Intermediärstoffwechsel bestimmt sind und sich biochemisch von ihren natürlichen Analoga nicht unterscheiden“.<sup>[1]</sup>

Urey gelang es später, Stickstoff mit <sup>15</sup>N anzureichern, sodass Schoenheimer und Rittenberg ein Marker für Aminosäuren zur Untersuchung der Dynamik des Proteinumsatzes zur Verfügung stand. Sie entdeckten, dass nach der Verabreichung von <sup>15</sup>N-markiertem Tyrosin an Ratten nur etwa 50 % der Markierung im Urin nachzuweisen war, „während der überwiegende Teil des restlichen <sup>15</sup>N-markierten Tyrosins in Gewebeproteine eingebaut wird. Ein entsprechender Anteil von Proteinstickstoff wird ausgeschieden“.<sup>[4]</sup> Sie bemerkten außerdem, dass von der Hälfte, die in das Körperprotein eingebaut wurde, „nur ein kleiner Teil an die ursprüngliche Kohlenstoffkette band, in diesem Fall an Tyrosin, während der größte Teil auf andere stickstoffhaltige Gruppen des Proteins verteilt wurde“<sup>[4]</sup> – hauptsächlich als NH<sub>2</sub>-Gruppen in anderen Aminosäuren. Diese Experimente zeigten eindeutig, dass sich die Strukturproteine des Körpers in einem dynamischen Zustand von Synthese und Abbau befinden und dass sogar die einzelnen Aminosäuren dynamischen Umwandlungen unterliegen. Ähnliche Ergebnisse erhielt man mit <sup>15</sup>N-markiertem Leucin.<sup>[5]</sup>

Die Befunde widerlegten die zu der Zeit gültige Lehrmeinung, dass 1) mit der Nahrung aufgenommene Proteine vollständig verstoffwechselt und die Produkte ausgeschieden werden und 2) die Strukturproteine des Körpers stabil und statisch sind. Schoenheimer wurde eingeladen, die prestigeträchtige

Edward-K.-Dunham-Vorlesung in Harvard zu halten, wo er seine revolutionären Befunde vorstellte. Nach seinem tragischen Tod im Jahr 1941 wurden seine Vortragsnotizen von Hans Clarke, David Rittenberg und Sarah Ratner editiert und bei Harvard University Press veröffentlicht. Der Titel des Büchleins, *The Dynamic State of Body Constituents*,<sup>[6]</sup> wurde von Schoenheimers Vorlesung übernommen. Schoenheimer hatte darin seine neue Hypothese präzise dargelegt: „Der Vergleich mit einer Verbrennungsmaschine erzeugte das Bild eines ständigen, gleichmäßigen Flusses von Brennstoff in ein unveränderliches System und die Umwandlung dieses Brennstoffes in Abfallprodukte. Die neuen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich nicht nur der Brennstoff, sondern auch die Strukturbestandteile im ständigen Fluss befinden. Das klassische Bild muss daher durch eines ersetzt werden, das den dynamischen Zustand der Körperstruktur berücksichtigt“. Diese Idee, dass die Proteine einem Umsatz unterliegen, wurde allerdings nicht ohne Weiteres akzeptiert und bis zur Mitte der 50er Jahre angefochten. Zum Beispiel untersuchten Hogness und Mitarbeiter die Kinetik der  $\beta$ -Galactosidase in *E. coli* und fassten ihre Befunde so zusammen:<sup>[7]</sup> „Es scheint keine schlüssigen Beweise dafür zu geben, dass sich die Proteinmoleküle in den Zellen von Säugergeweben in einem dynamischen Zustand befinden. Vielmehr haben unsere Experimente gezeigt, dass die Proteine in wachsenden *E.-coli*-Zellen statisch sind. Daher scheint der Schluss zwingend, dass Synthese und Erhaltung von Proteinen in wachsenden Zellen nicht notwendigerweise oder von Natur aus mit einem ‚dynamischen Zustand‘ verbunden sind.“ Obwohl die Experimente nur mit bakterieller  $\beta$ -Galactosidase durchgeführt wurden, gingen die Schlussfolgerungen sehr weit, einschließlich der Hypothese zu Säugerproteinen. Der Ausdruck „dynamischer Zustand“ war nicht zufällig gewählt, wandte er sich doch unmittelbar gegen Schoenheimers Studien.

Inzwischen, nach mehr als sechs Jahrzehnten Forschung, nach der Entdeckung des Lysosoms und später des komplexen Ubiquitin-Proteasom-Systems mit seinen zahlreichen Bestandteilen, ist das Gebiet von Grund auf umgewälzt. Wir wissen heute, dass die intrazellulären Proteine in großem Umfang umgesetzt werden, dass dieser Prozess in den meisten Fällen spezifisch ist und dass die Stabilität vieler Proteine individuell reguliert wird und abhängig von den Umgebungsbedingungen schwanken kann. Man hat erkannt, dass die Proteolyse zellulärer Proteine ein hoch komplexer, zeitlich kontrollierter und straff regulierter Vorgang ist, der eine wichtige Aufgabe in vielen Stoffwechselwegen hat. Dazu gehören Zellzyklus, Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Regulation der Transkription, Antigenpräsentation, Signaltransduktion, rezeptorvermittelte Endocytose, Qualitätskontrolle und die Modulation verschiedener Stoffwechselwege. Als Ergebnis dieser Entwicklungen änderte sich auch die gängige Lehrmeinung, dass die Regulation zellulärer Prozesse hauptsächlich auf der Ebene von Transkription und Translation stattfindet, denn der regulierte Proteinabbau wurde als ebenso bedeutend erkannt. Hält man sich die Vielzahl der beteiligten Substrate und Prozesse vor Augen, überrascht es nicht, dass Abweichungen von den normalen Stoffwechselwegen mit der Pathogenese vieler Krankheiten, darunter manche Krebsarten, Neurodegeneration und Stö-

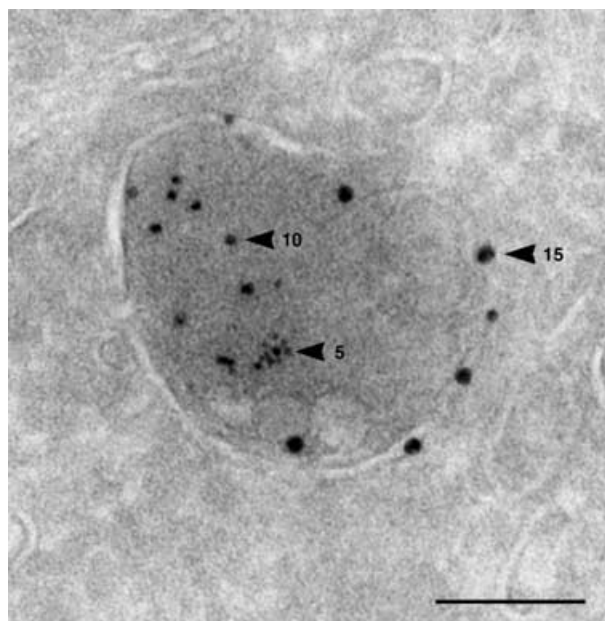


rungen des Immun- und Entzündungssystems, in Verbindung gebracht wurden. Daher wurde das Ubiquitinsystem auch als Angriffspunkt für Wirkstoffe untersucht. In den Mechanismus eingreifende Substanzen befinden sich gegenwärtig in der Entwicklung, und ein Wirkstoff ist bereits am Markt.

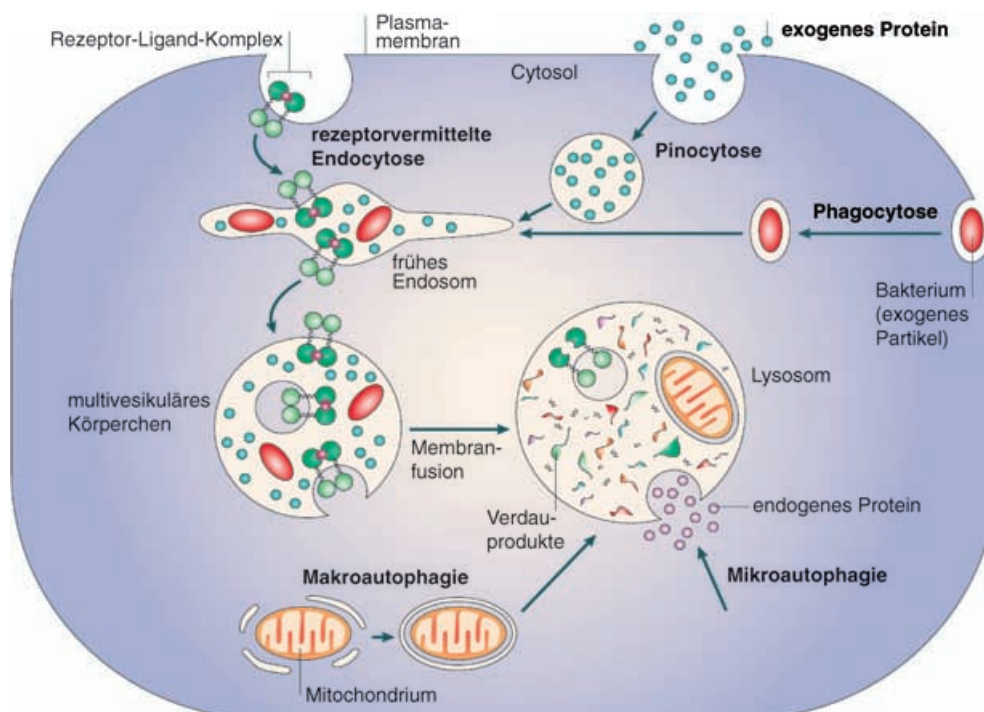
### 3. Das Lysosom und der intrazelluläre Proteinabbau

Mitte der 50er Jahre entdeckte Christian de Duve das Lysosom (siehe z. B. Lit. [8,9] und Abbildung 1). Das Lysosom wurde zuerst in der Rattenleber als eine Vakuole erkannt, die etliche hydrolytische Enzyme mit saurem pH-Optimum enthält. Es ist von einer Membran umgeben, die die Enzyme inaktiv hält, um den Zellinhalt vor ihrer Wirkung zu schützen (siehe unten). Der Begriff Lysosom wurde im Verlauf der Jahre mehrfach neu definiert, da erkannt wurde, dass der Proteinverdau ein dynamischer Prozess ist und zahlreiche Stadien lysosomaler Reifung beim Verdau exogener Proteine (die über rezeptorvermittelte Endocytose und Pinocytose in das Lysosom gelangen) und exogener Partikel (die durch Phagocytose aufgenommen werden; die beiden Vorgänge werden auch als Heterophagie bezeichnet) sowie endogener Proteine und zellulärer Organellen umfasst (Aufnahme durch Mikro- und Makroautophagie; siehe Abbildung 2).

