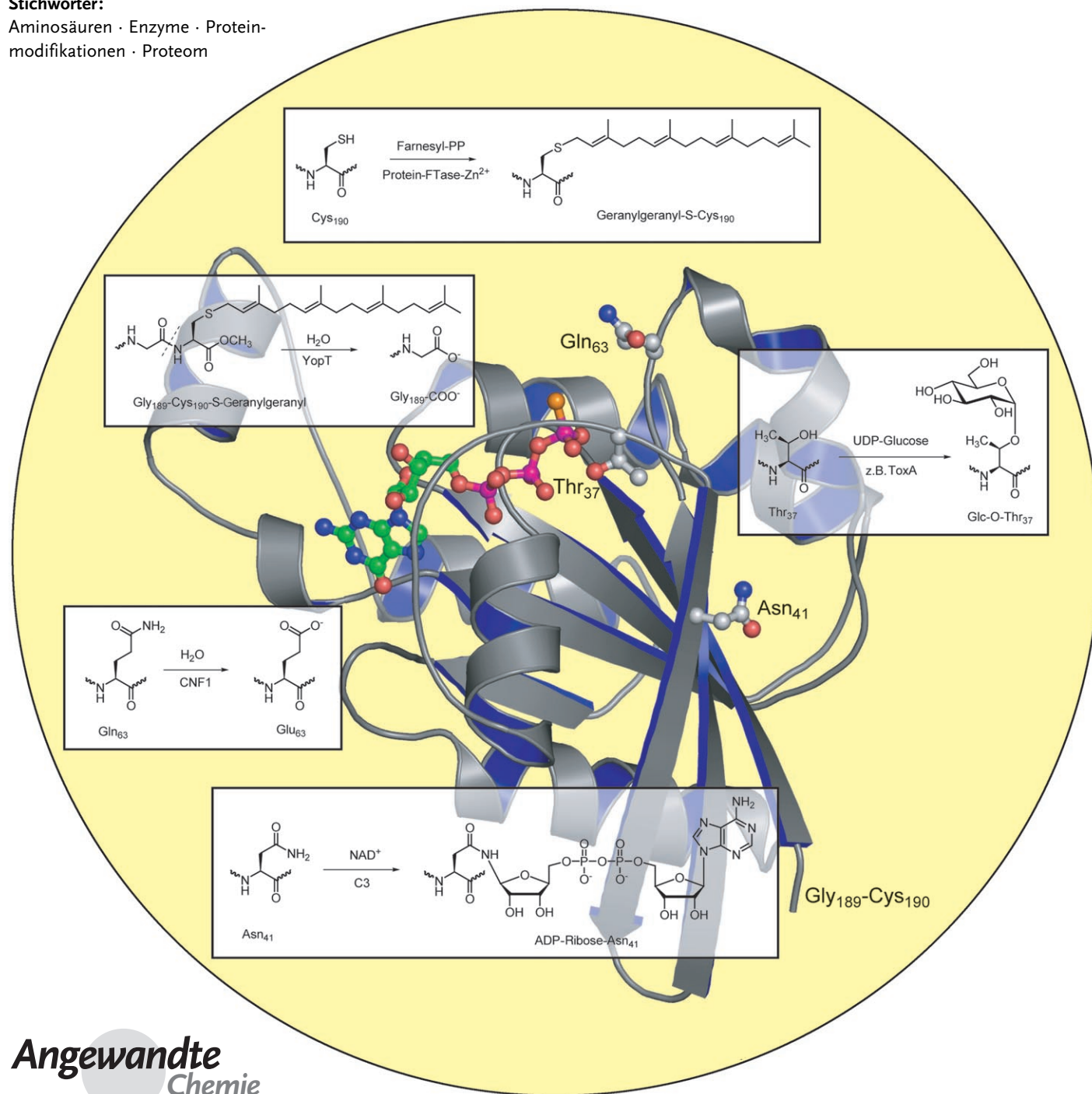


Posttranslationale Proteinmodifikation: die Chemie der Proteomdiversifizierung

Christopher T. Walsh,* Sylvie Garneau-Tsodikova und Gregory J. Gatto, Jr.

Stichwörter:

Aminosäuren · Enzyme · Proteinmodifikationen · Proteom



Die Vielfalt an kovalenten Proteinvarianten (das Proteom) übersteigt bei weitem die Zahl an Proteinen, die sich aus der Codierkapazität der DNA ableitet. Ursache für diese Diversität sind gerichtete posttranslationale Modifikationen. Unter den Enzymen, die solche Modifikationen ausführen, finden sich etwa 500 humane Proteinkinasen, 150 Proteinphosphatasen und 500 Proteasen. Die Hauptarten der kovalenten Proteinmodifikationen – Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung, Methylierung und Ubiquitinierung – können nach der modifizierten Aminosäureseitenkette, dem modifizierenden Enzym und dem Grad an Reversibilität klassifiziert werden. Auch chemische Ereignisse wie das Proteinspleißen, die Reifung des grünen Fluoreszenzproteins und die Selbstaktivierung des Proteasoms zählen zu den posttranslationalen Modifikationen. Ein gründliches Verständnis von Umfang und Muster der posttranslationalen Modifikationen vermittelt Einblicke in die Funktion und Dynamik eukaryotischer Proteomzusammensetzungen.

1. Einleitung

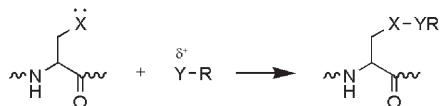
Es gibt zwei Hauptmechanismen, nach denen die Codierkapazität eukaryotischer, 6000 bis 30000 Gene (Hefe bis Mensch) umfassender Genome erweitert wird, um so die Diversität des entsprechenden Proteoms – des Bestandes aller Proteine in einer Zelle oder einem Organismus – zu vergrößern. Ein Proteom kann mit über 10^6 molekularen Proteineinheiten um zwei bis drei Größenordnungen komplexer sein als vom codierenden Genom vorgegeben. Der erste der beiden Mechanismen zur Proteomdiversifizierung – Spleißen der mRNA, einschließlich des gewebespezifischen alternativen Spleißens – findet bereits auf der Transkriptionsebene statt.^[1,2] Diese Prozesse spielen im eukaryotischen RNA-Metabolismus eine entscheidende Rolle.

Das Hauptaugenmerk dieses Aufsatzes liegt jedoch auf dem zweiten Mechanismus, der kovalenten posttranslationalen Proteinmodifikation (PTM), die an einer oder an meh-

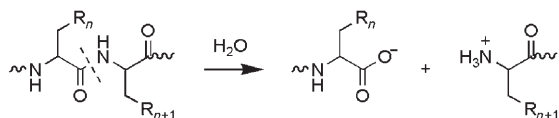
ren Stellen ablaufen kann.^[3] Wie der Name schon sagt, handelt es sich um kovalente Modifikationen, die erst nach der Transkription der DNA zu RNA und deren Translation zu Proteinen stattfinden. Eine Vielzahl von spezifischen enzymkatalysierten Modifikationen wird hierbei an den Seitenketten oder am Proteinrückgrat der naszierenden oder bereits fertig gefalteten und unter physiologischen Bedingungen stabilen Proteine ausgeführt. Zwar kommt es auch bei Prokaryoten zur Proteomdiversifizierung durch kovalente Modifikationen; weitaus häufiger und vielfältiger tritt dies aber in kernhaltigen Zellen auf. Etwa 5 % des Genoms höherer Eukaryoten kann für Enzyme reserviert sein, die posttranslationale Modifizierungen des Proteoms ausführen.

Die PTM lässt sich in zwei übergeordnete Kategorien aufteilen (Schema 1). Die erste Kategorie umfasst enzymkatalysierte kovalente Additionen chemischer Gruppen, meistens eines elektrophilen Cosubstratfragments, an eine Seitenkette des Proteins. Die zu modifizierende Seitenkette ist

1. kovalente Modifikation



2. Spaltung des Proteinrückgrats



Schema 1. Die beiden Hauptkategorien posttranslationaler Modifikationen: 1) kovalente Modifikation einer nucleophilen Aminosäureseitenkette durch ein elektrophiles Cosubstratfragment; 2) Spaltung des Proteinrückgrats an einer spezifischen Peptidbindung.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7509
2. Kovalente Addition: die Hauptdarsteller	7511
3. Kovalente Addition: die Nebenrollen	7521
4. Katalogisierung posttranslationaler Modifikationen	7527
5. Posttranslationale Mehrfach- und Tandemmodifikationen von Proteinen	7528
6. Reversible kontra irreversible posttranslationale Modifikation	7529
7. Kontrollierte Proteolyse	7531
8. Selbstspaltungen und Umlagerungen von Peptidbindungen	7532
9. Umlagerungen von Peptidbindungen ohne Selbstspaltung	7535
10. Schlussfolgerungen	7536

[*] Prof. C. T. Walsh, Dr. S. Garneau-Tsodikova, Dr. G. J. Gatto, Jr.
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology
Harvard Medical School
Boston, MA 02115 (USA)
Fax: (+1) 617-432-0348
E-mail: christopher_walsh@hms.harvard.edu

normalerweise elektronenreich und nimmt die Rolle des Nucleophils ein. Die zweite Kategorie umfasst kovalente Spaltungen des Peptidrückgrats, die entweder durch eine Protease oder, seltener, autokatalytisch durch das Protein selbst vermittelt werden. Kernstrategie zur Regulation von Zusammensetzung und Funktion des Proteoms ist dabei die limitierte Proteolyse; hierdurch werden Zielort, Aktivität und die Lebensdauer eines jeden Proteins im intra- und extrazellulären Milieu festgeschrieben.

Abgesehen von dieser übergeordneten Einteilung können die kovalenten Proteinmodifikationen nach verschiedenen Aspekten klassifiziert werden. Ein Kriterium ist die Identität der zu modifizierenden Seitenkette; fünfzehn der zwanzig proteinogenen Standardaminoacids werden durch Seitenkettenmodifikation diversifiziert (Tabelle 1). Eine andere Form der Einteilung richtet sich nach dem Cosubstrat- oder Coenzymfragment, das enzymatisch an das Protein gekuppelt wird, und der daraus hervorgehenden Art der chemischen Modifikation. Eigene Rubriken bilden unter anderem die S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängige Methylierung, ATP-abhängige Phosphorylierung, Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung, NAD-abhängige ADP-Ribosylierung, CoASH-abhängige Phosphopantetheinylierung und die Phosphoadenosinphosphosulfat-(PAPS)-abhängige Sulfurylierung. Ein drittes Kategorisierungssche-

Tabelle 1: Posttranslationale Proteinmodifikationen durch Modifikation der Seitenketten.^[a]

Aminosäurerest	Reaktion	Beispiel
Asp	Phosphorylierung	Proteintyrosinphosphatasen; Antwortregulatoren in Zweikomponentensystemen
Glu	Isomerisierung zu isoAsp	
	Methylierung	Chemotaxis-Rezeptorproteine
	Carboxylierung	Gla-Reste bei der Blutkoagulation
Ser	Polyglycinierung	Tubulin
	Polyglutamylierung	Tubulin
	Phosphorylierung	Proteinserinkinasen/-phosphatasen
	O-Glycosylierung	O-Glycosylierung des Notch-Rezeptors
	Phosphopantetheinylierung	Fettsäuresynthase
Thr	Selbstspaltungen	Bildung von Pyruvamid-Enzymen
	Phosphorylierung	Proteintreoninkinasen und -phosphatasen
Tyr	O-Glycosylierung	
	Phosphorylierung	Tyrosinkinasen und -phosphatasen
	Sulfatierung	Reifung des CCR5-Rezeptors
	ortho-Nitrierung	Entzündungsreaktionen
His	TOPA-Chinon	Reifung der Aminoxidase
	Phosphorylierung	Sensorproteinkinasen in regulatorischen Zweikomponentensystemen
Lys	Aminocarboxypropylierung	Bildung von Diphthamid
	N-Methylierung	Methyl-CoM-Reduktase
	N-Methylierung	Methylierung von Histon
	N-Acylierung durch Acetyl-, Biotinyl-, Lipoyl-, Ubiquitylgruppen	Acetylierung von Histon, prosthetische Gruppen am Schwingarm, Ubiquitin, Proteinmarkierung durch kleine Ubiquitin-ähnliche Marker (SUMOs)
	C-Hydroxylierung	Reifung von Collagen
Cys	S-Hydroxylierung (S-OH)	Sulfenatzwischenstufen
	Bildung von Disulfidbindungen	Proteine in oxidierenden Umgebungen
	Phosphorylierung	PTPasen
	S-Acylierung	Ras
	S-Prenylierung	Ras
Met	Proteinspleißen	Exzision von Intein
	Oxidation zu Sulfoxid	Met-Sulfoxidreduktase
Arg	N-Methylierung	Histone
	N-ADP-Ribosylierung	G _{5α}
Asn	N-Glycosylierung	N-Glycoproteine
	N-ADP-Ribosylierung	eEF-2
	Proteinspleißen	Stufe der Inteinexzision
	Transglutaminierung	Proteinvernetzung
Gln	C-Mannosylierung	Plasmamembranproteine
Trp	C-Hydroxylierung	Collagen, HIF-1α
Pro	C-Hydroxylierung	
Gly	C-Hydroxylierung	Bildung C-terminaler Amide

[a] Nicht bekannt sind Modifikationen an Leu, Ile, Val, Ala, Phe. Eine ausführlichere Liste findet sich in Lit. [3].



Christopher T. Walsh, geboren 1944, studierte Biologie in Harvard (M.Sc.) und promovierte in Biochemie bei Fritz Lipman am Rockefeller Institute of Medical Research. Nach 15 Jahren am Massachusetts Institute of Technology (MIT; 1972–1987) gehört er seit 1987 der Harvard Medical School an. Er bekleidete einen Lehrstuhl am Department of Chemistry am MIT (1982–1987) sowie am Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology an der Harvard Medical School (1987–1995). Sein Forschungsschwerpunkt sind die Mechanismen von Enzymen und Inhibitoren und die Biosynthese von nichtribosomalen Peptidantibiotika.



Sylvie Garneau-Tsodikova, geboren in Québec, Kanada, studierte Chemie (B.Sc. 1995; M.Sc. 1997) an der Université Laval bei Robert Chênevert und Perséphone Cannonne. Im Januar 2003 promovierte sie in Chemie an der Universität Alberta bei John C. Vederas mit einer Arbeit über die Wirkung antimikrobieller Stoffe auf Bakterienzellwände. Derzeit ist sie Postdoc bei Christopher T. Walsh an der Harvard Medical School und befasst sich mit der Halogenierung und Bildung von Pyrrolen in Naturstoffen.

ma richtet sich nach den zusätzlichen Funktionen, die durch eine kovalente Addition entstehen, z. B. erweiterte katalytische Aktivitäten von Enzymen, die mit Biotinyl-, Lipoyl- und Phosphopantetheinylgruppen ausgestattet wurden, geänderte subzelluläre Adressen von Proteinen mit den unterschiedlichsten Lipidmodifikationen (Prenylierung, Palmitoylierung oder Verknüpfung mit einem Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker) oder die Markierung von Proteinen durch Ubiquitin, die den Transport zum Lysosom oder Proteasom induziert.

2. Kovalente Addition: die Hauptdarsteller

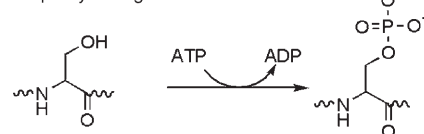
Die fünf am häufigsten vorkommenden kovalenten Additionen sind Phosphorylierung, Acylierung, Alkylierung, Glycosylierung und Oxidation (Schema 2). Die auf diese Weise modifizierten Proteinprodukte bilden Untergruppen des Proteoms eines Organismus: das Phosphoproteom, das Acylproteom, das Alkylproteom, das Glycoproteom und das oxidierte Proteom. Jedes dieser Subproteome kann wiederum hoch divers sein.

2.1. Proteinphosphorylierung

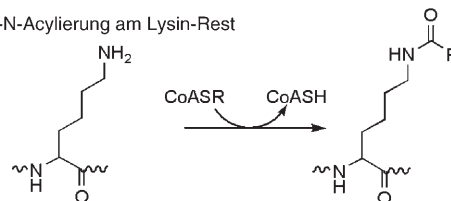
Das Phosphoproteom von Säugern enthält Phospho-Ser(pS)-, Phospho-Thr(pT)- und Phospho-Tyr(pY)-Reste in einer Verteilung von ungefähr 90:10 (pS:pT:pY) (Abbildung 1).^[4] Bakterielle und pilzliche Phosphoproteome können zusätzlich pHis- und pAsp-Reste enthalten. Diese stammen von Proteinen, die an Zweikomponenten-Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind.^[5] Das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* weist mehr als 60 solcher Signalkaskaden auf.^[6]

Die Proteinphosphorylierungen katalysierenden Enzyme bilden eine der größten Klassen von PTM-Enzymen. Man bezeichnet diese Superfamilie der Proteinkinasen als Kinom, und allein das menschliche Kinom enthält mehr als 500 Vertreter.^[7] Wenn jede dieser Proteinkinasen im Schnitt nur 20 verschiedene Proteinsubstrate (oder Aminosäurereste innerhalb einer kleineren Proteinuntergruppe) phosphoryliert, würden bereits 10000 unterschiedliche molekulare Formen von Phosphoproteinen resultieren. Mit dieser Zahl wird

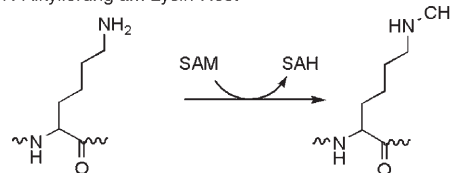
O-Phosphorylierung am Serin-Rest



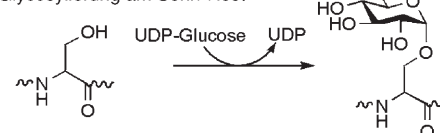
ε-N-Acylierung am Lysin-Rest



ε-N-Alkylierung am Lysin-Rest



O-Glycosylierung am Serin-Rest



Oxidation am Prolinrest



Schema 2. Die fünf Hauptklassen kovalenter Seitenkettenadditionen: Phosphorylierung, Acetylierung, Alkylierung, Glycosylierung, Oxidierung.

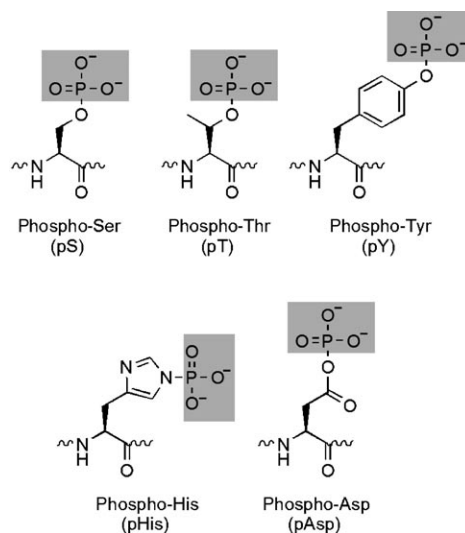


Abbildung 1. Die phosphorylierten Formen von Aminosäuresideketten in Proteinen: Phospho-Ser (pS), Phospho-Thr (pT), Phospho-Tyr (pY), Phospho-His (pHis), Phospho-Asp (pAsp).



Gregory J. Gatto, Jr., geboren 1972, studierte Chemie an der Princeton University bei Martin Semmelhack. Er promovierte 2003 an der Johns Hopkins University School of Medicine bei Jeremy Berg mit einer Arbeit zur Strukturbiologie der peroxisomal gerichteten Signalerkennung. Derzeit ist er NIH-Postdoc bei Christopher T. Walsh an der Harvard Medical School und befasst sich mit der Biosynthese von Makrolid-Immunsuppressoren.

höchstwahrscheinlich die wahre Größe des Phosphoproteoms von höheren Eukaryoten noch erheblich unterschätzt. Zum Beispiel wird die enzymatische Aktivität der Abl-Proteinkinase durch Phosphorylierung an bis zu elf Resten (Tyr, Thr, Ser) moduliert (Abbildung 2).

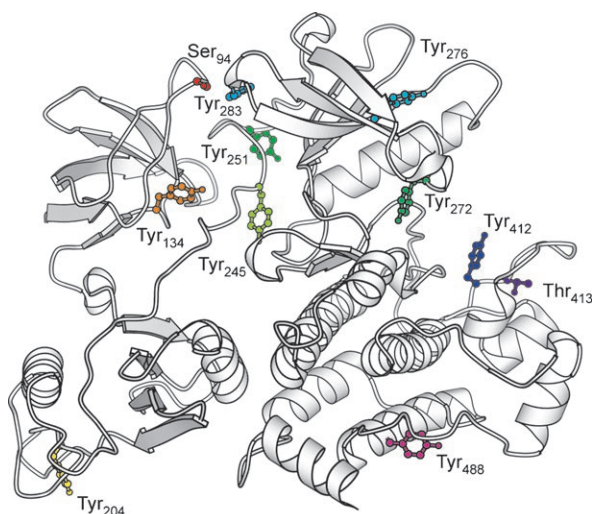


Abbildung 2. Die Tyrosinkinase Abl enthält elf Phosphorylierungsstellen an Ser-, Thr- und Tyr-Resten (farblich kenntlich gemacht von Rot am N-Terminus nach Violett am C-Terminus). Diese und alle weiteren dreidimensionalen Strukturdarstellungen in diesem Aufsatz wurden mit MolScript^[122] erstellt.

Durch seine Ladung induziert das tetraedrische Phosphatdianion in der lokalen Mikroumgebung des Proteins Konformationsänderungen,^[8] und oft kommt es zu Paarungen mit den kationischen Arg-Seitenketten (Abbildung 3).

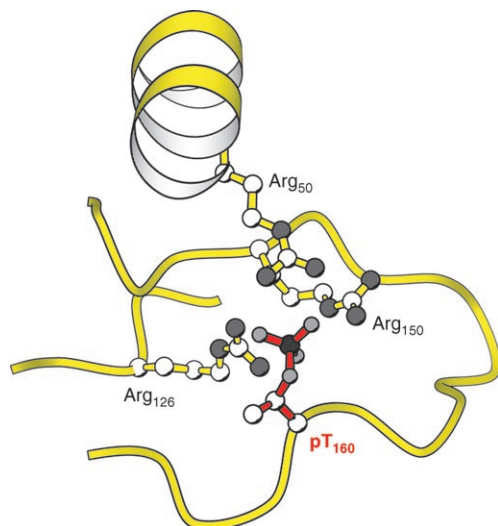


Abbildung 3. Die Umwandlung einer neutralen OH-Seitenkette zur dianionischen PO_3^{2-} -Seitenkette führt zu einer gegabelten Wechselwirkung mit zwei kationischen Arg-Seitenketten. Hierdurch ergibt sich eine Konformationsänderung, die Signaltransduktionen an Partnerproteine oder kleine Moleküle auslöst oder vermittelt. Dargestellt ist die Wechselwirkung von pThr₁₆₀ mit den Guanidiniumfunktionen von Arg₅₀, Arg₁₂₆ und Arg₁₅₀ im Cdk2-Protein.

Häufig gibt diese lokale Reorganisation von Proteindomänen den Impuls zur Signaltransduktion, beispielsweise bei den vier parallelen MAP-Kinase-Signalwegen von Eukaryoten und bei der Aktivierung von Membranrezeptor-Tyrosinkinasen während der Autophosphorylierung. Die enzymatische Umwandlung einer neutralen OH-Seitenkette in ein Phosphat-Dianion hat sich als Konformationschalter zur Restrukturierung von Proteindomänen derart bewährt, dass sie sich im Laufe der Evolution als ein Leitmotiv bei der eukaryotischen Proteomdiversifizierung manifestierte.

