

Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation

Wolfgang Hilt

Institut für Biochemie, Universität Stuttgart

Die Zelle muss die Integrität ihrer Proteine sicherstellen und deren Aktivität regulieren. Die Proteinausstattung der Zelle, das Proteom, repräsentiert die im Genom gespeicherte Information. Fehlerhafte oder geschädigte Proteine tun das nicht und müssen umgehend entfernt werden. Das Proteom muss außerdem ständig moduliert werden. Dies ist wichtig zur Anpassung der Zelle an bestimmte Bedingungen oder zur Durchführung definierter zellulärer Programme, wie z. B. dem Teilungszyklus oder der Zelldifferenzierung. Bei der Erfüllung beider Aufgaben – Entfernung von Proteinmüll und Regulation der Aktivität von Proteinen – spielen selektive Proteolyseprozesse eine vitale Rolle. Um Proteine mit hoher Selektivität direkt an ihrem zellulären Wirkort zerstören zu können, hat die Evolution eine bemerkenswert komplexe Maschinerie hervorgebracht, das Ubiquitin-Proteasom-System. Dieses greift zentral in multiple Funktionen der Zelle ein.

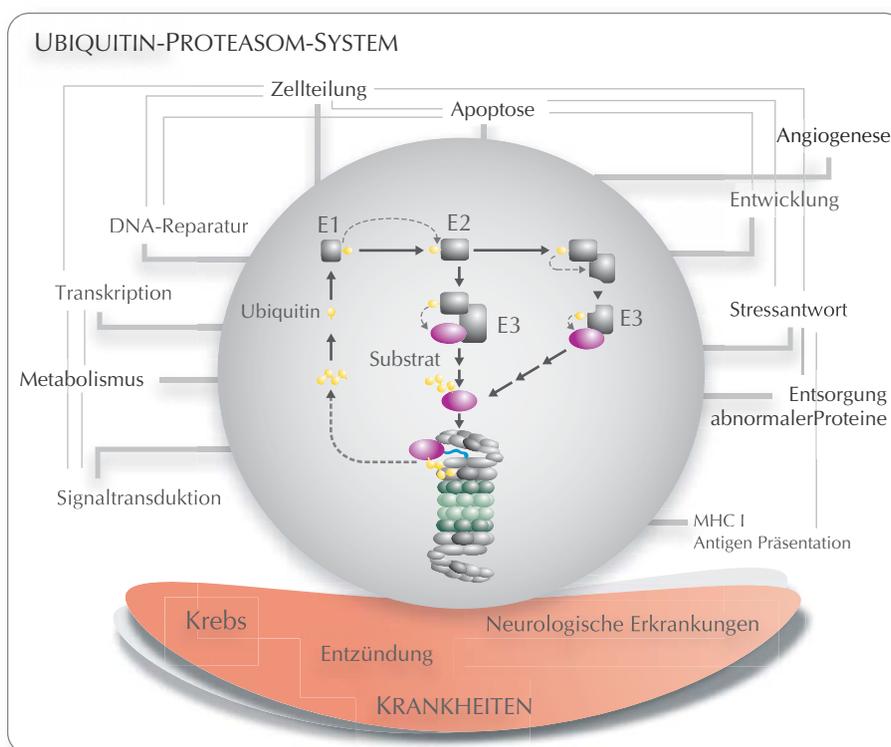


Abb. 1: Das UP-System: Proteasomen degradieren Zielproteine, die durch Anheftung von Polyubiquitinketten markiert wurden. Ubiquitin ist ein kleines Protein mit 76 Aminosäuren, das in Eukaryoten hoch konserviert vorkommt. Ubiquitin wird durch Bindung an ein E1-Enzym aktiviert, anschließend auf E2-Ubiquitin-Konjugasen übertragen. E3-Ubiquitin-Ligasen vermitteln oder bewirken nach Übernahme der Ubiquitineinheit schließlich die Modifizierung der Zielsubstrate. Das UP-System greift durch (signalgesteuerte) Proteolyse von Regulatoren oder anderen Zielproteinen kontrollierend in unterschiedliche zelluläre Funktionen ein. Störungen des Systems tragen bei zur Entstehung schwerer Erkrankungen.

