

Carpe Diubiquitin**

Langdon J. Martin und Ronald T. Raines*

Polypeptide · Proteinabbau · Totalsynthesen · Ubiquitin

Eukaryotische Zellen werden durch posttranskriptionale Modifikationen ihrer Proteine komplexer und mannigfaltiger gemacht. Die womöglich folgenreichste dieser Modifikationen ist die Ubiquitinierung. Ubiquitin (Ub) ist ein kleines, robustes, hochkonserviertes Protein (Abbildung 1). Die kovalente Anbindung eines Ubiquitins markiert zelluläre Proteine für ihren Abbau durch das Proteasom und kann darüber hinaus auch weitere Folgen haben. Defekte in der Ubiquitinmarkierung sind mit zahlreichen Krankheiten korreliert, einschließlich Krebs, Entzündungskrankheiten und neurodegenerativen Störungen.

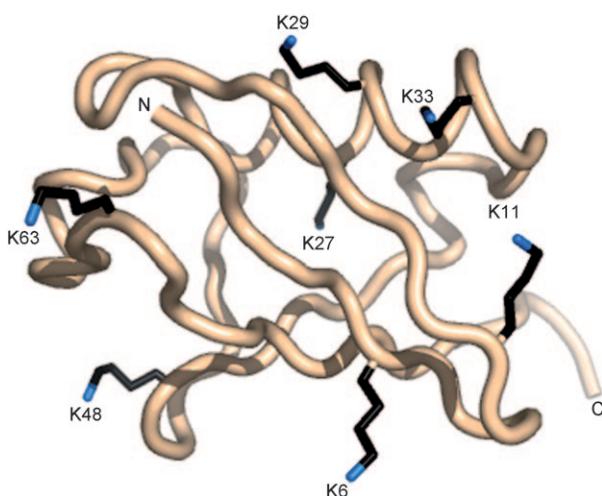


Abbildung 1. Dreidimensionale Struktur von Ubiquitin, das aus 76 Aminosäuren aufgebaut ist. Die sieben Lysinreste sind markiert (schwarz; blau: NH₂-Gruppen).

Die Ubiquitinierung geht mit der Bildung einer Isopeptidbindung einher – einer unüblichen Amid-Verknüpfung zwischen dem ε-Stickstoff eines Lysinrests im Zielprotein (dem „Akzeptor“) und der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins (dem „Donor“). Ein Lysinrest des angeknüpften Ubiquitins kann anschließend mit einem weiteren Ubiquitin verknüpft werden und so weiter. Ubiquitin enthält sieben Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63; Abbildung 1). Jede der möglichen Isopeptidbindungen wird in lebenden Zellen angetroffen – und jede löst verschiedenartige zelluläre Antworten aus.

Die Synthese von Proteinen mit nicht-kanonischen Verknüpfungen, wie etwa Isopeptidbindungen, ist eine stete Herausforderung in der chemischen Biologie. Vor kurzem haben drei unabhängige Arbeitsgruppen^[1] die Bildung von Diubiquitin beschrieben, einschließlich der Totalsynthese aller möglichen Diubiquitinketten.^[1a] Dieses Ergebnis ist ein Meilenstein in der chemischen Biologie, und es ermöglicht die ersten Untersuchungen der Struktur und Funktion von Regiosomeren der Diubiquitinierung.

Die Isopeptidbindung kann mit Standardrekombinationstechniken nicht erzeugt werden, wohl aber mithilfe bestimmter Enzyme. In einer bahnbrechenden Arbeit entwickelten Pickart und Mitarbeiter eine chemoenzymatische Route zu Di- und Polyubiquitin (Tabelle 1).^[2] Diese Arbeit führte zur Entdeckung von K48-verknüpften Ketten mit mindestens vier Ubiquitinen als Signal für den proteasomalen Abbau.

Methoden der modernen Proteinchemie bieten zusätzliche Optionen für den Aufbau von Isopeptidbindungen. 2007 setzten Muir und Mitarbeiter eine photolabile Hilfsgruppe ein, um die Semisynthese eines Histons mit einem Ubiquitinpartner an einer spezifischen Stelle zu bewerkstelligen;^[3] eine solche Modifikation kann starke Auswirkungen auf die Transkription haben. Der Muir-Ansatz ist spurlos, d.h., im Syntheseprodukt bleiben keine Atome der Hilfsgruppe zurück. Andere chemische Ansätze zur Konjugation einzelner Ubiquitine an Substrate nutzen ein Pyrrolysin-Analogon, das eine native chemische Ligation ermöglicht,^[4] die Bildung von Disulfidbindungen^[5] und eine Isopeptid-artige Bindung zu einem Oxim.^[6]

Neuere Arbeiten haben das Syntheserepertoire für die Herstellung von Diubiquitin erweitert. Przybylski und Mitarbeitern gelang eine Totalsynthese von K63-verknüpftem Diubiquitin, indem sie die Bildung eines Thioethers als einen Mechanismus zur Verknüpfung synthetischer Peptide nutzten.^[7] In den erhaltenen Produkten ersetzen die Thioether mehrere native Peptidbindungen.