2.2. Proteinacylierung

Die häufigsten posttranslationalen Acylierungen von Proteinen resultieren in C_2 -Ketten (Acetylgruppen; z.B. Acetylierung von Histon),^[9] C_{14} -Ketten (Myristoylierung an N-terminalen Glycinresten)^[10] und C_{16} -Ketten (S-palmitoylierte Cys-Reste).^[11] Die 8-kDa-Kette des kleinen Proteins Ubiquitin^[12] enthält einen Acylrest und wird enzymatisch durch Ubiquitin-Ligasen übertragen. Ob ein Protein mit einer C_2 -, C_{14} -, C_{16} - oder 8-kDa-Kette acyliert wird, hat höchst unterschiedliche biologische Konsequenzen.

2.2.1. ϵ -N-Acetylierung von Lysin

Die mehrfache Acetylierung von Lysin-Resten in den N-terminalen Enden von Histonen oder am C-Terminus des p53-Transkriptionsfaktors^[13] sind offenbar wesentliche Prozesse bei der Ausführung des epigenetischen Codes, der die selektive Gentranskription steuert. Acetylgruppendonor ist jeweils der Primärmetabolit Acetyl-CoA. Spezifische Histon-Acetyl-Transferase(HAT)-Isoenzyme unterscheiden zwischen Kombinationen von ϵ - NH_2 -Gruppen der Lys-Seitenketten in den N-Termini von Histonen. Dies sind zwei Lys-Reste im Histon H2A und jeweils vier in H2B, H3 und H4 (Abbildung 4). Da in den Nucleosomen jedes Histon in zwei Kopien pro oktaemerem Kern vorkommt, stehen potenziell $14 \times 2 = 28$ Lys-Seitenketten für die Acetylierung zur Verfügung. Bei Hefe-Histonen wurden bis zu 13 Acetylierungsstellen ausgemacht,^[14] entsprechend einer fast 50-prozentigen posttranslationalen Modifizierung. Die Kombinationsmög-

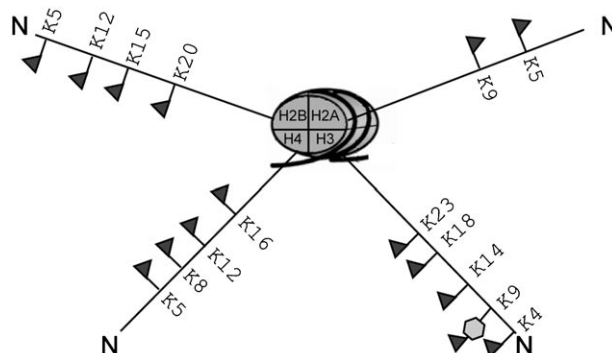


Abbildung 4. Insgesamt fünfzehn Lys-Reste in den N-terminalen Ketten von H2A, H2B, H3 und H4 fungieren als mögliche enzymatische Acetylierungsstellen (durch Fähnchen markiert).

lichkeiten für unterschiedlich acetylierte Histon-Enden in Nucleosomen nehmen astronomische Ausmaße an.

Durch die Lys-Acetylierung werden potenziell kationische Seitenketten in neutrale Seitenketten umgewandelt, wodurch sich die Ladungsverteilung ändert. Auch die *N*-Acetyl-Lys-Gruppe wird von bestimmten Proteindomänen spezifisch erkannt; dies sind die Bromodomänen (Abbildung 5), die in Transkriptionsfaktoren und assoziierten Proteinen eingebettet sind. Der Acetylierungsstatus der Histon-Enden kann das Andocken der Transkriptionsfaktoren regulieren, welche die Initiierung der Gentranskription im von Nucleosomen bedeckten Chromatinbereich steuern.^[14] In Abschnitt 5 werden wir näher darauf eingehen, wie am C-Terminus des Transkriptionsfaktors p53 fünf Lysinreste entweder acetyliert oder ubiquitiniert werden. Die Acetylierung blockiert die Lysin-Seitenkette gegen Ubiquitinierung und dient somit dazu, die biologische Halbwertszeit des p53-Proteins zu verlängern.

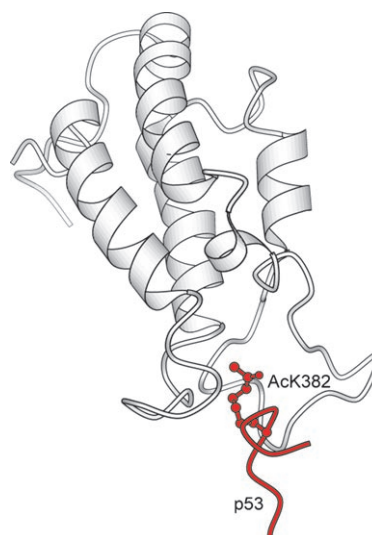
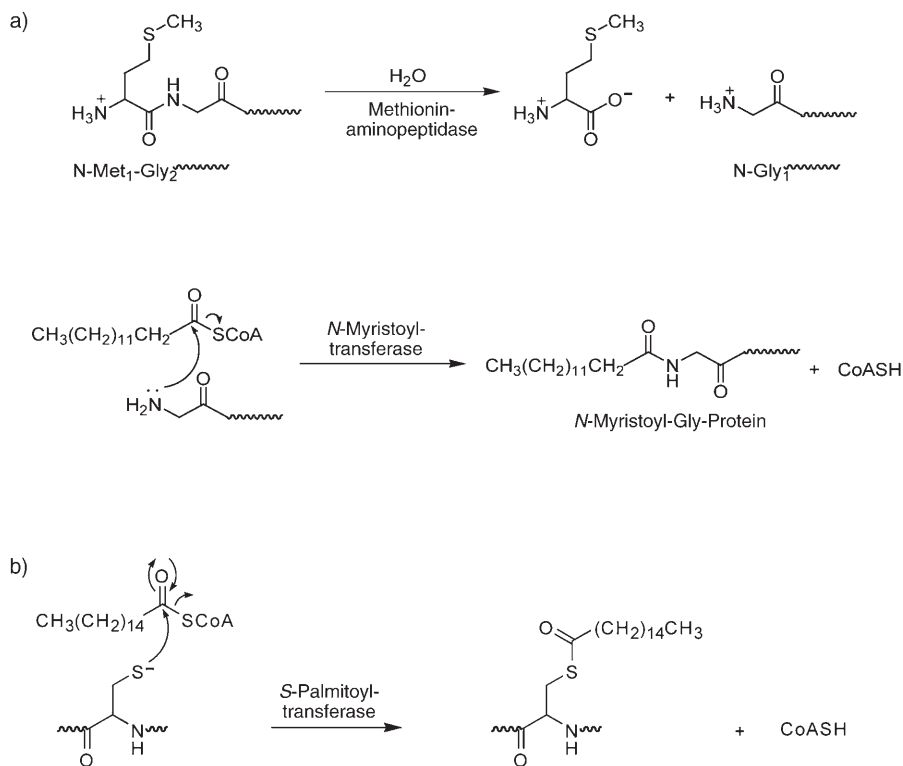


Abbildung 5. Der Acetylierungsstatus der N-terminalen Histonketten kann über die Bindung von Partnerproteinen entscheiden und so die Transkriptionsaktivität eines Nucleosoms steuern. Dargestellt ist die Wechselwirkung einer Acetyl- ϵ -NH-Lys-Seitenkette an einem Peptidfragment von Histon H3 mit der Bromodomäne des Koaktivatorproteins.^[32]

2.2.2. *N*-Myristoylierung und *S*-Palmitoylierung

Die Myristoylierung von eukaryotischen Proteinen am N-terminalen Glycinrest wird durch das PTM-Enzym *N*-Myristoyltransferase katalysiert, das als Donorsubstrat das C_{14} -Myristoyl-CoA nutzt.^[15] Da die Proteinsynthese mit einem N-terminalen Methionin startet, ist die Hydrolyse der Met₁-Gly₂-Bindung durch eine Methioninaminopeptidase eine Vorbedingung für die Myristoylierung (Schema 3). Die neu geschaffene freie Aminogruppe des jetzt N-terminalen Glycins fungiert als Nucleophil bei der Acylierung. Die eingeführte hydrophobe C_{14} -Fettsäurekette kann als lipophile Gruppe Proteine hin zu Membrangrenzschichten dirigieren.^[10] Die Myristoylkette kann außerdem in zwei Zuständen vorliegen: vergraben in einer Proteinfalte oder in einer für die Membraninsertion verfügbaren Konformation.^[16] Beispiele von *N*-myristoylierten Proteinen sind das HIV-Gag-Protein und die Proteinkinase A.^[17]

Bei der Palmitoylierung von Proteinen nutzt die PTM-Acyltransferase das mit der C_{16} -Fettsäure konjugierte CoA als Donor, allerdings wird die Acylgruppe hier üblicherweise auf die Sulfhydryl-Seitenkette von Cys-Resten und nicht auf den N-Terminus von Proteinen übertragen (Schema 3).^[11] Eines der bekanntesten Beispiele ist die *S*-Palmitoylierung von Cystein am C-Terminus von Proteinen wie der Ras-GTPase. Die Lipidierung der nucleophilen Thiolat-Seitenketten ist die Voraussetzung dafür, dass Ras aus dem Cytoplasma zur Membrangrenzschicht gelangen kann, wo es seine Signalpartnerproteine trifft.^[10] Wie in Abschnitt 5 erläutert wird, ist die *S*-Palmitoylierung von Ras-Isoformen Teil einer Kaskade von reversiblen posttranslationalen Modifikationen, die



Schema 3. a) Durch die Spaltung der Met₁-Gly₂-Peptidbindung durch Methioninaminopeptidase wird die NH_2 -Gruppe von Gly für die *N*-Myristoylierung durch die *N*-Myristoyltransferase mit Myristoyl-CoA als Donor zugänglich gemacht. b) Palmitoyl-S-Proteintransferasen katalysieren den nucleophilen Angriff der Thiofunktion von Cys-Seitenketten auf Palmitoyl-CoA.

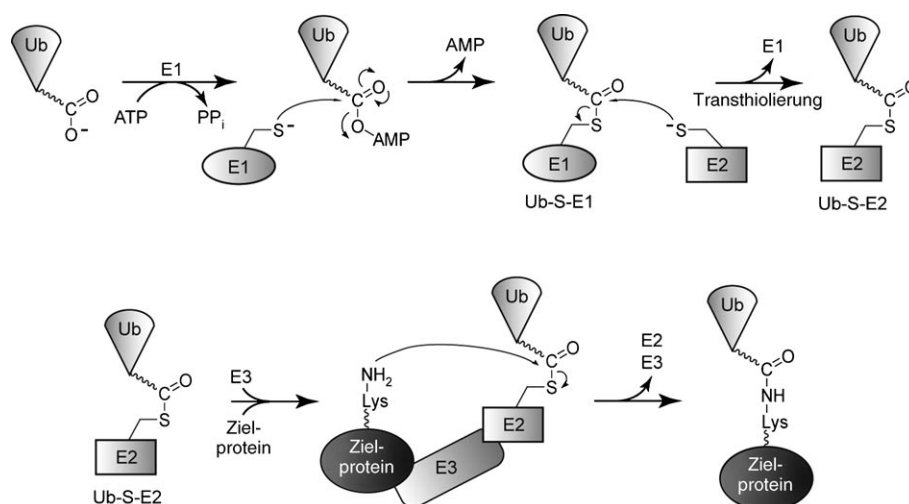
bei der Reifung und der Membranverankerung von Ras eine Rolle spielen.^[18] Als Proteinsubstrate für die *S*-Palmitoylierung fungieren Transmembranrezeptoren wie die CD8 α -Un-

tereinheit und der Chemokinrezeptor CCR oder cytoplasmatische Proteine wie die Tyrosinkinase Lck.^[11]

2.2.3. Mono- und Polyubiquitinierung von Proteinen

Eine konsequente Fortsetzung des posttranslationalen Transfers von Acylketten niedrigen Molekulargewichts (C_2 , C_{14} , C_{16}) auf Proteine ist die Acylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysin mit dem 8-kDa-Protein Ubiquitin. Analog wie der Acyl-CoA-Donor der elektrophilen Acetyl-, Myristoyl- und Palmitoylacetylgruppen muss die C-terminale Carboxygruppe des 76 Aminosäure langen Ubiquitins vor dem Acyltransfer aktiviert werden. Das Prinzip der Aktivierung ist mit dem Acylthioestersystem vergleichbar, allerdings verwenden die eukaryotischen Zellen anstelle von Ubiquityl-CoA Ubiquityl-S-Proteine als Donoren.^[19,20] An der enzymatischen Aktivierung sind zunächst ein Enzym 1 beteiligt (Schema 4), das Ubiquityl-AMP erzeugt, sowie ungefähr ein Dutzend thiolhaltige Enzyme 2 (eine Untergruppe der Familie der Ubiquityl-S-Enzyme 2), die das nucleophile aktive Zentrum zum Einfang der Ubiquityleinheit bereitstellen. Im Allgemeinen katalysiert ein dritter Satz von Enzymen, die Ubiquitin-Protein-Ligasen E3, den Transfer der aktivierten Ubiquitinmarker auf Lys-Seitenketten der Zielproteine. Manche E3-Unterklassen sind Mehrkomponentenkatalysatoren mit bis zu vier Untereinheiten und erreichen so die erforderliche Selektivität für ein bestimmtes Zielprotein.^[21] In höheren Eukaryoten gibt es mehrere hundert Isoformen dieser E3-Ubiquitin-Ligasen, die eine sehr feine Unterscheidung zwischen vielen für die Ubiquitinierung vorgesehenen Zielproteinen ermöglichen.^[22]

Anders als die kleinen Acylgruppen, die in Abschnitt 2.2.2 besprochen wurden, bietet die Ubiquitinacyl-Einheit eine informationsreiche Struktur (Abbildung 6), die durch bestimmte Partnerproteine, welche die nachgelagerten biologi-



Schema 4. Aktivierung des C-Terminus von Ubiquitin (am Gly₇₆) durch Enzym 1 (Bildung von Ub-AMP) und anschließende Übertragung eines Cys-Thiolats vom aktiven Zentrum eines Enzyms 2 (Bildung von Ub-S-E2). Die Enzyme E3 fungieren als Chaperone zur Rekrutierung von spezifischen Proteinen, die an einer Lys-Seitenkette ubiquitiniert werden.

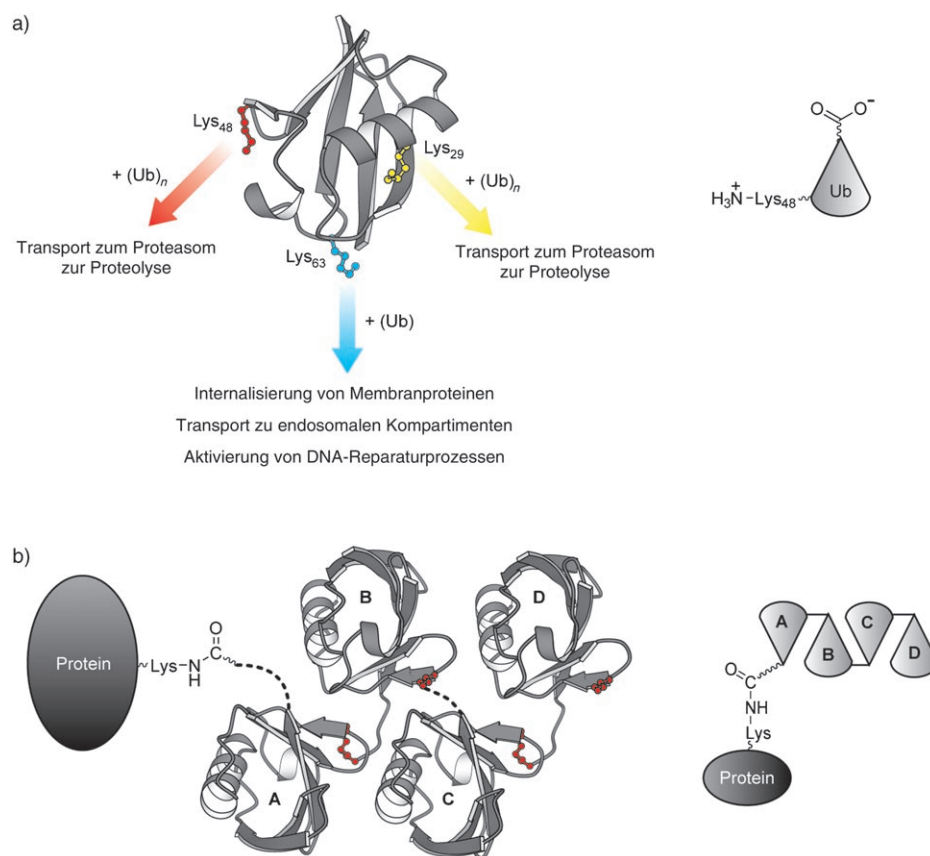


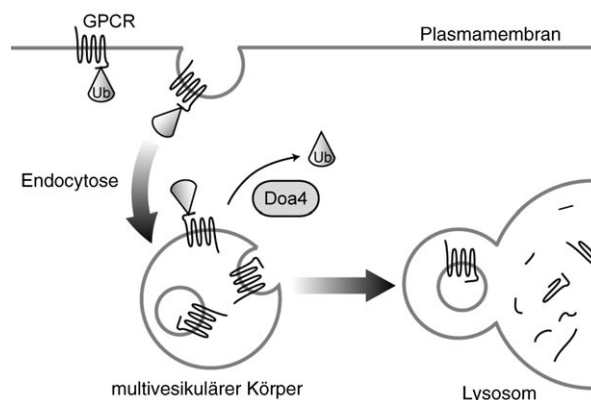
Abbildung 6. a) Dreidimensionale Darstellung des 76 Aminosäure langen Ubiquitins: Die Lys₂₉, Lys₄₈ und Lys₆₃-Seitenketten auf den Seitenflächen des Ubiquitins bieten unterschiedliche Oberflächen für die Tandemkonjugation einer wachsenden Polyubiquitinkette. b) Struktur einer Tetraubiquitineinheit entsprechend der Mindestkettenlänge, wie sie für den Transport von polyubiquitinierten Proteinen zum Proteasom erforderlich ist.

schen Reaktionen steuern, „gelesen“ werden kann. Nach der Zahl der am Protein angefügten Ubiquitinmoleküle unterscheidet man zwei Arten der Ubiquitinierung: Monoubiquitinierung und Polyubiquitinierung. Bei der Polyubiquitinie-

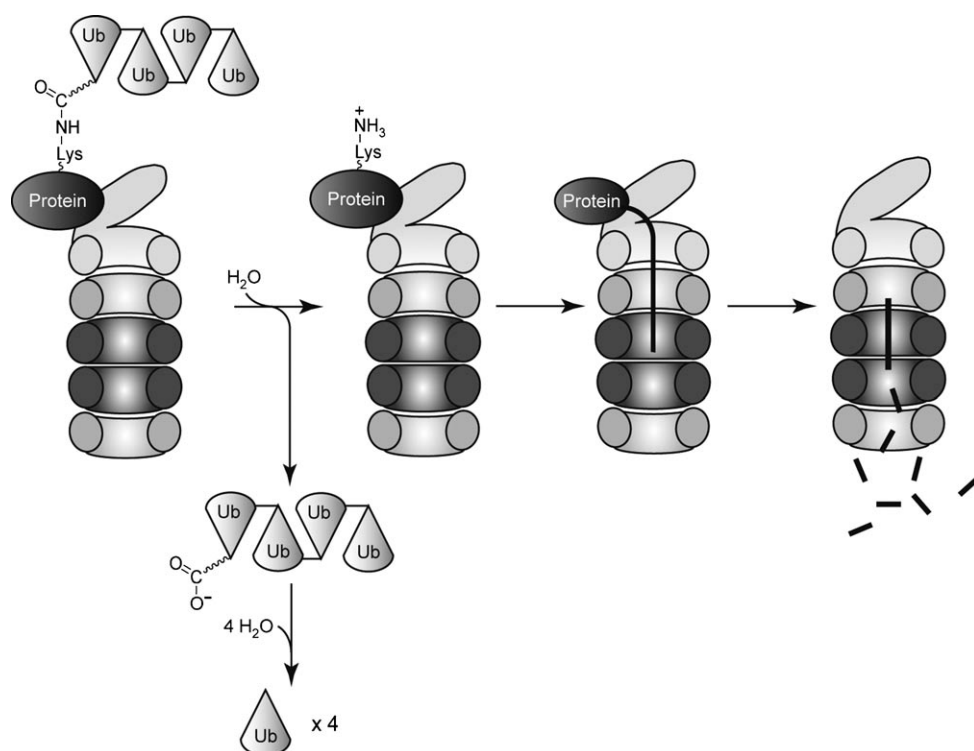
ring werden Ketten aus Ubiquitinmolekülen enzymatisch erzeugt. Wie in Abbildung 6a dargestellt ist, weist das Ubiquitin unterschiedliche Oberflächen mit exponierten Lysin-Seitenketten auf. Jeder Lysin-Rest eines Ubiquitin-Monomers kann tandemartig an das C-terminale Gly₇₆ des vorangegangenen Monomers angefügt werden. In den meisten Fällen scheinen die Polyubiquitinstränge über Lys₄₈ aufgebaut zu werden, obwohl auch über Lys₆₃ verknüpfte Ketten gut bekannt sind.^[23] In Abbildung 6b ist die Struktur einer Ub₄-Kette dargestellt. Ungeklärt ist, wie die E3-Ligasen in der Zelle Ub_n-Ketten von bis zu Ub₂₀ an Proteine heften können.

Die durch Mono- und Polyubiquitinierung markierten Proteine wechseln innerhalb der Zelle ihren Aufenthaltsort und werden in den allermeisten Fällen einem proteolytischen Abbau zugeführt, wobei die Mechanismen sehr verschieden sein können. Die Monoubiquitinierung an einer Lys-ε-NH₂-Funktion durch eine E3-Ubiquitin-Ligase kann die Verlagerung eines Transmembranrezeptorproteins von der Plasmamembran zum Sortierapparat des Golgi-Netzwerks einleiten.^[24–26] Der informationsreiche, kovalent gebundene Ub-Marker wird durch eine Reihe von Partnerproteinen erkannt, die mit einer oder mehreren Varianten von Ub-Bindungsdomänen ausgestattet sind. Die Partnerproteine können als Chaperone fungieren und mehrere Funktionen ausführen: Internalisierung der ubiquitinierten Rezeptoren, Import in frühe Endosomen, Transport zu Lysosomen zum hydrolytischen Abbau durch lysosomale Proteasen (Schema 5).^[23] Diese Reaktionswege sind Teil des homöostatischen Mechanismus zur Regulierung der Dichte und Halbwertszeit von Rezeptoren in der Plasmamembran.