Das lysosomale/vakuoläre System, wie es sich uns gegenwärtig darstellt, ist ein diskontinuierliches und heterogenes Abbausystem, zu dem auch hydrolasefreie Strukturen gehören, z. B. frühe Endosomen, die endocytisierte Rezeptor-Ligand-Komplexe und pinocytisiertes oder phagocytisiertes extrazelluläres Material enthalten. Am anderen Ende der



**Abbildung 1.** Das Lysosom: Gefrier-Ultradünnschnitt einer PC12-Zelle der Ratte nach einstündiger Beladung mit Rinderserumalbumin (BSA)-Gold-Konjugaten (5-nm-Partikel) und Immunmarkierung des lysosomalen Enzyms Cathepsin B mit 10-nm-Partikeln und des lysosomalen Membranproteins LAMP1 mit 15-nm-Partikeln. Lysosomen sind auch an ihrem typischen dichten Inhalt und zahlreichen internen Membranen zu erkennen. Maßstab 100 nm. Wir danken Viola Oorschot und Judith Klumperman am Department of Cell Biology des University Medical Centre Utrecht, Niederlande, für die Überlassung der Aufnahme.



**Abbildung 2.** Die vier lysosomalen Verdauvorgänge: 1) spezifische rezeptorvermittelte Endocytose; 2) Pinocytose (unspezifischer Einschluss cytosolischer Tröpfchen, die extrazelluläre Flüssigkeit enthalten); 3) Phagocytose (von extrazellulären Partikeln); 4) Autophagie (Mikro- und Makroautophagie intrazellulärer Proteine und Organellen). Abdruck nach Lit. [83] mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Stoffwechselkette enthält es auch die Restkörperchen, d.h. die Endprodukte des abgeschlossenen Verdauvorgangs von Heterophagie und Autophagie. Zwischen diesen Extremen kann man mehrere Stadien beobachten: primäre/entstehende Lysosomen, in denen noch keine proteolytischen Vorgänge angelaufen sind; frühe autophagische Vakuolen, die intrazelluläre Organellen enthalten können; intermediäre/späte Endosomen und phagocytotische Vakuolen (heterophagische Vakuolen), die extrazelluläre Komponenten und Partikel enthalten; multivesikuläre Körperchen (MVBs; multivesicular bodies), die Übergangsstadien zwischen Endosomen/phagocytotischen Vakuolen und verdauenden Lysosomen sind (Abbildung 2).

Die Entdeckung des Lysosoms zusammen mit unabhängigen Experimenten, die zur gleichen Zeit die Auffassung untermauerten, dass zelluläre Proteine sich tatsächlich in einem fließenden Gleichgewicht von Synthese und Abbau befinden (siehe z.B. Lit. [10]), ließ die damaligen Wissenschaftler erstmals auf den Gedanken kommen, dass sie eine Organelle vor sich hatten, die den Abbau intrazellulärer Proteine vermitteln könnte. Die Tatsache, dass die Proteasen durch eine Membran von ihren Substraten getrennt waren, bot eine Erklärung dafür an, wie der Abbau kontrolliert wird. Es verblieb lediglich die Frage, wie die Substrate in das Lumen der Lysosomen transportiert werden.

Ein wichtiges Ergebnis in diesem Zusammenhang war die Aufklärung des grundlegenden Wirkmechanismus des Lysosoms, der Autophagie (siehe den Übersichtsartikel in Lit. [11]). Unter normalen Stoffwechselbedingungen werden Teile des Cytoplasmas, die alle Arten zellulärer Proteine enthalten, in ein membrangebundenes Kompartiment segregiert, mit einem primären Lysosom fusioniert und verdaut. Dieser Vorgang wird als Mikroautophagie bezeichnet. Unter extremeren Bedingungen, z.B. unter Nährstoffmangel, können auch Mitochondrien, Membranen des endoplasmatischen Retikulums, Glycogenkörperchen und andere Cytoplasmakomponenten in einem Makroautophagie genannten Prozess eingeschlossen werden (siehe z.B. Lit. [12]). Die verschiedenen Reaktionsweisen des Lysosoms beim Verdau extra- und intrazellulärer Proteine sind in Abbildung 2 illustriert.

Während der folgenden mehr als zwanzig Jahre zwischen Mitte der 50er und den späten 70ern wurde es jedoch zunehmend schwieriger, bestimmte Aspekte des intrazellulären Proteinabbaus mit dem bekannten lysosomalen Mechanismus zu erklären. Aus unabhängigen Experimenten mehrten sich die Hinweise, dass zumindest bestimmte Klassen zellulärer Proteine nicht-lysosomal abgebaut werden. Da keine „Alternative“ zur Verfügung stand, brachte man mal mehr mal weniger fundierte Erklärungen hervor, um die „Lysosomen-Hypothese“ zu verteidigen.

Zunächst häuften sich die Hinweise, dass sich unterschiedliche Proteine in ihrer Stabilität stark unterscheiden und dass ihre biologischen Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) um bis zu drei Größenordnungen schwanken – von wenigen Minuten bis zu vielen Tagen. So beträgt die Halbwertszeit der Ornithindecaboxylase (ODC) etwa 10 Minuten, die von Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) hingegen 15 Stunden (siehe z.B. die Übersichten in Lit. [13,14]). Außerdem

wurde gezeigt, dass sich die Abbaugeschwindigkeiten vieler Proteine abhängig von physiologischen Bedingungen wie dem Nährstoff- und Hormonzustand ändern. Es war schwierig, diese Befunde mit dem lysosomalen Wirkmechanismus in Einklang zu bringen. Dieser sagte unter anderem aus, dass die mikroautophagischen Vesikel sämtliche zellulären (cytosolischen) Proteine enthält, sodass man eine einheitliche Abbaugeschwindigkeit erwarten sollte. Falls die Mikro- und Makroautophagie tatsächlich die Mechanismen waren, die die intrazelluläre Proteolyse vermitteln, dann musste auch angenommen werden, dass eine Änderung der pathophysiologischen Bedingungen wie Nährstoffentzug oder erneute Nährstoffzuführung die Stabilität aller zellulären Proteine in gleichem Maße beeinflusst. Dies war jedoch eindeutig nicht der Fall.

Andere Bedenken hinsichtlich der Rolle des Lysosoms kamen aus Befunden, wonach spezifische und unspezifische Inhibitoren lysosomaler Proteasen unterschiedliche Effekte auf unterschiedliche Proteinp Populationen hatten; dies wies darauf hin, dass bestimmte Proteinklassen von unterschiedlichen proteolytischen Systemen angegriffen werden. So wurde der Abbau endocytierter/pinocytierter extrazellulärer Proteine deutlich gehemmt, während ein nur geringfügiger Effekt auf den Abbau langlebiger zellulärer Proteine und überhaupt kein Effekt auf den Abbau kurzlebiger und abnormer/mutierter Proteine festgestellt wurde.

Schließlich standen die thermodynamisch paradoxe Beobachtung, dass der Abbau zellulärer Proteine Stoffwechselenergie benötigt und, noch wichtiger, die sich verdichtenden Befunde, dass die proteolytische Maschinerie diese Energie direkt nutzt, im Widerspruch zur bekannten Funktionsweise lysosomaler Proteasen, die unter geeigneten sauren Bedingungen ähnlich wie alle bekannten Proteasen Proteine exergonisch abbauen.

Die Annahme, dass das Lysosom den Abbau intrazellulärer Proteine vermittelt, war trotz allem schlüssig. Die Proteolyse folgt aus einer direkten Wechselwirkung zwischen den Proteasen und ihren Substraten, und so war klar, dass aktive Proteasen nicht frei im Cytosol vorliegen können, da dies die Zelle zerstören würde. Man kam daher überein, dass jedes proteolytische System für den Abbau intrazellulärer Proteine auch einen Mechanismus beinhalten musste, der Proteasen und Substrate voneinander trennt und sie nur bei Bedarf zusammenkommen lässt. Die Komponente, die diesen „Umzäunungsmechanismus“ bewirkt, ist die Lysosomenmembran.

Niemand hatte natürlich ahnen können, dass eine damals unbekannte Art posttranslationaler Modifikation – die Ubiquitinierung – als proteolytisches Signal wirkt und dass unmarkierte Proteine geschützt bleiben. So war man zwar in der Lage, die notwendige Trennung zwischen den Proteasen und ihren Substraten anhand der Lysosomenstruktur und die Aufnahme cytosolischer Proteine in das Lumen der Lysosomen durch den Autophagie-Mechanismus zu erklären, einige entscheidende Fragen blieben aber offen. Probleme bereiteten unter anderem: 1) die schwankenden Halbwertszeiten, 2) der Energiebedarf und 3) die spezifische Reaktion unterschiedlicher Proteinklassen auf Inhibitoren lysosomaler Proteasen.

Trotzdem versuchte man auch weiterhin, das lysosomale Modell zu verteidigen. In einem Modell wurde postuliert, dass unterschiedliche Proteine mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf lysosomale Proteasen reagieren und ihre Halbwertszeit in vivo mit ihrer Empfindlichkeit gegen Proteasen in vitro korreliert.<sup>[15]</sup> Um zu erklären, warum gegen lysosomale Proteasen empfindliche Proteine extrem lange Halbwertszeiten haben können oder warum die Stabilität einzelner Proteine mit den physiologischen Randbedingungen schwankt, wurde vorgeschlagen, dass zwar alle zellulären Proteine im Lysosom eingeschlossen werden, aber nur die kurzlebigen abgebaut werden, während die langlebigen zurück ins Cytosol geschleust werden: „Um die unterschiedlichen Halbwertszeiten von Zellbestandteilen oder von einzelnen Komponenten unter wechselnden physiologischen Bedingungen erklären zu können, musste in das Modell die Möglichkeit mit einbezogen werden, dass native Komponenten zurück in das extralysosomale Kompartiment ausgeschleust werden“.<sup>[16]</sup>

Nach einem anderen Modell bestimmte die Affinität der Proteine für die Lysosomenmembran die Selektivität. Demnach steuert die Membran den Eintritt der Proteine in das Lysosom und die Abbaugeschwindigkeit.<sup>[17]</sup> Für eine ausgewählte Gruppe von Proteinen, wie die gluconeogenetischen Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Fructose-1,6-bisphosphatase, wurde vorgeschlagen (wenn auch nicht stichhaltig nachgewiesen), dass ihr Abbau in der Hefevakuole durch Glucose reguliert wird (nach einem als „Katabolit-Inaktivierung“ bezeichneten Mechanismus) und möglicherweise einen Phosphorylierungsschritt einschließt. Dieser Regulierungsmechanismus für den vakuolischen Proteinabbau war aber nur auf eine kleine und spezifische Gruppe von Proteinen beschränkt (siehe z. B. Lit. [18,19]).

