



Die Lys48-verknüpfte Polyubiquitinkette als proteasomales Signal: kein Einzelkind mehr

Yelena Kravtsova-Ivantsiv,* Thomas Sommer und Aaron Ciechanover*

Monoubiquitinierung · Polyubiquitinketten ·
Proteasom · Proteinabbau · Ubiquitin

Die Konjugation von Ubiquitin (Ub) an Proteine ist an der Regulation vieler Prozesse beteiligt. Die Modifikation dient als in trans wirkendes Erkennungselement, wobei strangabwärts gelegene Effektoren an das modifizierte Protein binden und dessen Schicksal und/oder Funktion bestimmen. Die allgemein akzeptierte Auffassung ist, dass eine PolyUb-Kette, die über das interne Lys48 von Ub verknüpft und an einem internen Lys-Rest des Substrats verankert ist, das kanonische Signal für die Erkennung und den Abbau durch das Proteasom darstellt. Jüngste Studien haben jedoch gezeigt, dass das Signal weitaus vielfältiger ist und dass Ketten auf der Basis anderer interner Verknüpfungen sowie lineare oder heterologe Ketten aus Ub oder Ub-artigen Proteinen und selbst MonoUb vom Proteasom erkannt werden. Darüber hinaus wurden auch Ketten beschrieben, die an andere als interne Lys-Reste binden. All diese jüngsten Entdeckungen stellen die gegenwärtig akzeptierte Sichtweise in Frage.

1. Einleitung

Die kovalente Konjugation von Ubiquitin (Ub) wird durch eine dreistufige enzymatische Reaktion vermittelt. 1) Ein Ub-aktivierendes Enzym (E1) katalysiert eine energieabhängige Reaktion (die Energie liefert ATP), die eine hochenergetische Thioesterbindung zwischen der Carboxygruppe des terminalen Glycinrestes im Ubiquitin und einem Cysteinrest des Enzyms erzeugt. 2) Eines von mehreren Ub-Carrier-Proteinen (E2; auch bekannt als Ub-konjugierende Enzyme, UBCs) transferiert Ubiquitin von der hochenergetischen Thioesterbindung mit E1 zu einer hochenergetischen Thioesterbindung mit E2. 3) Eine der zahlreichen substratspezifischen Ub-Proteinligasen (E3) katalysiert eine dritte Reaktion. Je nach Art der Ligase kann Ubiquitin eine dritte

hochenergetische Thioesterbindung mit diesem Enzym bilden (im Falle der HECT („homologous to the E6-AP C-terminus“-Ligasen), oder es kann direkt zum ligasegebundenen Substrat transferiert werden (im Falle von RING („really interesting gene“-Ligasen)). In vielen Fällen erzeugt die

Reaktion schrittweise eine PolyUb-Kette, deren erste Ub-Einheit mit einer ϵ -NH₂-Gruppe eines Lys-Restes im Substrat verbunden ist. Die Ub-Einheiten sind über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Gly der einen Einheit und der ϵ -NH₂-Gruppe des internen Lys48 der vorhergehenden Einheit verknüpft.^[1] Proteine, die auf diese Weise modifiziert sind, werden durch das 26S-Proteasom erkannt und abgebaut. Das 26S-Proteasom ist ein Enzym mit drei verschiedenen proteolytischen Aktivitäten: einer Chymotrypsin-artigen, einer Trypsin-artigen und einer peptidylglutamyl-peptidhydrolysierenden Aktivität. Während des Proteinabbaus wird Ub durch die Aktivität deubiquitinierender Enzyme (DUBs) rezykliert. Die DUBs zerlegen die Ubiquitin-Ketten, indem sie die Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin von Ub und der Aminogruppe des Lysinrestes entweder in der proximalen Ub-Einheit in der Kette oder im Substrat hydrolysieren (falls es die erste Ub-Einheit ist). Der proteasomale Abbau der Ub-markierten Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse, darunter die Steuerung des Zellzyklus und der Zellteilung, die Aufrechterhaltung der zellulären Qualitätskontrolle und die Regulation der Konzentration von Transkriptionsfaktoren.^[2] Ub enthält sieben interne Lysinreste, und die allgemeine Hypothese war, dass Ketten, die über andere Lysine als Lys48 verknüpft sind, nicht-proteoly-

[*] Y. Kravtsova-Ivantsiv, A. Ciechanover
Cancer and Vascular Biology Research Center, Faculty of Medicine,
Technion-Israel Institute of Technology
Efron Street, Bat Galim, POB 9649, Haifa 31096 (Israel)
E-Mail: yelenaiv@tx.technion.ac.il
c_tzachy@netvision.net.il

T. Sommer
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Berlin (Deutschland)

tische Funktionen haben. Zum Beispiel werden mehrere Schritte in der Aktivierung von NF- κ B oder der Regulation der Endozytose durch Lys63-verknüpfte Ub-Ketten vermittelt.^[3] In diesen Fällen steuert die Modifikation die Funktion des markierten Proteins, das nicht eliminiert wird.

Für viele Jahre war die allgemein akzeptierte Auffassung, dass die Kette 1) mindestens vier Ub-Einheiten enthalten muss,^[4] 2) aus Ub-Einheiten aufgebaut sein muss, die über interne Lys48 verknüpft sind,^[5] und 3) an einer ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysinrestes im Zielsubstrat verankert ist.^[6] Jüngste Ergebnisse haben jedoch einen sehr viel breiteren Satz von Ub-basierten proteolytischen Signalen aufgezeigt, die wir in diesem Kurzaufsatz vorstellen wollen.