Durch Polyubiquitinierung modifizierte Proteine werden direkt den Proteasen des Proteasoms zugeführt. Die Tandemverknüpfung von vier oder mehr Ubiquitinmolekülen mit einer Lys-Seitenkette erzeugt ein strukturelles Signal, auf das Protein-chaperone mit Ubiquitin-Bindungsdomänen reagieren. Das Chaperon eskortiert das markierte Protein zu den Proteasomen,^[27] wo die Chaperone abdissoziieren und die Polyubiquitinkette hydrolytisch wieder entfernt wird (möglicherweise während der ATP-getriebenen Entfaltung des Zielproteins) (Schema 6). Anschließend entfaltet das Protein und wird in die Proteasomenkammer geschoben, wo die aktiven Zentren der Proteaseuntereinheiten es zu kleinen Peptiden abbauen. Die E1,E2,E3-Ubiquitin-Ligase-Maschinerie steuert den charakteristischen zeitlichen Ablauf der Proteinzerstörung (etwa von Cyclin-Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen) im Zellzyklus.^[28,29] Die Aktivität der E3-Ligasen kann durch posttranslationale Zu-



Schema 5. Erkennung der Ub-Struktur eines monoubiquitinierten Proteins durch Partnerproteine/Chaperone mit einer oder mehreren Ubiquitin-Erkennungsdomänen und Transport des Protein zum Sekretionssystem.



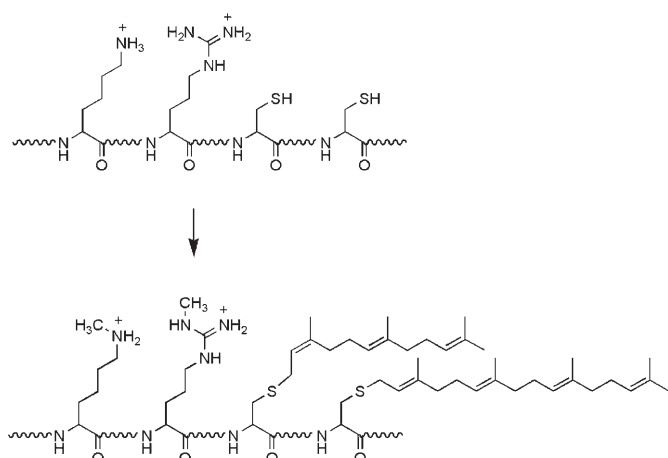
Schema 6. Erkennung von Ub_n-markierten Proteinen durch Chaperone und Transport zum Proteasom. Dort wird die Isopeptidbindung zum Zielprotein hydrolysiert und der Ub_n-Marker freigesetzt; das Zielprotein wird entfaltet und in die Proteasomenkammer geschoben.

stände der Katalysatoren oder der Zielproteine, z.B. durch spezifische Phosphorylierung von Ser- und Thr-Resten, gesteuert werden.

2.3. Proteinalkylierung

Alkylsubstituenten werden durch posttranslational modifizierende Enzyme regiospezifisch an Proteine geknüpft. Am häufigsten übertragen werden die Methylgruppe (C₁), z.B. bei der Histonmethylierung von Lys- und Arg-Seiten-

ketten,^[30] sowie die Farnesyl- und Geranylgeranylgruppen (C_{15} bzw. C_{20}) (Schema 7).^[31] Sowohl die kleine C_1 -Gruppe als auch die großen hydrophoben C_{15} - und C_{20} -Gruppen führen zur Erhöhung der Hydrophobie, allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß.



Schema 7. Übertragung von Alkylgruppen auf Proteinseitenketten: Am häufigsten wird die Methylgruppe aus S-Adenosylmethionin (SAM) auf Lys- und Arg-Seitenketten übertragen (auch O-, S- und C-Methylierungen sind bekannt); Proteinprenyltransferasen übertragen Farnesyl- (C_{15}) und Geranylgeranylgruppen (C_{20}) von entsprechenden Prenyldiphosphaten auf Cys-Seitenketten.

2.3.1. N-Methylierung

Während C-, O- und S-Methylierungen von Aminosäureseitenketten in Proteinen bereits gut untersucht sind,^[3] wird die N-Methylierung von Lys- und Arg-Seitenketten derzeit noch intensiv erforscht. Insbesondere interessiert man sich für die N-Methylierung an Histon-Enden, die zugleich acetyliert werden. Tatsächlich ergänzt die posttranslationale kovalente N-Methylierung der Histon-Enden die Acetylierung bei der Histoncodierung (Abbildung 7). Zum Beispiel werden sieben der ersten 36 Aminosäuren von H3 (Arg_{2,17,26} und Lys_{4,9,27,36}) durch eine Familie von Histon-Methyltransferasen methyliert,^[32] von denen einige aminosäurespezifisch sind. Die nächst höhere Informations- und Komplexitätsebene wird dadurch erreicht, dass Lys- ϵ -NH₂-Gruppen stufenweise einfach, zweifach oder dreifach methyliert werden können (Schema 8). Auch in diesem Fall führen unterschiedliche Methyltransferasen zu spezi-

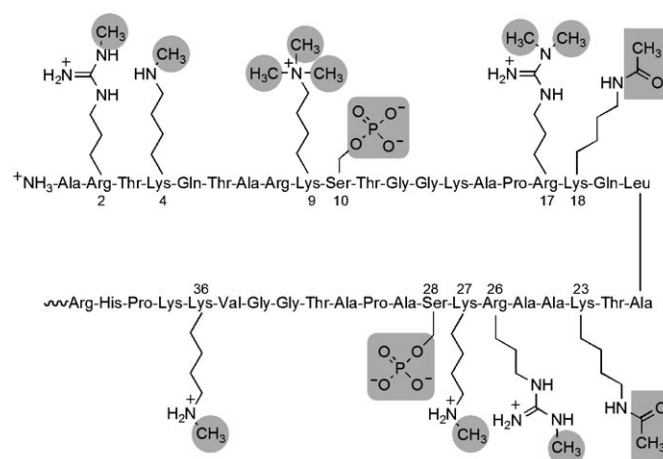
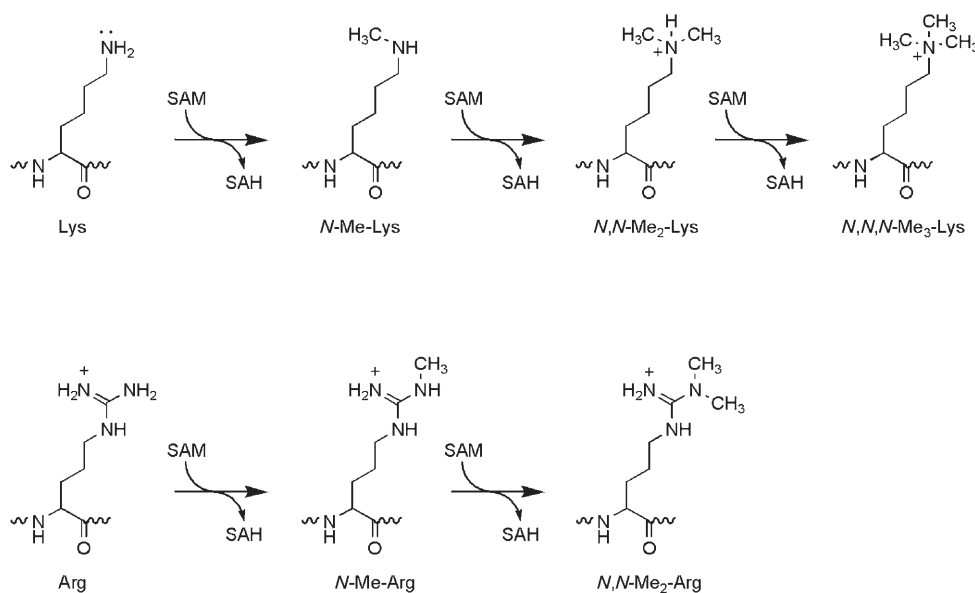


Abbildung 7. N-Methylierungen am Histon H3 können an Arg_{2,17,26} und Lys_{4,9,27,36} auftreten. Lys₁₈ und Lys₂₇ können acetyliert, Ser₁₀ und Ser₂₈ phosphoryliert werden.

fischen Verteilungen. Analog dazu beobachtet man sowohl Monomethyl- als auch Dimethyl-Arg-Reste. Die Größen- und Hydrophobieunterschiede der Monomethyl- und Trimethylsubstituenten an der Lys-Seitenkette ermöglichen eine selektive Erkennung von an der Transkriptionssteuerung beteiligten Proteinen. Beispielsweise erkennt Trimethyl-Lys₉ in H3 sein Partnerprotein HP1 durch Bindung an dessen Chromodomäne (Abbildung 8); dieser Prozess ist Teil der Komplexbildung von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatorproteinen.^[14,32]

N-Acetylierungen und N-Methylierungen von Seitenketten in Histon-Enden können auf die Transkriptionsrepression und -aktivierung von Genen gegenteilige Effekte ausüben. Das Histon H3 ist nur eines von vier, jeweils als Dimer vorkommenden Histonen im Nucleosomenkern. Aus den mög-



Schema 8. Die N-terminalen Histonketten werden nacheinander an den Lys-Seitenketten mono-, di- und trimethyliert und an den Arg-Seitenketten mono- und dimethyliert. SAH = S-Adenosylhomocystein.

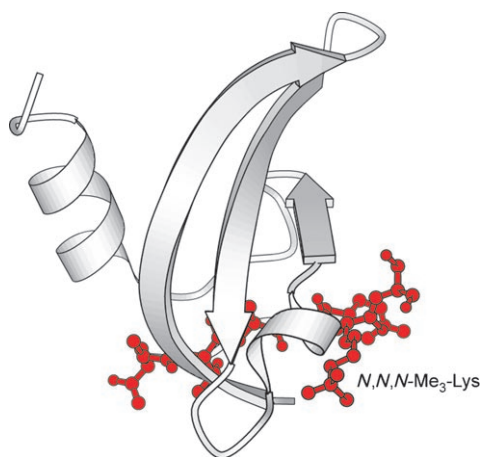


Abbildung 8. *N,N,N*-Trimethyl-Lys₉ von H3 bindet als Ligand an die Chromodomäne des HP1-Proteins.

lichen vier Acetylierungen und sieben Methylierungen ergeben sich allein für H3 bereits $11 \times 2 = 22$ Titrationsstellen für die transkriptionell wirkenden Coaktivator- und Corepressor-Komplexe.

2.3.2. *S*-Prenylierung

Die C₁₅-Farnesyl- und C₂₀-Geranylgeranyl-Lipidgruppen werden aus C₅-Isoprenyldiphosphaten als Primärmetaboliten durch iterative Alkylverlängerung durch C-C-verknüpfende Enzyme aufgebaut.^[33] Die Farnesyl- und Geranylgeranyldiphosphate können eine weitere Isoprenverlängerung eingehen (z.B. bei der C₁₅-Dimerisierung zu Squalen bei der Cholesterin-Biosynthese) oder in der posttranslationalen Proteinprenylierung als Alkyldonoren fungieren (Schema 9).^[34] Bei einigen der Protein-Farnesyltransferasen und Protein-Geranylgeranyltransferasen handelt es sich um α,β -Heterodimere mit gemeinsamer α -Untereinheit. Bestimmte Vertreter der Ras-GTPase-Überfamilie können an der Thiolfunktion der Cys-Seitenketten prenyliert werden, einige mit der C₁₅-, andere mit der C₂₀-Prenylkette. Proteine der Ras-Familie mit einem CaaX-Motiv (X ist eine kleine Aminosäure wie Ala oder Ser) am C-Terminus werden typischerweise farnesyliert. Im Falle von X = Leu (wie bei der Rac- und der RhoA-GTPase) wird hingegen der Cys-Rest (C) geranylgeranyliert (Schema 10a). Die Rab-Proteine, eine GTPase-Unterfamilie mit mehr als 60 Mitgliedern, weisen zwei Cysteine am oder nahe dem C-Terminus auf, die beispielsweise als CCXX vorliegen können.

Beide Cysteine werden posttranslational geranylgeranyliert (Schema 10b), sodass zwei C₂₀-Lipidanker eingeführt werden.^[35] Die Rab-Proteine zirkulieren zwischen den Membranvesikeln des Sekretionssystems, wobei sie von Eskortproteinen begleitet werden.^[36,37]

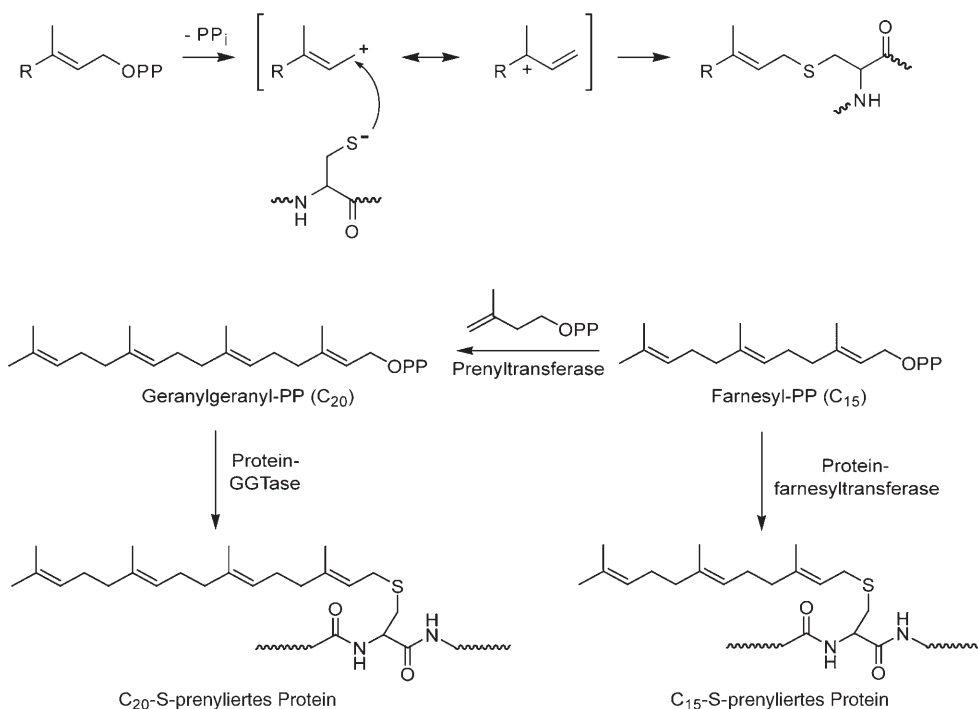
Manche Proteine werden sowohl N- als auch S-acyliert und in diversen Kombination auch S-prenyliert. Aufgabe der Lipidanker ist es immer, die modifizierten Proteine hin zur Membran zu dirigieren und so ihre subzellulären Aufenthaltsorte zu kontrollieren.

2.4. Proteinglycosylierung

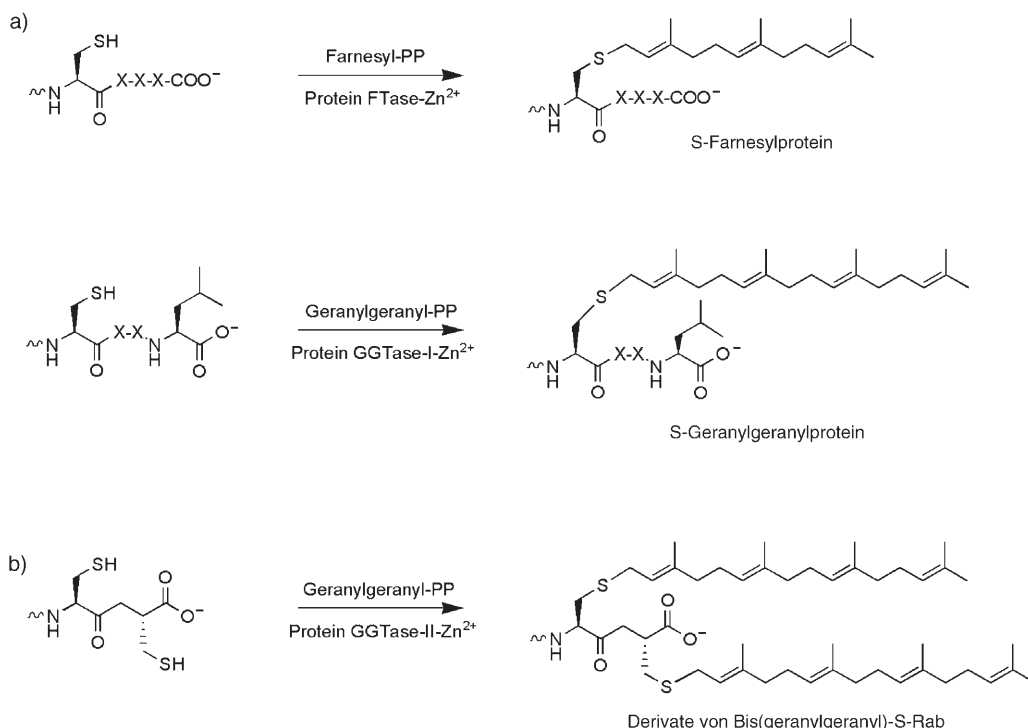
Die kovalente Glycosylierung von Proteinen ist bei Prokaryoten relativ selten, kommt bei Eukaryoten aber häufig vor. Bekannt sind C-, O- und N-Glycosylierungen, wobei die C-Glycosylierung, speziell die Mannosylierung am C2 des Indolrings von Tryptophan,^[38] recht selten auftritt.

2.4.1. *N*-Glycosylierung

Unter den eukaryotischen Proteinen sind die N-Glycoproteine weiter verbreitet als die O-Glycoproteine und haben normalerweise auch eine komplexere Struktur.^[39] N-Glycoproteine enthalten eine Glycan-Verzweigungseinheit, die durch eine Reihe von membranassoziierten Glycosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum (ER) auf einer Lipiddiphosphatplattform vorgefertigt wird.^[40] Diese vorgefertigte N-Glycaneinheit, das Tetradecasaccharyl-PP-dolichol, ist ein Substrat der mehrere Untereinheiten umfassenden Oligosaccharyltransferase (Schema 11).^[41] Die Seitenkettenatome, die bei der Biogenese der N-Glycoproteine



Schema 9. Mechanismus der *S*-Isoprenylierung an der Cys-Seitenkette durch Proteinprenyltransferasen.

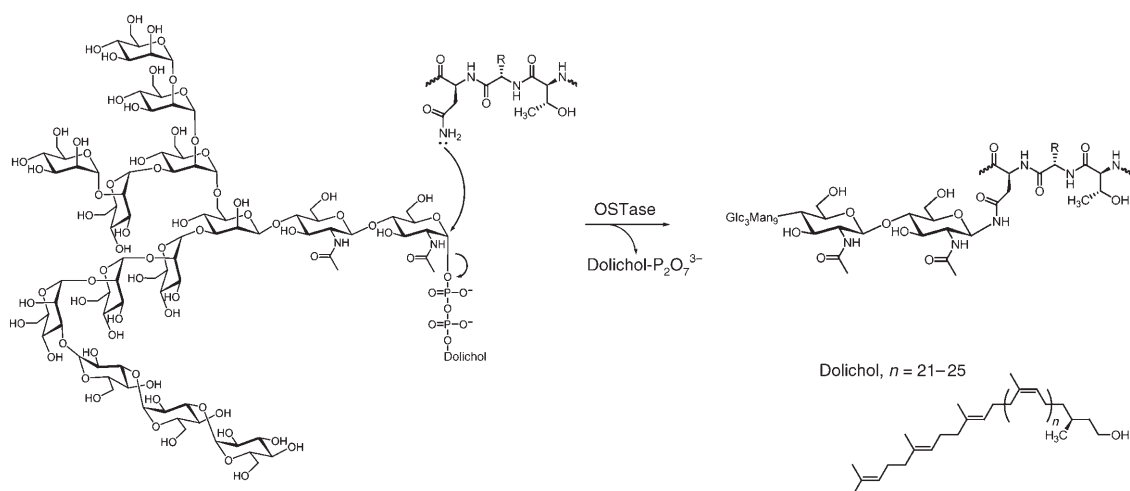


Schema 10. Prenylierung am C-Terminus der Überfamilie der Ras-Proteine: a) Farnesylierung des C-Terminus von Ras an CaaX (X = Ala, Ser). Geranylgeranylierung von Rac an CaaX (X = Leu). b) Doppelte Geranylgeranylierung des CC-Carboxyterminus von Rab-Proteinen.

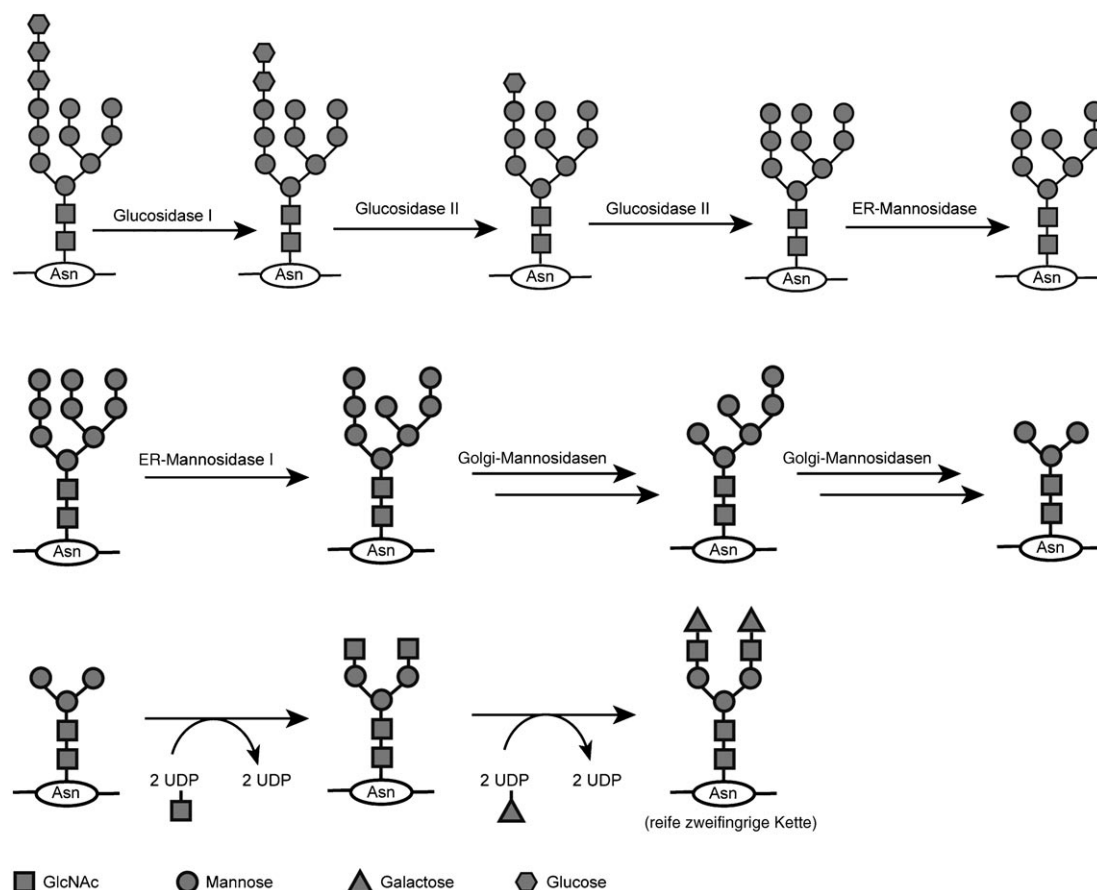
modifiziert werden, sind die Carboxamid-Stickstoffe von Asn, meistens in der Sequenz Ser/Thr-X-Asn. Durch die Modifikation erhöht sich vermutlich die schwache Nucleophilie der CONH₂-Gruppe in Asn durch Bildung von Wasserstoffbrücken zu Ser/Thr-OH; allerdings ist der einleitende Schritt der Glycanübertragung noch kaum verstanden.