Das Ubiquitin-Proteasom-System

► In jeder Säugerzelle findet man ca. 30.000 Proteasomen, hochkomplexe Nano-Proteolysemaschinen, entwickelt für den effizienten Abbau von Zielproteinen. Proteasomen bestehen aus einem 20S-Kernkomplex. Dieser trägt verborgen im Inneren seiner Hohlzylinderstruktur die proteolytisch aktiven Zentren. An beiden Enden finden sich zusätzlich zwei regulatorische 19S-Komplexe. Diese zeichnen sich verantwortlich für die Erkennung und Bindung von Substratproteinen, deren Entfaltung und Transport der Polypeptidketten zu den proteolytischen Zentren des 20S Kerns^[1]. Die im Zytoplasma und Zellkern operierenden Proteolysemaschinen müssen ihre Substrate mit höchster Präzision erfassen. Wie wird diese Selektivität erreicht? Ein spezielles Adressier-

system, das Ubiquitinsystem, wählt Zielproteine aus und markiert diese für den Abbau. Dazu werden in einer Enzymkaskade bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen Polyubiquitinketten am Zielprotein aufgebaut (Abb. 1). Proteasomen bauen in der Regel nur solchermaßen markierte Proteine ab (eine Übersicht zu Ausnahmen findet man in^[2]). Aufgrund der Diversität der E3-Enzyme ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UP-System) in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Zielproteine zu erfassen.

Proteinqualitätskontrolle

Proteine falten im Verlauf der Neusynthese in die native Form. Dies ist eine diffizile Angelegenheit. Fehler in der Proteinfaltung führen zu alternativen Strukturen ohne biologische Aktivität. Faltungsprobleme wer-

den zusätzlich gefördert durch Sequenzabweichungen bedingt durch Mutationen, Transkriptions- oder Translationsfehler. Defekte ribosomale Produkte (DriPs) sind eine nicht zu unterschätzende Herausforderung für die Zelle. Jüngere Untersuchungen lassen annehmen, dass unter normalen Umständen bis zu 30 % der neu-synthetisierten Proteine niemals den korrekten, nativen Zustand erreichen^[3]. Fehlerhafte Veränderungen von Proteinen können darüber hinaus auch im Verlauf ihrer Lebensdauer durch toxische Schädigungen (Einwirkung von Reagenzien, Strahlung) auftreten. Fehlgefaltete und geschädigte Proteine beeinträchtigen die Zelle nachhaltig. Sie nehmen im dicht gepackten Zellgefüge Raum ein, beschlagnahmen Interaktionspartner ohne ihre Aufgabe zu erfüllen, bilden im schlimmsten Fall unlösliche Aggregate, die akkumulieren und die Zelle oft bis zum Absterben schädigen. Die Bildung von Proteinaggregaten ist ein zentrales, wenn nicht ursächliches Phänomen neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington oder Prionenkrankheiten.

Die Beseitigung fehlerhafter Proteine und Wahrung eines intakten Proteoms ist für die Zelle von essenzieller Bedeutung. Die Evolution hat deshalb effektive Systeme zur Sicherung der Proteinqualität hervorgebracht. Der Qualitätssicherungsprozess läuft in drei Phasen ab: Überprüfung der Proteine („Proofreading“), Versuch der Faltung mit aktiver Unterstützung und, schlägt die Neufaltung fehl, Degradation des fehlerhaften Proteins. So genannte Chaperone spielen hier eine zentrale Rolle. Diese erkennen und binden fehlerhafte Proteine, unterstützen aktiv die Faltung, fungieren als Plattform für die Assemblierung und Kompartimentierung von Proteinen, tragen aber auch zur Entscheidung zur Degradation bei und führen fehlerhafte Proteine der Abbau-maschinerie zu. Proteasomen-Inhibitionsstudien in Säugerzellen sowie Untersuchungen von Hefemutanten mit inaktivem Proteasom oder einer Störung bestimmter Ubiquitinierungswege belegen klar die zentrale Rolle des UP-Systems in der Proteinqualitätskontrolle. Inzwischen sind drei Hauptschauplätze der Proteolyse abnormaler Proteine über das UP-System erkannt.