Zumindest für den Fall der stressinduzierten Makroautophagie ergaben neuere Untersuchungen, dass eine allgemeine Aminosäuresequenz, KFERQ, durch Bindung an einen spezifischen „Rezeptor“ und mit Unterstützung cytosolischer und lysosomaler Chaperone den Eintritt vieler cytosolischer Proteine in das Lumen der Lysosomen dirigiert. Diese Hypothese, deren Bestätigung noch aussteht, erklärt den Abbau großer Populationen von Proteinen mit homologer Sequenz, nicht aber, wie spezifische Proteine unter festgelegten Bedingungen zum Abbau ausgewählt werden (Übersichtsartikel in Lit. [20,21]). Der Energiebedarf für den Proteinabbau wurde als indirekt beschrieben; aufgewendet wird die Energie z. B. für den Proteintransport durch die Lysosomenmembran,<sup>[22]</sup> für die Aktivität der Protonenpumpe und für die Aufrechterhaltung des stark sauren pH-Wertes in den Lysosomen, der für die optimale Aktivität der lysosomalen Proteasen notwendig ist.<sup>[23]</sup> Wir wissen inzwischen, dass beide Mechanismen Energie benötigen. Da kein anderes Modell verfügbar war und der lysosomale Proteinabbau die schlüssigste Erklärung bot, fasste Christian de Duve seine Sichtweise in einem Übersichtsartikel Mitte der 60er Jahre so zusammen: „Gerade so, wie der extrazelluläre Verdau durch die konzentrierte Wirkung von Enzymen mit beschränkter individueller Kapazität ausgeführt wird, verhält es sich unserer Auffassung nach auch beim intrazellulären Verdau“.<sup>[24]</sup> Das Problem, dass einzelne Proteingruppen mit unterschiedlicher

Empfindlichkeit auf lysosomale Hemmstoffe reagieren, blieb ungelöst und war zugleich der Auslöser dafür, dass die Suche nach einem nicht-lysosomalen proteolytischen System weiterging.

Die Suche nach dem geheimnisvollen nicht-lysosomalen proteolytischen System wurde dadurch erschwert, dass ein zellfreies Testsystem fehlte, das die zellulären Proteolysevorgänge naturgetreu nachbilden kann, d. h. Proteine spezifisch und unter Energiebedarf abbaut. Ein wichtiger Durchbruch gelang Rabinovitz und Fisher, die in Kaninchen-Retikulozyten den Abbau von Aminosäureanaloga enthaltendem Hämoglobin nachweisen konnten.<sup>[25]</sup> Ihre Experimente konnten bekannte Krankheitszustände, die Hämoglobinopathien, nachbilden. Bei diesen Erkrankungen werden mutierte Hämoglobinketten (wie das Sichelzellen-Hämoglobin) oder im Überschuss gebildete Einzelketten (die auch im Normalfall gebildet werden, bei Thalassämien aber im Überschuss auftreten, da die zweite Kette nicht synthetisiert oder aufgrund einer Mutation schnell abgebaut wird, sodass der Hämoglobinkomplex nicht zusammengefügt werden kann) in Retikulozyten schnell abgebaut.<sup>[26,27]</sup> Retikulozyten sind ausdifferenzierte rote Blutzellen, die keine Lysosomen enthalten. Daher wurde postuliert, dass das Hämoglobin in diesen Zellen durch einen nicht-lysosomalen Mechanismus abgebaut wird.

Etlinger und Goldberg<sup>[28]</sup> waren die ersten, die eine zellfreie proteolytische Zubereitung aus Retikulozyten isolierten und charakterisierten. Der Rohextrakt baute selektiv abnormes Hämoglobin ab, hydrolysierte ATP und wirkte optimal bei neutralem pH-Wert, was die These weiter festigte, dass die proteolytische Aktivität nicht-lysosomalen Ursprungs war. Ein ähnliches System wurde später durch unsere Arbeitsgruppe isoliert und charakterisiert.<sup>[29]</sup> Weitere Arbeiten unserer Gruppe führten zur Trennung, Charakterisierung und Reinigung der wichtigsten enzymatischen Komponenten aus diesen Extrakten und zur Entdeckung des Ubiquitin-Markierungssystems (siehe unten).

#### 4. Die Lysosomen-Hypothese wird angefochten

Wie oben dargelegt, konnte der bis dahin gültige Wirkungsmechanismus des Lysosoms einige zentrale Merkmale des intrazellulären Proteinabbaus nur teilweise und in manchen Punkten nicht befriedigend erklären. Ungelöste Fragen betrafen die uneinheitliche Stabilität einzelner Proteine, den Einfluss des Nährstoff- und Hormonzustandes auf den Proteinabbau und die Energieabhängigkeit der intrazellulären Proteolyse. Speziell den Befund, dass Inhibitoren in unterschiedlicher Weise auf verschiedene Klassen zellulärer Proteine wirken, konnte man sich überhaupt nicht erklären.

Das Aufkommen von Methoden zur Untersuchung der Proteinkinetik in Zellen und die Entwicklung von spezifischen und allgemeinen lysosomalen Inhibitoren führte zur Identifizierung verschiedener Klassen lang- und kurzlebiger zellulärer Proteine und zu der Entdeckung, dass diese Inhibitoren unterschiedlich auf die Proteingruppen einwirken (siehe z. B. Lit. [30,31]). Ein elegantes Experiment wurde in diesem Zusammenhang von Brian Poole und Mitarbeitern an



der Rockefeller University durchgeführt. Poole befasste sich mit der Wirkung lysosomotroper Substanzen – schwacher Basen wie Ammoniumchlorid und Chloroquin –, die sich im Lysosom anreichern und den niedrigen pH-Wert puffern. Man nahm an, dass die Wirkung von Chloroquin und ähnlichen Substanzen gegen Malaria auf diesem Mechanismus beruht. Die Vorstellung war, dass Chloroquin die Aktivität des Parasitenlysosoms hemmt, das dadurch nicht in der Lage ist, während seiner intraerythrocytischen Lebensphase das Hämoglobin des Wirtes abzubauen. Poole und Mitarbeiter markierten endogene Proteine in lebenden Makrophagen mit  $^3\text{H}$ -Leucin und „fütterten“ sie anschließend mit toten Makrophagen, die zuvor mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin markiert worden waren. Sie vermuteten, dass die Trümmer und die Proteine der toten Makrophagen von den lebenden Makrophagen phagocytiert und zum Abbau in das Lysosom transportiert wurden und verfolgten den Einfluss lysosomotroper Substanzen auf den Abbau dieser beiden Proteinpopulationen. Insbesondere untersuchten sie den Einfluss der schwachen Basen Chloroquin und Ammoniumchlorid (die in das Lysosom eindringen und Protonen neutralisieren) und des sauren Ionophors X537A, der den Protonengradienten über die Lysosomenmembran puffert. Sie fanden heraus, dass diese Wirkstoffe spezifisch den Abbau extrazellulärer Proteine hemmen, nicht jedoch den Abbau intrazellulärer Proteine.<sup>[32]</sup>

Aufgrund der Befunde sagte Poole explizit die Existenz eines nicht-lysosomalen proteolytischen Systems voraus, das intrazelluläre Proteine abbaut: „Einige der tritiummarkierten Makrophagen ließen wir die toten  $^{14}\text{C}$ -markierten Makrophagen endocytieren. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und in frisches Medium überführt. Auf diese Weise waren wir in der Lage, den Verdau von Makrophagenprotein aus zwei Quellen in den gleichen Zellen zu verfolgen. Die exogenen Proteine werden in den Lysosomen abgebaut, während die endogenen Proteine an einer Stelle abgebaut werden, die zum Abbau endogener Proteine während des Proteinumsatzes dient“.<sup>[33]</sup>

Ein schwer zu begreifender Aspekt war der Bedarf an Stoffwechselenergie beim Abbau prokaryotischer<sup>[34]</sup> und eukaryotischer Proteine.<sup>[10,35]</sup> Die Proteolyse ist ein exergonischer Prozess, weshalb die thermodynamisch paradoxe Situation, dass die intrazelluläre Proteolyse Energie benötigt, zu der Annahme führte, dass die Energie nicht direkt von den Proteasen oder für den proteolytischen Vorgang selbst verbraucht, sondern indirekt genutzt wird. Simpson fasste seine Ergebnisse so zusammen:<sup>[10]</sup> „Man kann die Daten auch dahingehend interpretieren, dass die Freisetzung von Aminosäuren aus dem Protein direkt von einer Energiezufuhr abhängt. Eine vergleichbare Hypothese, die sich auf Untersuchungen der Autolyse in Gewebestücken stützt, ist vor kurzem vorgebracht worden, doch sind die zugrundeliegenden Daten sehr schwierig zu deuten. Die Tatsache jedoch, dass die Proteinhydrolyse, wie sie durch die bekannten Proteasen und Peptidasen katalysiert wird, exergonisch verläuft, zusammen mit der Beobachtung, dass die Autolyse in exziierten Organen oder Gewebestücken noch über Wochen anhält (lange nachdem Phosphorylierung und Oxidation abgeklungen sind), macht die Hypothese unwahrscheinlich, dass die Reaktionen, die zum Proteinabbau führen, direkt von einer Energiezufuhr

abhängen“. Unschlüssig über die experimentellen Befunde hielt sich Simpson vorsichtigerweise ein Hintertürchen offen, um einen proteolytischen Prozess mit direktem Energiebedarf erklären zu können: „Die Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass zwei (oder mehr) Proteinabbau-mechanismen existieren – der eine hydrolytisch, der andere energieverbrauchend.“

Da jeder proteolytische Prozess an irgendeinem Punkt hydrolytisch sein muss, wirkt diese Unterscheidung zwischen einem hydrolytischen und einem energieverbrauchenden, mithin nicht-hydrolytischen Prozess undurchsichtig. Betrachtet man diese Aussage rückblickend mit unserer heutigen Kenntnis des Wirkmechanismus des Ubiquitinsystems, das auch im prähydrolytischen Stadium Energie benötigt (Ubiquitin-Konjugation), könnte Simpson an einen zweistufigen Mechanismus gedacht haben, ohne dies aber klar auszudrücken. Am Ende seiner erkennbar schwierig zustande gekommenen Überlegungen lässt uns Simpson mit einer vagen Erklärung zurück, die den Proteinabbau mit der Proteinsynthese, einem seinerzeit als stoffwechselenergieverbrauchend bekannten Prozess, verknüpft: „Die Tatsache, dass eine Energiezufuhr sowohl für den Einbau als auch für die Freisetzung von Aminosäuren aus Proteinen erforderlich ist, könnte auch bedeuten, dass die beiden Prozesse miteinander verknüpft sind. Zusätzliche Daten, die eine solche Sichtweise stützen, gibt es aus anderen Arten von Experimenten. Ältere Studien über den Stickstoffhaushalt von Benedict, Folin, Gamble, Smith und anderen deuten darauf hin, dass sich die Geschwindigkeit des Proteinkatabolismus mit dem Nahrungsprotein-spiegel ändert. Da man erwarten sollte, dass der Proteingehalt der Nahrung einen direkten Einfluss auf die Synthese und weniger auf den Abbau von Proteinen hat, ist auch anzunehmen, dass die veränderte Geschwindigkeit des Proteinkatabolismus durch eine Änderung der Synthesegeschwindigkeit verursacht wird“.<sup>[10]</sup>