2. Einzelne und mehrfache Monoubiquitinierungen

Mehrere kürzlich durchgeführte Studien belegen, dass das Proteasom Substrate erkennen kann, die durch einfache oder mehrfache Monoubiquitinierung modifiziert wurden (Abbildung 1). So wurde gefunden, dass ein Peptid einer Mindest-

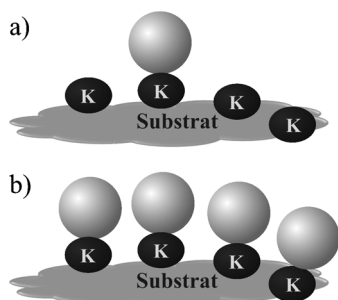


Abbildung 1. Monoubiquitinierung. a) Modifikation eines Proteins durch einfache Monoubiquitinierung. b) Modifikation eines Proteins durch mehrfache Monoubiquitinierungen. Graue Kugeln: Ub, schwarze Kugeln: Lys (K).

länge von 20 Aminosäuren effizient abgebaut wird, wenn es linear an Ub fusioniert wird, ohne dass eine weitere Kettenverlängerung erforderlich wäre.^[7] Für diese linearen Fusionate wurde gezeigt, dass ein einzelnes Ub den Abbau von Peptiden aus bis zu ungefähr 150 Aminosäuren vermittelt.^[8] Ein Beispiel für ein natürlich vorkommendes Substrat, das nach einfacher Monoubiquitinierung eines spezifischen Lys-Restes abgebaut wird, ist das Protein PAX3 (paired box 3 protein), ein Regulator der Muskeldifferenzierung. Die Reaktion wird durch die TAF1-Ligase katalysiert.^[9] In ähnlicher Weise führt die Konjugation eines einzelnen Ub zum proteasomalen Abbau des Zelladhäsionsrezeptors Syndecan4, der an der Zellmigration beteiligt ist.^[10]

Bei einigen Substraten ist ihre Modifizierung durch mehrfache Monoubiquitinierungen erforderlich, um ihren proteasomalen Abbau zu vermitteln. Zum Beispiel muss p105, der Vorläufer des NF- κ B-Transkriptionsfaktors p50, an mehreren Lysinen in der C-terminalen Domäne des Moleküls monoubiquitiniert werden, um, unter Freisetzung des N-terminalen p50-Segments, das die aktive Untereinheit des Transkriptionsfaktors darstellt, prozessiert zu werden.^[11] Der



Aaron Ciechanover erhielt seinen MD an der Hebrew University in Jerusalem und seinen DSc am Technion in Haifa. Nach einem Postdoktorat am MIT kehrte er an das Technion zurück und ist dort Mitglied der medizinischen Fakultät. Gemeinsam mit Avram Hershko und Irwin Rose erhielt er 2004 den Chemie-Nobelpreis für die Entdeckung des Ubiquitinsystems.



Yelena Kravtsova-Ivantsiv erhielt ihren B.Sc. und M.Sc. in Life Sciences an der Lviv State University, Ukraine, und promovierte an der Ben Gurion University of the Negev in Beer Sheva, Israel. Sie ist derzeit Senior Research Associate an der medizinischen Fakultät am Technion in der Arbeitsgruppe von Aaron Ciechanover.



Thomas Sommer promovierte an der Freien Universität Berlin. Er verbrachte ein Postdoktorat bei Dr. Stefan Jentsch am Friedrich-Miescher-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen und ist derzeit Fakultätsmitglied und wissenschaftlicher Vizerektor am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin. Er ist außerdem Professor an der Humboldt-Universität in Berlin.

Zellzyklusregulator Cyclin B1 wird nach mehrfachen, von der APC/C-Ub-Ligase katalysierten Monoubiquitinierungen abgebaut.^[12] Beschränkt man die Zahl der Lysinreste, die als Ub-Anker fungieren können, so „erzwingt“ man damit die Bildung von OligoUb- und/oder PolyUb-Ketten.^[12]

Diese Befunde legen ein neues dynamisches Konzept der Dichte/Avidität des Ub-Signals nahe: Die räumliche Anordnung einer genügend großen Zahl einzelner Ub-Einheiten, die an mehrere Stellen des proteasomalen Ub-Rezeptors binden, gewährleistet eine starke Bindung des markierten Substrats an das Proteasom, wodurch ein effizienter und prozessiver Abbau des Substrats erfolgen kann. Beschränkt man die Zahl der Ub-Anker auf dem Substrat, so wird damit die Bildung einer PolyUb-Kette erzwungen. Die miteinander verbundenen Einheiten dieser PolyUb-Kette ersetzen dann die einzelnen Einheiten, die andernfalls über mehrere Anker entlang dem Substrat verteilt sind. Das Konzept eines dynamischen und adaptiven Signals kann erweitert werden und, neben anderen Charakteristika, auch die Länge des Substrats einschließen. Ein einzelnes Ub hat die niedrigste Affinität für das Proteasom, während bei einer Verlängerung der Kette die Affinität schrittweise ansteigt. Bei kurzen Substraten könnte daher eine einzelne Einheit oder eine kurze Ub-Kette genügen, um das Substrat ausreichend stark an das Proteasom zu binden und so dessen effizienten Abbau sicherzustellen.

Längere Substrate dürften längere Ketten benötigen. Diese Hypothese wurde in einer jüngsten Studie untermauert, in der gezeigt wurde, dass ein einzelnes Ub den Abbau künstlicher (HA-Repeats) oder natürlich vorkommender Substrate (Hug1, Cks2 und α -Synuclein) aus bis zu ungefähr 150 Aminosäuren unterstützt.^[8]