Proteinqualitätskontrolle im Zytoplasma

Durch Aufspüren einer E3-Ubiquitin-Ligase, CHIP, die mit Chaperonen der Hsp70/Hsp90 Familie interagiert, konnte eine molekulare Verbindung zwischen UP-System und cytoplasmatischer Proteinqualitätskontrolle aufgezeigt werden^[4]. Hsp70-Chaperone werden assoziiert mit Ribosomen gefunden. Sie binden neu synthetisierte Poly-

peptidketten im Stadium der Synthese oder kurz nach der Fertigstellung und unterstützen deren Faltung unter Verbrauch von ATP. CHIP kann diesen Prozess korrumpieren. Es hemmt den ATP-Umsatz cytosolischer Hsp70-Proteine und blockiert Hsp70-vermittelte Proteinfaltung. CHIP bindet an E2-Enzyme der Ubc4/Ubc5-Familie, die für die Ubiquitinierung abnormaler Proteine verantwortlich zeichnen. Die Bindung an Hsp70/Hsp90 ist notwendig, damit die CHIP-Ubiquitin-Ligase Aktivität ausüben kann. Diese Befunde verknüpfen klar die Ubiquitin-abhängige Proteolyse mit der Qualitätskontrolle cytoplasmatisch synthetisierter Proteine.

Das ERAD-System

Circa 20 % der Proteine werden in den sekretorischen Weg eingeschleust. Diese Proteine erreichen das endoplasmatische Retikulum im entfaltenen Zustand. Fehlgefaltete oder nicht-assemblierte Proteine werden an der Reise zum Bestimmungsort gehindert, aus dem ER-extrahiert und der proteasomalen Abbaumaschinerie im Zytoplasma zugeführt. Ein komplexes System für Modifizierung, Proofreading, Rücktransport ins Zytoplasma, Ubiquitin-Markierung und Proteolyse steuert und bewerkstelligt diese Aufgabe. Die Ubiquitinierung der Proteine, die vom ER-abhängigen Degradationssystem (ERAD) erfasst werden, erfolgt beim Durchtritt durch die Membran. Zentrale Funktionseinheiten der Ubiquitinierungsmaschinerie wie das E2-Enzym Ubc6 oder die E3-Ligasen Hrd1/Der3 und Doa10 findet man in der ER-Membran verankert. Grundlegende Arbeiten in Hefezellen konnten die Basismechanismen des ERAD-Wegs enthüllen. Laufend werden neue Komponenten der Maschinerie identifiziert, die Prozesse besser verstanden^[5].

Qualitätskontrolle im Kern

Erst kürzlich wurde ein entscheidender Durchbruch erreicht in der Erfassung eines Proteinqualitätskontrollsystems, das sich auf Proteine konzentriert, die im Verlauf ihrer Lebensdauer abnormal werden^[6]. Die Suche nach Komponenten einer Proteinqualitätskontrolle im Zellkern – einem Kompartiment in dem keine Proteinneusynthese stattfindet – führte zur Entdeckung einer Ubiquitin-Ligase, San1, die im Kern operiert und dort selektiv die Ubiquitinierung und damit den Abbau abnormaler Proteine bewirkt^[7]. Fehlt San1 wird eine Stressantwort ausgelöst; die Zellen erkennen offensichtlich, dass geschädigte Proteine im Kern akkumulieren und aktivieren ein „Back-up“-System, das den San1-Verlust kompensiert. ▶▶