Mit der Entdeckung von Lysosomen in Eukaryotenzellen konnte argumentiert werden, dass der Energiebedarf etwa auf den Transport der Substrate in das Lysosom oder die Aufrechterhaltung des niedrigen intralysosomalen pH-Wertes zurückgeht. Die Beobachtung von Hershko und Tomkins, dass die Aktivität der Tyrosin-Aminotransferase (TAT) im Anschluss an die Abreicherung von ATP in der Zelle stabilisiert wird,<sup>[36]</sup> deutete darauf hin, dass Energie in einem frühen Schritt der Proteolyse benötigt werden könnte, höchstwahrscheinlich sogar vor der eigentlichen Proteolyse. Ein Hinweis auf den Mechanismus ließ sich daraus jedoch nicht ableiten: Die Energie konnte beispielsweise für eine spezifische Modifizierung der Tyrosin-Aminotransferase, etwa eine Phosphorylierung, verwendet werden, die das Protein für den Abbau durch das Lysosom oder durch einen anderen, bis dahin unbekannten proteolytischen Mechanismus sensibilisiert, oder aber für eine Modifizierung, die die mutmaßliche Protease aktiviert. Sie könnte auch für einen allgemeineren lysosomalen Mechanismus genutzt werden, z. B. für den Transport der Tyrosin-Aminotransferase in das Lysosom oder für die Aufrechterhaltung des niedrigen intralysosomalen pH-Wertes, da klar ist, dass ein ATP-Abbau auch den lysosomalen Abbau vollständig hemmt. Energieinhibitoren hemmten fast vollständig den Abbau des gesamten

zellulären Proteins, was frühere Arbeiten bestätigte (z.B. Lit. [10]) und auf eine allgemeine Rolle der Energie im Proteinkatabolismus schließen ließ. Ein interessanter Befund war, dass die Energieinhibitoren einen deutlich anderen Effekt hatten als Inhibitoren der Proteinsynthese, die lediglich den gesteigerten Proteinabbau (der durch eine Abreicherung von Steroidhormonen induziert wurde) beeinflussten, nicht aber den basalen Proteinabbau. Aufgrund dieser Beobachtung konnte zumindest ausgeschlossen werden, dass die Proteinsynthese mit sämtlichen Arten von Proteinabbau eng gekoppelt ist.

Bakterien besitzen keine Lysosomen, weshalb man bei ihnen nicht mit dem Energiebedarf eines lysosomalen Proteinabbaus argumentieren kann, doch könnten andere indirekte Effekte der ATP-Hydrolyse – etwa die Phosphorylierung von Substraten oder proteolytischen Enzymen oder die Aufrechterhaltung des „energetisierten Membranstatus“ – die Proteolyse in *E. coli* beeinflussen. Nach diesem Modell würden Proteine durch Konformationsänderungen für die Proteolyse aktiviert. Konformationsänderungen könnten z.B. bei der Assoziation mit der Zellmembran auftreten, die einen lokalen, energieabhängigen Gradienten eines bestimmten Ions aufrechterhält. Ein solcher Effekt konnte jedoch ausgeschlossen werden,<sup>[37]</sup> und da es keine Hinweise auf einen Phosphorylierungsmechanismus gab (das Proteolysesystem in Prokaryoten war zu dieser Zeit allerdings noch nicht identifiziert), schien es, dass zumindest in Bakterien die Energie direkt für die Proteolyse aufgebracht wird (was sich später als zutreffend herausstellte).

In jedem Fall deutet die Tatsache, dass der eigentlich thermodynamisch exergonische Proteinabbau in Prokaryoten und Eukaryoten Energie benötigt, stark darauf hin, dass die Proteolyse in Zellen hochgradig reguliert ist und dass in beiden Organismenreichen während der Evolution ein ähnlicher Mechanismus konserviert wurde. In Anbetracht des möglichen direkten ATP-Bedarfs beim Proteinabbau in Bakterien war es nicht allzu unwahrscheinlich, einen vergleichbaren direkten Mechanismus für die Proteolyse zellulärer Proteine in Eukaryoten anzunehmen. Untermuert wurde diese Ansicht durch die Beschreibung des zellfreien proteolytischen Systems in Retikulozyten,<sup>[28,29]</sup> einem lysosomfreien Zelltyp. Bei Retikulozyten wurde gefunden, dass die Energie wahrscheinlich direkt für die Proteolyse verwendet wird, wenngleich der zugrundeliegende Mechanismus zu der Zeit ebenfalls noch unbekannt war. Auch wenn einige Fragen offen blieben, bereitete die Beschreibung des zellfreien Systems nun den Weg für die detaillierte Analyse der Proteolysemechanismen.

## 5. Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das zellfreie proteolytische System aus Retikulozyten<sup>[28,29]</sup> erwies sich als wichtiger Ausgangspunkt für die Reinigung und Charakterisierung der am Ubiquitin-Proteasom-System beteiligten Enzyme. Eine erste Fraktionierung des Rohextraktes aus Retikulozyten auf dem Anionenaustauscher Diethylaminoethylcellulose (DEAE) ergab zwei Fraktionen, die beide für die Rekonstitution der energieab-

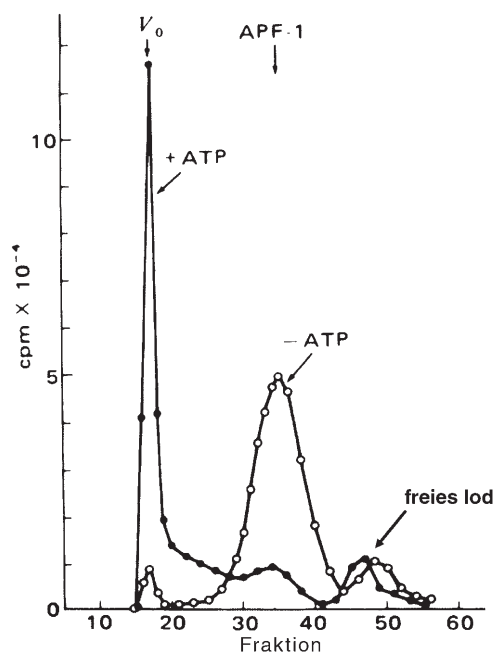
**Tabelle 2:** Auftrennung der ATP-abhängigen proteolytischen Aktivität aus Retikulozyten-Rohextrakt in zwei essenzielle komplementäre Aktivitäten (nach Lit. [38] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Fraktion	Abbau von [ <sup>3</sup> H]-Globin [%]	
	–ATP	+ATP
Lysat	1.5	10.0
Fraktion I	0.0	0.0
Fraktion II	1.5	2.7
Fraktion I + Fraktion II	1.6	10.6

hängigen proteolytischen Aktivität des Rohextraktes notwendig waren: Das nicht adsorbierte Material im Durchfluss wurde als Fraktion I bezeichnet, und das adsorbierte Protein, das mit hoher Salzkonzentration vom Austauscher eluiert wurde, nannte man Fraktion II (Tabelle 2).<sup>[38]</sup>

Dies war eine wichtige Beobachtung für die spätere Aufschlüsselung des Proteolysesystems. Zum einen ließ der Befund darauf schließen, dass das System nicht aus einer einzelnen „klassischen“ Protease bestand, die im Laufe der Evolution eine Energieabhängigkeit erworben hatte (obwohl solche energieabhängigen Proteasen, etwa das 26S-Proteasom aus Säugern und das prokaryotische Genprodukt des *lon*-Gens, später beschrieben wurden), sondern dass es sich aus mindestens zwei Komponenten zusammensetzte. Dieser Befund einer energieabhängigen, aus zwei Komponenten bestehenden Protease passte in kein Konzept. Im Versuch, eine Erklärung zu finden, schlugen wir beispielsweise vor, dass es sich bei den beiden Fraktionen um eine inhibierte Protease und ihren Aktivator handeln könnte.

Aus den Rekonstitutionsexperimenten und dem Befund, dass die beiden aktiven Komponenten voneinander abhängen, zogen wir unseren Nutzen, indem wir versuchten, die Aktivität aus getrennten Fraktionen immer zu rekonstituieren, wenn wir im Verlauf der weiteren Reinigungsschritte einen Aktivitätsverlust feststellten. Mit diesem Ansatz der biochemischen „Komplementierung“ gelang es uns, weitere Enzyme des Systems zu entdecken, die im Reaktionsgemisch essenziell sind, um die vielstufige Proteolyse des Substrats zu katalysieren. Wir entschlossen uns, als erstes die aktive Komponente aus Fraktion I zu reinigen. Was wir fanden, war ein kleines, etwa 8.5 kDa großes hitzestabiles Protein, das wir als ATP-abhängigen Proteolysefaktor 1 (APF-1) bezeichneten. APF-1 wurde später als Ubiquitin identifiziert (siehe unten; die Bezeichnung APF-1 wird im folgenden Text bis zu der Stelle beibehalten, wo die Identifizierung des Ubiquitins beschrieben wird). Im Nachhinein erwies es sich als eine wichtige Entscheidung, die Reinigung mit Fraktion I zu beginnen, denn diese Fraktion enthielt nur ein einzelnes Protein, APF-1, das zur Proteolyse unserer damaligen Modellsubstrate (BSA und Lysozym) essenziell war, während Fraktion II, wie sich später herausstellte, zusätzliche aktive Faktoren enthielt. Spätere Experimente ergaben, dass Fraktion I noch andere Bestandteile aufwies, die für den Abbau anderer Substrate notwendig waren, für die Rekonstitution des damals verwendeten Systems jedoch nicht gebraucht wurden. So konnten wir nicht nur APF-1 reinigen, sondern auch rasch seine Wirkungsweise entschlüsseln. Hätten wir mit Fraktion II begonnen, hätten sich die Forschungen erheblich