An dem im ersten Schritt angefügten Tetradasaccharidstrang Glc₃Man₉(GlcNAc)₂ laufen mehrere bemerkenswerte enzymatisch-hydrolytische Schneide- und Wiederaufbauprozesse ab, die die Zusammensetzung der N-Glycanketten massiv verändern (Schema 12). Die ersten hydrolyti-

schen Enzyme sind zwei Glucosidasen im ER-Lumen, die mit dem Dodecasaccharid GlcMan₉(GlcNAc)₂ verknüpfte Proteine erzeugen. Diese sind Liganden der Chaperone Calnexin und Calreticulin, die die Dodecasaccharid-Kette erkennen und die Rückfaltung der naszierenden, gerade aus der ER-Membran in das Lumen gelangten Glycoproteine unterstützen. Nach Hydrolyse des verbliebenen Glc-Restes durch die ER-Glucosidase verlieren die Chaperone ihre Affinität zu den Undecasaccharid-N-Proteinen. Eine Glycoprotein-Glucosyltransferase kann den Glc-Rest wieder zurück auf das Undecasaccharid übertragen,^[42] sodass es zu einer erneuten



Schema 11. Das verzweigte Tetradasaccharyl-PP ist Donorsubstrat bei der N-Glycosylierung einer Asn-Seitenkette durch die Oligosaccharyltransferase. Dieser Glycosylierungsschritt initiiert sämtliche Glycoproteinmodifikationen.

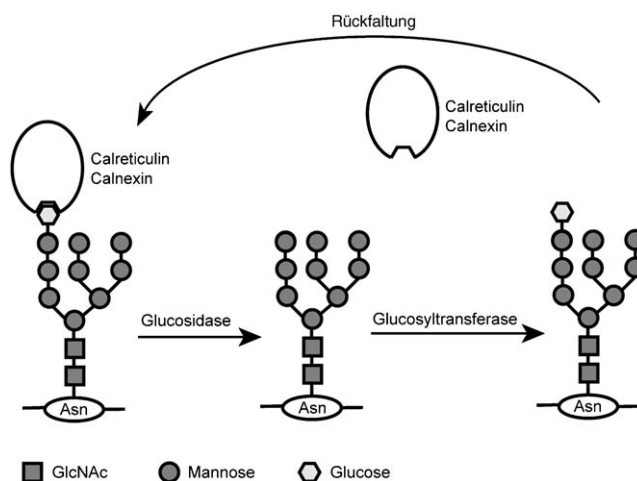


Schema 12. Abfolge von Schneideprozessen, die die ursprüngliche N-verknüpfte $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ -Glykankette zu $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ (im ER) und anschließend zum Pentasaccharidkern $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ (im Golgi-Komplex) abbauen. Dieser wird dann wieder zu den reifen N-Glykanketten aufgebaut, die in den Glycoproteinen nach Passieren des Sekretionssystems gefunden werden.

chaperonunterstützten Rückfaltung kommen kann. Dieser wiederholte Prozess gewährleistet eine Qualitätskontrolle für die Glycoproteinsekretion. Falls das Glycoprotein nach mehreren Runden der Deglukosylierung/Reglukosylierung nicht rückgefaltet werden kann, wird es zurück ins Cytoplasma exportiert. Dort wird das entfaltete Protein polyubiquitiniert und im Rahmen des ER-beschleunigten Qualitätskontrollsystems proteasomvermittelt durch eine E3-Ligase abgebaut (Schema 13).^[42]

$\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ -N-Glycoproteine mit korrekter Faltung werden in den Golgi-Apparat eingeschleust, wo Mannosidasen hydrolytisch sechs Mannosereste entfernen. Der resultierende Pentasaccharid-Kern $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ kommt bei allen reifen N-Glycoproteinen vor. An dieser Stelle wird der verzweigte Oligosaccharid-Kern wieder zu zwei- und dreifingrigen Oligosacchariden aufgebaut, die charakteristisch für die reifen N-Glycoproteine auf der Zelloberfläche sind.^[43] Aufgrund der Vielzahl an Golgi-Glycosyltransferasen entsteht eine enorme Vielfalt an reifen N-Glykanketten.

In einem Protein können auch mehrere Asn-Reste glycosyliert werden, wobei der Aufbau der Glycan-Ketten von der stochastischen Verteilung von mindestens zehn Schneide- und Wiederaufbauereignissen während der Passage durch das ER- und die Golgi-Kompartimente abhängt.^[41,43] Schätzungsweise wird jedes Protein, das in die eukaryotischen Se-



Schema 13. Zyklischer Ab- und Aufbau der Oligosaccharidkette von $\text{GlcMan}_9(\text{GlcNAc})_2$ -Asn zu $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ -Asn und zurück durch Glucosidase bzw. Glycoproteinglucosyltransferase. Die Glc enthaltende Oligosaccharidkette wird durch die Chaperonproteine Calreticulin und Calnexin erkannt. Diese unterstützen die naszierenden N-Glycoproteine bei der Rückfaltung, nachdem sie glycosyliert und cotranslational in das ER-Lumen freigesetzt worden sind. Der Glucosylierungszyklus ist Teil des Qualitätskontrollsystems für Proteine, die in das ER sekretiert werden.

kreationswege eintritt, N-glycosyliert, sodass letztlich zehntausende Glycoproteinvarianten in Eukaryotenzellen vorliegen können. Zum Beispiel wurde von 52 Glycoformen des Prionoproteins berichtet.^[44, 45]

2.4.2. O-Glycosylierung

Im Allgemeinen sind die O-Glycosylketten bei eukaryotischen Proteinen kürzer und weniger komplex als die der N-Glycoproteine. Viele Proteine enthalten das Monosaccharid GlcNAc,^[46] das durch eine spezifische O-GlcNAc-Transferase angehängt und durch eine zugehörige Hydrolase wieder entfernt wird. Andere Proteine, etwa das Signalprotein Notch, enthalten Tri- und Tetrasaccharide in ihren EGF-Domänen (Abbildung 9).^[47, 48] Die O-Glycosylierung ist eine

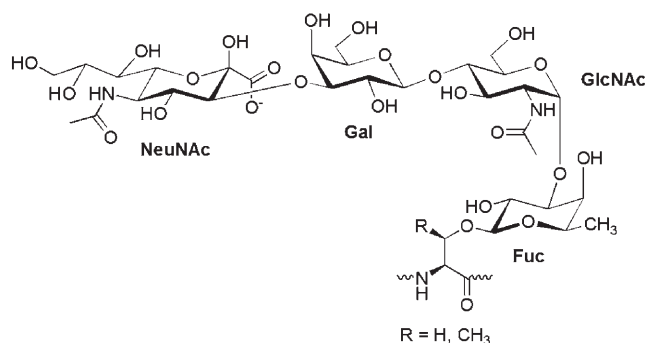
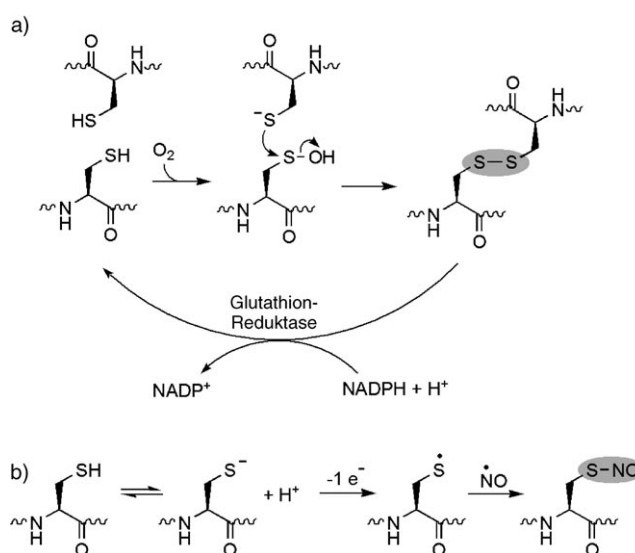


Abbildung 9. Das Tetrasaccharid Sialyl- α -2,3-Gal-x-1,4-GlcNAc- β -1,3-Fucosyl-Ser ist mit dem Notch-Protein während dessen Transport durch die Sekretionskompartimente in Richtung Zelloberfläche verknüpft.

entscheidende Stufe im Reifungsprozesses des Notch-Proteins während dessen Passage durch den Sekretionsweg an die Zelloberfläche. In vielen funktionalen Zusammenhängen spielen die kurzen O-verbrückten Zuckerketten eine wichtige Rolle, z. B. bei der Modulierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors^[49] oder als entscheidende Erkennungselemente für die Notch-Signalgebung an der Zelloberfläche.^[50, 51]

2.5. Bildung von S-S-Bindungen

Man unterscheidet zwei Hauptbindungsarten, durch die Proteine oder Teile von Proteinen kovalent verknüpft werden. Der bei weitem häufigste Typ sind Disulfidbrücken, die durch Oxidation der Thiol-Seitenkette von Cysteinresten gebildet werden.^[52, 53] Die eukaryotischen Zellkompartimente sowohl des Cytoplasmas als auch des Kerns stellen eine reduzierende Mikroumgebung bereit, was sich in einem 100:1-Verhältnis von reduziertem (GSH) und oxidiertem Protein (GSSH) widerspiegelt.^[54] Dieses hohe Verhältnis zugunsten der reduzierten Proteinformen wird durch hohe Konzentrationen von NAD(P)H und Enzymen wie der Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase aufrechterhalten;^[3] diese Enzyme nutzen das Reduktionspotential von NAD(P)H, um Disulfidbrücken in oxidierten Proteinen wieder zu reduzieren (Schema 14a). Während die Proteine den Sekretionsweg in



Schema 14. Oxidation der Thiolseitenketten von Cysteinresten: a) Oxidation von Dithiolgruppen zu Disulfiden (z. B. über Sulfensäurezwischenstufen) und reversible Reduktion zurück zu den Dithiolen durch die Glutathion-Reduktase; b) Oxidation von Cys-S⁻-Seitenketten zu S-Nitrosyl-Cys durch Stickstoffmonoxid (*NO).

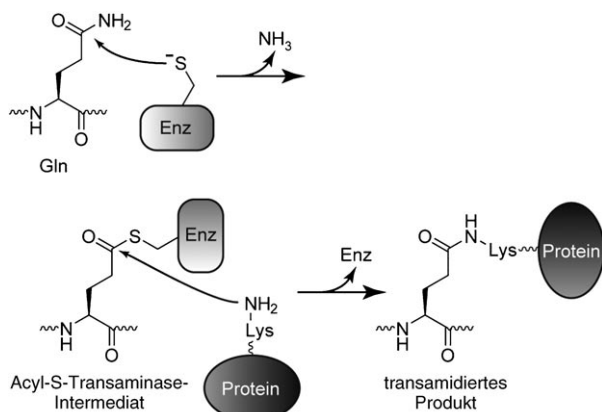
einer Eukaryotenzelle durchlaufen, sinken die Konzentrationsniveaus von Gesamt-Glutathion und reduziertem Nicotinamid, sodass die Kompartimente zunehmend stärker oxidierend werden und die Disulfidbrücken allmählich überwiegen. Wenn die Proteine die äußere Zelloberfläche erreichen oder in den Extrazellulärraum ausgestoßen werden, stabilisieren die Disulfidbindungen die Proteinarchitektur. Ein Beispiel dafür sind Bauchspeicheldrüsen-Proteasen, die in ihrer Zymogenform Disulfidbrücken bilden, wenn sie in die oxidierende Mikroumgebung der Zymogengranula gebracht werden.

Die Oxidation von Dithiolfunktionen zu Disulfiden in Proteinen verläuft typischerweise über die Oxidation einer elektronenreichen Thiol-Seitenkette eines Cysteinrestes. Eine Einelektronenoxidation brächte dabei Thiylradikale hervor, die zu den Disulfiden dimerisieren würden. Andererseits kann die Thiolfunktion durch eine Reihe von Sauerstoff-Oxidantien oxidiert werden (Peroxide, Hydroxylradikale), wodurch zunächst Sulfensäure(SOH)-Seitenketten entstehen. Ein benachbartes Cys-S⁻ kann anschließend das Sulfenat abfangen und so das Disulfid erzeugen. Die Dithiolformen werden regeneriert, indem reduziertes Glutathion oder Thioredoxin (TSH, ein Dithiolprotein von niedrigem Molekulargewicht) den Thiol-Disulfid-Austausch vermitteln. Die oxidierten TSST- oder GSSG-Formen werden durch Thioredoxin- bzw. Glutathion-Reduktase unter Aufwand einer NADPH-Oxidation wieder in ihre ursprüngliche Form zurückgeführt.

Die elektronenreichen Thiolate und Thiylradikale können durch andere Oxidantien und Radikale, z. B. *NO, abgefangen werden. S-Nitrosylierungen der Thiolat-Seitenketten von Cysteinresten mit radikalischen Stickstoffoxiddervativen sind für viele Proteine dokumentiert (Schema 14b). Cys-SNO-

Einheiten sind vermutlich in oxidativen Signalübertragungswegen weit verbreitet.^[55]

Die zweite posttranslational modifizierende Verknüpfungsstrategie verläuft nichtoxidativ und beruht auf der katalytischen Wirkung einer Transglutaminase, die zunächst Glutamin-Seitenketten von Substratproteinen zu Acyl-S-Transaminase-Zwischenstufen desaminiert. Diese Zwischenstufen werden dann von Lys- ϵ -NH₂ abgefangen, sodass formal eine Transamidierung resultiert (Schema 15).^[56,57]



Schema 15. Nichtoxidative Proteinverknüpfung durch Transglutaminasen. Die Amidgruppe der Gln-Seitenkette wird durch die ϵ -NH-Gruppe des Lysins ersetzt, sodass eine Glu- ϵ -Lys-Verknüpfung entsteht.

3. Kovalente Addition: die Nebenrollen

Die in Abschnitt 2 erläuterten fünf Arten von posttranslationaler Modifikation kommen sehr häufig vor und sind gut charakterisiert. Daneben gibt es aber noch viele weitere Klassen von enzymatischen Proteinmodifikationen, die zur Erweiterung der Stoffwechsel- und Signalisierungskapazitäten genutzt werden.

3.1. Hydroxylierung von Proteinen

Eine weitere Kategorie posttranslationaler Proteinoxidationen ist die enzymatische Hydroxylierung. Hydroxylierungen von Proteinen kommen bei Aminoacyl-Seitenketten an nichtnucleophilen Positionen vor, z. B. werden im Collagen Pro-Gly und Lys-Gly zu 3-OH-Pro, 4-OH-Pro und 5-OH-Lys hydroxyliert (Abbildung 10). Die Hydroxylierungen sind Schlüsselmodifikationen bei der Reifung der Collagenfaser.^[58] Nach Einführung der OH-Gruppe werden einige der 5-OH-Lys-Reste gemeinsam unter Bildung einer O-Disaccharid-Verknüpfung glycosyliert. Die Modifikation zu 4-Hydroxyprolin, die zehnfach häufiger auftritt als die Hydroxylierung am C3, ist an der Dreifachhelixstruktur des Collagens beteiligt, wobei die 4-OH-Gruppe jeweils aus der Helix herausragt.

Von einigen wenigen Proteinen ist bekannt, dass die CH₂-Gruppe von Asn zu CH-OH umgewandelt wird (zu 3-OH-Asn, Abbildung 10), z. B. beim Transkriptionsfaktor HIF

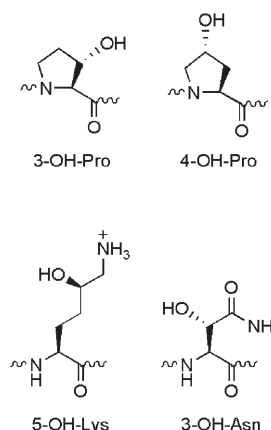
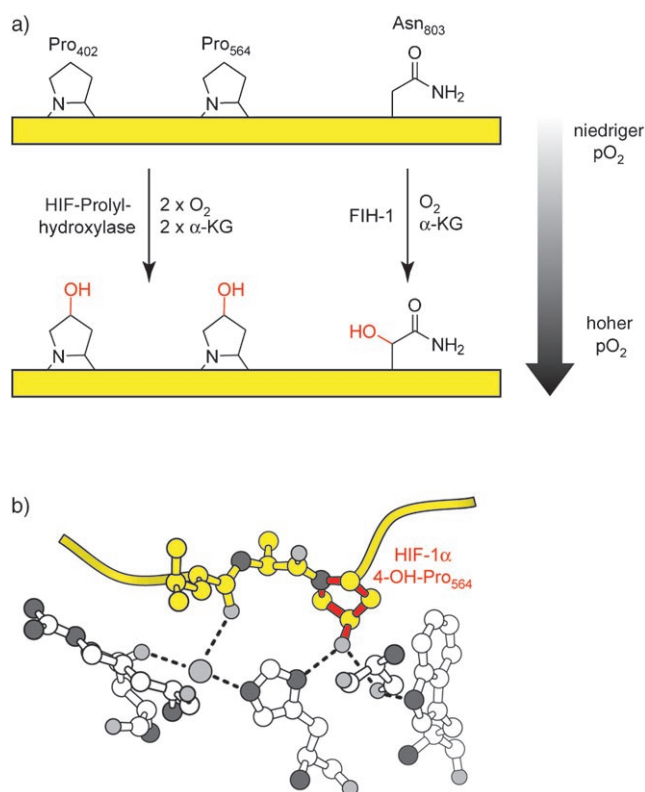


Abbildung 10. Durch Fe^{II}-abhängige Monooxygenasen posttranslational hydroxylierte Aminosäurereste: 3-OH-Pro, 4-OH-Pro, 5-OH-Lys, 3-OH-Asn.

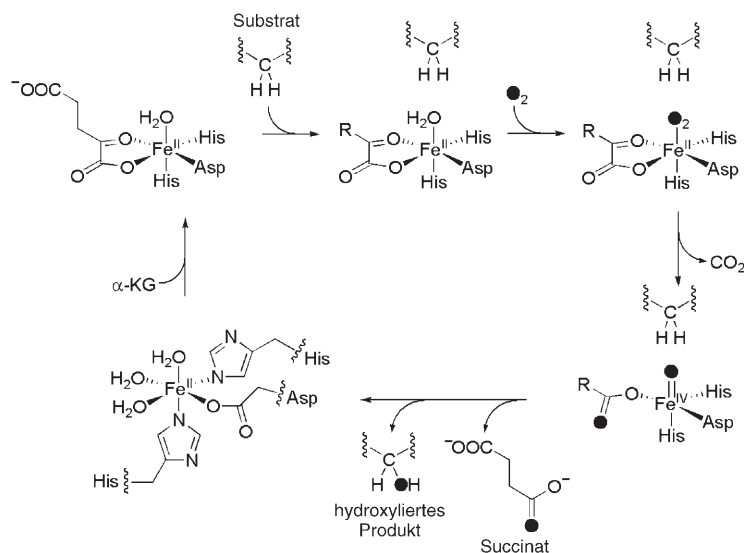
(Hypoxia Inducible Factor).^[59] Die HIF-Transkription wird bei niedrigen O₂-Partialdrücken ausgelöst und induziert wiederum die Transkription von Hunderten von Genen einschließlich des Gens für Erythropoietin, das die verstärkte Bildung von roten Blutkörperchen für erhöhten O₂-Transport zu hypoxischen Geweben bewirkt.

Bei der posttranslationalen Hydroxylierung der HIF-1 α -Untereinheit des HIF $\alpha\beta$ -Heterodimers modifiziert eine der Hydroxylasen spezifisch zwei Pro-Reste zu 4-OH-Pro,^[60] während die andere einen bestimmten Asn-Rest angreift und zu 3-OH-Asn hydroxyliert.^[61] Diese Hydroxylierungen fungieren als adaptive Prozesse in der Sauerstoffmesskaskade in Säugergewebe (Schema 16).^[62] Die Lebensdauer der HIF-1 α -Untereinheit in der Zelle wird durch das Ubiquitinsystem gesteuert. Die Polyubiquitinierung von HIF-1 α wird durch eine spezielle E3-Ligase, das Von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein, ausgeführt.^[63,64] Die Affinität des VHL-Proteins wird durch den Hydroxylierungsstatus von Pro₄₀₂ und Pro₅₆₄ in HIF-1 α gesteuert.^[60] Bei geringem O₂-Partialdruck in der Zelle ist die Pro-Hydroxylase nicht mit ihrem Substrat O₂ gesättigt und hat eine geringe Aktivität. Bei hohem pO₂ ist die Hydroxylase aktiv und überführt die beiden Pro-Reste in 4-OH-Pro-Reste. Die Hydroxy-Seitenkette von HO-Pro₅₆₄ im modifizierten HIF-1 α bewirkt eine ungefähr tausendfach stärkere Bindung zur VHL-Ligase als nichtmodifiziertes HIF-1 α .^[60] Durch diesen Mechanismus werden die hydroxylierten HIF-1 α -Formen selektiv polyubiquitiniert, sodass sie bei hohem pO₂ proteasomvermittelt abgebaut werden, bei niedrigem Partialdruck aber persistent bleiben. Diese höhere Persistenz führt zu einer längeren Lebensdauer des HIF $\alpha\beta$ -Heterodimers und längerer Aktivierung der für Hypoxien charakteristischen Transkription.

Die hier beschriebenen Proteinhydroxylasen gehören zur Familie der Nicht-Häm-Fe^{II}-Monooxygenasen, die zwei His- und eine Asp-Seitenkette aufweisen, mit denen sie drei der sechs Koordinationsstellen für das Fe^{II} bereitstellen (Schema 17).^[65] Zwei weitere Koordinationsstellen werden durch das Cosubstrat α -Ketoglutarat (α -KG), und die sechste durch O₂ belegt. Sind sowohl O₂ als auch α -KG gebunden,



Schema 16. a) Hydroxylierung von Pro- und Asn-Resten in der HIF-1α-Untereinheit; b) Wechselwirkung der HO-Pro₅₆₄-Seitenkette im durch die E3-Ligase polyubiquitinierten HIF.



Schema 17. Mechanismus der Proteinhydroxylierung durch die Nichthäm-Fe^{II}-Monooxygenasen. Im aktiven Zentrum wird Fe^{II} durch drei Reste des Proteins koordiniert (2 His, 1 Asp). Die anschließende Koordination durch α-Ketoglutarat und O₂ resultiert in einer Disauerstoffspaltung und der Bildung einer hoch oxidierten Fe^{IV}=O-Spezies. Dieser Eisenkomplex spaltet die nichtaktivierte C-H-Bindung des Substrats, wodurch Succinat und das hydroxylierte Produkt freigesetzt werden.

wird die organische Disäure oxidativ zu Succinat decarboxyliert. Dabei wird O₂ so gespalten, dass ein Atom im Succinat verbleibt und das andere am Eisen als hoch oxidiertes Fe^{IV}=O koordiniert. Die Oxidationskraft dieses hoch oxidierten Oxoisenkomplexes reicht aus, um die nichtaktivierten C-H-Bindungen an den C3- und C4-Positionen von Pro, am C5 von Lys und am C3 von Asn zu spalten und auf diese Weise kurzlebige [•]CH-Radikalspezies sowie Fe^{III}-OH zu erzeugen. Der OH[•]-Transfer von Fe^{III}-OH auf das Kohlenstoffradikal resultiert in den hydroxylierten Proteinseitenketten. Hinsichtlich ihrer Polarität unterscheiden sich diese Seitenkettenhydroxylierungen relativ stark von den meisten anderen in diesem Aufsatz behandelten posttranslationalen Modifikationen. Die modifizierten Aminosäureseitenketten sind nicht elektronenreich oder nucleophil. Stattdessen erzeugt das Eisenenzym ein starkes Oxidationsmittel und führt homolytische Spaltungen von nichtaktivierten C-H-Bindungen regio- und stereospezifisch aus.