[*] Dr. L. J. Martin, Prof. R. T. Raines

Department of Biochemistry, 433 Babcock Drive
University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706 (USA)

Fax: (+1) 1-608-890-2583

E-Mail: rtraines@wisc.edu

Homepage: <http://www.biochem.wisc.edu/faculty/raines/lab>

Prof. R. T. Raines

Department of Chemistry, 1101 University Avenue
University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706 (USA)

[**] L.J.M. dankt den NIH für ein Promotionsstipendium (F32 GM087097). Unsere Arbeiten zur Proteinchemie werden durch Fördermittel der NIH (R01 GM044783) unterstützt.

Tabelle 1: Diubiquitine, erhalten durch Biosynthese, Semisynthese und Synthese.

Methode	Donor-Ub	Akzeptor-Ub	Produkt	Isopeptid-bindung(en)	Bemerkung
in vivo				K (alle), N-Terminus	Freies Diubiquitin ist nur als Abbau-Nebenprodukt bekannt
Brik ^[1a]				K (alle)	Verwendung zur Untersuchung der Substratspezifität der Isopeptidase T
Liu & Liu ^[1c]				K48	Mercaptolysinrest vermittelt die Bildung sowohl von Peptid- als auch Isopeptidbindungen
Chin ^[1b]				K6, K29	Verwendung zur Strukturbestimmung von K6-verknüpftem Diubiquitin und zur Charakterisierung von Isopeptidasen
Pickart ^[2]				K48, K63	Benötigt ein E2-Enzym und C-terminale Hydrolase
Przybylski ^[7]		2		K63	Erste chemische Totalsynthese eines Diubiquitinmotivs

Die neuen Arbeiten der Gruppen um Liu und Liu,^[1c] Chin und Komander^[1b] sowie Brik^[1a] sind außerordentlich interessant. Die verschiedenenartigen, komplementären Ansätze dieser Autoren ermöglichen die spurlose Totalsynthese von Diubiquinketten in Mengen, die für Struktur-Funktions-Analysen taugen.

Die Gruppen von Liu und Liu verwendeten eine Kombination aus Festphasenpeptidsynthese und nativer chemischer Ligation (NCL) zur Herstellung eines K48-verknüpften Diubiquitins.^[1c] Ihr Schlüsselreagens ist ein Lysin-Analogon, das eine photolabile Schutzgruppe am ε-Stickstoff und eine Thiolgruppe am γ-Kohlenstoff trägt. Das Thiol vermittelt eine native chemische Ligation (zur Bildung einer Peptidbindung mit dem α-Stickstoff) als ein Teil der Bildung des Donor-Ubiquitins. Eine zweite NCL vervollständigt die Synthese dieses Ubiquitins, und die Schutzgruppe wird durch Photolyse entfernt. Das γ-Thiol vermittelt anschließend eine weitere NCL, die nun einen vollständigen Ubiquitin-thioester (der mithilfe eines Inteins erhalten wurde) unter Bildung der gewünschten Isopeptidbindung anknüpft. Eine Desulfurierung spaltet den exogenen Schwefel ab.

Die Arbeitsgruppen um Chin und Komander verwenden ebenfalls einen Ubiquitin-thioester als Quelle für das Donor-Ubiquitin, ihre Methode des Ubiquitinaufbaus weicht aber vom vorigen Ansatz ab.^[1b] Durch Stopp-Codon-Suppression gelang der Einbau eines einzelnen *N*^e-Boc-geschützten Lysinrestes, an den sich eine globale Cbz-Schützung (Cbz = Benzyloxycarbonyl) anschloss, sodass letztlich ein Ubiquitin mit einer einzelnen ungeschützten Aminogruppe

erhalten wurde. Dessen Kondensation mit dem C-terminalen *N*-Hydroxysuccinimidylester eines zweiten Ubiquitins erzeugt die Isopeptidbindung. Globale Entschüttung ergibt dann „natives“ Diubiquitin. Die Methode führte zur Kristallstruktur von K6-verknüpftem Diubiquitin sowie zu Substraten für Deubiquitinase-Assays.