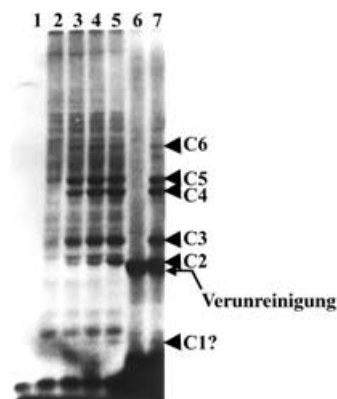


**Abbildung 3.** APF-1/Ubiquitin wird zu höheren Massenzahlen hin verschoben, wenn es in ATP-haltigem Zellrohextrakt inkubiert wird:  $^{125}$ I-markiertes APF-1/Ubiquitin wurde mit Fraktion II aus Retikulozyten-Rohextrakt in Abwesenheit ( $\circ$ ) oder in Gegenwart ( $\bullet$ ) von ATP inkubiert, und das Reaktionsgemisch wurde mit Gelfiltrations-Chromatographie getrennt. Aufgetragen ist die gemessene Radioaktivität in jeder Fraktion. Man erkennt, dass das APF-1/Ubiquitin nach Zugabe von ATP mit einer oder mehreren Komponenten aus Fraktion II assoziiert; bei diesen könnte es sich um andere Enzyme oder ihre Substrate handeln. Abdruck nach Lit. [39] mit freundlicher Genehmigung der National Academy of Sciences.

schwieriger gestaltet. Ein ganz entscheidendes Ergebnis war, dass bei Inkubation in Gegenwart der Fraktion II mehrere Moleküle APF-1 kovalent an das Substrat binden und dass die Modifikation ATP verbraucht (Abbildungen 3 und 4).<sup>[39,40]</sup> Außerdem fanden wir, dass die Modifikation reversibel ist und dass APF-1 vom Substrat oder seinen Abbauprodukten abgespalten werden kann.<sup>[40]</sup>

Basierend auf der Entdeckung, dass APF-1 kovalent an Proteinsubstrate konjugiert und in Gegenwart von ATP und dem Rohextrakt von Fraktion II deren Proteolyse stimuliert, wurde 1980 ein Modell vorgeschlagen, demzufolge die Modifikation eines Proteins durch mehrere Moleküle APF-1 dieses für den Abbau durch eine damals noch unbekannte, stromabwärts liegende Protease markiert, die unmodifiziertes Substrat nicht erkennt; das APF-1 wird nach dem Abbau freigesetzt und wiederverwendet.<sup>[40]</sup> Eine Analyse der Aminosäuren von APF-1 zusammen mit dem bekannten Molekulargewicht und anderen allgemeinen Merkmalen führte zu dem Verdacht, dass es sich bei APF-1 um Ubiquitin handeln könnte,<sup>[41]</sup> ein bekanntes Protein mit damals noch unbekannter Funktion. Tatsächlich wurde diese Vermutung durch Wilkinson und Mitarbeiter eindeutig bestätigt.<sup>[42]</sup>

Ubiquitin ist ein kleines, hitzestabiles und evolutionär hochkonserviertes Protein mit 76 Aminosäuren. Es wurde erstmalig bei der Isolierung von Thymopoetin gereinigt,<sup>[43]</sup> und man fand anschließend, dass es in allen lebenden Zellen,



**Abbildung 4.** Mehrere APF-1/Ubiquitin-Moleküle werden an das Proteolysesubstrat gebunden, um es für den Abbau zu markieren: Um die Daten aus dem in Abbildung 3 gezeigten Experiment mechanistisch zu analysieren und um die Hypothese zu testen, dass APF-1 mit dem Proteolysesubstrat konjugiert, wurde  $^{125}$ I-APF-1/Ubiquitin mit dem Rohextrakt von Fraktion II ohne (Spur 1) oder mit ATP (Spuren 2–5) sowie ohne Lysozym (Spuren 1, 2) und mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Lysozym (Spuren 3–5) inkubiert. Die Reaktionsgemische, die in den Spuren 6 und 7 getrennt wurden, waren ohne (Spur 6) oder mit ATP (Spur 7) inkubiert worden und enthielten unmarkiertes APF-1/Ubiquitin und  $^{125}$ I-markiertes Lysozym. C1–C6 bezeichnen spezifische APF-1/Ubiquitin-Lysozym-Addukte, wobei die Zahl der an ein Lysozymmolekül gebundenen APF-1/Ubiquitin-Moleküle vermutlich von 1 bis 6 steigt. Die Reaktionsgemische wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt und durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm entwickelt. Abdruck nach Lit. [40] mit freundlicher Genehmigung der National Academy of Sciences.

einschließlich Prokaryoten, ubiquitär exprimiert wird.<sup>[44]</sup> Interessanterweise stellte man in ersten Untersuchungen lymphocytendifferenzierende Eigenschaften des Ubiquitins fest, die auf die Stimulation der Adenylatcyclase zurückgeführt wurden.<sup>[44,45]</sup> Dies führte dazu, dass man dem Enzym den Namen UBIP (ubiquitous immunopoietic polypeptide) gab.<sup>[44]</sup> In späteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass Ubiquitin nicht an der Immunantwort beteiligt ist,<sup>[46]</sup> sondern dass eine Kontamination von Endotoxin im Präparat die Adenylatcyclase-Aktivierung und T-Zell-Differenzierung auslöste. Außerdem ließ sich aus der Sequenz verschiedener Eubakterien- und Archaeobakterien-Genome sowie aus biochemischen Analysen von Zellextrakten dieser Organismen nachweisen (unveröffentlichte Ergebnisse), dass sich das Vorkommen von Ubiquitin auf Eukaryoten beschränkt. Das in Bakterien gefundene Ubiquitin<sup>[44]</sup> war wahrscheinlich eine Kontamination von Hefe-Ubiquitin aus dem Hefeextrakt, der für das Anzuchtmedium der Bakterien verwendet worden war. Auch wenn der Name „Ubiquitin“ rückblickend unzutreffend ist, weil das Protein nur in Eukaryoten vorkommt und nicht so verbreitet ist wie ursprünglich angenommen, hat man ihn aus historischen Gründen beibehalten. Um Verwirrung zu vermeiden schlage ich entsprechend vor, dass auch die Namen anderer neuartiger Enzyme und Komponenten des Ubiquitinsystems (und auch anderer Systeme) stets so verwendet werden sollen, wie sie von ihren Entdeckern geprägt wurden.



Bedeutsam für die Untersuchung des Ubiquitinsystems war die Entdeckung, dass ein einzelnes Ubiquitinmolekül kovalent an Histone konjugieren kann, vor allem an die Histone H2A und H2B. Die Funktion dieser Konjugate blieb bis vor kurzem rätselhaft, auch wenn ihre Struktur schon Mitte der 70er Jahre aufgeklärt wurde. Die Struktur des Ubiquitinkonjugats mit H2A (uH2A, auch als Protein A24 bezeichnet) wurde durch Goldknopf und Busch<sup>[47,48]</sup> sowie Hunt und Dayhoff<sup>[49]</sup> entschlüsselt. Die beiden Proteine sind durch eine gabelförmig verzweigte Isopeptidbindung zwischen dem carboxyterminalen Glycin des Ubiquitins (Gly<sup>76</sup>) und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysins (Lys<sup>119</sup>) des Histonmoleküls verknüpft. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Isopeptidbindung identisch ist mit der Bindung zwischen Ubiquitin und dem für die Proteolyse markierten Zielprotein<sup>[50]</sup> und auch mit der Bindung zwischen den Ubiquitinresten in der Polyubiquitinkette,<sup>[51,52]</sup> die an den Proteolysesubstraten synthetisiert wird und als Proteolysesignal für das stromabwärts liegende 26S-Proteasom dient. In dieser speziellen Polyubiquitinkette wird eine Bindung zwischen Gly<sup>76</sup> des einen Ubiquitinmoleküls und einem inneren Lys<sup>48</sup> des zuvor konjugierten Moleküls geknüpft. Es werden ausschließlich die über Lys<sup>48</sup> aufgebauten Ketten vom 26S-Proteasom erkannt: Diese sind die Proteolysesignale.

In neueren Studien wurde gezeigt, dass das erste Ubiquitinmolekül auch linear an den N-terminalen Rest des Proteolysesubstrates binden kann.<sup>[53]</sup> Die nachfolgenden Ubiquitinmoleküle erzeugen anschließend die über Lys<sup>48</sup> verknüpfte Polyubiquitinkette an dem ersten linear gebundenen Rest. Diese N-terminale Ubiquitinierung ist in jedem Fall dann erforderlich, wenn lysinfreie Proteine zum Abbau markiert werden sollen. Es wurden aber auch einige lysinhaltige Proteine beschrieben, die diesen Stoffwechselweg nehmen, z. B. der muskelspezifische Transkriptionsfaktor MyoD. In diesen Fällen sind die internen Lysinreste vermutlich für die entsprechenden Ligasen nicht zugänglich.

Einige andere Arten von konjugierten Polyubiquitinketten sind beschrieben worden, die nicht zur Markierung von Substraten für die Proteolyse dienen. So gibt es eine über Lys<sup>68</sup> verknüpfte Polyubiquitinkette, die vermutlich für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erforderlich ist (siehe Lit. [54]). Ebenfalls aufgeklärt wurde vor kurzem die Rolle der Monoubiquitinierung von Histonen, die, wahrscheinlich durch Modulation der Nucleosomenstruktur, für die Regulation der Transkription zuständig ist (siehe z. B. Lit. [55,56]).

Die Entdeckung, dass APF-1 mit Ubiquitin identisch ist und auf gleiche Weise über eine energiereiche Isopeptidbindung an das Proteolysesubstrat bindet wie an das Histon H2A, löste damals das Rätsel um den Energiebedarf der intrazellulären Proteolyse und bereitete den Weg für die Entschlüsselung des komplexen Mechanismus, der zur Bildung dieser Isopeptidbindung führt. Der Vorgang erwies sich als vergleichbar mit der durch tRNA-Synthetase katalysierten Bildung einer Peptidbindung nach Aminosäureaktivierung, wie sie im Verlauf der Proteinsynthese und während der nichtribosomalen Synthese kurzer Peptide auftritt.<sup>[57]</sup> Mit dem entschlüsselten Mechanismus der Ubiquitinaktivierung und unter Verwendung von immobilisiertem Ubiquitin als

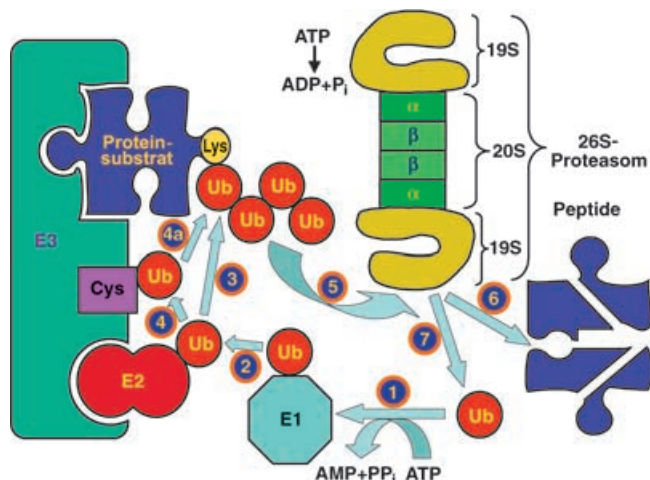
„kovalentem“ Affinitätsanker gelang es uns, die drei Enzyme zu reinigen, die an der Kaskadenreaktion der Ubiquitinkonjugation beteiligt sind: E1 (das Ubiquitin-aktivierende Enzym), E2 (das Ubiquitin-Trägerprotein) und E3 (die Ubiquitin-Proteinligase).<sup>[58,59]</sup> Die Entdeckung einer Ligase E3 mit einer hohen Substratspezifität lieferte eine mögliche Antwort auf die Frage der abweichenden Stabilitäten unterschiedlicher Proteine – der Schlüssel konnte darin liegen, dass diese Proteine von unterschiedlichen Ligasen spezifisch erkannt und markiert werden.