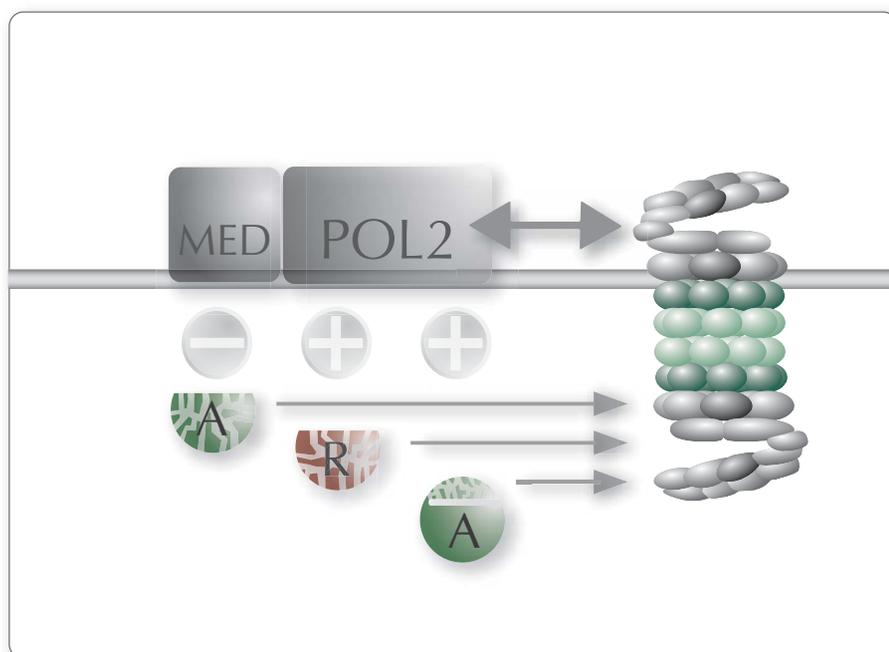


Abb. 2: Das UP-System reguliert Transkription auf verschiedenen Ebenen: Durch Abbau von Transkriptionsaktivatoren wird die Konzentration der entsprechenden Genprodukte herunterreguliert. Das proteasomale System kann durch vollständigen Abbau von Repressorproteinen oder durch limitierte Proteolyse und damit Aktivierung von Transkriptionsaktivatorvorläufern aber „paradoxiertweise“ die Anhebung der Konzentration bestimmter Genprodukte stimulieren. Das UP-System zeigt direkte physikalische Verbindungen zur Transkriptionsmaschinerie (Mediator-Polymerase II-Holoenzymkomplex).



Mit San1 ist ein Zugriffspunkt auf ein Qualitätskontrollsystem vorhanden, das sich offensichtlich auf „alternde“ Proteine beschränkt. Solche Systeme sind von besonderer Bedeutung für langlebige Zellen, wie z.B. Neuronen. Damit ergeben sich neue Chancen des besseren Verständnisses neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington.

Regulatorische Proteolyse

Das zweite große Hauptfeld proteasomaler Proteolyse ist der Abbau definierter Zielproteine für regulatorische Zwecke. Die Zerstörung ausgesuchter Proteine als ein die Lebensfunktionen der Zelle steuernder Schritt ist von großer Bedeutung. Viel größer als wir, gewohnt an die Abläufe in „unserer“ technischen Welt, auf den ersten Blick schließen würden. Wem erscheint es vernünftig Maschinen abzuschalten, indem man sie in ihre Bestandteile zerlegt. Für die Zelle macht das aber durchaus Sinn. Verläuft doch die proteolytische Zerstörung eines Proteins schnell und irreversibel, garantiert daher die termingerechte und gänzliche Abschaltung der Aktivität eines Proteins. Die entstehenden Abbauprodukte, die Aminosäuren, können leicht für den Wiederaufbau neuer Funktionseinheiten recycelt werden. Der Gewinn ist hoch, der Preis erträglich. Unmittelbares Ziel ist hier die direkte Limi-

tierung der Aktivität bestimmter Proteine. So werden z.B. Enzyme zur Anpassung des Metabolismus durch UP-abhängige Proteolyse neutralisiert.

Transkriptionskontrolle

Das UP-System greift in die Kontrolle der Konzentration bestimmter Zielproteine nicht nur direkt durch deren Proteolyse ein. Es reguliert vielfältig auch Genexpression und damit Proteinsynthese durch Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Abb. 2). Zunehmende Indizien sprechen für eine umfassendere Rolle des UP-Systems in der Transkriptionskontrolle, die weit über die reine Kontrolle frei diffundierender Transkriptionsfaktoren hinausgeht. So gibt es Hinweise, dass das Proteasom manche Transkriptionsfaktoren nur nach Ausübung der Funktion oder direkt an der Transkriptionsmaschine erfasst. Neuere Befunde deuten zudem auf eine physikalische Interaktion zwischen der Transkriptionsmaschinerie und dem UP-System. So wurden Vertreter des Ubiquitinsystems in RNA-Polymerase II-Repressor Komplexen aufgespürt, eine periodische Assoziation von Proteasomen an bestimmten Promotorregionen nachgewiesen. Es wird diskutiert, dass Proteolysevermittelte Steuerschritte für die Freisetzung der RNA-Polymerase von Präinitiationskomplexen an den Promotoren und da-

mit die Initiation der Transkription, für die Begrenzung der Kopierdurchgänge und determinierte Abschaltung der Maschinerie sowie für die Klärung der Promotoren nach Abschluss der Transkription eine Rolle spielen können^[8].