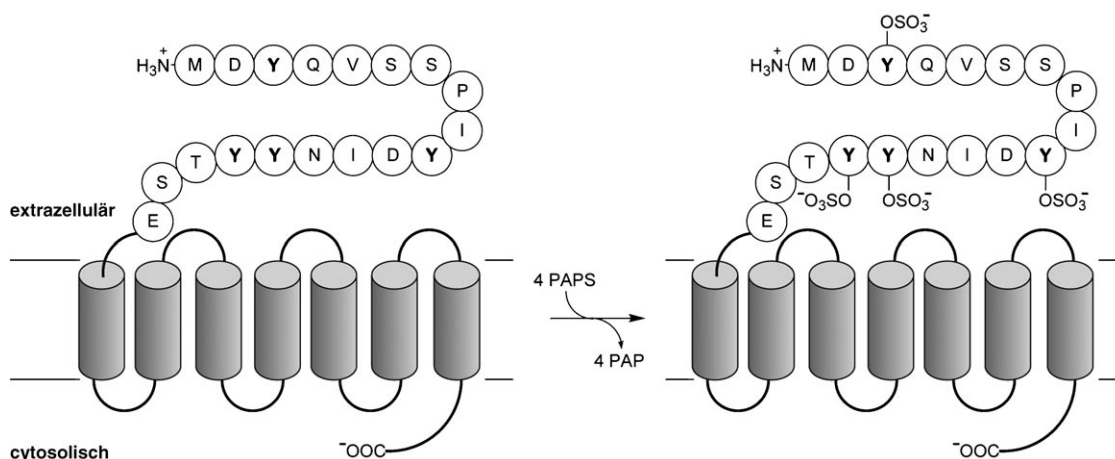
3.2. Schwefelübertragung auf Proteine

Phosphorgruppen sind nicht die einzigen anorganischen Gruppen, die auf Proteinseitenketten übertragen werden. Auch die SO₃⁻-Gruppe wird – durch Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) – z. B. auf Tyrosin-Seitenketten in Proteinen übertragen.^[66] PAPS überträgt generell aktivierte Sulfuryl-(SO₃⁻)-Gruppen auf nucleophile Zentren sowohl in kleineren Molekülen (z. B. Oligosacchariden wie Heparin^[67]) als auch in Proteinen und Proteoglycanen. Der CCR5-Rezeptor wird im Golgi-Komplex auf seinem Weg zur Plasmamembran, wo er an der extrazellulären Oberfläche präsentiert wird, an vier N-terminalen Tyrosinresten jeweils enzymatisch mit einer Sulfurylgruppe versehen (Schema 18).^[68] Dieser anionische Tyr-OSO₃⁻-Cluster ist für die Erkennung durch den CCR5-Chemokinin-Liganden wichtig.

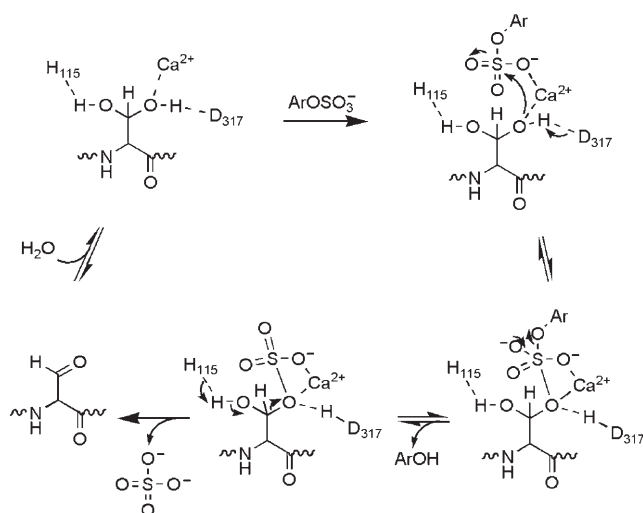
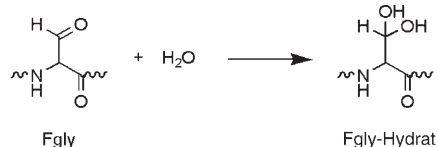
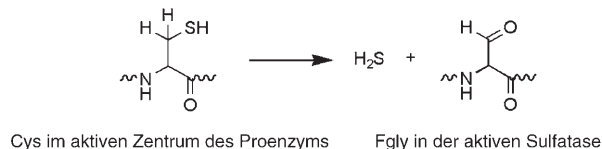
Sobald die sulfatierten Moleküle internalisiert sind, wird die Sulfatesterbindung durch Sulfatasen im Sekretionskompartiment, vor allem in Lysosomen, enzymatisch hydrolysiert.^[69–71] Die Sulfatasen, die als Abbauenzyme für Arylsulfatestersubstrate bekannt sind, liegen ihrerseits inaktiv als Proenzyme vor, bis sie posttranslational aktiviert werden. Diese Aktivierung umfasst die oxidative Umwandlung eines Cysteinrests im aktiven Zentrum zum Aldehyd in Form des Formylglycins (Fgly).^[70] Nach dieser Umwandlung eines nucleophilen Thiolats in ein elektrophiles Carbonyl nimmt Fgly ein Hydratisierungsgleichgewicht zwischen seiner Aldehyd- und Aldehydhydrat-Form (*gem*-Diol) ein (Schema 19). Die hydratisierte Form im aktiven Zentrum der Sulfatase initiiert den kovalenten Angriff auf das Substrat, die an das Protein gebundene Sulfatgruppe.^[72] Ergebnis ist die Spaltung der O-SO₃⁻-Bindung.

3.3. Proteinmodifikationen durch bakterielle Toxine

Bakterien, die eukaryotische Zellen befallen, sekretieren ein Komplement von Proteinen in die Wirtszelle und schwächen so deren Abwehrmechanismen. Unter diesen Virulenz-



Schema 18. Übertragung von vier SO_3^- -Gruppen aus PAPS an den Phenolsauerstoff von vier im N-terminalen Bereich des CCR5-Rezeptors lokalisierten Tyr-Seitenketten, während dieser die Sekretionskompartimente in Richtung Zelloberfläche passiert.



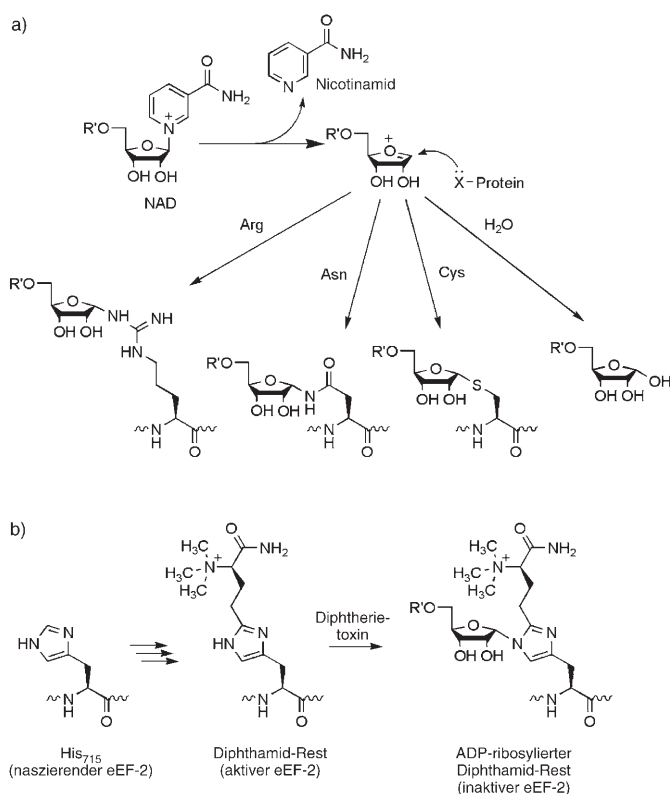
Schema 19. Die oxidative Umwandlung eines im aktiven Zentrum lokalisierten Cys-S⁻ zur Aldehydform FormylGly (Fgyl) überführt inaktive Sulfatasevorstufen in enzymatisch aktive Formen. Durch Hydratisierung der Fgyl-Seitenkette entsteht das gem-Diol, das als aktives Nucleophil den Schwefel im Substrat Ar-OSO_3^- angreift und so die Spaltung der O-SO_3^- -Bindung einleitet.

faktoren kommen drei Enzymtypen vor, die posttranslationale Modifikationen katalysieren: ADP-Ribosylierung, Glucosylierung und Desamidierung von Wirtproteinen.^[3]

3.3.1. ADP-Ribosylierung

Einige der bekanntesten bakteriellen Exotoxine, darunter das Cholera toxin, das Diphtherietoxin, das Keuchhustentoxin und das Botulinustoxin,^[73] sind ADP-Ribosyltransferasen. Als Donorsubstrat für die ADP-Riboseeinheit fungiert das leicht zugängliche Coenzym NAD. Die positiv geladene Nicotinamidgruppe von NAD wird unter Bildung eines Übergangszustandes – des Ribaoxacarbenium-Ions der übertragenden ADP-Riboseeinheit – freigesetzt (Schema 20a). Dieses Ion kann zum einen im aktiven Zentrum des Toxins durch robuste Nucleophile des Protein-Cofaktors, z. B. die Thiolat-Seitenketten von Cys, abgefangen werden. Ein Beispiel für diese Wirkungsweise ist die Modifizierung der α -Untereinheit der inhibitorisch wirkenden GTPase G_i , welche die cyclische AMP-Produktion reguliert, durch das Keuchhustentoxin. Zum anderen kann das Ribaoxacarbeniumion auch durch schwache Nucleophile abgefangen werden, z. B. durch die Guanidiniumgruppe von Arg der α -Untereinheit der GTPase G_s bei der Wirkung des Cholera toxins. Ein drittes Beispiel ist die Modifizierung des schwach nucleophilen Asn₄₁ in der Rho-Unterfamilie kleiner GTPasen durch das C3-Toxin aus *Clostridium botulinum*, die zu einer Depolymerisation des Actingerüsts der Wirtszelle führt.

Ein viertes Beispiel für die schädigende Wirkung eines Bakterientoxins auf ein spezifisches Wirtprotein in der Zelle ist das Diphtherietoxin, das den Proteinsynthesefaktor eEF-2 (eukaryotic elongation factor 2) an His₇₁₅ modifiziert. Zuvor durchläuft der Histidinrest eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen zur Vorbereitung – Übertragung einer Aminocarboxypropylgruppe durch das Cosubstrat SAM, N,N,N-Trimethylierung durch drei weitere SAM-Moleküle und glutaminvermittelte Amidierung –, die das His₇₁₅ insgesamt in einen Diphthamid-Rest im gereiften eEF-2 überführen. In dieser Molekülform wird eEF-2 durch das Diphthe-



Schema 20. ADP-Ribosylierung von Substratproteinen durch Bakterientoxine: a) Bei der Spaltung von NAD wird Nicotinamid freigesetzt und ein im aktiven Zentrum des Enzyms stabilisiertes Ribaoxocarbeniumion erzeugt. Dieses kann durch mehrere als Cosubstrat wirkende Nucleophile abgefangen werden: vom robusten Cys-S⁻ bei der Katalyse durch das Keuchhustentoxin bis hin zu den schwachen Asn- und Arg-Seitenketten der Botulinum- und Cholera-Toxine. Das natürliche Nucleophil H₂O führt zu Nebenreaktionen durch die NAD-Glycohydrolase. b) Das Diphtherietoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung am modifizierten Histidinrest des Elongationsfaktors eEF-2. In fünf posttranslationalen Schritten wird His₇₁₅ im noch ungefalteten eEF-2 zunächst mit einer Methionyleinheit aus SAM ausgerüstet, dann N,N,N-trimethyliert und schließlich amidiert. Dieser Diphthamid-Rest an Position 715 dient als Angriffspunkt bei der ADP-Ribosylierung am N3 des Imidazolrings durch das Diphtherietoxin.

rietoxin ADP ribosyliert (Schema 20b). Als Folge wird die wichtige Elongationsfunktion dauerhaft inaktiviert und die Proteinsynthese der infizierten Wirtszelle gestoppt.^[73]

3.3.2. Andere Modifikationen durch Bakterientoxine

Auch für weitere Bakterientoxine bieten sich die GTPase-Familien Ras und Rho als Zielscheiben an. Ein solches Enzym ist das letale Toxin aus *Clostridium sordelli*, bei dem es sich ebenfalls um eine Protein-Glycosyl-Transferase handelt. Hier ist es aber nicht die ADP-Riboseeinheit aus NAD, sondern die Glucoseeinheit aus UDP-Glucose, die durch das Toxin katalytisch übertragen wird. Das Ziehnucleophil ist die β -OH-Gruppe von Thr₃₅ in Ras. Die katalytische Aktivität von Ras wird durch die O-Glucosylierung blockiert.^[74,75]

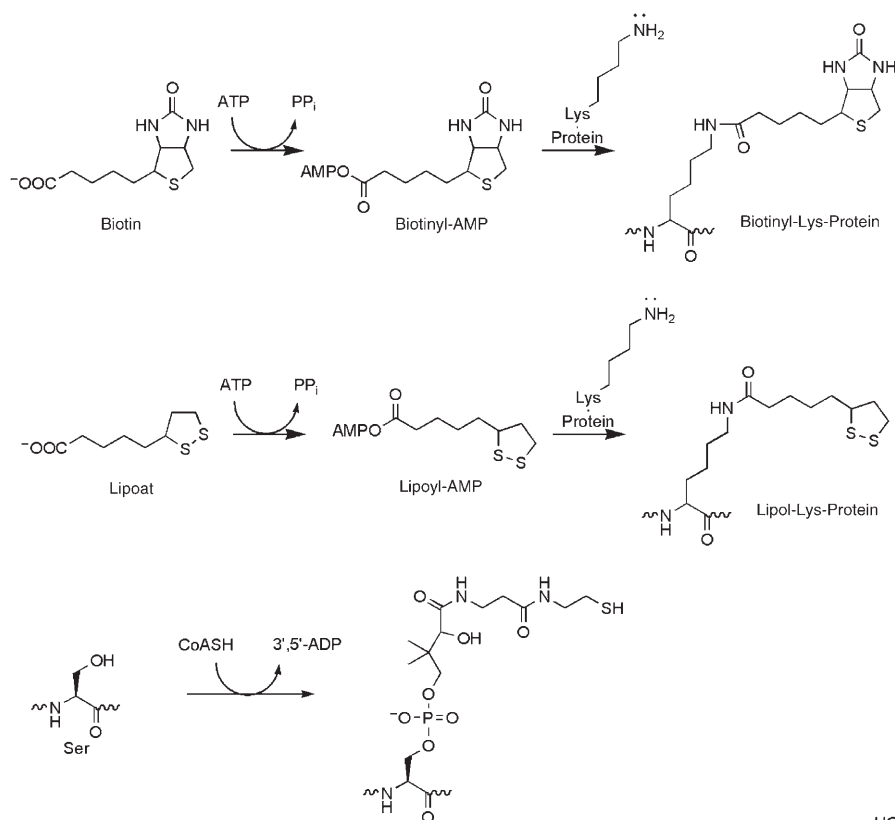
Eine andere posttranslationale Modifizierungsstrategie ist die Desamidierung von Gln₆₁ in Rho durch das cytotoxische

nekrotisierende Protein aus pathogenen *E.-coli*-Stämmen.^[76] Die Hydrolyse der im aktiven Zentrum der GTPase lokalisierten Carboxamidgruppe von Gln zur γ -COO⁻-Funktion von Glu₆₁ zerstört die Mechanistik des aktiven Zentrums. Insgesamt sind die Familien der kleinen GTPasen an derart vielen Signaltransduktions- und Stoffwechselschnittstellen der Zelle als thermodynamische Schalter beteiligt, dass sie auf verschiedenartigste Weise chemisch „programmiert“ werden können. Dabei werden ihr Aufenthaltsort und ihre Steuerungsfunktion sowohl bei der normalen Reifung als auch beim Pathogenangriff durch kovalente Modifikation verändert.

3.4. Anbringung von Cofaktoren mit einem „Schwingarm“

Etliche Hauptenzyme des Primärmetabolismus sind im Normalzustand nichtfunktional und müssen zur Aktivierung ihrer Acyl- und Carboxylübertragungsfunktionen posttranslational mit prosthetischen Gruppen versehen werden, die ihre Schlüsselfunktionalitäten enthalten. Die Coenzyme für die Acylübertragung sind Liponsäure und Phosphopantethein, und die prosthetische Gruppe für den Carboxyltransfer ist Biotin (Schema 21). Alle drei Cofaktoren werden durch ihre zugehörigen Aktivierungs-/Ladungsenzyme kovalent mit Seitenketten ihrer Apoproteine verknüpft. Um die Biotinylamid- und Lipoamid-Verknüpfungen aufzubauen, werden Biotin und Lipoat zunächst als Acyl-AMP-Spezies aktiviert und dann durch die ϵ -NH₂-Gruppe einer Lysin-Seitenkette abgefangen, die das Zielprotein in seiner korrekt gefalteten 100-Reste-Domäne präsentiert. Die volle Reichweite der Lys-Biotin- und Lys-Lipoat-Ketten beträgt etwa 20 Å, was diesen prosthetischen Gruppen die historische Bezeichnung als „Schwingarme“ (swinging arms) einbrachte, die mit verschiedenen Domänen in Multienzymkomplexen wechselwirken können.^[77] Auf ähnliche Weise wird auch die als Donor-substrat fungierende Phosphopantetheinyl-Einheit von CoASH durch die β -OH-Funktion eines spezifischen Ser-Restes abgefangen, der in einer 80–100 Aminosäure langen Proteindomäne lokalisiert ist. Wiederum entsteht eine prosthetische Gruppe an einem 20 Å langen Schwingarm, mit dem sie chemisch durch einen Phosphodiester und nicht wie in den vorangegangenen Beispielen durch ein Säureamid verknüpft ist.

Der am Enzym gebundene Biotinyl-Cofaktor wird zur Übertragung von C₁-Gruppen in Form von CO₂ genutzt. Carboxylasen, die HCO₃⁻ an Acetyl-CoA und Propionyl-CoA unter Bildung von Malonyl- bzw. Methylmalonyl-CoA knüpfen, enthalten mehrere aktive Zentren oder spezielle Untereinheiten mit unterschiedlicher chemischer Funktion. Die Biotin-Carboxylase-Untereinheit verwendet ATP als Cosubstrat zusammen mit HCO₃⁻. Das Zwischenprodukt, ein gemischtes Carboxyphosphatanhydrid, wird durch das Biotinyl-Lys am Ureido-Stickstoff N1 abgefangen, wodurch ein als N1-Carboxybiotinyl-Lys-Enzym fixiertes CO₂ gebildet wird (Schema 22). Dieses fixierte CO₂ wird zum aktiven Zentrum gebracht, wo das C₂-Carbanion der Acetyleneinheit von CoA das N-Carboxybiotinyl-Ende angreift. Bei dieser Aktion wird durch die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA



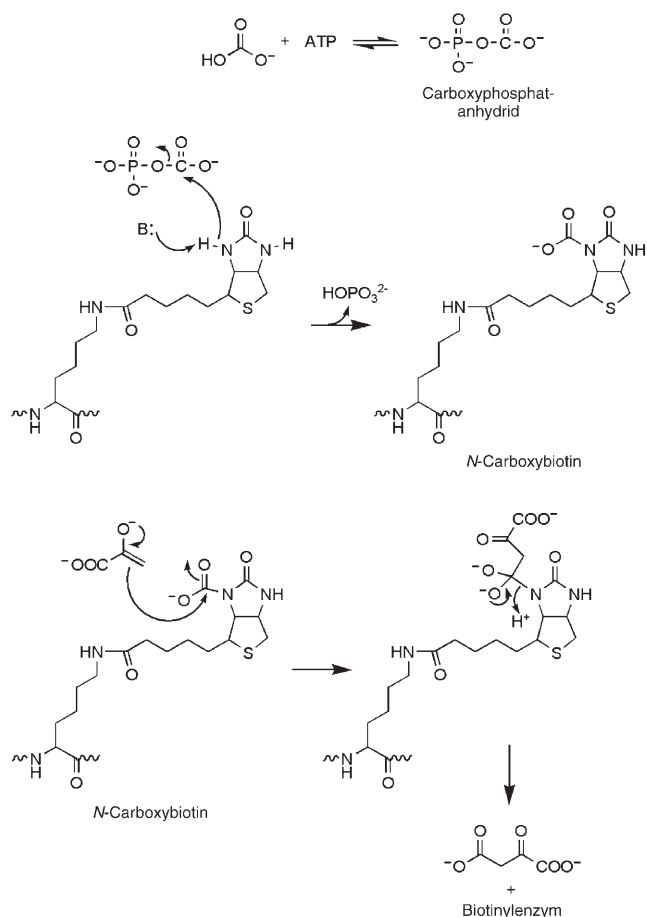
Schema 21. Coenzyme, die an das aktive Zentrum von Enzymen gebunden sind, fungieren als prosthetische Gruppen an einem „Schwingarm“. So befördern sie CO₂ oder Acylgruppen zwischen aktiven Zentren hin und her: Biotin und die resultierende Biotinylamid-Lys-Verknüpfung, Lipoat und die resultierende Lipoamid-Lys-Verknüpfung, CoASH und die resultierende Pantetheinyl-OPO₃-Verknüpfung.

eine C-C-Bindung geknüpft. Malonyl-CoA ist einer der Schlüsselbausteine bei der Fettsäurebiosynthese in der Zelle.

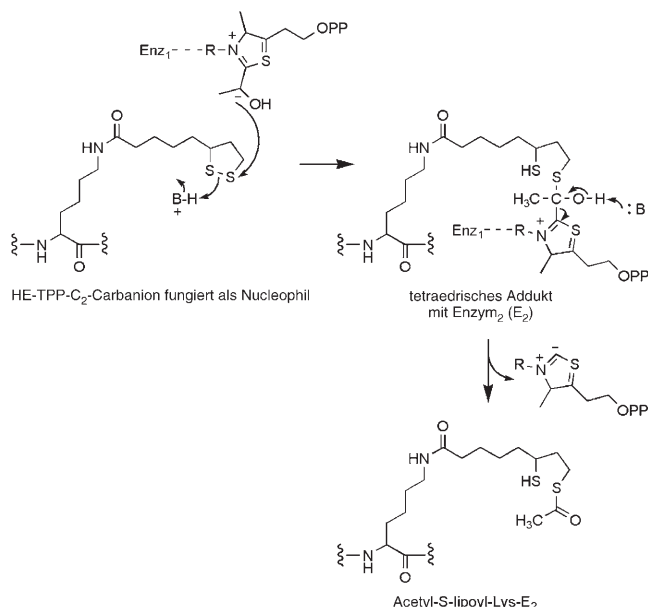
Die anderen beiden Coenzyme, Lipoamid und Pantetheinylphosphat, werden genutzt, um von Substraten stammende Acylgruppen zwischen den aktiven Zentren unterschiedlich zusammengesetzter Multidomänenenzyme zu transportieren.^[77,78] Die prosthetische Gruppe Lipoamid ist in sämtlichen α -Ketosäure-Dehydrogenasekomplexen zu finden, die oxidative Decarboxylierungen ausführen, z. B. von Pyruvat am Ende der Glycolyse und von α -Ketoglutarat im Citronensäurezyklus. Bei der Pyruvat-Dehydrogenasereaktion dient das Disulfid des Cofaktors Lipoamid als Elektronensenke, während das C₂-Carbanion von Hydroxyethylthiamin-PP den Ring öffnet (Schema 23). Während der Übertragung wird das C₂-Fragment von der Oxidationsstufe des Acetaldehyds zu der des Acetats oxidiert. Bei gleichzeitiger Reduktion der Disulfidfunktion im oxidierten Lipoamid wird es dann als aktivierter Acetyl-S-lipoamidthioester abgefangen. Diese Reaktion beschreibt die Rolle der prosthetischen Lipoamidgruppe als „Redoxenergiefänger“. In der zweiten Reaktionshälfte bewegt sich der Acetyl-S-lipoamid-Arm hin zu einer separaten aktiven Stelle und dockt neben einem CoASH-Molekül an, woraufhin die Acylgruppe auf die Thiofunktion von CoAS⁻ übertragen werden kann. Bei

diesem isoenergetischen Transfer wird die oxidierte Acetylseinheit als Acetyl-CoA – die frei diffundierende „Energiewährung“ der Zelle – freigesetzt.