3. PolyUb-Ketten

Homogene Ub-Ketten mit identischen internen Verknüpfungen

Ubiquitin ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, davon sieben Lysine in den Positionen 6, 11, 27, 29, 33, 48 und 63. Das am häufigsten vorkommende Ub-Polymer, das an der Markierung von Substraten für deren Abbau beteiligt ist, ist eine homogene Kette, in der jede Ub-Einheit über eine Isopeptidbindung mit dem Lys48 der vorhergehenden Ub-Einheit verknüpft ist.^[5,13] Es wurde angenommen, dass nur Ketten dieses Typs in der Lage sind, Substrate für ihren proteasomalen Abbau zu markieren. Eine massenspektrometrische Analyse^[13] hat gezeigt, dass homogene Ketten auf der Basis von Verknüpfungen der Lysinreste 29, 11, 27 und 6 (in abnehmender Häufigkeit) ebenfalls einen proteasomalen Abbau vermitteln können. Zum Beispiel konnten mehrere Studien nachweisen, dass homogene Ketten auf der Basis von Lys11-Verknüpfungen, die durch APC/C-Ub-Ligase^[14] aufgebaut waren, wichtige Mediatoren des Proteinabbaus während der Zellteilung sind.^[15] Die Bildung solcher Ketten, die (wie die Lys48-verknüpften Ketten) ebenfalls an die S5-Untereinheit des Proteasoms binden,^[16] ist möglicherweise von einem TEK-Box-Motiv abhängig, das sowohl auf Ub als auch dem Substrat gefunden wurde.^[15b]

Andere Studien haben gezeigt, dass Lys33-verknüpfte^[17] und Lys63-verknüpfte Ketten^[18] ebenfalls vom Proteasom erkannt werden. Es scheint daher, dass homogene Ketten basierend auf Verknüpfungen sämtlicher interner Lysinreste (Abbildung 2) in der Lage sind, Proteine für den protea-

somalen Abbau zu markieren. Zu beachten ist jedoch, dass einige dieser Studien mit zellfreien Systemen ausgeführt wurden und die entsprechenden zellulären Ereignisse möglicherweise nicht realistisch reproduzieren.

Heterogene Ub-Ketten mit unterschiedlichen internen Verknüpfungen

Da Ub-Ketten enzymatisch synthetisiert werden, war es logisch anzunehmen, dass sie homogen, d. h. über den gleichen internen Lys-Rest verknüpft sind. Massenspektrometrische Analysen haben jedoch gezeigt, dass gemischte Ketten mit Verknüpfungen unterschiedlicher interner Lysinreste (Abbildung 3a) ebenfalls Proteine für den proteasomalen Abbau markieren können. Ein Beispiel für ein solches Protein ist Cyclin B1, das Untersuchungen zufolge nicht nur, wie schon bekannt, durch mehrfache Monoubiquitinierungen,^[12] sondern auch durch kurze Ub-Ketten mit internen Verknüpfungen der Lysine 11, 48 und 63 markiert wird.^[15c] Damit ein Signal genügend hoher Ub-Dichte erzeugt werden kann, könnte es sein, dass verschiedene Proteine je nach Verfügbarkeit ihrer Ub-Anker Mischungen von Ketten unterschiedlicher Längen und interner Verknüpfungen benutzen.

Ferner wurden mehrfach verzweigte (gegabelte) Ketten beschrieben,^[19] in denen mehr als eine Ub-Einheit an die vorhergehende Ub-Einheit gebunden ist (Abbildung 3b). Diese Ketten binden allerdings nur schwach an das Proteasom,^[19a,20] was vermuten lässt, dass sie nicht die Funktion haben, Proteine für den Abbau zu markieren. Zum Beispiel erzeugt die Autoubiquitinierung von Ring1B gemischte mehrfach verzweigte Ketten mit Verknüpfungen der Lysine 6, 27 und 48; diese Ketten stimulieren die monoubiquitinierende Ligaseaktivität des Proteins für sein Substrat, H2A.^[19b]

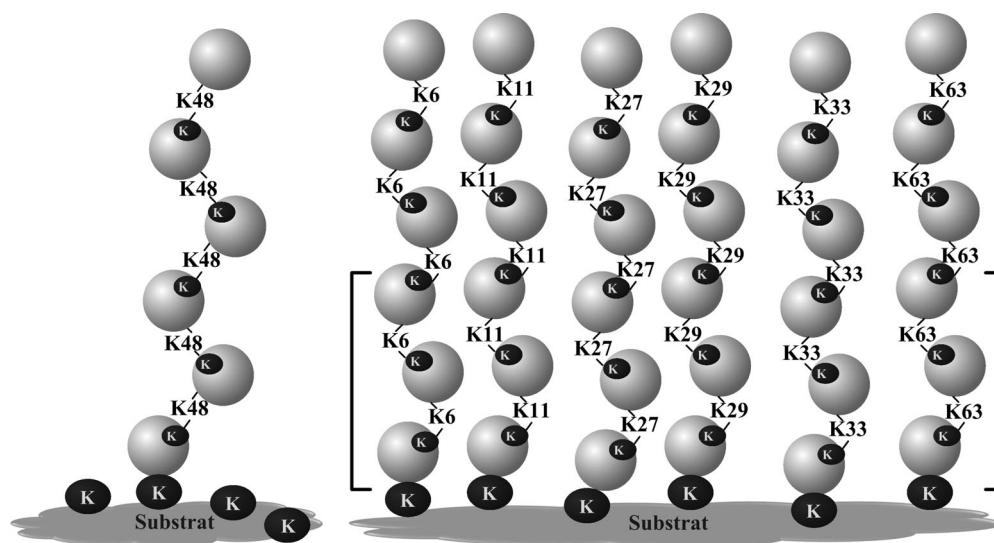


Abbildung 2. Homogene Ubiquitinketten. Ketten basierend auf Verknüpfungen der Lysine 6, 11, 27, 29, 33, 48 oder 63.