Kontrolle von Leben und Sterben der Zellen

Ziel des Zellteilungszyklus ist die Verdopplung der Zelle mit exakter Kopie der genetischen Information; dies wird durch den präzisen Ablauf eines komplexen Programms erreicht. Cyclin-abhängige Kinase-Komplexe (CDKs) sind der zentrale Taktgeber des Zellzyklusprogramms. Diese werden durch oszillierende Wellen von Cyclinen phasenspezifisch moduliert. Das UP-System sorgt durch den Abbau der unterschiedlichen Cycline für die termingerechte Abschaltung der CDKs. Es kann CDKs aber auch durch die Proteolyse spezifischer Inhibitoren aktivieren. UP-vermittelte Proteolyse-schritte spielen damit eine zentrale Rolle in der biochemischen Uhr des Zellzyklus. Die Proteolyse CDK-unabhängiger Regulatoren stellt darüber hinaus sicher, dass die Teilprogramme des Zellzyklus vollständig und in exakter Reihenfolge ablaufen. Dies sei am Beispiel des Anaphase-Inhibitors Pds1 im Detail dargestellt (Abb. 3). UP-vermittelte Proteolyse spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Entfernung von Strukturkomponenten der Zellzyklusmaschinerie, deren Anwesenheit den exakten Ablauf des nachfolgenden Teilungszyklus stören (Abb. 3)^[9].

In Antwort auf äußere Signale oder interne Schäden kann die Zelle einen apoptotischen Suizid induzieren. Auch hier greift das UP-System regulierend ein. Die Inhibition des proteasomalen Systems kann, je nach Zelllinie, Apoptose auslösen oder verhindern. Wichtige Apoptoseregulatoren, wie der Tumorsuppressor p53, IAP-Proteine oder Mitglieder der Bcl2-Familie wurden als Zielproteine des UP-Systems identifiziert^[9]. Caspasen, die als Signal- und Effektorproteasen eine zentrale Rolle im Apoptosegeschehen einnehmen, zerlegen im Verlauf des Zelltods proteasomale Untereinheiten^[10]. Möglicherweise ist der Zusammenbruch des UP-Systems ein wichtiges Signalereignis der Apoptose.

Perspektiven

Die Erforschung des UP-Systems erweitert nicht nur unser grundsätzliches zellbiologisches Wissen. Es ergeben sich daraus auch interessante Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Medikamente. Konkret bestätigt wurde dies durch die Markteinführung des Proteasomeninhibitors Bortezomib (Velcade) als