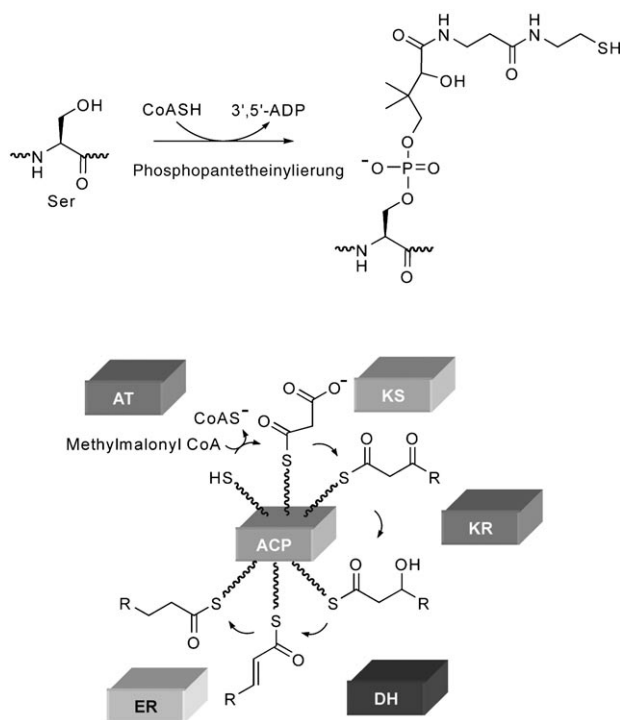
Ein drittes Beispiel für einen an einem Schwingarm verknüpften Cofaktor ist die Pantetheinyl-Einheit an den Acylcarrier-Proteindomänen (ACPs). Diese stellen ebenfalls eine nucleophile terminale Thiolatfunktion zum Abfangen von Acylgruppen bereit. ACPs spielen eine zentrale Rolle in der Fettsäurebiosynthese, bei der Acylketten durch Zyklen von Claisen-Kondensation und Redoxreaktionen jeweils um C₂-Einheiten verlängert werden. Dabei wird das Zwischenprodukt β -Ketoacyl-S-ACP zu β -Methylenacyl-S-ACP reduziert, das für die nächste C₂-Addition zur Verfügung steht (Schema 24).^[78] Man nimmt an, dass die Acylgruppen



Schema 22. N-Carboxylierung von Biotinylamid durch ATP und HCO₃⁻ im aktiven Zentrum der Biotincarboxylase mit anschließender Übertragung von gebundenem CO₂ zum aktiven Zentrum der Acetyl-CoA-Carboxylase, wodurch Malonyl-CoA entsteht.



Schema 23. Die oxidierte Disulfidform von Lipoamid dient als Elektronensinke bei der Abfangreaktion durch das C₂-Carbanion aus Hydroxyethylthiamidpyrophosphat (HE-TTP), bei der das TPP-Thiazolcarbanion wieder freigesetzt und Acetyl-S-Lipoamid erzeugt wird. Bei der Übertragung wird das C₂-Fragment oxidiert, das Lipoamiddisulfid reduziert und die Energie in der Acetylthioesterbindung gespeichert, die während des anschließenden Transfers der Acetylseinheit auf CoAS⁻ erhalten bleibt.



Schema 24. Die terminale Thiolatfunktion der prosthetischen Phosphopantetheinylgruppe fungiert bei der Fettsäurebiosynthese als Nucleophil zum Abfangen des ersten Acylfragments. In jedem sich anschließenden Zyklus wird die Acylkette um zwei Kohlenstoffatome verlängert, wobei der Pantetheinyl-Arm die wachsende Acylkette zwischen den aktiven Zentren von Ketosynthase (KS), Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER) wandern lässt. Die β-Ketogruppen werden dabei in die um vier Elektronen reduzierte Oxidationsstufe der β-Methyleneinheiten überführt.

während ihrer zyklischen Wanderung zu den aktiven Zentren von Ketosynthase, Ketoreduktase, Dehydratase und Enoylreduktase an dem flexiblen Phosphopantetheinyl-Arm gebunden bleiben.

Diese Strategie der kovalenten Anbindung von Coenzymen über einen Schwingarm wurde offenbar von der Natur entwickelt, um die kleinen Acylfragmente oder CO₂ zu fixieren und sie zu den speziellen katalytischen Zentren der Multienzymkomplexe oder zu den einzelnen an einem modifizierenden Zyklus beteiligten Enzymen transportieren zu können. Es gibt noch andere Beispiele für die Anbindung von Cofaktoren an Lysin-Seitenketten im Protein. In einem Fall entsteht eine hydrolysierbare Iminbindung zwischen Lys-NH₂ und einem Aldehydkohlenstoff im Cofaktor. Beispiele hierfür sind Vitamin B6 in seiner Aldehydform, Pyridoxalphosphat, alle Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme und Rhodopsin.

3.5. Posttranslationale Carboxylierung von Glutaminsäure für die zweizählige Bindung von Calcium

Eine an der Blutgerinnung beteiligte Proteinfamilie wird posttranslational in einem Bereich von dicht beieinander liegenden Glutamatresten modifiziert, während die Proteine in Richtung Extrazellulärraum den Sekretionsapparat passieren. Bei dieser Modifikation wird CO₂ am γ-Methylen-

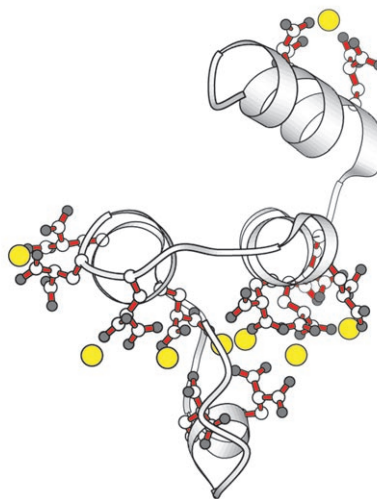
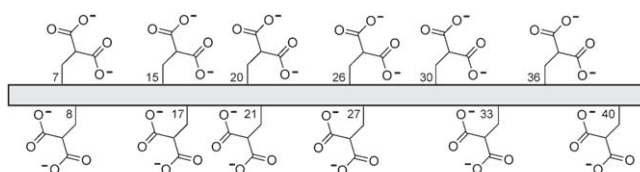


Abbildung 11. Zwölf eng aneinander gereihete Glu-Reste in der Carboxylierungsdomäne der Pro-Form der Koagulationsprotease Faktor IX werden zu γ-CarboxyGlu(Gla)-Resten modifiziert. Sie bieten eine hohe lokale Konzentration an zweizähligen Malonylseitenketten für die Koordination von Ca²⁺. Die dreidimensionale Darstellung des acht Calciumionen (gelbe Kugeln) komplexierenden Dodeca-Gla-Bereichs macht besonders deutlich, wie die Struktur von den zweiwertigen Metallionen beeinflusst wird.

kohlenstoff des Glu-Restes fixiert und somit eine Malonyl-Seitenkette mit der Bezeichnung γ -Carboxy-Glu (Gla) erzeugt. Diese Gla-Seitenketten können zweiwertige Kationen zweizählig chelatisieren; hervorzuheben ist dabei vor allem die Wechselwirkung mit Ca^{2+} -Ionen. Proteine, bei denen eine solche Tandem- γ -Glu-Carboxylierung stattfindet, sind unter anderem die Proenzymformen von Proteasen wie Prothrombin, proFaktor IX und proFaktor X.^[79] Bei diesen Proenzymen werden zehn bis zwölf Glu-Seitenketten in einem 40 Aminosäuren langen Strang zu γ -Carboxy-Glu-Resten carboxyliert, was lokal eine hohe Dichte von zweizählig Chelatoren für Ca^{2+} -Ionen erzeugt (Abbildung 11). In Gegenwart von Ca^{2+} verändern die Gla-Domänen ihre Konformation und induzieren die Assoziation der Proteasen auf der Blutplättchenoberfläche, wodurch Proteinkomplexe gebildet und benachbarte Proteasen aktiviert werden, welche wiederum die Blutgerinnungskaskade in Gang setzen.^[79]

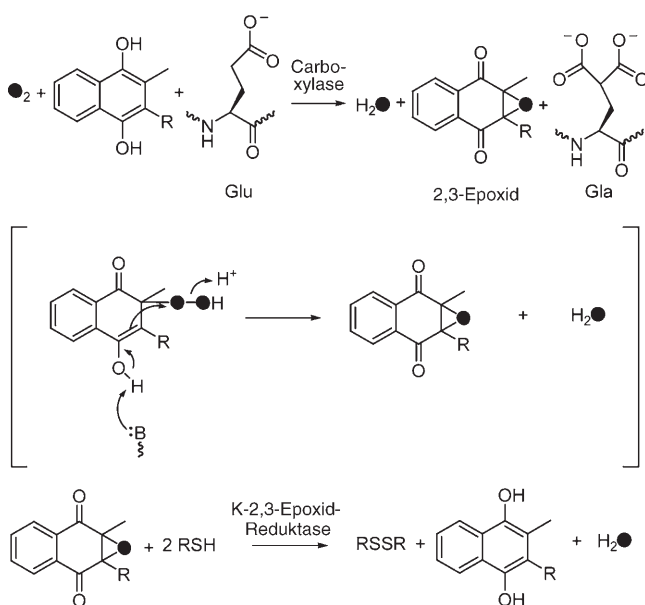
Anders als bei den in Abschnitt 3.4 besprochenen Carboxylierungsreaktionen, bei denen sich ein mit CO_2 beladener Biotin-Arm zwischen den aktiven Zentren der Enzyme hin und her bewegt, kommen bei der Carboxylierung von Glutaminsäureseitenketten zu Gla-Resten keine Biotinylamid-abhängigen Enzyme zum Einsatz. Als Cofaktor für die CO_2 -Fixierung bei den Gla-Modifikationen dient vielmehr das Naphthochinon Vitamin K, das hier seine einzige wohldefinierte Rolle im Säugermetabolismus ausführt. Die eigentlich aktive Form für die vom Vitamin K abhängige Proteincarboxylase ist dabei das Dihydronaphthochinol, KH_2 . Als Co-substrat wird zusätzlich O_2 benötigt, und nach dem vorgeschlagenen Mechanismus (Schema 25) bildet sich das Per-

oxidaddukt K-OOH. Die Cyclisierung dieses Chinonhydroperoxids führt zum Alkoxid-Anion des 2,3-Epoxids von Vitamin K. Dieses Anion hat die erforderliche Basizität, um ein Proton aus der CH_2 -Seitenkette des γ -Glu-Restes zu entfernen und so das zum CO_2 -Angriff benötigte Carbanion zu generieren. Mit der neu geknüpften C-C-Bindung sind nun die Malonylseitenketten der Gla-Reste im Produkt vollständig hergestellt.

4. Katalogisierung posttranslationaler Modifikationen

Wenn man sich die oben genannten größeren und kleineren Teilkategorien der posttranslationalen Modifikation anschaut, kommt man auf mindestens Hunderttausende, vielleicht Millionen von möglichen Proteinvarianten in der eukaryotischen Zelle. Das schafft gewaltige analytische Probleme, noch größer aber ist die Aufgabe für die Systembiologie, mögliche Verbindungen unter den Subproteomen ausfindig zu machen. Ein beträchtlicher Teil der aktuellen PTM-Forschung ist der Entwicklung von Methoden gewidmet, mit deren Hilfe sich solche „Inventarlisten“ aufstellen lassen. Hauptsächlich wird dazu die Massenspektrometrie herangezogen, die zum einen Nachweisempfindlichkeiten im femtomolaren Bereich aufweist und es außerdem ermöglicht, eine große Zahl von Peptidfragmenten mit charakteristischen Modifikationen zu identifizieren.^[80] Herausragende Studien in jüngster Zeit sind der Nachweis von Hunderten von pS- und pT-Peptiden aus dem Phosphoproteom der Hefe^[81] und die Isolierung von ubiquitinierten Hefeproteinen mithilfe des His-Markers. Letztere Methode ermöglichte die Identifizierung von über hundert ubiquitinierten Proteinen, deren Polyubiquitinketten durch verschiedene Lys-Reste des Ubiquitin-Monomers verbunden waren.^[82]

Jede Probenahme eines Proteoms aus einem Organismus oder einer Zelle stellt nur eine Momentaufnahme in einem hoch dynamischen Prozess dar. Damit wird eine aussagekräftige Analytik vereitelt, und es erscheint zunehmend notwendig, mit zeitaufauflösenden Verfahren zu arbeiten. Heterogenität kann auf verschiedene Weise entstehen. Da posttranslational modifizierende Enzyme nicht frei von Templaten funktionieren, treten Modifikationen stochastisch auf und durchdringen eine Population von Zielproteinen womöglich nicht vollständig. Mit welcher Effizienz eine spezifische Position modifiziert wird (z.B. die N-Glycosylierung eines bestimmten Asn-Restes in der für die Modifikation am besten geeigneten Sequenz Asn-X-Ser), hängt davon ab, wie lange etwa der Asn-haltige Proteinbereich während seiner Passage durch die ER-Membran ungefaltete vorliegt. Der Carboxamid-Stickstoff ist dann nur für einen kurzen Augenblick frei zugänglich. Auch die Oligosaccharyl-N-Transferase ist in dieser Mikroumgebung nur begrenzt vorrätig, sodass die Zeit, die Proteinsubstrat und Enzymkatalysator miteinander verbringen, zu kurz ist, um eine vollständige Modifikation von 100% Manipulationsstellen in der Proteinpopulation zu erzielen. Bei der mehrstufigen Reifung des N-Glycankerns $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ von Glycoproteinen kommt es bis zu einem Dutzend solcher Substrat-Katalysator-Begegnungen. Bei



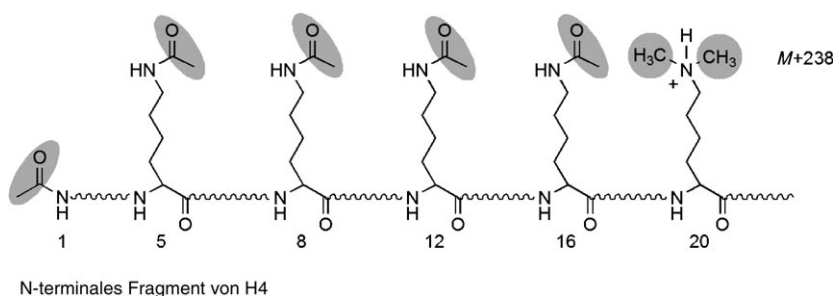
Schema 25. Mechanismsvorschlag für die Funktion der Dihydroform von Vitamin K (KH_2) als Cosubstrat bei der posttranslationalen Protein-carboxylierung von Glu- zu Gla-Seitenketten. Bei der Reaktion von KH_2 mit O_2 als Cosubstrat entsteht eine Hydroperoxy-K-Zwischenstufe, die weiter zum 2,3-Epoxy-Vitamin-K-Alkoxid reagieren kann. Das Alkoxid ist vermutlich als Base stark genug, um eines der γ - CH_2 -Wasserstoffatome von Glu zu abstrahieren. Das dadurch zwischenzeitlich entstehende γ -Carbanion wird benötigt, um CO_2 anzugreifen und so die neue C-C-Bindung im Gla-Endprodukt herzustellen.

einer Ausbeute von 90 % pro Stufe ergeben sich rechnerisch genau die komplexen und heterogenen Glycoprotein-Mischungen, die oft nachgewiesen werden. So sind etwa vom Prion-Protein, wie schon erwähnt, etwa 52 Glycoformen bekannt.^[45]

5. Posttranslationale Mehrfach- und Tandemmodifikationen von Proteinen

Häufig treten die posttranslationalen Modifikationen an Mehrfachpositionen auf oder laufen als Tandemkaskaden ab, die für die Funktion essenziell sind. So wurden bei der Abl-Tyrosinkinase an elf verschiedenen Positionen Phosphorylierungen beobachtet – neun an Tyrosin, eine an Serin und eine an Threonin –, die über die verschiedenen katalytischen und regulatorischen Domänen des Proteins weit verstreut liegen^[83] (siehe Abbildung 2, im Prinzip sind $11! = 40\,420\,800$ unterschiedliche phosphorylierte Formen nur für dieses eine Protein möglich). Da sehr wahrscheinlich die jeweiligen Positionen nur teilweise belegt sind, resultiert eine riesige Zahl von Phosphoformen allein für dieses Protein.

Typischerweise werden die Histonoktamerenden in den Nucleosomen mehrfach an Lysinresten acetyliert und methyliert, einmal an Serin phosphoryliert und einmal am N-Terminus ubiquitiniert. Dies bedeutet Modifikationsmöglichkeiten an 28 Stellen, wie es in Abschnitt 2.2 und 2.3 beschrieben ist. Sicherlich werden nicht alle 28! Möglichkeiten von der Natur ausgeführt. Kürzlich haben Kelleher und Mitarbeiter^[84] eine an hoch auflösende Massenspektrometrie gekoppelte Bioinformatikmethode entwickelt, mit der bestimmte Histonvarianten vorhergesagt, gesucht und identifiziert werden können. So wiesen sie eine spezifische Sechsfachmodifizierung des N-Terminus von Histon H3 anhand seiner charakteristischen $[M + 238]$ -Massensignatur nach (Abbildung 12). Dieses Musterbeispiel zeigt auf, wie eine solche funktionale Bindungsvielfalt von Proteinisoformen identifiziert werden kann. (Entsprechend der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen; der systemische Ansatz besteht darin herauszufinden, wie viele solcher „Nadeln“ insgesamt im „Proteinheuhaufen“ vorkommen.) Vermutlich werden die Mehrfachmodifikationen der Histon-Enden in spezifischen Zeitmustern von der Enzymaschinerie geschrieben und gelesen,

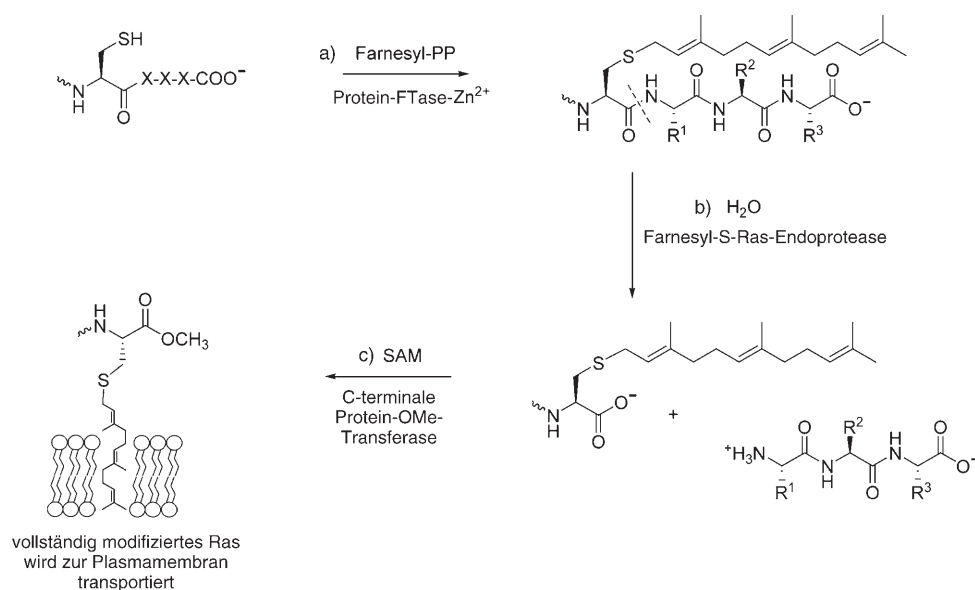


N-terminales Fragment von H4

Abbildung 12. In einem posttranslationalen Tandemprozess wird das N-terminale Ende von Histon H4 siebenfach modifiziert: der N-Terminus selbst sowie die Lysinreste Lys_{5,8,12,16} werden acetyliert, und Lys₂₀ wird N,N-dimethyliert.

sodass die Transkriptionsrepressoren und Aktivatorkomplexe selektiv angefordert werden können.

Posttranslationale Tandemmodifikationen sind auch sonst bei vielen Proteinen bekannt; sie sorgen für den komplexen Informationsgehalt, der die posttranslationalen Modifikationen antreibt. Die in vier Stufen nacheinander ablaufenden Modifikationen am C-Terminus von Ras-Proteinen – 1) S-Prenylierung, 2) S-Palmitoylierung von Nachbarcysteinen, 3) spezifische endoproteolytische Spaltung, die eines der Cysteine zum neuen C-Terminus umwandelt, 4) Methylierung an diesem neu generierten C-terminalen Carboxylat – bilden zusammen den integrierten Reifungsprozess. Infolge der Reifung wird das so modifizierte Ras hin zur Membran befördert, wo es an seine stromaufwärts liegenden Proteinkinasepartner andockt (Schema 26).^[35] In Abschnitt 3.3 haben wir erwähnt, dass der Gln-Rest im aktiven Zentrum bei der mit der Ras-Familie verwandten GTPase-Familie RhoA ADP-ribosyliert, O-glucosyliert und desamidiert werden kann. Mit der zusätzlichen Abfolge von Prenylierung, Proteolyse und C-terminaler Carboxymethylierung, die sich bei Rho abspielt, kommen insgesamt sieben spezifische post-

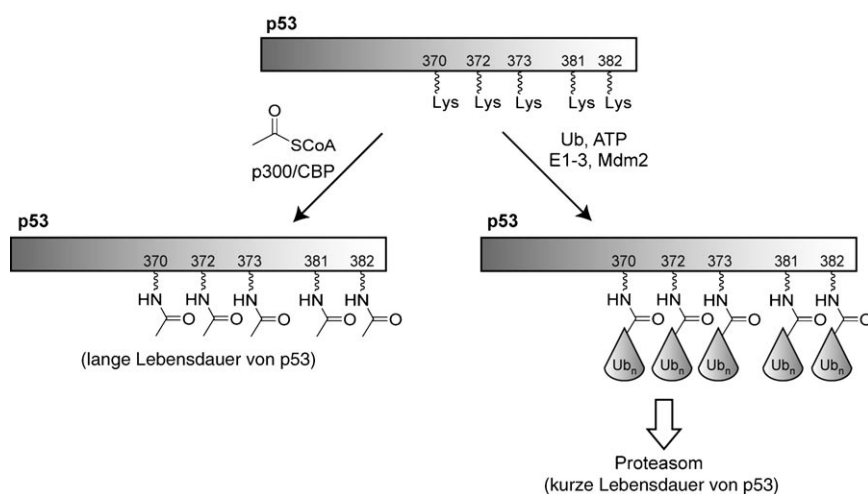


Schema 26. Mehrstufige Modifikation der Ras-GTPase: a) S-Prenylierung, b) Endoproteolyse, c) C-terminale O-Methylierung.

translationale Modifikationsstufen zusammen. Das reife RhoA kann auch noch durch die YopT-Protease aus dem Pathogen *Yersinia pestis*, das einen Teil seines Virulenzprogramms ausführt, gespalten werden.^[85]

Die posttranslationale Tandemmodifikation kann auch als Startsignal für einen biologischen Signalprozess dienen, wie das Beispiel der Ubiquitinierung verdeutlicht: Um die Ereigniskaskade mit dem Ergebnis der Proteolyse ins Rollen zu bringen, müssen nacheinander mindestens vier 8-kDa-Marker von Ubiquitin an das Zielprotein geheftet werden. Offensichtlich bildet eine Polyubiquitinlänge von mindestens 4 Ub den Schwellenwert für die Erkennung durch Chaperonproteine, die die markierten Proteine zu den Proteasomen begleiten.^[27]

Es gibt auch Belege für die gegenseitige Konkurrenz von posttranslationalen Modifikationen, die gegenläufige Funktionalitäten des Zielproteins zur Folge haben. Zwei Beispiele für eine Konkurrenz zwischen Ubiquitinierung und Acetylierung sind 1) SMAD7, ein Protein im TGF β -Signalübertragungsweg,^[86] und 2) der Transkriptionsfaktor p53, der in der Nähe seines C-Terminus an fünf Lysin-Seitenketten modifiziert wird. Die ϵ -NH₂-Gruppen von p53 oder SMAD-Proteinen können acetyliert oder ubiquitiniert werden (Schema 27). Die Ubiquitinierung führt letztlich zum proteolytischen Abbau des Proteins, während die Acetylierung die Ubiquitinierung blockiert und demzufolge die Lebensdauer der Proteine in der Zelle verlängert.^[13]



Schema 27. Konkurrenz von Acetylierung gegenüber Ubiquitinierung der ϵ -NH-Gruppe von Lys_{370,372,373,381,382} nahe des C-Terminus des Transkriptionsfaktors p53.