Brik und Mitarbeiter beschrieben schließlich die chemische Totalsynthese aller sieben Diubiquitine.^[1a] Ihre Strategie stimmt mit der von Liu und Liu weitgehend überein – mit allerdings feinen, aber bemerkenswerten Unterschieden. Ihr Schlüsselreagens war ebenfalls ein Mercaptolysin, in diesem Fall trug aber der δ-Kohlenstoff die Thiolgruppe. Alle Ubiquitinmonomere wurden, unter Verwendung einer A46C-Variante für die NCL, aus zwei Ausgangspeptiden zusammengefügt. Das δ-Mercaptolysin wurde während der Festphasensynthese als Thiazolidin geschützt und dann unmittelbar vor Bildung der Isopeptidbindung entschüttet. Der Thioester wurde auf clevere Weise aus einem angehängten C-terminalen *N*-Methylcysteinamid erzeugt. Durch Umsetzung des Donor-Thioesters mit jedem der sieben δ-Mercaptolysin-Ubiquitine wurde das gesamte Sortiment an Ubiquitin-Ubiquitin-Isopeptidbindungen erhalten. Eine Desulfurierung machte die Synthese spurlos.

Die erhaltenen Diubiquitine wurde als Substrate für den Abbau durch humane Isopeptidase T untersucht. Dieses Enzym spaltet Polyubiquinketten; es verhindert damit, dass diese das Proteasom inhibieren und sorgt für die Rückführung der freigesetzten Ubiquitine in den Zellkreislauf. Die höchste Aktivität zeigte das Enzym gegenüber dem K48-

Isopeptid, allerdings wurde für die K63-Verknüpfung eine fast ähnlich hohe Aktivität beobachtet. Dieser Befund war überraschend, wenn man bedenkt, dass die von diesen beiden Verknüpfungen hervorgerufenen Signale verschieden sind und dass die K11-Verknüpfung (die in Hefe ebenso häufig vorkommt wie die K48-Verknüpfung und ebenfalls ein Signal für den proteosomalen Abbau sein könnte) kein Substrat zu sein scheint.^[8]

Diese Entwicklungen sind echte Meilensteine. Die physiologisch weit verbreiteten, aber präparativ schwer zugänglichen Isopeptidbindungen sind das Kernstück der post-translationalen Modifikation durch Ubiquitin (und Ubiquitin-artige Proteine). Die chemische Biologie ist zu einem Punkt gekommen, wo sich das vollständige Repertoire der im „Ubiquitincode“ enthaltenen Signale ausreizen lässt. Bemerkenswert ist aber, dass sich der derzeitige Stand der Forschung auf Zielstrukturen mit einer einzelnen Isopeptidverknüpfung beschränkt – ob nun zwischen Ubiquitin und einem Zielprotein oder zwischen zwei Ubiquitinen. Deshalb verfolgen wir mit Spannung, ob zukünftige Arbeiten auch zu den Tetraubiquitinen führen werden, die die wahren Signalgeber des Proteinabbaus sind.

Eingegangen am 22. September 2010
Online veröffentlicht am 4. November 2010

-
- [1] a) K. S. A. Kumar, L. Spasser, L. A. Erlich, S. N. Bavikar, A. Brik, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9312–9317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9126–9131; b) S. Virdee, Y. Ye, D. P. Nguyen, D. Komander, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 750–757; c) R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7199–7201.
 - [2] a) J. Piotrowski, R. Beal, L. Hoffman, K. D. Wilkinson, R. E. Cohen, C. M. Pickart, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23712–23721; b) C. M. Pickart, D. Fushman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 610–616.
 - [3] a) C. Chatterjee, R. K. McGinty, J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2872–2876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814–2818; b) R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, T. W. Muir, *Nature* **2008**, *453*, 812–816.
 - [4] X. Li, T. Fekner, J. J. Ottesen, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9348–9351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9184–9187.
 - [5] a) C. Chatterjee, R. K. McGinty, B. Fierz, T. W. Muir, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 267–269; b) J. Chen, Y. Ai, J. Wang, L. Haracska, Z. Zhuang, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 270–272.
 - [6] A. Shammugam, A. Fish, M. P. A. Luna-Vargas, A. C. Faesen, F. El Oualid, T. K. Sixma, H. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8834–8835.
 - [7] J. E. Jung, H.-P. Wollscheid, A. Marquardt, M. Manea, M. Scheffner, M. Przybylski, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1152–1162.
 - [8] a) F. Ikeda, I. Dikic, *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 536–542; b) P. Xu, D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, R. J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, J. Peng, *Cell* **2009**, *137*, 133–145; c) D. Komander, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 937–953.