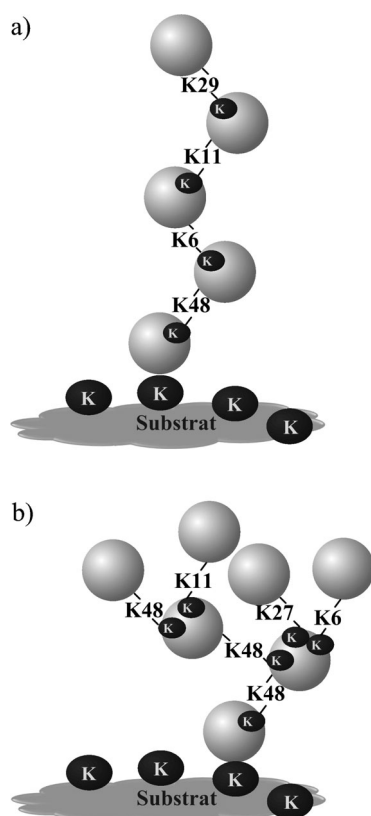


Abbildung 3. Heterogene Ubiquitinketten. a) Gemischte Ketten basierend auf Verknüpfungen unterschiedlicher Lysine. b) Mehrfach verzweigte (gegabelte) Ketten, in denen mehrere Ub-Einheiten an charakteristischen Lys-Resten in einer einzelnen Ub-Einheit verankert sind.

Heterologe gemischte Ub- und UbL-Ketten

Die Lys-Reste bestimmter Proteine können durch das Ub-artige (UbL) Protein SUMO (small ubiquitin modifier) modifiziert werden. Diese Modifikation reguliert eine Vielzahl von Prozessen, darunter die Stressantwort und DNA-Reparatur, die Signaltransduktion und den Transport von Proteinen in ihre subzellulären Kompartimente.^[21] SUMO kann als Monomer an einen Lys-Rest des Substrats konjugiert werden, oder aber, ähnlich wie Ub, eine homogene Kette bilden. Kürzlich wurde gezeigt, dass SUMOylierung und Ubiquitinierung miteinander kooperieren. In einer ersten Studie wurde gefunden, dass Zellen, die mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt wurden, Ketten von SUMO1^[22] sowie von SUMO2 und SUMO3^[23] anreichern, was darauf hindeutet, dass solche Ketten an der Markierung von Proteinen für deren Abbau beteiligt sind. In einem anderen Experiment ergab die Aufreinigung von Ub-Addukten ebenfalls SUMO2-Konjugate,^[23] was darauf schließen lässt, dass diese UbL Teil einer PolyUb-Kette sein kann (Abbildung 4). Des Weiteren wurde vorgeschlagen (wenn auch nicht unmittelbar nachgewiesen), dass Mono- oder Poly-SUMOylierung eine Vorbedingung für eine Polyubiquitinierung mit anschließendem Proteinabbau ist, womit beide Modifikationen an den gleichen Stoffwechselweg gekoppelt wären.^[23]

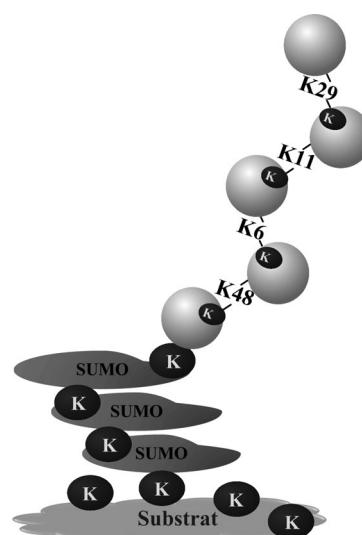


Abbildung 4. Heterologe Ubiquitin-Ketten. Ketten aus Ub und einem Ub-artigen Protein.

Ein direkter Beweis, dass heterologe Ketten aus SUMO und Ub zu proteasomalem Abbau führen können, stammt aus Studien zur Behandlung von akuter Promyelozytenleukämie (APL) mit Arsentrioxid. Dabei wurde gefunden, dass der Wirkstoff den Abbau des Promyelozytenleukämie/Retinsäurerezeptor-alpha (PML-RAR α)-Fusionsproteins induziert. Das Protein geht zuerst eine Poly-SUMOylierung ein und rekrutiert dabei die RING-Finger-Protein 4 (RNF-4)-Ub-Ligase.^[24] Die nachfolgende Kettenverlängerung durch Polyubiquitinierung der SUMO-Ketten markiert PML-RAR α für den proteasomalen Abbau.^[24b] In einem anderen Beispiel wurde gezeigt, dass das Entfernen der SUMO-spezifischen Protease SENP1 (eines deSUMOylierenden Enzyms) zur Unterdrückung der hypoxischen Antwort führt, indem der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) 1 α für den raschen Abbau markiert wird. Es wurde ferner gezeigt, dass HIF1 α SUMOyliert wird, indem das Ubiquitinligaseprotein von Hippel-Lindau (pVHL) an HIF1 α rekrutiert wird, was in dessen Ubiquitinierung und Abbau resultiert.^[25] Wahrscheinlich stabilisiert die Deletion von SENP1 die SUMO-Kette von HIF1 α , was die Elongation der SUMO-Kette durch Ub und folglich den HIF1 α -Abbau effizienter macht. Es ist noch nicht geklärt, was die anfängliche SUMOylierung von HIF1 α stimuliert und wie diese Modifikation mit der normalen Sauerstoffversorgung (Normoxie) zusammenhängt, bei der spezifische Prolinreste im Protein hydroxyliert werden, ein Prozess, der auch im Zusammenhang mit der Rekrutierung der pVHL-Ligase beschrieben wurde.^[26]

Diese Beispiele zeigen eine weitere Komplexitätsebene des Ub-Systems auf, die den Signalprozess für den proteasomalen Proteinabbau auf Systeme jenseits von Ub ausdehnt. Das Zusammenspiel zwischen den zwei unterschiedlichen Modifikationssystemen könnte zu einer präziseren Regulation des Proteinabbau beitragen. Zu beachten ist aber, dass die Bildung heterogener Ketten nur eine begrenzte biologische Rolle spielen könnte, und die Beteiligung solcher Ketten an der proteasomalen Erkennung muss erst noch für andere

Substrate nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass Proteine primär für nicht-proteolytische Funktionen SUMOyliert und dann später ubiquitiniert werden, um zum Proteasom geleitet zu werden.