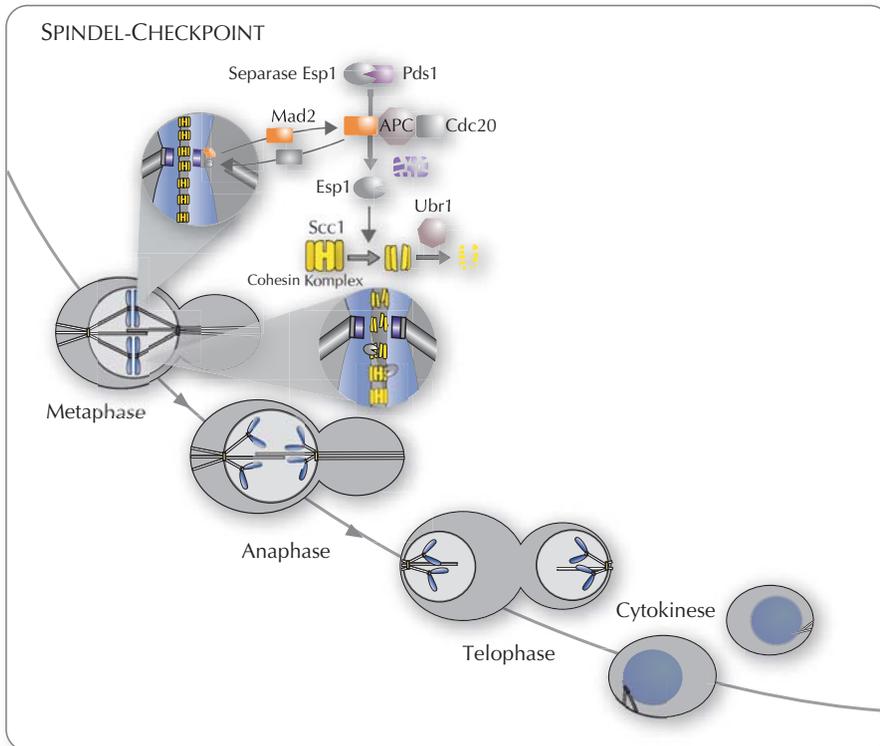


Abb. 3: Das UP-System steuert Schritte der Mitose: Der Abbau des Anaphaseinhibitors Pds1 wird durch einen Ubiquitin-Ligase Komplex Cdc20-APC getriggert; dies ist ein zentraler Steuerschritt in der Einleitung der Mitose. Pds1 agiert als spezifischer Inhibitor einer hochselektiven Protease, der Separase Esp1. Diese wird bei Abbau von Pds1 in aktiver Form freigesetzt. Esp1 schneidet dann Scc1, eine Unter-einheit der Cohesin-Komplexe, und löst so die physikalische Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden der duplizierten Chromosomen. In der Metaphase senden Chromosomen, die nicht korrekt an die Mikrotubuli der Mitosespindel angeheftet sind ein molekulares Signal (Mad2) das Cdc20-APC blockiert. So wird erreicht, dass die Trennung der Chromosomen nur nach korrektem Aufbau der Mitosespindel erfolgen kann. Dieser Proteasomen-vermittelte Regulationsschritt des „Spindel-damage-checkpoints“ ist von zentraler Bedeutung für die Perfektion der Chromosomensegregation in der Mitose und damit die genetische Stabilität der Zelle. Scc1-Fragmente stören den korrekten Aufbau der Chromatidenkohäsion im nachfolgenden Teilungszyklus. Sie werden deshalb im Verlauf der Mitose über einen APC-unabhängigen über die E3-Ligase Ubr1 vermittelten UP-Weg entfernt.

Krebstherapeutikum. Dieses Medikament bewährt sich als enorm wirksam in der Behandlung von Rezidiven multipler Myelome. Die Ausweitung des Einsatzspektrums auf weitere bösartige Erkrankungen wie Hodgkin und non-Hodgkin Lymphome, Leukämien, Lungen- und Prostatakarzinome ist viel versprechend. Bortezomib blockiert den Abbau wichtiger Regulatoren der Tumorzelle; die Identität dieser Zielproteine ist aber vielfach noch nicht im Detail geklärt. Klar ist, das Medikament stoppt die Proliferation der Zellen, löst Apoptose aus, hemmt Gefäßneubildung und erhöht zusätzlich die Sensitivität der Tumorzellen gegen Chemotherapeutika und Bestrahlung^[11].

Proteasomeninhibitoren wird auch ein Potenzial für die Therapie anderer Erkrankungen wie Mukoviszidose, Autoimmun- oder chronisch entzündlicher Erkrankungen

zugeschrieben. Viel versprechende therapeutische Wirkungen werden in der Zukunft von Medikamenten erwartet, die in die Funktion von E3-Ligasen oder proteasomalen Substraten eingreifen, damit mit höchster Präzision definierte Regulationsvorgänge der Zelle stören oder wiederherstellen.

Literatur

- [1] **Wolf, D. H. and Hilt, W.** (2004): The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta*, 1695, 19–31.
- [2] **Verma, R. and Deshaies, R. J.** (2000): A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell*, 101, 341–344.
- [3] **Schubert, U. et al.** (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770–774.
- [4] **Esser, C. et al.** (2004): Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1695, 171–188.
- [5] **Hirsch, C. et al.** (2004): Endoplasmic reticulum-associated protein degradation – one model fits all? *Biochim. Biophys. Acta*, 1695, 215–223.
- [6] **Sommer, T. and Hirsch, C.** (2005): San1p, checking up on nuclear proteins. *Cell*, 120, 734–736.
- [7] **Gardner, R. G. et al.** (2005): Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell*, 120, 803–815.
- [8] **Lipford, J. R. and Deshaies, R. J.** (2003): Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat. Cell Biol.* 5, 845–850.
- [9] **Hilt, W.** (2004): Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1615–1632.
- [10] **Sun, X. M. et al.** (2004): Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol. Cell.* 14, 81–93.
- [11] **Schwartz, R. and Davidson, T.** (2004): Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Huntingt.)* 18, 14–21.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Wolfgang Hilt
Institut für Biochemie
Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 55
D-70569 Stuttgart
Tel.: 0711-685 4388
Fax: 0711-685 4392
hilt@ibc.uni-stuttgart.de