Innerhalb kurzer Zeit fanden sich klare Belege für die Hypothese, dass Ubiquitin als Markierung fungiert. Chin und Mitarbeiter injizierten markiertes Ubiquitin und Hämoglobin in HeLa-Zellen und denaturierten das injizierte Hämoglobin durch Oxidation mit Phenylhydrazin. Durch den Denaturierungsschritt wurde die Ubiquitinkonjugation an das Globin deutlich verstärkt, wobei die Konzentration der Globin-Ubiquitin-Konjugate proportional zur Geschwindigkeit des Hämoglobinabbaus war.<sup>[60]</sup> Hershko und Mitarbeiter beobachteten eine ähnliche Korrelation für kurzlebige Proteine, die ein Aminosäureanalogon enthielten.<sup>[61]</sup> In einer früher isolierten Zellzyklusstoppmutante, die das Ubiquitin-Histon-Addukt H2A bei der permissiven Temperatur verliert,<sup>[62]</sup> wurde ein thermolabiles E1 gefunden.<sup>[63]</sup> Nach Inaktivierung durch Erhitzen ist die Zelle nicht mehr fähig, normale kurzlebige Proteine abzubauen.<sup>[64]</sup> Zwar erbrachten diese Zellexperimente keinen direkten Nachweis, dass die Ubiquitinierung des Substrats als Abbausignal dient, sie lieferten aber den bis dahin stärksten Hinweis auf eine direkte Verbindung zwischen Ubiquitinkonjugation und Proteinabbau.

Das einzige noch fehlende Bindeglied, das man zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert hatte, war die stromabwärts liegende Protease, die die ubiquitinierten Substrate spezifisch erkennt. Tanaka und Mitarbeiter fanden einen zweiten ATP-abhängigen Schritt im proteolytischen System der Retikulozyten, der nach der Ubiquitinkonjugation auftritt.<sup>[65]</sup> und Hershko und Mitarbeiter wiesen nach, dass diese Energie für den Abbau der Konjugate benötigt wird.<sup>[66]</sup> Ein wichtiger Fortschritt waren Arbeiten von Hough und Mitarbeitern, die eine hochmolekulare alkalische Protease teilweise reinigten und charakterisierten; das Enzym baute Ubiquitinaddukte von Lysozym ATP-abhängig ab, nicht jedoch unmarkiertes Lysozym.<sup>[67]</sup> Diese Protease, die später als 26S-Proteasom benannt wurde (siehe unten), erfüllte alle notwendigen Kriterien der gesuchten spezifischen proteolytischen Komponente des Ubiquitinsystems.

Der Befund wurde von Waxman und Mitarbeitern bestätigt, die außerdem die Protease gründlicher charakterisierten. Es handelt sich um ein ungewöhnlich großes, ca. 1.5 MDa schweres Enzym, das keiner anderen bekannten Protease ähnelt.<sup>[68]</sup> Ein weiterer Schritt nach vorne war die Entdeckung,<sup>[69]</sup> dass ein kleinerer neutraler 20S-Proteasekomplex aus vielen Untereinheiten, der zusammen mit dem größeren 26S-Komplex entdeckt wurde, einem „multikatalytischen Proteinasekomplex“ (MPC) gleicht, den Wilk und Orłowski<sup>[70]</sup> in der Rinderspeicheldrüse gefunden hatten. Diese 20S-Protease ist ATP-unabhängig und katalysiert Spaltungen am C-terminalen Ende von hydrophoben, basischen und sauren

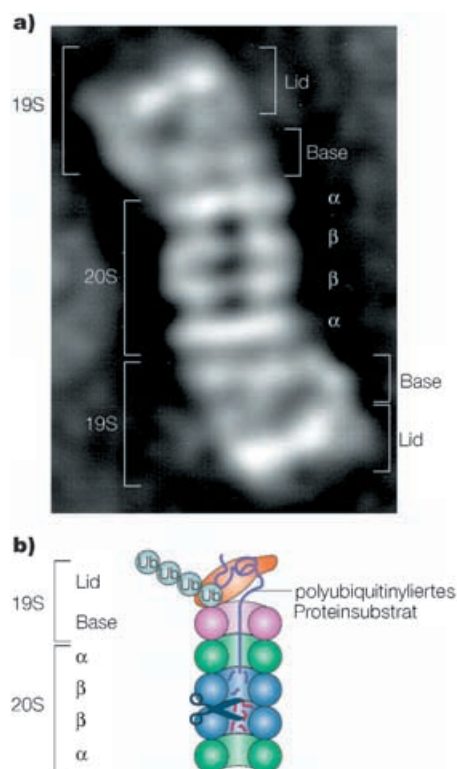
Aminosäureresten. Hough et al. wiesen auf die Möglichkeit hin, dass diese 20S-Protease ein Bestandteil der größeren 26S-Protease sein könnte, die Ubiquitinaddukte abbaut.<sup>[69]</sup> Tatsächlich wurde in späteren Untersuchungen gezeigt, dass der



**Abbildung 5.** Das proteolytische Ubiquitin-Proteasom-System: Ubiquitin wird durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert (1) und auf ein Ubiquitin-Trägerprotein (ubiquitin-conjugation enzyme, UBC) E2 übertragen (2). E2 überträgt die aktivierten Ubiquitinreste auf das Substratprotein, das spezifisch von der Ubiquitinligase E3 gebunden wird. Der Transfer findet entweder direkt (3) (bei RING-Finger-Ligasen) oder über eine weitere Thiolester-Zwischenstufe an der Ligase statt (4, 4a) (bei HECT-Domänen-Ligasen). Durch aufeinander folgende Konjugation von Ubiquitinmolekülen entsteht eine Polyubiquitinkette, die als Bindungs- (5) und Abbausignal für das stromabwärts liegende 26S-Proteasom dient. Das Substrat wird zu kurzen Peptiden abgebaut (6), und wiederverwendbares Ubiquitin wird von Ubiquitin-abspaltenden Enzymen (de-ubiquitinating enzymes, DUBs) freigesetzt (7).

20S-Komplex das katalytisch wirkende Kernprotein des größeren 26S-Komplexes ist.<sup>[71,72]</sup> Der unumstößliche Beweis, dass die aktive „pilzförmige“ 26S-Protease durch die Assoziation zweier separater Unterkomplexe entsteht – des katalytischen zylinderförmigen 20S-MPC und des kugelförmigen 19S-Unterkomplexes, dem man eine regulatorische Funktion zuschrieb –, wurde allerdings erst in den frühen 90er Jahren durch Hoffman et al. erbracht,<sup>[73]</sup> die die beiden gereinigten Komplexe mischten und so das aktive 26S-Enzym erzeugten.

Das Proteasom ist eine große multikatalytische 26S-Protease, die polyubiquitinierte Proteine zu kleinen Peptiden abbaut (Abbildungen 5 und 6). Es besteht aus zwei Unterkomplexen: einem 20S-Kernprotein (CP), das Träger der katalytischen Aktivität ist, und einem regulatorischen 19S-Protein (RP). Das 20S-CP hat eine fassförmige Struktur aus vier aufeinander liegenden Ringen – zwei identischen äußeren  $\alpha$ -Ringen und zwei identischen inneren  $\beta$ -Ringen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe von Eukaryoten bestehen jeder aus sieben verschiedenen Untereinheiten, sodass dem 20S-Komplex die allgemeine Struktur  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  zukommt. Die katalytischen Zentren befinden sich auf einigen der  $\beta$ -Untereinheiten. Beide Enden des 20S-Fasses können von regulatorischen 19S-Proteinen abgeschirmt werden. Diese bestehen aus jeweils 17 Untereinheiten, von denen 9 einen Basalkomplex



**Abbildung 6.** Struktur des Proteasoms. Wiedergabe nach Lit. [83] mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group. a) Elektronenmikroskopische Aufnahme des 26S-Proteasoms aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*; b) schematische Darstellung der Struktur und Funktion des 26S-Proteasoms.

(„base“) und 8 einen Deckelkomplex („lid“) bilden. Eine wichtige Funktion des 19S-RP ist es, ubiquitinierte Proteine und andere potenzielle Substrate des Proteasoms zu erkennen. Mehrere Ubiquitin-bindende Untereinheiten des 19S-RP wurden bereits identifiziert, doch ihre biologische Wirkungsweise konnte noch nicht aufgeklärt werden. Eine zweite Funktion des 19S-RP besteht darin, eine Öffnung zum  $\alpha$ -Ring freizulegen, sodass das Substrat in die proteolytische Kammer gelangen kann. Da ein gefaltetes Protein nicht durch den schmalen Kanal des Proteasoms passt, nimmt man auch an, dass das 19S-RP Substrate entfaltet und in das 20S-CP transportiert. Die Öffnung des Kanals und die Entfaltung des Substrats erfordern Stoffwechselenergie, und entsprechend trägt der Basalkomplex sechs unterschiedliche ATPase-Untereinheiten. Nach dem Abbau des Proteins werden kurze Peptide, die aus dem Substrat stammen, sowie wiederverwendbares Ubiquitin freigesetzt.