Lineare Ub-Ketten

In den oben beschriebenen Ub-Ketten sind die Einheiten über Isopeptidbindungen zwischen dem C-terminalen Gly76 des distalen Ub-Moleküls und verschiedenen internen Lysinen des proximalen Ub-Moleküls miteinander verknüpft. Kürzlich wurde nun eine andere Art von Kette beschrieben, in der die Verknüpfungen in einer Kopf-Schwanz-Anordnung konjugiert sind. Hier ist der C-terminale Rest der einen Einheit über eine Peptidbindung mit dem N-terminalen Rest der proximaleren Einheit verknüpft (Abbildung 5). Die li-

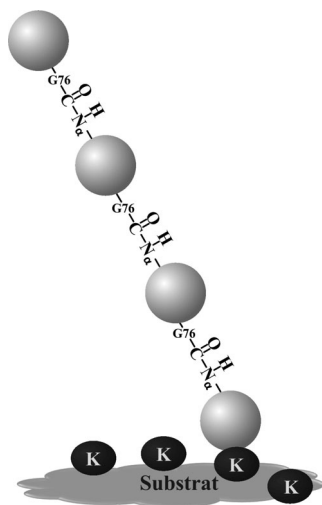


Abbildung 5. Lineare Ubiquitinketten. Ketten, in denen die Ub-Einheiten in Kopf-Schwanz-Anordnung verknüpft sind.

neare Kette wird durch die Ub-Ligase LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) aufgebaut. LUBAC besteht aus drei Proteinen: SHARPIN (SHANK-associated Rh domain-interacting protein), einer längere Isoform von HOIL-1L (heme-oxidized iron-regulatory protein 2 Ub ligase-1) und HOIP (HOIL-1L-interacting protein).^[27] Es wurde gezeigt, dass LUBAC lineare Ub-Ketten am grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aufbauen kann, wobei das erste Ub an den N-Terminus gebunden wird. Diese Modifikation resultiert im proteasomalen Abbau des markierten GFP, was auf eine mögliche Beteiligung linearer Ub-Ketten in der Erkennung von Substraten durch proteasomale Rezeptoren schließen lässt.^[28] Gestützt werden diese Daten durch den Befund, dass eine lineare TetraUb-Kette den Abbau des eukaryotischen Replication-Clamp-Proteins PCNA befördert. Diese Reaktion wird durch den Komplex aus CDC48 (AAA ATPase cell division protein 48), NPL4 (nuclear protein localization protein 4) und UFD (Ub fusion degradation 1) vermittelt.^[29]

4. Ubiquitinierungen an Nicht-Lysin-Stellen

Interne Ubiquitinierungsstellen

In der Mehrzahl der Fälle findet die Ubiquitinierung an internen Lys-Resten des Zielsubstrats statt. Jüngste Studien haben jedoch gezeigt, dass Ub in manchen Fällen über eine Esterbindung an Ser oder Thr oder über eine Thioesterbindung an Cys konjugiert werden kann (Abbildung 6).^[30] Zum

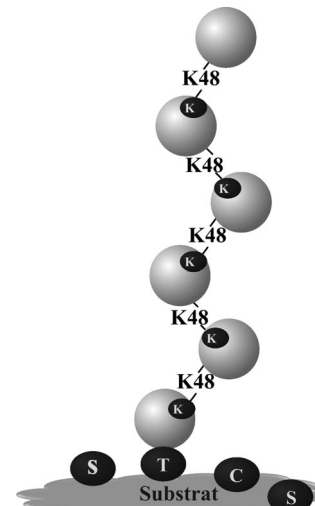


Abbildung 6. Ubiquitinierung an anderen Resten als Lys (Cys (C), Ser (S) und Thr (T)).

Beispiel ubiquitiniert die murine γ -Herpesvirus-E3-Ligase mK3 einhergehend mit Ube2j2, der kognaten E2 von mK3, den zytoplasmatischen Schwanz von MHC (major histocompatible complex I heavy chain) bevorzugt an Thr und Ser. Das Protein wird dann über den ERAD-Pfad (endoplasmic reticulum associated degradation) abgebaut.^[31] In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Neurogenin (NGN), ein die neuronale Differenzierung regulierender Transkriptionsfaktor, sowohl an Lys als auch Nicht-Lysin-Resten (Cys, Ser und Thr sowie dem N-terminalen Rest) ubiquitiniert wird. Wichtig dabei ist, dass Ub-Ketten, die an unterschiedlichen Resten verankert sind, als Signale für den proteasomalen Abbau dienen können.^[30b,c]

N-terminale Ubiquitinierung

Es scheint, dass eine Ub-Kette neben internen Resten auch an der α -NH₂-Gruppe des N-terminalen Rests des Substrats erzeugt werden kann (Abbildung 7).^[32]

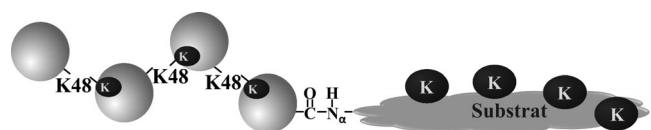


Abbildung 7. Ubiquitinierung an einem N-terminalen Rest.

Das erste Protein, für das gezeigt wurde, dass es durch N-terminale Ubiquitinierung markiert wird, war MyoD (myoblast determination protein 1).^[32] Der Studie folgten mehrere weitere Berichte über andere Proteine, die ähnlich ubiquitiniert werden.^[33] Die Existenz einer N-terminalen Ubiquitinierung wirft die interessante Hypothese auf, dass die N-terminale Acetylierung, die eine verbreitete posttranslationale Modifikation ist, zum Schutz von Proteinen vor Ubiquitinierung und Abbau dient.^[34]

Wahrscheinlich verleiht die Nutzung eines zusätzlichen Ub-Ankers dem System jene zusätzliche Flexibilität, die für die Feinabstimmung der Proteolyse seiner unzähligen Substrate benötigt wird.