6. Reversible kontra irreversible posttranslationale Modifikation

Je nach dem biologischen Zweck, den eine bestimmte kovalente Proteinmodifikation ausübt, kann unter Umständen die Reversibilität ein wichtiger Kontrollparameter sein. Typisches Beispiel für eine reversible Modifikation ist die Proteinphosphorylierung, die sich im Laufe der Evolution zur maßgeblichen Modifikation bei der Proteinsignalübertragung entwickelte. Die fünf PTM-Hauptkategorien – Phosphory-

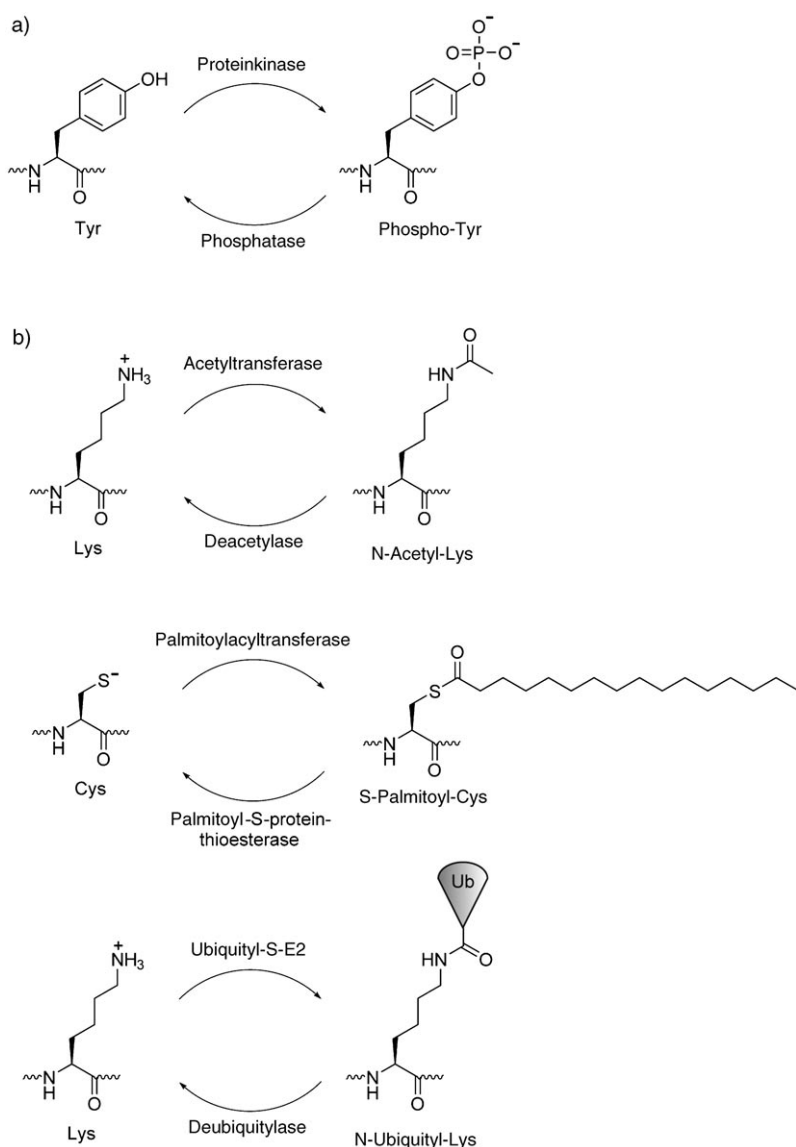
lierung, Acylierung, Glucosylierung, Thiol-Disulfid-Modifikation und Alkylierung (siehe Abschnitt 2) – greifen mit Ausnahme der Alkylierungen auf spezifische Enzyme zurück (häufig große Enzymfamilien), um die kovalenten Modifikationen wieder rückgängig zu machen. Phosphorylierungen, Acylierungen und Glycosylierungen werden im Allgemeinen durch Hydrolasen rückgängig gemacht, während Disulfidspaltungen durch Reduktasen ausgeführt werden. Wir werden weiter unten ausführen, dass für die Alkylierungen inzwischen ein oxidativer enzymatischer Mechanismus bekannt ist, mit dem die N-Methylsubstituenten an den Histonen wieder abgetrennt werden.

Proteinkinasen liegen üblicherweise im Grundzustand als inaktive Form mit niedriger Aktivität vor, solange kein bestimmter Stimulus zugegen ist. Wenn ein Signal weitergeleitet wird, kommt es zur Aktivierung der Kinase, was bei MAP-Kinasen oft eine kovalente Autophosphorylierung von Thr-Resten zu pT oder von TXY-Sequons zu doppelt phosphorylierten pTXpY-Folgen bedeutet. Nach der Aktivierung kann die Proteinkinase ihr jeweiliges Zielprotein mit wesentlich höherer katalytischer Effizienz modifizieren.^[8] Die durch cyclisches AMP aktivierte Proteinkinase A beispielsweise phosphoryliert bei der Signalkettenpropagation über 100 Proteine^[87] an Ser- und Thr-Resten.

Um die Zeitdauer und Intensität der Phosphoproteinsignalübertragung steuern zu können, müssen die Signale auch abschaltbar sein. Eine vollständige Beendigung des Übertragungswegs wird durch hydrolytische Entfernung der PO₃²⁻-Gruppe durch Phosphoprotein-Phosphatasen erreicht (Schema 28a). Das menschliche Genom codiert für ungefähr 150 Proteinphosphatasen, einschließlich der pS- und pT-selektiven Phosphatasen, pY-Phosphatasen und solcher mit dualer Spezifität (pS und pY).^[88] Unter den Phosphatasen sind 107 pY-spezifisch.^[89] Die wesentlich kleinere Zahl an pS- und pT-Phosphatasen wird dadurch wieder ausgeglichen, dass viele kleinere regulatorische Untereinheiten eine Kontrollfunktion über den subzellulären Aufenthaltsort und die Substraterkennung der pS- und pT-Hydrolyse-Enzyme ausüben.

Die enzymvermittelte Reversibilität der PTM hat als praktische Konsequenz, dass der Gehalt an Phosphoproteom in der Zelle zu jeder Zeit das Gleichgewicht an Aktivität der 500 Proteinkinasen und 150 Proteinphosphatasen gegenüber ihren Proteinsubstraten widerspiegelt. Daraus ergibt sich eine nahezu unendliche Zahl von Bezugspunkten für die Zelle.^[90,91]

Die Acetylierung, Ubiquitinierung und S-Palmitoylierung sind drei weitere kovalente Modifikationen, die leicht rückgängig zu machen sind (Schema 28b) und sich daher für die Regulation und Signalübertragung eignen. Die Histon-Acetyltransferasen (HATs) werden durch eine Familie von Histon-Deacetylasen (HDACs) funktional revertiert.^[92,93] Manche HDACs sind katalytische Domänen, die in mehr-



Schema 28. Reversible kovalente Modifikation von Proteinen: a) Phosphoproteinphosphatasen kehren die Wirkung von Proteinkinasen um; b) Proteinacetylierungen, S-Palmitoylierungen und Ubiquitinierungen werden durch Deacetylasen, Palmitoyl-S-Proteinthioesterasen und Deubiquitinasen wieder rückgängig gemacht.

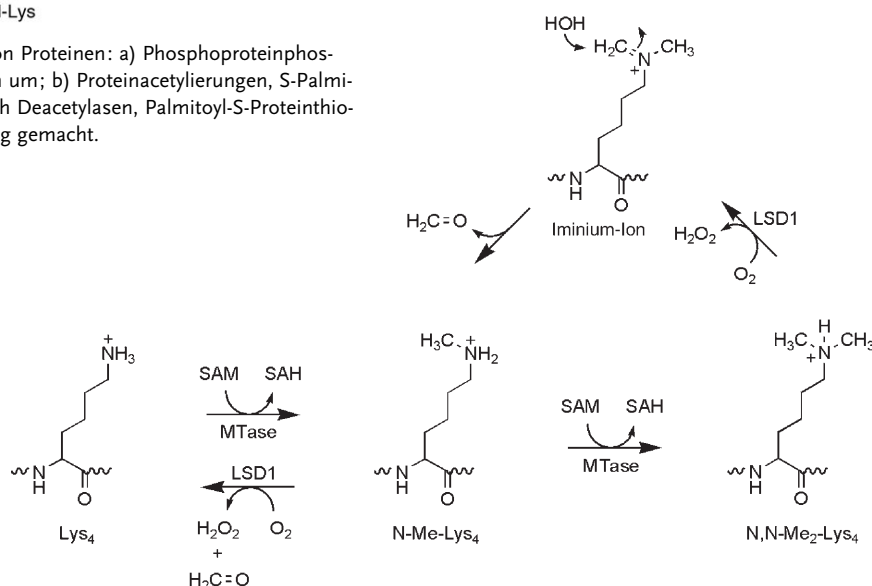
schichtig modular aufgebaute Proteine eingebettet sind. Diese Proteinmodule werden dynamisch von den acetylierten und methylierten Lysin-Seitenketten in den Histon-Enden rekrutiert. Eine eigenständige Familie von NAD-abhängigen Histon-Deacetylasen, die Sirtuine, üben Funktionen bei der Stummschaltung von Genen aus und koppeln so den Energiestoffwechsel an die Transkriptionsregulation.^[94,95]

Anders als die Lys-Acetylierung ist die Lys-N-Methylierung von Histonen weder enzymatisch noch nichtenzyma-

tisch reversibel, da es keine ersichtliche Möglichkeit gibt, wie die N-Alkyl-Bindung hydrolytisch gespalten werden könnte. Bezüglich des Schreibens und Änderns des Histoncodes nimmt man daher an, dass nur Acetylierungen, nicht aber Methylierungen gelöscht werden können. Allerdings wurden in jüngster Zeit FAD-abhängige Methyl-Lys-Desaminasen entdeckt, was bedeutet, dass mit einem oxidativen Mechanismus die Wirkung von Histon-Methyltransferasen wieder rückgängig gemacht werden kann.^[96] Dabei wird N-Methyl-Lys enzymatisch zum hydrolyseempfindlichen Imin $\text{CH}_2=\text{NH}$ -Lys umgewandelt (Schema 29). Nach der Hydrolyse verbleiben der unmodifizierte H_2N -Lys-Rest und ein Äquivalent Formaldehyd.

Die dutzenden bis hunderten von Ubiquitin-Proteinligasen erzeugen in den markierten Proteinen Isopeptidbindungen des Typs Ubiquityl- ϵ -NH-Lys. Dieser Bindungstyp ist resistent gegen normale Proteasen, wird aber durch eine Familie von einigen dutzend Deubiquitylasen (DUBs)^[97,98] wieder gespalten. Wahrscheinlich erkennen die DUBs zu verschiedenen Zeiten an verschiedenen Orten der Zelle selektiv Untergruppen der ubiquitinierten Proteine und bewahren sie so vor dem Abbau in den Proteasomen.

Die palmitoylierten Cysteinreste enthalten kovalente Thioesterverbindungen. Diese können nichtenzymatisch hydrolysiert werden, aber dieser Vorgang ist ein in der Membran langsamer Vorgang. Daher gibt es spezifische Palmitoylprotein-Thioesterasen,^[11]



Schema 29. ϵ -N-Methylierungen an Lys-Seitenketten werden durch Oxidation (nicht durch Hydrolyse) mithilfe eines Flavoproteins wieder rückgängig gemacht, wobei als Produkt ein hydrolyseempfindliches Imin entsteht.

die Lebensdauer und infolgedessen den Aufenthalt des Proteins an der Membrangrenzfläche steuern.

Außer den oben genannten reversiblen posttranslationalen Modifikationen gibt es auch funktional irreversible Modifikationsarten. Anders als die Cys-S-Palmitoyl-Verknüpfung ist die Thioesterbindung der Cys-S-Prenylierung nicht hydrolytisch spaltbar. (Auch hier sind zwar oxidative Mechanismen bekannt, aber diese treten nur beim Abbau der prenylierten Proteine in den Lysosomen auf.) So gesehen bietet die Strategie, zur Membranlokalisation die Proteine enzymatisch entweder zu palmitoylieren oder zu prenylieren, eine Auswahl zwischen reversibler oder irreversibler Modifikation. Irreversible Modifikationen sind auch die C-Carboxylierung von Glu- zu Gla-Resten und die Hydroxylierung von Seitenketten, z.B. die von Pro und Asn im Sauerstoff-Sensorprotein HIF-1 α .

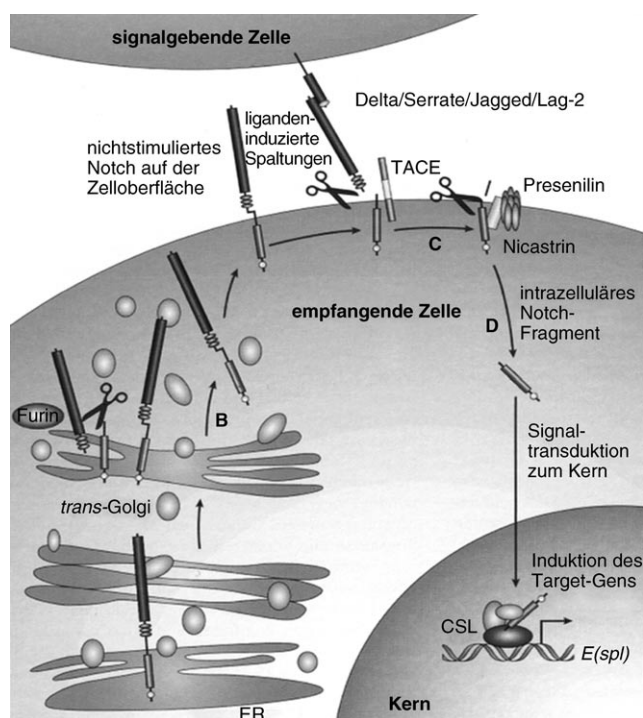
Eine im Endeffekt irreversible posttranslationale Modifikation ist die zweite Hauptkategorie von kovalenten Proteinmodifikationen: die proteolytische Spaltung von Peptidbindungen.

7. Kontrollierte Proteolyse

Der Lebenszyklus von Proteinen im Intra- oder Extrazellarraum eines Organismus wird durch die homöostatische Funktion von Proteasen gesteuert, die das kovalente Peptidrückgrat spalten und die Aminosäurebausteine dem Zellreservoir an freien Aminosäuren hinzufügen. Große Proteinuntergruppen der Eukaryotenzelle werden in einer Abfolge von mehreren proteolytischen Schritten als Teil des normalen räumlichen und zeitlichen Reifungsprozesses zerschnitten. Dieses kontrollierte proteolytische Schneiden von spezifischen Peptidsequenzen innerhalb einer gegebenen Proteinsubstratmenge führen Proteasen aus, deren Funktion im Allgemeinen nicht im Abbau-, sondern im Reifungs- und Formgebungsprozess liegt.

Bei nahezu jedem Protein, das in der eukaryotischen Zelle in das endoplasmatische Retikulum eintritt, wird eine N-terminale, 25–30 Aminosäuren lange Sequenz abgespalten. Dies ist die Signalsequenz, die den Zugang zum ER spezifiziert, und die Peptidasen sind Signalpeptidasen.^[99] An diesen ersten Reifungsschritt kann sich später im Sekretionskompartiment des Golgi- und *trans*-Golgi-Netzwerks die Wirkung von Proprotein-Konvertasen anschließen.^[100,101] Bestes Beispiel ist die Spaltung von Proinsulin zu Insulin, dessen beide Ketten durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Am Hormon Cholecystokinin finden sechs bis acht Spaltungen und proteolytische Prozesse statt, die das translatierte, 115 Aminosäuren lange Anfangsprodukt in das acht Aminosäuren lange, sulfatierte reife Hormon verwandeln.^[102]

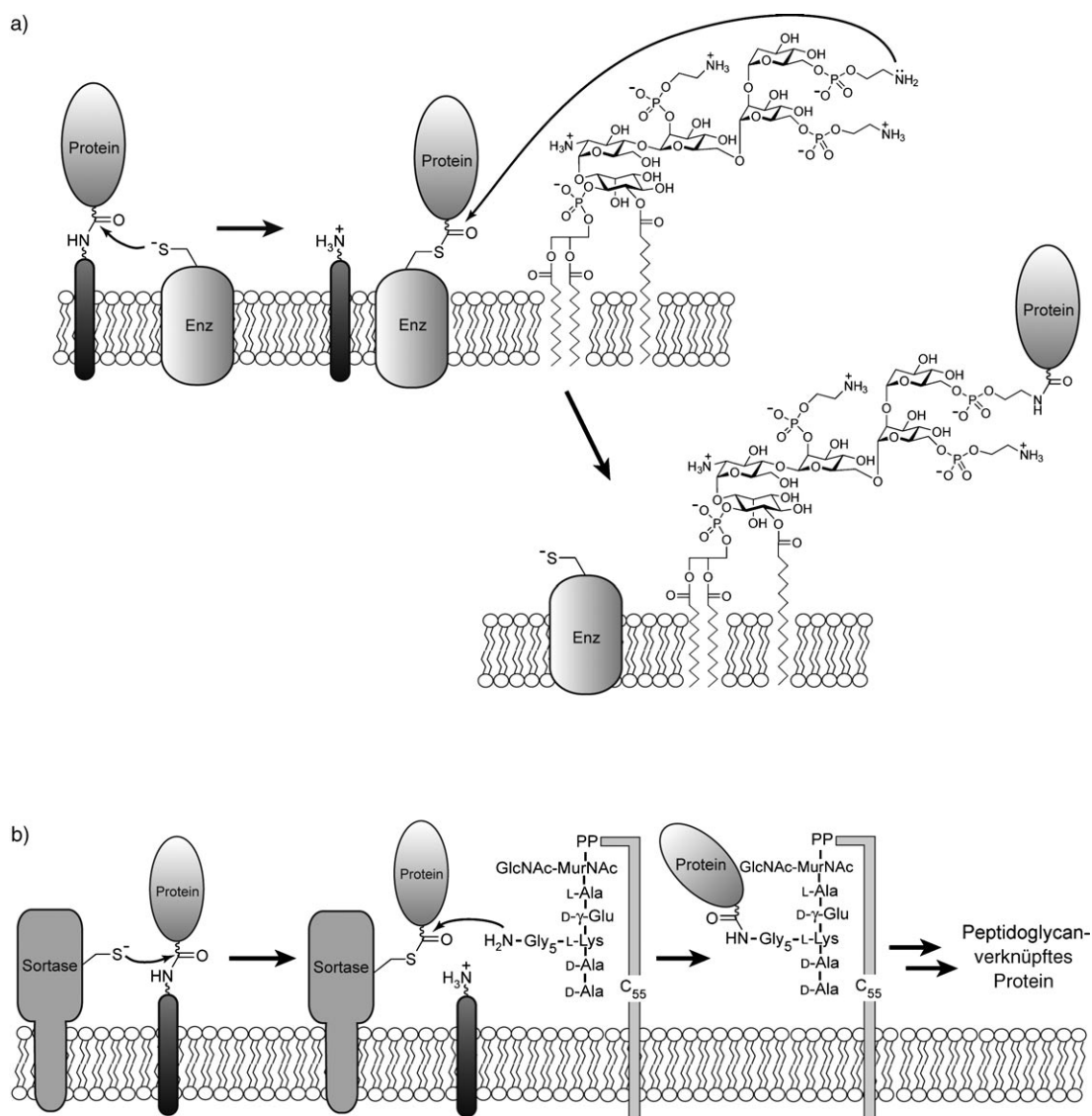
Die Reifung des O-Glycoproteins Notch durch limitierte Proteolyse verläuft in vier räumlich und zeitlich voneinander getrennten Stufen (Schema 30): 1) Abspaltung des Signalpeptids im ER; 2) Spaltung durch Proprotein-Konvertasen in zwei Untereinheiten, die auf ihrem Weg zur Zelloberfläche im *trans*-Golgi-Netzwerk weiterhin assoziiert bleiben; 3) Entfernung der Extrazellulardomäne an der Plasmamembran durch proteolytische Aktivität des Sheddase-Typs, die



Schema 30. Die Notch-Reifung durch vier sequenzielle proteolytische Spaltungen an spezifischen Stellen und spezifischen Orten in der eukaryotischen Zelle: A) Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids zur Sekretion in das ER (in der Abbildung nicht zu sehen); B) hydrolytisches Schneiden durch Proteinkonvertasen während der Passage durch den *trans*-Golgi-Apparat; C) hydrolytisches Schneiden durch eine Proteinscheddase an der Zelloberfläche; D) die regulierte Intramembranproteolyse setzt das cytoplasmatische Notch-Restprotein für seinen Rückweg zum Kern und seine dortige Funktion als Transkriptionsfaktor frei. Wiedergabe aus Lit. [121] mit Genehmigung.

durch das Anlagern von Proteinliganden ausgelöst wird; 4) regulierte Proteolyse innerhalb der Membran (regulated intramembrane proteolysis, RIP) des verkürzten Notch-Proteins.^[99,103,104] Der cytoplasmatische Proteinstummel von Notch, von dem nur wenige Aminosäuren in der Vesikelmembran verbleiben, wird nun zurück ins Cytoplasma freigesetzt, kann in das Kernkompartiment eindringen, dort mit Partnerproteinen assoziieren und so seine Funktion als selektiver Transkriptionsaktivator ausführen. Die Abfolge von vier räumlich und zeitlich getrennten Stufen limitierter Proteolyse steuert den Aufenthaltsort und die Aktivität von Notch. Notch wird durch das ER und den Golgi-Komplex zur Zelloberfläche gebracht, fungiert dort als Oberflächenrezeptor und wird als Fragment wieder ins Cytoplasma freigesetzt, um dort nach Erreichen des Kerns seine transkriptionsaktivierende Funktion auszuüben. Es gibt zweifellos noch viele weitere Beispiele von mehrstufigen Proteaseprozessen, mit denen der Aufenthaltsort und die Funktion der Zielproteine sowie ihre Lebensdauer in der Zelle reguliert werden.