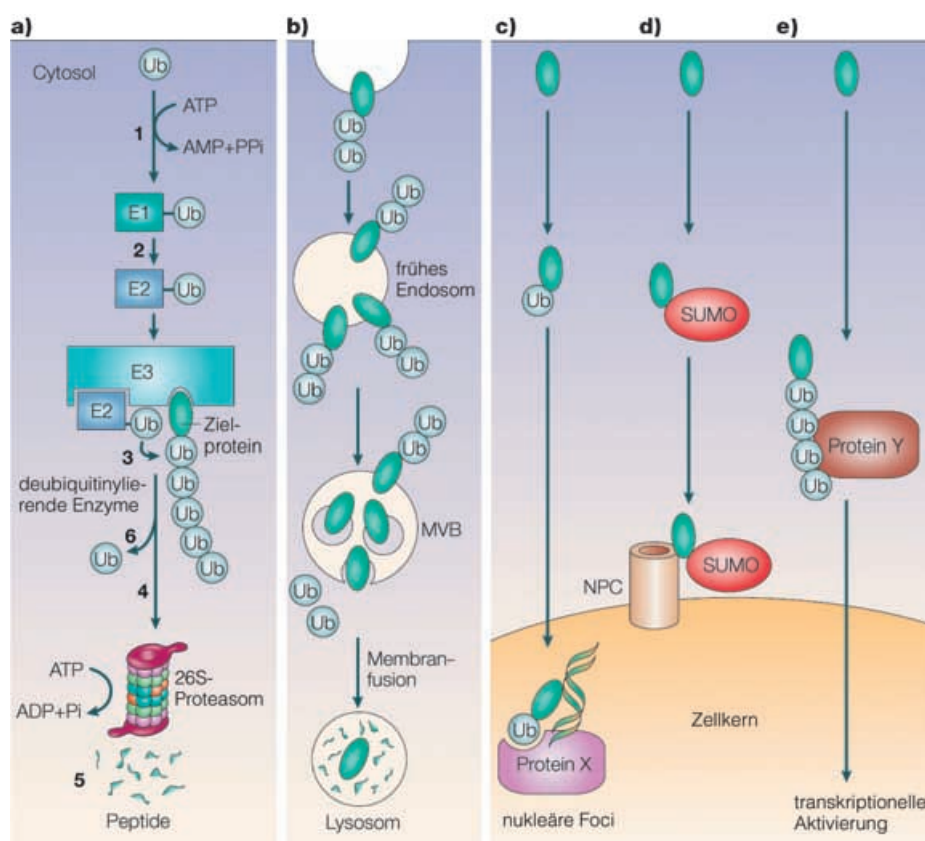
## 6. Schlussbemerkungen

Die Erkenntnis, dass die Proteolyse ein zentraler Regulationsmechanismus ist, dient als ein bemerkenswertes Beispiel für das Aufkommen eines neuen biologischen Konzepts und für die Auseinandersetzungen, die die Ablösung alter Vorstellungen begleiten. Der fünf Jahrzehnte währende Lernprozess zwischen den frühen 40er und 90er Jahren

begann mit erbitterten Debatten darüber, ob zelluläre Proteine statisch sind, wie man es lange Zeit geglaubt hatte, oder ob sie einem Umsatz unterliegen. Auf die Entdeckung des dynamischen Zustandes der Proteine folgte die Entdeckung des Lysosoms, das man von Mitte der 50er Jahre bis Mitte der 70er Jahre für diejenige Organelle hielt, in der intrazelluläre Proteine zerstört werden. Unabhängige experimentelle Hinweise unterhöhlten allmählich die Lysosomen-Hypothese und führten zu einer neuen Vorstellung, wonach der Großteil der intrazellulären Proteine – unter basalen Stoffwechselbedingungen – durch ein nichtlysosomales System abgebaut wird. In den späten 70er und frühen 80er Jahren schließlich wurde das Ubiquitinsystem entdeckt.

Mit der Identifizierung der Reaktionen und Enzyme, die an der Ubiquitin-Proteasom-Kaskade beteiligt sind, begann in den späten 80er und frühen 90er Jahren eine neue Ära der Proteolyseforschung. Immer mehr Untersuchungen wurden publiziert, die eine Beteiligung des Systems an der Markierung von regulatorischen Schlüsselproteinen aufzeigten; Beispiele waren lichtregulierte Proteine in Pflanzen, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Tumorsuppressoren und Tumorpromotoren in Säugerzellen (siehe z.B. Lit. [74–78]). Es folgten zahlreiche Studien zu den Abbaumechanismen dieser spezifischen Proteine, von denen jedes seinen eigenen und einzigartigen Erkennungs- und Regulationsmechanismus aufweist. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurden hunderte von E3-Enzymen aufgedeckt, was die Komplexität und die hohe Spezifität und Selektivität des Systems bestätigte.

Zwei wichtige Fortschritte waren die Entdeckung der nicht-proteolytischen Funktionen von Ubiquitin (z.B. Aktivierung der Transkription und Beförderung von Proteinen zur Vakuole) und die Entdeckung von Modifikationen durch ubiquitinähnliche Proteine (ubiquitin-like proteins, UBLs), die ebenfalls an zahlreichen nicht-proteolytischen Funktionen beteiligt sind, etwa dem Dirigieren von Proteinen zu ihrem subzellulären Bestimmungsort, dem Schutz von Proteinen vor Ubiquitinierung oder der Steuerung von Prozessen wie der Autophagie (siehe z.B. Lit. [79]). Einige Aufgaben der Modifikationen durch Ubiquitin und UBLs sind in Abbildung 7 zusammengestellt. All diese Experimente ließen die Erkenntnis heranreifen, dass diese neue Art kovalenter Konjugation eine Schlüsselrolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse durch proteolytische und nicht-proteolytische Mechanismen spielt; Beispiele sind Zellzyklus, Zellteilung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung, Aktivierung und Hemmung der Transkription, Apoptose, Immun-

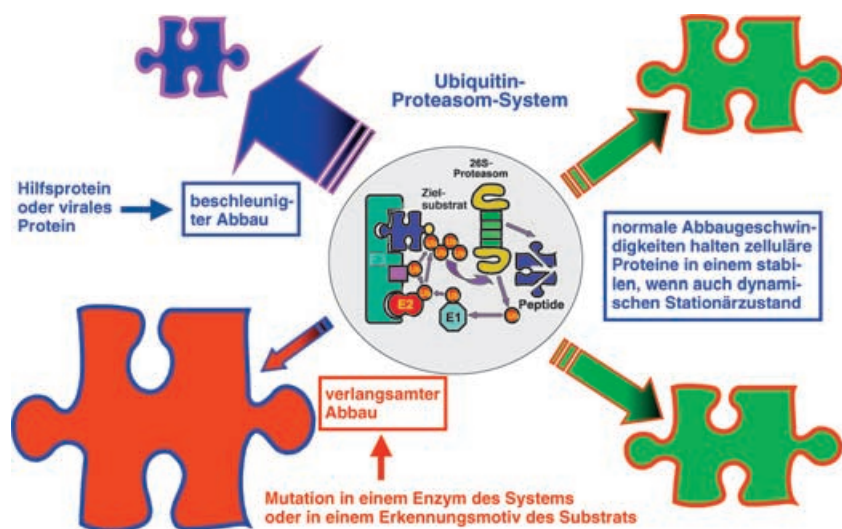


**Abbildung 7.** Einige wichtige Aufgaben von Modifikationen durch Ubiquitin und ubiquitinähnliche Proteine: a) Proteasom-abhängiger Abbau zellulärer Proteine (siehe Abbildungen 5 und 6); b) Mono- oder Oligoubiquitinierung, die Membranproteine zum Abbau im Lysosom oder in der Vakuole markiert; c) Monoubiquitinierung oder d) singuläre Modifikation durch ein ubiquitinähnliches Protein, z. B. SUMO, die Proteine zum Transport zu subzellulären Bestimmungsorten wie nukleären Foci oder dem Kernporenkomplex (NPC) markieren. Die Modifikation durch UBLs kann anderen, nicht-proteolytischen Aufgaben dienen, etwa dem Schutz von Proteinen vor Ubiquitinierung oder der Aktivierung von E3-Komplexen. e) Die Erzeugung einer Lys<sup>63</sup>-basierten Polyubiquitinkette kann direkt oder indirekt Transkriptionsregulatoren aktivieren (über die Rekrutierung anderer Proteine wie des gezeigten Proteins Y oder durch Aktivierung stromaufwärts liegender Komponenten wie Kinasen). Ub = Ubiquitin. Abdruck nach Lit. [83] mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

und Entzündungsreaktionen, Signaltransduktion, rezeptor-vermittelte Endocytose, verschiedene Stoffwechselwege und die Qualitätskontrolle der Zelle. Mit den Entdeckungen, dass die Modifikation durch Ubiquitin an der Beförderung von Proteinen zum Lysosom oder zur Vakuole beteiligt ist und dass die Modifikation durch spezifische ubiquitinähnliche Proteine und Konjugationsmechanismen die Autophagie steuert, schloss sich ein historischer Kreis, zeigte es sich doch, dass die beiden scheinbar unterschiedlichen proteolytischen Systeme miteinander kommunizieren.

Bedenkt man, wieviele Prozesse und Substrate über eine Ubiquitinierung reguliert werden, so war es nicht überraschend, dass Störungen dieses Systems direkt oder indirekt der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen zugrunde liegen. Während die Inaktivierung eines Hauptenzymes wie E1 tödlich ist, rufen Mutationen in Enzymen oder in Substrat-erkennungsmotiven, die keine lebenswichtigen Stoffwechselwege betreffen oder die betreffenden Prozesse nur teilweise hemmen, ein breites Spektrum von Krankheitsbildern hervor.





**Abbildung 8.** Störungen im Ubiquitin-Proteasom-System und Pathogenese menschlicher Krankheiten: Der normale Abbau zellulärer Proteine hält diese in einem Fließgleichgewicht, dessen Niveau sich unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen ändern kann (rechte Seite, oben und unten). Wenn der Abbau durch eine Zunahme an E3 beschleunigt wird (z. B. Skp2 im Falle von p27), oder aber durch die Überexpression eines Hilfsproteins, das einen Komplex mit dem Substrat bildet und es für den Abbau markiert (z. B. assoziiert das Oncoprotein E6 des Papillomavirus des Menschen mit p53 und markiert es für den Abbau durch die E6-AP-Ligase; die ER-Proteine US2 und US11, die vom Cytomegalie-Virus codiert werden, markieren MHC-Moleküle der Klasse I für den mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierten Abbau), so nimmt die Gleichgewichtskonzentration des Proteins ab (links oben). Eine Mutation in einer Ubiquitinligase (z. B. bei adenomatöser Polyposis coli oder in E6-AP beim Angelman-Syndrom) oder in einem Erkennungsmotiv des Substrats (kann im  $\beta$ -Catenin oder in ENaC auftreten) führt zu einem verlangsamten Abbau und der Akkumulation des Substratproteins (links unten).

Ähnlich können sich erworbene Änderungen in der Aktivität des Systems zu bestimmten Krankheiten entfalten. Die pathologischen Zustände, die mit dem Ubiquitinsystem zusammenhängen, lassen sich in zwei Gruppen einteilen: 1) Zustände, die auf einen Funktionsverlust zurückgehen – etwa Mutationen in einem Enzym des Ubiquitinsystems oder im Erkennungsmotiv des Proteolysesubstrats; hierdurch werden bestimmte Proteine stabilisiert. 2) Zustände, die durch einen Funktionsgewinn hervorgerufen werden – etwa ein abnormer oder beschleunigter Abbau des Zielproteins.