5. Ubiquitinierung an Nicht-Konsensus-Stellen

Die Ubiquitinkonjugation wird von einer komplexen Abfolge enzymatischer Reaktionen katalysiert und scheint intuitiv hochspezifisch zu sein. Daher war die Entdeckung überraschend, dass es keine bekannten Konsensus- oder homologen Ubiquitinierungsstellen gibt. Es scheint, dass die Ubiquitinierungsstellen im Falle einiger weniger Proteine spezifisch sind, bei manchen Proteinen unbestimmte Charakteristika gemeinsam haben und in vielen Fällen promiskuitiv sind.

Bei einer Gruppe von Proteinen – p19^{INK4d}, PAX3, I κ B α und p53 – wurden spezifische Anker-Lysine identifiziert, obwohl die umgebenden Aminosäuren keine offensichtlichen gemeinsamen Merkmale haben. Es können ein einzelner oder mehrere Anker vorhanden sein; im Falle mehrerer Anker sind diese typischerweise in einer Region des Zielproteins geclustert. Allerdings variiert der Grad an Spezifität (d.h. die Beteiligung anderer Lysinreste außer denen in der spezifischen Stelle), und es müssen auch nicht alle Lysinreste im Cluster an der Erkennung des spezifischen Substrats beteiligt sein. Zum Beispiel ist in p19^{INK4d} Lys62 der hauptsächliche Ub-Akzeptor,^[35] während in PAX3 die Modifikation von Lys437 oder Lys475 genügt, um das Protein für seinen Abbau zu markieren (die Ubiquitinierung eines Restes verhindert sogar die Modifikation des zweiten).^[9b] Die Ubiquitinierung von I κ B α findet an Lys21 und/oder Lys22 statt,^[36] während für p53 berichtet wurde, dass ein Cluster aus sechs Lysinresten in der C-terminalen Domäne modifiziert wird.^[37]

Eine systematischere Analyse der Ubiquitinierungsstellen wurde durch Tandemmassenspektrometrie von Hefeproteinen ausgeführt^[38] und ermöglichte die halbquantitative und voraussetzungsfreie Kartierung von posttranslationalen Modifikationsstellen.^[39] Durch Analysieren der in diesen Studien gewonnenen Datensätze fanden Catic und Mitarbeiter, dass sich, mit einer Ausnahme, alle durch Ub modifizierten Lysine auf der Oberfläche des Proteins befinden müssen. Und auch bei der einzigen Ausnahme, in der der Lysinrest begraben ist, muss das Protein vor der Ubiquitinierung entfalten (Lys370 in der Glutamatdehydrogenase 1).^[40] Es gibt also eine klare Präferenz für die Ubiquitinierung in α -Helices (einer spiralen Struktur eines Proteins, in der die Rückgrat-N-H-Gruppe einer bestimmten Aminosäure an die Rückgrat-C=O-Gruppe

der vier Reste entfernten Aminosäure bindet).^[40] Interessanterweise befinden sich die Ub-Lysinreste 48 und 63, die in PolyUb-Ketten am häufigsten modifiziert werden, in Schleifenregionen. Versuche, charakteristische Aminosäuren in Nachbarstellung zu den ubiquitinierten Lysinen zu identifizieren, ergaben keine klaren Ergebnisse.^[40] Ähnliche Resultate wurden auch in einer hierzu unabhängigen Studie gefunden, in der demonstriert wurde, dass bevorzugte Ubiquitinierungsstellen oberflächenzugängliche Lysinreste sind, die in der geordneten Sekundärregion (Coil > Helix > β -Faltblatt > Turn) lokalisiert und von kleinen, positiv geladenen Resten umgeben sind.^[41]

In vielen Fällen sind die Ubiquitinierungsstellen schwer zu identifizieren. Zum Beispiel muss im Fall des p105-Vorläufers von NF- κ B die Ubiquitinierung an mehreren Lysinresten (ca. 30) stattfinden, die im C-terminalen Teil des Moleküls (einem Segment mit ca. 500 Aminosäuren) lokalisiert sind. Allerdings scheint die exakte Lokalisierung der modifizierten Reste keinen Einfluss auf den Ausgang der Prozessierung zu haben: Offenbar bestimmt lediglich die Zahl der modifizierten Reste das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Prozessierung von p105.^[11,42]

Bei vielen anderen Substraten sind die Ubiquitinierungsstellen nicht spezifisch. Cyclin B1 kann an jedem einzelnen Lysinrest im Molekül ubiquitiniert werden, selbst an künstlich eingeführten Stellen.^[43] Ähnliche Befunde wurden für die ζ -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors beschrieben.^[44]

Die niedrige evolutionäre Konservierung der Ubiquitinierungsstellen könnte ein Ausdruck der Vitalität und Anpassungsfähigkeit des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) sein, dessen mit wichtigste Funktion es ist, fremde, mutierte und anderweitig denaturierte/fehlgefaltete Proteine zu entfernen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die unüberschaubare Zahl an proteolytischen Substraten und die Notwendigkeit, eine „Hierarchie“ für ihren Transport in die Abbaumaschinerie zu errichten, erforderte wahrscheinlich die Evolution vieler unterschiedlicher Signale, die vom Proteasom und den Transportproteinen erkannt werden. Unterschiedliche Strukturen und Längen von Ub-Ketten können feine Abwandlungen der Wechselwirkung zwischen dem Proteasom und den Substraten bereitstellen und auf diese Weise Affinitäten und Abbauraten regulieren. Es sollte erwähnt werden, dass die am häufigsten vorkommenden Ketten, die die Mehrheit der Substrate für den Abbau markieren, nach wie vor Lys48-verknüpfte Ketten sind. Aber selbst diese Ketten können noch andere Verknüpfungen enthalten, die ihnen andersartige Charakteristika verleihen, wie sie für die Feinabstimmung des proteolytischen Prozesses benötigt werden. Es sollte betont werden, dass die Multiplizität von Verknüpfungen innerhalb einer vorwiegend Lys48-verknüpften Kette auch die Promiskuität des Konjugationssystems widerspiegeln kann und nicht unbedingt eine biologische Anforderung ist, denn alles, was ein Proteasom braucht, ist eine „kritische Masse“ von Lys48-verknüpften Ub-Einheiten. Auch sind Anomalien des Ub-Systems die

Ursache verschiedener Pathologien, einschließlich bösartiger Tumoren und neurodegenerativer Störungen. Der zusätzliche Grad an Komplexität und Spezifität des Signals spiegelt sich möglicherweise auch in diesen Anomalien. Deshalb wird ein fundiertes Verständnis des Mechanismus der proteasomalen Erkennung die Entwicklung hochspezifischer Wirkstoffe mit nur geringen Nebenwirkungen ermöglichen.

Die Forschungen in der Arbeitsgruppe von A.C. werden von der Dr. Miriam and Sheldon Adelson Foundation for Medical Research (AMRF), der Israel Science Foundation (ISF) und der Deutsch-Israelischen Projektkooperation (DIP; zusammen mit T.S.) gefördert. A.C. ist Israel Cancer Research Fund (ICRF) USA Professor. T.S. wird von der DIP (in Zusammenarbeit mit A.C.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Eingegangen am 16. Juli 2012

Online veröffentlicht am 4. November 2012

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- [2] a) R. J. Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner, *Protein Degradation Handbook, Vol. 1*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**; b) R. J. Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner, *Protein Degradation Handbook, Vol. 2*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; c) R. J. Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner, *Protein Degradation Handbook, Vol. 3*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; d) R. J. Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner, *Protein Degradation Handbook, Vol. 4*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [3] a) Z. J. Chen, L. J. Sun, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 275–286; b) E. Lauwers, Z. Erpapazoglou, R. Haguenaer-Tsapis, B. Andre, *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 196–204.
- [4] J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, C. M. Pickart, *EMBO J.* **2000**, *19*, 94–102.
- [5] V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, A. Varshavsky, *Science* **1989**, *243*, 1576–1583.
- [6] a) A. Ciechanover, S. Elias, H. Heller, S. Ferber, A. Hershko, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7525–7528; b) K. D. Wilkinson, M. K. Urban, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7529–7532; c) A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, I. A. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1783–1786; d) A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1365–1368.
- [7] N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, A. Ciechanover, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11907–11912.
- [8] N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, S. Buchsbaum, O. Lewinson, M. Haj-Yahya, M. Hejjaoui, H. A. Lashuel, T. Sommer, A. Brik, A. Ciechanover, *Mol. Cell* **2012**, *48*, 87–97.
- [9] a) S. C. Boutet, S. Biressi, K. Iori, V. Natsu, T. A. Rando, *Mol. Cell* **2010**, *40*, 749–761; b) S. C. Boutet, M. H. Disatnik, L. S. Chan, K. Iori, T. A. Rando, *Cell* **2007**, *130*, 349–362.
- [10] L. Carvallo, R. Munoz, F. Bustos, N. Escobedo, H. Carrasco, G. Olivares, J. Larrain, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 29546–29555.
- [11] Y. Kravtsova-Ivantsiv, S. Cohen, A. Ciechanover, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 496–504.
- [12] N. V. Dimova, N. A. Hathaway, B. H. Lee, D. S. Kirkpatrick, M. L. Berkowitz, S. P. Gygi, D. Finley, R. W. King, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 168–176.
- [13] E. B. Dammer, C. H. Na, P. Xu, N. T. Seyfried, D. M. Duong, D. Cheng, M. Gearing, H. Rees, J. J. Lah, A. I. Levey, J. Rush, J. Peng, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10457–10465.
- [14] a) A. Williamson, K. E. Wickliffe, B. G. Mellone, L. Song, G. H. Karpen, M. Rape, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18213–18218; b) T. Wu, Y. Merbl, Y. Huo, J. L. Gallop, A. Tzur, M. W. Kirschner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1355–1360; c) M. J. Garnett, J. Mansfeld, C. Godwin, T. Matsusaka, J. Wu, P. Russell, J. Pines, A. R. Venkitaraman, *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1363–1369.
- [15] a) M. L. Matsumoto, K. E. Wickliffe, K. C. Dong, C. Yu, I. Bosanac, D. Bustos, L. Phu, D. S. Kirkpatrick, S. G. Hymowitz, M. Rape, R. F. Kelley, V. M. Dixit, *Mol. Cell* **2010**, *39*, 477–484; b) L. Jin, A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, M. Rape, *Cell* **2008**, *133*, 653–665; c) D. S. Kirkpatrick, N. A. Hathaway, J. Hanna, S. Elsasser, J. Rush, D. Finley, R. W. King, S. P. Gygi, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 700–710; d) K. E. Wickliffe, A. Williamson, H. J. Meyer, A. Kelly, M. Rape, *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 656–663.
- [16] O. V. Baboshina, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2823–2831.
- [17] a) L. Bedford, R. Layfield, R. J. Mayer, J. Peng, P. Xu, *Neurosci. Lett.* **2011**, *491*, 44–47; b) P. Xu, D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, J. Peng, *Cell* **2009**, *137*, 133–145.
- [18] Y. Saeki, T. Kudo, T. Sone, Y. Kikuchi, H. Yokosawa, A. Toh-e, K. Tanaka, *EMBO J.* **2009**, *28*, 359–371.
- [19] a) H. T. Kim, K. P. Kim, F. Lledias, A. F. Kisselev, K. M. Scaglione, D. Skowrya, S. P. Gygi, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17375–17386; b) R. Ben-Saadon, D. Zaaroor, T. Ziv, A. Ciechanover, *Mol. Cell* **2006**, *24*, 701–711.
- [20] H. T. Kim, K. P. Kim, T. Uchiki, S. P. Gygi, A. L. Goldberg, *EMBO J.* **2009**, *28*, 1867–1877.
- [21] a) G. J. Praefcke, K. Hofmann, R. J. Dohmen, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 23–31; b) J. R. Gareau, C. D. Lima, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 861–871; c) E. Meulmeester, F. Melchior, *Nature* **2008**, *452*, 709–711.
- [22] V. Matafora, A. D'Amato, S. Mori, F. Blasi, A. Bachi, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2243–2255.
- [23] J. Schimmel, K. M. Larsen, I. Matic, M. van Hagen, J. Cox, M. Mann, J. S. Andersen, A. C. Vertegaal, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 2107–2122.
- [24] a) V. Lallemand-Breitenbach, M. Jeanne, S. Benhenda, R. Nasr, M. Lei, L. Peres, J. Zhou, J. Zhu, B. Raught, H. de The, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 547–555; b) M. H. Tatham, M. C. Geoffroy, L. Shen, A. Plechanovova, N. Hattersley, E. G. Jaffray, J. J. Palvimo, R. T. Hay, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 538–546; c) S. R. Weisshaar, K. Keusekotten, A. Krause, C. Horst, H. M. Springer, K. Gotsche, R. J. Dohmen, G. J. Praefcke, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3174–3178.
- [25] J. Cheng, X. Kang, S. Zhang, E. T. Yeh, *Cell* **2007**, *131*, 584–595.
- [26] a) M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, W. G. Kaelin, Jr., *Science* **2001**, *292*, 464–468; b) N. Masson, C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, *EMBO J.* **2001**, *20*, 5197–5206; c) P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, *Science* **2001**, *292*, 468–472.
- [27] a) B. Gerlach, S. M. Cordier, A. C. Schmukle, C. H. Emmerich, E. Rieser, T. L. Haas, A. I. Webb, J. A. Rickard, H. Anderton, W. W. Wong, U. Nachbur, L. Gangoda, U. Warnken, A. W. Purcell, J. Silke, H. Walczak, *Nature* **2011**, *471*, 591–596; b) F. Ikeda, Y. L. Deribe, S. S. Skanland, B. Stieglitz, C. Grabbe, M. Franz-Wachtel, S. J. van Wijk, P. Goswami, V. Nagy, J. Terzic, F. Tokunaga, A. Androulidaki, T. Nakagawa, M. Pasparakis, K. Iwai, J. P. Sundberg, L. Schaefer, K. Rittinger, B. Macek, I. Dikic, *Nature* **2011**, *471*, 637–641; c) F. Tokunaga, T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, K. Iwai, *Nature* **2011**, *471*, 633–636.