Störungen des Ubiquitinsystems, die Krankheitszustände verursachen, sind in Abbildung 8 zusammengestellt. Die gezielte Inaktivierung von Genen, die für spezifische Enzyme und Substrate des Ubiquitinsystems in Tieren codieren, ermöglicht einen systematischeren Einblick in das breite Spektrum möglicher Krankheiten, die durch Störungen der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse hervorgerufen werden. Ein gründlicheres Verständnis der Abläufe und die Identifizierung der Komponenten, die am Abbau von regulatorischen Schlüsselproteinen beteiligt sind, werden zur Entwicklung mechanismusbasierter Wirkstoffe führen, die spezifisch nur die beteiligten Proteine angreifen. Der erste Wirkstoff, ein spezifischer Hemmstoff des Proteasoms, befindet sich bereits am Markt.<sup>[80]</sup> Für die Zukunft ist insbesondere die Entdeckung solcher Wirkstoffe zu erwarten, die gegen spezifische Prozesse gerichtet sind. Ein Beispiel ist die Hemmung der beschleunigten Mdm2- oder E6-AP-vermittelten Markie-

rung des Tumorsuppressors p53, die zur Wiederherstellung seiner Funktion führt.

Viele Übersichtsartikel zu diversen Aspekten des Ubiquitinsystems sind veröffentlicht worden. Der Zweck dieses Aufsatzes war es, dem Leser die historischen Meilensteine in der Ubiquitinforschung zu schildern. Für eine weitergehende Lektüre wird auf die vielen Aufsätze zum Thema verwiesen, z. B. Lit. [81,82]. Einige Teile dieses Aufsatzes, darunter mehrere Abbildungen, basieren auf dem kürzlich publizierten Übersichtsartikel in Lit. [83].

*Die Forschungen meiner Arbeitsgruppe wurden während vieler Jahre durch folgende Institutionen unterstützt: US-Israel Binational Science Foundation (BSF), Israel Science Foundation (ISF) der Israeli National Academy of Humanities, Arts and Sciences, Deutsch-Israelische Stiftung für wissenschaftliche Forschung und Entwicklung (GIF), Israel Cancer Research Fund USA (ICRF), Deutsch-Israelisches Programm zur Zusammenarbeit (DIP), Europäische Union (EU), Israel Cancer Society (ICS), Prostate Cancer Foundation Israel (PCF), Foundation for Promotion of Research at Technion sowie verschiedene vom Vice President of the Technion for Research vergebene Forschungsgelder. Teile der Ausstattung unseres Labors und des Cancer and Vascular Biology Research Center wurden mit Mitteln des Wolfson Charitable Fund – Center of Excellence for Studies on Turnover of Cellular Proteins and its Implication to Human Diseases erworben.*

Eingegangen am 26. April 2005

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] H. T. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1958**, 27, 1–14.
- [2] E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 42619–42631.
- [3] R. D. Simoni, R. L. Hill, M. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, e1–e3; siehe auch: R. Schoenheimer, D. Rittenberg *J. Biol. Chem.* **1935**, 111, 163–168; D. Rittenberg, R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* **1937**, 121, 235–253
- [4] R. Schoenheimer, S. Ratner, D. Rittenberg, *J. Biol. Chem.* **1939**, 127, 333–344.
- [5] S. Ratner, D. Rittenberg, A. S. Keston, R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* **1940**, 134, 665–676.
- [6] R. Schoenheimer, *The Dynamic State of Body Constituents*, Harvard University Press, Cambridge, **1942**.
- [7] D. S. Hogness, M. Cohn, J. Monod, *Biochim. Biophys. Acta* **1955**, 16, 99–116.
- [8] C. de Duve, R. Gianetto, F. Appelmans, R. Wattiaux, *Nature* **1953**, 172, 1143–1144.
- [9] R. Gianetto, C. de Duve, *Biochem. J.* **1955**, 59, 433–438.
- [10] M. V. Simpson, *J. Biol. Chem.* **1953**, 201, 143–154.
- [11] G. E. Mortimore, A. R. Poso, *Annu. Rev. Nutr.* **1987**, 7, 539–564.
- [12] T. P. Ashford, K. R. Porter, *J. Cell Biol.* **1962**, 12, 198–202.
- [13] R. T. Schimke, D. Doyle, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, 39, 929–976.



- [14] A. L. Goldberg, A. C. St. John, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, 45, 747–803.
- [15] H. L. Segal, J. R. Winkler, M. P. Miyagi, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 6364–6365.
- [16] M. Haider, H. L. Segal, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, 148, 228–237.
- [17] R. T. Dean, *Acta Biol. Med. Ger.* **1977**, 36, 1815–1820.
- [18] M. Müller, H. Müller, H. Holzer, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 723–727.
- [19] H. Holzer, *Revis. Biol. Cellular* **1989**, 21, 305–319.
- [20] A. E. Majeski, J. F. Dice, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 2435–2444.
- [21] A. M. Cuervo, J. F. Dice, *J. Mol. Med.* **1998**, 76, 6–12.
- [22] M. Hayashi, Y. Hiroi, Y. Natori, *Nature New Biol.* **1973**, 242, 163–166.
- [23] D. L. Schneider, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 3858–3864.
- [24] C. de Duve, R. Wattiaux, *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, 28, 435–492.
- [25] M. Rabinovitz, J. M. Fisher, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 91, 313–322.
- [26] R. W. Carrell, H. Lehmann, *Semin. Hematol.* **1969**, 6, 116–132.
- [27] E. R. Huehns, A. J. Bellingham, *Br. J. Haematol.* **1969**, 17, 1–10.
- [28] J. D. Etlinger, A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 54–58.
- [29] A. Hershko, H. Heller, D. Ganoth, A. Ciechanover in *Protein Turnover and Lysosome Function* (Hrsg.: H. L. Segal, D. J. Doyle), Academic Press, New York, **1978**, S. 149–169.
- [30] S. E. Knowles, F. J. Ballard, *Biochem. J.* **1976**, 156, 609–617.
- [31] N. T. Neff, G. N. DeMartino, A. L. Goldberg, *J. Cell. Physiol.* **1979**, 101, 439–457.
- [32] B. Poole, S. Ohkuma, M. J. Warburton, *Acta Biol. Med. Ger.* **1977**, 36, 1777–1788.
- [33] B. Poole, S. Ohkuma, M. J. Warburton in *Protein Turnover and Lysosome Function* (Hrsg.: H. L. Segal, D. J. Doyle), Academic Press, New York, **1978**, S. 43–58.
- [34] J. Mandelstam, *Biochem. J.* **1958**, 69, 110–119.
- [35] D. Steinberg, M. Vaughan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1956**, 65, 93–105.
- [36] A. Hershko, G. M. Tomkins, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 710–714.
- [37] A. L. Goldberg, J. D. Kowit, J. D. Etlinger in *Proteolysis and Physiological Regulation* (Hrsg.: D. W. Ribbons, K. Brew), Academic Press, New York, **1976**, S. 313–337.
- [38] A. Ciechanover, Y. Hod, A. Hershko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 81, 1100–1105.
- [39] A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1365–1368.
- [40] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, I. A. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1783–1786.
- [41] A. Ciechanover, S. Elias, H. Heller, S. Ferber, A. Hershko, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 7525–7528.
- [42] K. D. Wilkinson, M. K. Urban, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 7529–7532.
- [43] G. Goldstein, *Nature* **1974**, 247, 11–14.
- [44] G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, D. H. Schlesinger, H. D. Niall, E. A. Boyse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 11–15.
- [45] D. H. Schlessinger, G. Goldstein, H. D. Niall, *Biochemistry* **1975**, 14, 2214–2218.
- [46] T. L. K. Low, A. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 987–995.
- [47] I. L. Goldknopf, H. Busch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 65, 951–955.
- [48] I. L. Goldknopf, H. Busch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 864–868.
- [49] L. T. Hunt, M. O. Dayhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 74, 650–655.
- [50] A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1525–1528.
- [51] A. Hershko, H. Heller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 128, 1079–1086.
- [52] V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Mariott, D. Ecker, D. K. Gonda, A. Varshavsky, *Science* **1989**, 243, 1576–1583.
- [53] A. Ciechanover, R. Ben-Saadon, *Trends Cell Biol.* **2004**, 14, 103–106.
- [54] M. Muratani, W. P. Tansey, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 192–201.
- [55] Y. Zhang, *Genes Dev.* **2003**, 17, 2733–2740.
- [56] M. A. Osley, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1677, 74–78.
- [57] F. Lipman, *Science* **1971**, 173, 875–884.
- [58] A. Ciechanover, S. Elias, H. Heller, A. Hershko, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 2537–2542.
- [59] A. Hershko, H. Heller, S. Elias, A. Ciechanover, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8206–8214.
- [60] D. T. Chin, L. Kuehl, M. Rechsteiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 5857–5861.
- [61] A. Hershko, E. Eytan, A. Ciechanover, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13964–13970.
- [62] Y. Matsumoto, H. Yasuda, T. Marunouchi, M. Yamada, *FEBS Lett.* **1983**, 151, 139–142.
- [63] D. Finley, A. Ciechanover, A. Varshavsky, *Cell* **1984**, 37, 43–55.
- [64] A. Ciechanover, D. Finley, A. Varshavsky, *Cell* **1984**, 37, 57–66.
- [65] K. Tanaka, L. Waxman, A. L. Goldberg, *J. Cell Biol.* **1983**, 96, 1580–1585.
- [66] A. Hershko, E. Leshinsky, D. Ganoth, H. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 1619–1623.
- [67] R. Hough, G. Pratt, M. Rechsteiner, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 2400–2408.
- [68] L. Waxman, J. Fagan, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 2451–2457.
- [69] R. Hough, G. Pratt, M. Rechsteiner, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8303–8313.
- [70] S. Wilk, M. Orlowski, *J. Neurochem.* **1980**, 35, 1172–1182.
- [71] E. Eytan, D. Ganoth, T. Armon, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 7751–7755.
- [72] J. Driscoll, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 4789–4792.
- [73] L. Hoffman, G. Pratt, M. Rechsteiner, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 22362–22368.
- [74] J. Shanklin, M. Jaben, R. D. Vierstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 359–363.
- [75] M. Hochstrasser, A. Varshavsky, *Cell* **1990**, 61, 697–708.
- [76] M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, P. M. Howley, *Cell* **1990**, 63, 1129–1136.
- [77] M. Glotzer, A. W. Murray, M. W. Kirschner, *Nature* **1991**, 349, 132–138.
- [78] A. Ciechanover, J. A. DiGiuseppe, B. Bercovich, A. Orian, J. D. Richter, A. L. Schwartz, G. M. Brodeur, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 139–143.
- [79] N. Mizushima, T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi, Y. Ohsumi, *Nature* **1998**, 395, 395–398.
- [80] J. Adams, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 307–315.
- [81] M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 373–428.
- [82] C. M. Pickart, R. E. Cohen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 177–187.
- [83] A. Ciechanover, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 79–86.