- [28] T. Kirisako, K. Kamei, S. Murata, M. Kato, H. Fukumoto, M. Kanie, S. Sano, F. Tokunaga, K. Tanaka, K. Iwai, *EMBO J.* **2006**, *25*, 4877–4887.
- [29] S. Zhao, H. D. Ulrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 7704–7709.
- [30] a) S. W. Tait, E. de Vries, C. Maas, A. M. Keller, C. S. D'Santos, J. Borst, *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1453–1466; b) G. S. McDowell, R. Kucerova, A. Philpott, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *400*, 655–660; c) J. M. Vosper, G. S. McDowell, C. J. Hindley, C. S. Fiore-Herliche, R. Kucerova, I. Horan, A. Philpott, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 15458–15468; d) K. Cadwell, L. Coscoy, *Science* **2005**, *309*, 127–130.
- [31] X. Wang, R. A. Herr, W. J. Chua, L. Lybarger, E. J. Wiertz, T. H. Hansen, *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 613–624.
- [32] K. Breitschopf, E. Bengal, T. Ziv, A. Admon, A. Ciechanover, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5964–5973.
- [33] a) I. Fajerman, A. L. Schwartz, A. Ciechanover, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *314*, 505–512; b) J. Yang, Y. Hong, W. Wang, W. Wu, Y. Chi, H. Zong, X. Kong, Y. Wei, X. Yun, C. Cheng, K. Chen, J. Gu, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1409–1414; c) J. Trausch-Azar, T. C. Leone, D. P. Kelly, A. L. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40192–40200; d) Y. Wang, Q. Shao, X. Yu, W. Kong, J. E. Hildreth, B. Liu, *J. Virol.* **2011**, *85*, 4510–4519; e) S. Aviel, G. Winberg, M. Massucci, A. Ciechanover, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23491–23499; f) M. Ikeda, A. Ikeda, R. Longnecker, *Virology* **2002**, *300*, 153–159.
- [34] a) T. Meinnel, A. Serero, C. Giglione, *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 839–851; b) T. Meinnel, P. Peynot, C. Giglione, *Biochimie* **2005**, *87*, 701–712.
- [35] M. Thullberg, J. Bartek, J. Lukas, *Oncogene* **2000**, *19*, 2870–2876.
- [36] D. C. Scherer, J. A. Brockman, Z. Chen, T. Maniatis, D. W. Ballard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 11259–11263.
- [37] M. S. Rodriguez, J. M. Desterro, S. Lain, D. P. Lane, R. T. Hay, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8458–8467.
- [38] a) J. Peng, D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, S. P. Gygi, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 921–926; b) A. L. Hitchcock, K. Auld, S. P. Gygi, P. A. Silver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12735–12740.
- [39] a) H. Zhou, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 375–378; b) D. Lin, D. L. Tabb, J. R. Yates III, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2003**, *1646*, 1–10.
- [40] A. Catic, C. Collins, G. M. Church, H. L. Ploegh, *Bioinformatics* **2004**, *20*, 3302–3307.
- [41] J. M. Danielsen, K. B. Sylvestersen, S. Bekker-Jensen, D. Szklarczyk, J. W. Poulsen, H. Horn, L. J. Jensen, N. Mailand, M. L. Nielsen, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110 003590.
- [42] S. Cohen, H. Achbert-Weiner, A. Ciechanover, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 475–486.
- [43] R. W. King, M. Glotzer, M. W. Kirschner, *Mol. Biol. Cell* **1996**, *7*, 1343–1357.
- [44] D. Hou, C. Cenciarelli, J. P. Jensen, H. B. Nguyen, A. M. Weissman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14244–14247.