Eine Variante der kontrollierten Proteolyse ist die Abtrennung eines kurzen C-terminalen Peptids vom Proteinsubstrat durch proteaseartige Katalysatoren mit der kovalenten Zwischenstufe Proteinyll-S-Cys-Enzym (Schema 31).



Schema 31. Proteaseartige Katalysatoren verwenden Cys-Reste als Nucleophile im aktiven Zentrum, mit denen sie über eine Acyl-S-Cys-Enzym-Zwischenstufe Acylfragmente aus Substratproteinen auf nicht proteingebundene Aminrezeptoren übertragen: a) Anheftung des GPI-Ankers durch enzymatische Transamidierung; b) Präsentation und Anbindung von Proteinen an Peptidoglycaneinheiten im Zellwandensemble von *Staphylococcus aureus* durch Transamidierung durch das Enzym Sortase.

Beim Übertragen einer Proteinacylgruppe wird dabei zunächst der Lipid-GPI-Anker als Cosubstrat an das eukaryotische Protein gekuppelt. Eine Ethanolaminygruppe im GPI-Anker fängt dann spezifisch die Acylgruppe ab,^[105] was letztlich bedeutet, dass das C-terminale Peptid vom Anfangsprodukt der Translation auf den GPI-Anker „umschaltet“. Bei den bakteriellen Sortasen^[106] ist das nucleophile Amin, das die Staphylokokkenproteine abfangen soll, um sie als Antigene an der Zelloberfläche der Bakterien zu präsentieren, ein Gly- oder Ala-NH₂-Terminus, der aus Vernetzungen in der Peptidoglycanschicht von Zellwänden stammt. Beide hier behandelten C-terminalen Modifikationen sind letztlich Transamidierungen mit einem Amin als angreifendem Nucleophil, weshalb auch ein Aminolyseprodukt entsteht, anstelle des Hydrolyseprodukts Wasser.

8. Selbstspaltungen und Umlagerungen von Peptidbindungen

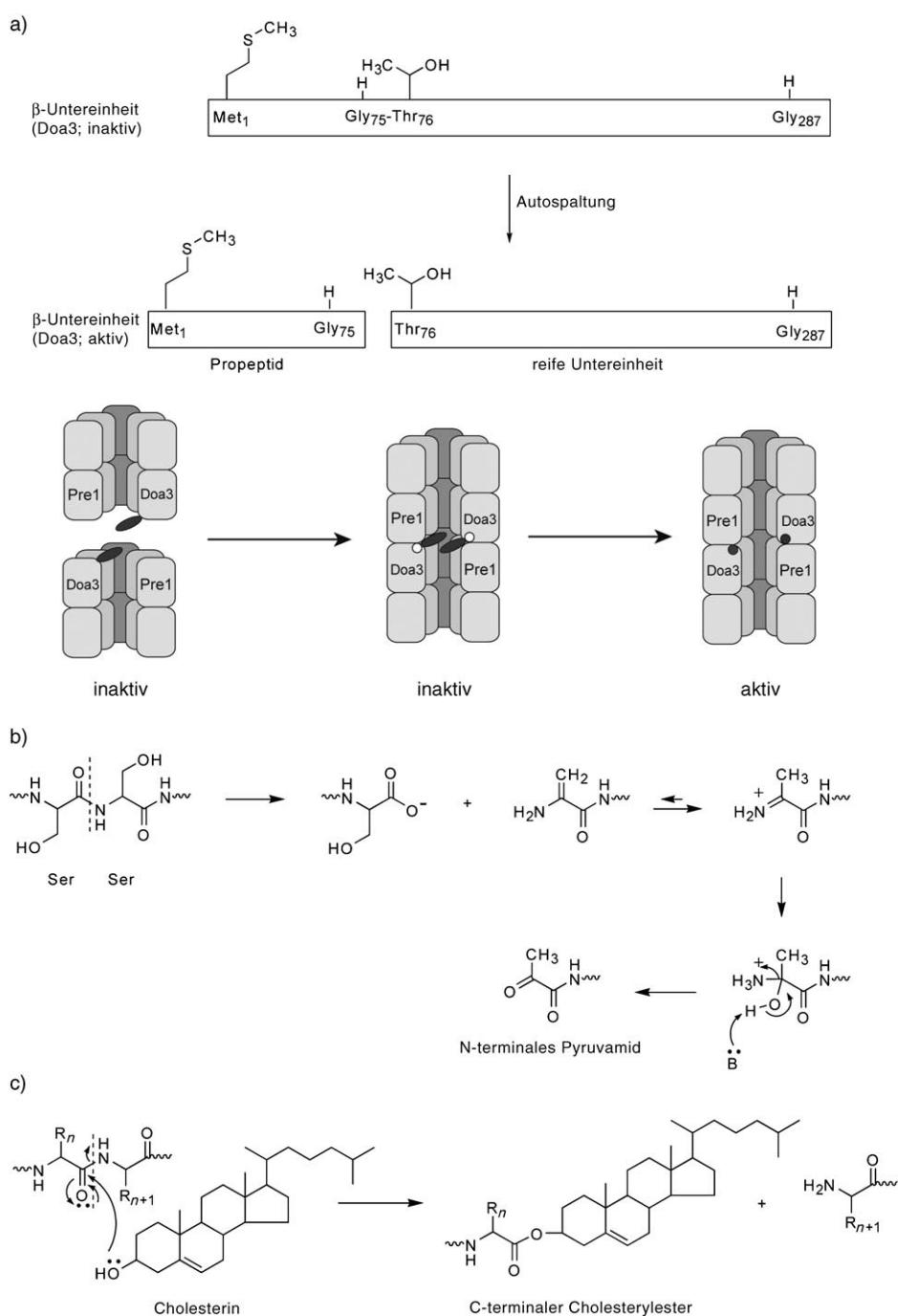
Ein ganzes Bündel von Prozessen beschreibt die autokatalytische Umlagerung von einer oder mehreren spezifischen Peptidbindungen im Proteinrückgrat eines schon gefalteten Proteins. Meistens führen die Prozesse zur Spaltung dieser spezifischen Peptidbindungen. Je nach abfängendem Nucleophil erfährt das aus dem selbstspaltenden Peptid stammende Acylfragment ein unterschiedliches Schicksal. Wasser als Cosubstrat führt zur Hydrolyse. Bei einem Alkohol als Cosubstrat ist das Produkt ein Ester, wie das Beispiel des N-terminalen Fragments des Hedgehog-Proteins zeigt, das von Cholesterin abgefangen wird. Wenn das Abfangereagens ein stromabwärts liegendes Amin des gleichen Proteins ist, re-

sultiert letztlich ein Proteinspleißen, obwohl die Abfangreaktion, wie weiter unten ausgeführt, indirekt verläuft. Erwähnenswert ist, dass allen drei Abfangprozessen ein bestimmter Zwischenprodukttyp gemeinsam ist.

Für die zweite Hauptvariante der autokatalytischen Rückgratumlagerungen gibt es zwei Kontexte, die in Abschnitt 9 erläutert werden. Einer ist die Selbstüberführung einer Tripeptideinheit in das hoch konjugierte aromatische Fluorophor des grünen Fluoreszenzproteins und seiner Verwandten. Bei der zweiten Umlagerungsart wird ein im aktiven Zentrum der Proformen von Phenylalanin- und Histidin-Desaminasen befindliches Tripeptid zum Cofaktor Imidazolium umgewandelt, der bei der Wirkung von Desaminasen als Elektronensenke dient.

8.1. Selbstspaltung von spezifischen Peptidbindungen bei der Aktivierung von Proteinvorstufen

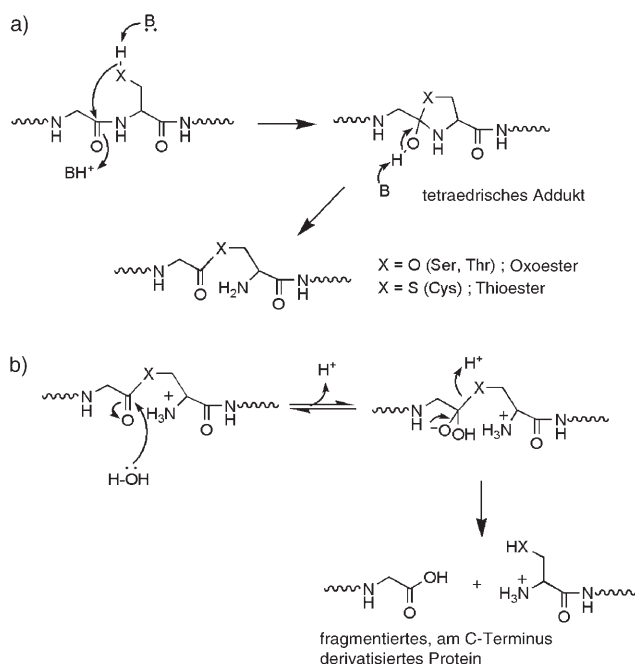
Eine kleine Untergruppe von fertig gefalteten Proteinen ist in der Lage, sich selbst durch Hydrolyse einer spezifischen Peptidbindung von einem einzelsträngigen inaktiven Vorstufenprotein in eine doppelsträngige aktive Form umzuwandeln. (Schema 32). Drei Varianten der autoproteolytischen Aktivierung sollen als Beispiele betrachtet werden: 1) Spaltung der einzelsträngigen Vorstufe der β -Untereinheit des Proteasoms; 2) Spaltung und Freilegung einer N-terminalen Pyruvamidgruppe in der Aspartat- α -Decarboxylase; 3) Spaltung und Aktivierung der Hedgehog-Proteine durch Alkoholyse der Peptidbindung mithilfe von Cholesterin. Bei allen drei Enzymen greift die Seitenkette von Ser-, Thr- oder Cys-Resten eine peptidische Carbonylfunktion an, die in unmittelbarer Nachbarschaft stromaufwärts liegt, wodurch ein fünfgliedriges tetraedrisches Addukt entsteht (Schema 33). Die Protonierung dieses Addukts am Stickstoff mit anschließender Spaltung der C-N-Bindung führt zur Ringöffnung und damit einhergehend zur Spaltung der Peptidbindung. Die beiden Kettenstücke sind nach wie vor miteinander verbunden, und zwar durch O-Ester- (Ser, Thr) oder S-Thioester-Verbrückungen (Cys). Dieses Strukturmotiv ist allen drei Beispielen gemeinsam. Die O-Ester- oder S-Thioesterbindung ist jetzt anfällig dafür, auch durch relativ schwache Nucleophile wie



Schema 32. Autoproteolyse an spezifischen Peptidbindungen; die entstehenden Proteinfragmente sind die aktiven Enzymformen: a) Durch die Selbstspaltung der Vorstufe der β -Untereinheit des Proteasoms wird Thr als katalytisch wirksames Nucleophil freigesetzt; b) durch die Selbstspaltung der Vorstufe der Aspartatdecarboxylase wird eine N-terminale Pyruvamidfunktion als Elektronensenke generiert; c) durch die Selbstspaltung des Hedgehog-Vorstufenproteins mit anschließender Abfangreaktion durch die 3-OH-Gruppe von Cholesterin wird das N-terminale Fragment als membrangebundener Cholesterylester erzeugt.

Wasser, Cholesterinalkohol oder von stromabwärts gelegenen Ser- und Cys-Seitenketten abgefangen zu werden.

Das Proteasom ist als vierschichtiger Zylinder $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ organisiert.^[107] Bei Hefe sind in jedem Siebennerring drei von sieben β -Untereinheiten aktiv, was aus der Selbstspaltung des β -Vorstufenstrangs an der Position Gly₇₅–Thr₇₆ und der Frei-

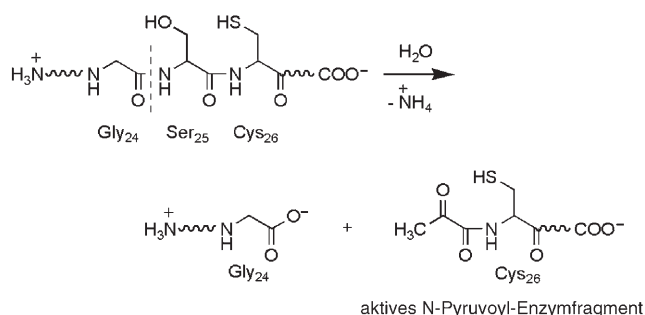


Schema 33. a) Der Selbstspaltungsmechanismus von Peptidbindungen verläuft über ein tetraedrisches cyclisches Addukt, das beim Angriff einer nucleophilen Seitenkette auf die unmittelbar stromaufwärts gelegene Peptidbindung gebildet wird. Das Addukt wird durch die Spaltung der C-N-Bindung wieder aufgelöst, wobei die ursprüngliche Peptidbindung gebrochen und eine Oxo- oder Thioesterbindung geschlossen wird. b) Der Ester kann durch eine Reihe von Nucleophilen abgefangen werden, einschließlich Wasser.

legung von Thr als neuer N-Terminus hervorgeht.^[108–110] Eingeleitet wird die Spaltung durch den Angriff der Thr₇₆-Seitenkette auf die benachbarte Carbonylfunktion, wodurch die jetzt freie Aminfunktion des neuen Thr₁ als Nucleophil für die katalytische Proteinsubstratspaltung eingerichtet wird. Dieser Mechanismus erklärt, warum das Vorstufenprotein inaktiv sein muss.^[111] Die β -Untereinheit des Proteasoms gehört zu einer Klasse von mehreren Proenzymen, die das N-terminale Nucleophil als katalytische Einheit durch Selbstspaltung freisetzen.^[109]

Bei einer verwandten Klasse von Enzymvorstufen leitet die CH₂OH-Gruppe eines Serinrestes die Spaltung an einer Carbonylfunktion ein, die wegen der Faltung nicht weit entfernt lokalisiert ist. Wie oben schon ausgeführt, lagert sich das tetraedrische Addukt unter Spaltung der ursprünglichen C-N-Peptidbindung zu einem O-Ester um. Nach Abspaltung der RO-Gruppe von diesem Ester resultiert am N-Terminus des stromabwärts gelegenen Stranges des zweisträngigen Produkts ein Dehydroalaninrest (Schema 34).^[109] Nach Hydratisierung und Ketonisierung bildet sich am N-Terminus des aktiven Enzyms eine Pyruvamidgruppe. Dieser gerichtete autoproteolytische Prozess bringt eine Ketoneinheit hervor, die den N-Terminus elektrophil macht, statt nucleophil wie in den vorigen Beispielen. Der N-Terminus, das aktive Zentrum des Enzyms, fungiert folglich für das Substrat Aspartat als Elektronensenke. Nach Decarboxylierung des neu entstandenen Aspartyl-Imino-Enzymkomplexes und anschließender Hydrolyse des gebundenen Iminprodukts resultiert β -Alanin,

Aspartat-Decarboxylase aus *E. coli*



Schema 34. Nach der Selbstspaltung von Peptiden an einer X-Ser-Verknüpfung folgt eine Eliminierung der Ser- β -OH-Gruppe und eine Tautomerisierung zur N-terminalen Pyruvamidgruppe. Diese Gruppe wirkt als Elektronensenke und bildet mit Aminosäuresubstraten ein Imin, das Carbanionen den Zugang erleichtert (im Beispiel Decarboxylierung von Asp).

ein bei der CoASH-Biosynthese benötigtes Zwischenprodukt.^[112]

Das dritte Beispiel für die Autoproteolyse eines Vorstufenproteins ist die Reifung des Hedgehog-Proteins, das in der Membranebene der eukaryotischen Plasmamembran frei diffundieren muss, um seine Signalgebungsfunktion auszuüben. Das Protein ist kovalent an die Membran durch einen C-terminalen Lipidanker gebunden, hier durch die Veresterung einer Cholesterineinheit mit der C-terminalen Carboxylfunktion.^[113] Diese Esterbrücke stammt aus dem Selbstspaltungsintermediat, das schon in den ersten beiden Beispielen vorkam. Der Umlagerungsmechanismus, mit dem die Peptidbindung im Vorstufenprotein zu einem Oxoester umgewandelt wird, ist identisch wie in den vorigen zwei Beispielen. Im vorliegenden Fall wird aber das Acylfragment aus dem Vorstufenprotein nicht von Wasser abgefangen (Hydrolyse), vielmehr bindet nun Cholesterin an eine spezifische Bindungsstelle. Das kinetisch bevorzugte Nucleophil ist die 3'-OH-Funktion von Cholesterin, und aus der Cholesterolyse geht als biologisch aktives Produkt ein Peptidylcholesterinester hervor (Schema 32c).

Diese drei Selbstspaltungsvarianten von fertig gefalteten Vorstufenproteinen (Schema 32) führen entweder zu a) zwei gewöhnlichen Peptidfragmenten, b) einem stromabwärts gelegenen Fragment mit N-terminaler Pyruvamidgruppe oder c) einem stromaufwärts gelegenen Fragment mit C-terminalem Cholesterinester. Dies verdeutlicht die Vielseitigkeit dieses Reaktionswegs, bei dem die Autokatalyse aus einer Peptidbindung ein gemeinsames Zwischenprodukt hervorbringt und die Umlagerung dieses Zwischenprodukts zum Ester als Endprodukt selektiv gesteuert wird. Bei allen drei Beispielen verläuft die Fragmentierung der Peptidbindung irreversibel.

8.2. Selbstspaltung und Religation: Proteinspleißen

Bei der letzten Selbstspaltungsvariante eines Vorstufenproteins wird der als Zwischenprodukt entstehende Ester (oder Thioester, wenn die Thiofunktion von Cys die be-

nachbarte stromaufwärts gelegene Peptidbindung angreift) durch ein intramolekulares Nucleophil abgefangen, statt durch externes HOH oder ROH. Als interne Nucleophile fungieren die in der gefalteten stromabwärts gelegenen Domäne des Vorstufenproteins befindlichen Seitenketten von Ser, Thr oder Cys. Dieser Vorgang ist das Prinzip des Proteinspleißens, d.h. der Selbstspaltung und Religation von Peptidbindungen, wie es von über 100 Bakterien- und Hefeproteinen einschließlich der DNA-Polymerasen und ATPasen praktiziert wird.^[109,114] Zunächst wird die Peptidbindung an der Kreuzungsstelle des stromaufwärts gelegenen Bereichs von Extein und Intein gespalten, und es entsteht als Zwischenprodukt ein Extein₁-Intein-O-Ester. Diesen Ester fängt das an der Intein-Extein₂-Grenze lokalisierte interne Nucleophil ab (Schema 35), wobei ein Zwischenprodukt mit Lariatstruktur erzeugt wird. Die Teilnahme einer am stromabwärts gelegenen Ende von Intein lokalisierten Asn-Seitenkette vollendet die Exzision von Intein, und nach Auflösung der Lariatstruktur resultiert als neues Zwischenprodukt wiederum ein Ester (Thioester). Da die Verschiebung von Acyl-O oder Acyl-S zu Acyl-N thermodynamisch begünstigt ist, bildet sich zwischen Extein₁ und Extein₂ wieder eine Peptidbindung.

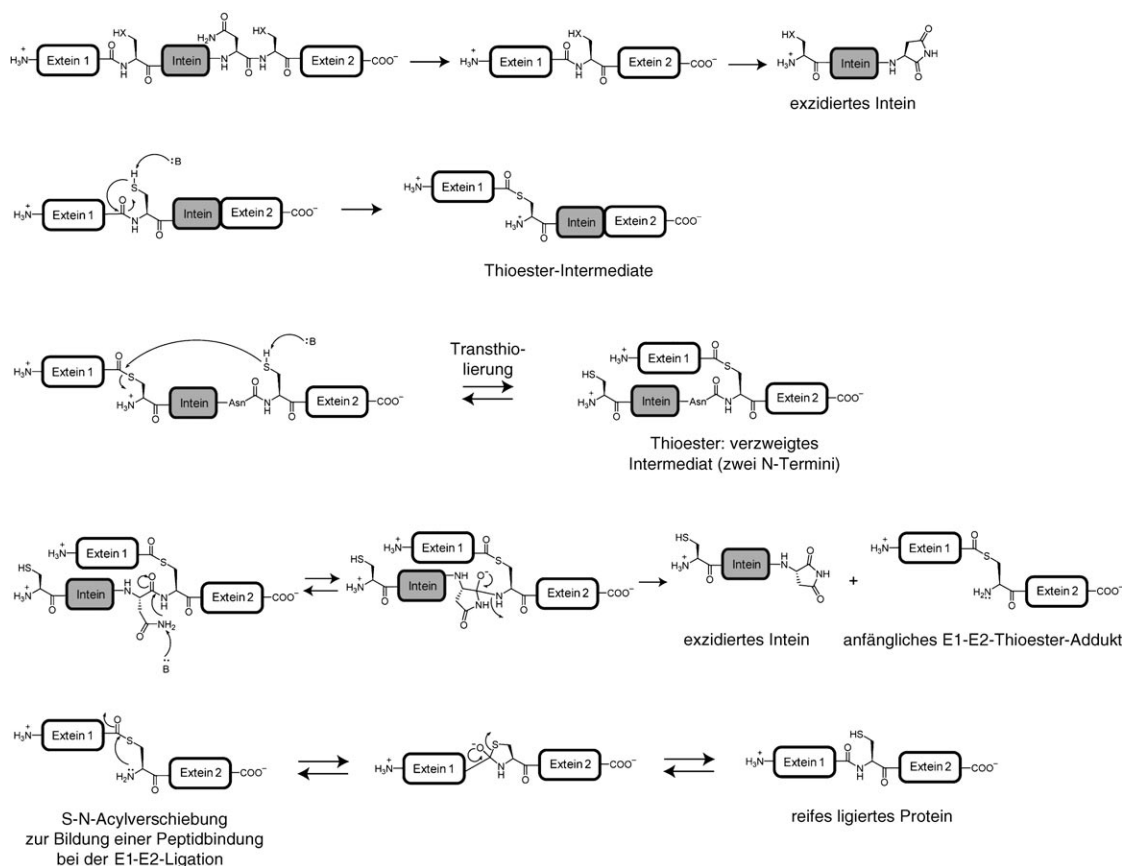
Evolutionär gesehen ist diese Proteinbiochemie alt (sie wird bei Proteinen aus *Archaea* angetroffen) und könnte der Urahn der anderen in diesem Abschnitt beschriebenen

Selbstspaltungen sein. Die bemerkenswerte Eigenschaft der Peptidbindungsspaltung ist ihre Reversibilität, die in den besonderen Strukturgegebenheiten der gefalteten Zwischenprodukte begründet liegt. Die Struktur ist so angelegt, dass die intramolekulare Acylübertragung während des Spleißens nicht durch das starke Nucleophil Wasser gestört wird. In dem Maße, wie es sich hier um „alte“ Proteinchemie handelt, müssen folgerichtig die Acyloxoester und Acylthioester als uranfängliche Zwischenprodukte bei Proteinreaktionen fungiert haben, und noch immer sind sie häufig bei den posttranslationalen Proteinreifungsreaktionen anzutreffen. Das Proteinspleißen findet außerdem viele praktische Anwendungen, so etwa bei der Modifikation von rekombinanten Proteinen mit synthetischen Peptiden durch Proteinligation.^[109,115]

9. Umlagerungen von Peptidbindungen ohne Selbstspaltung

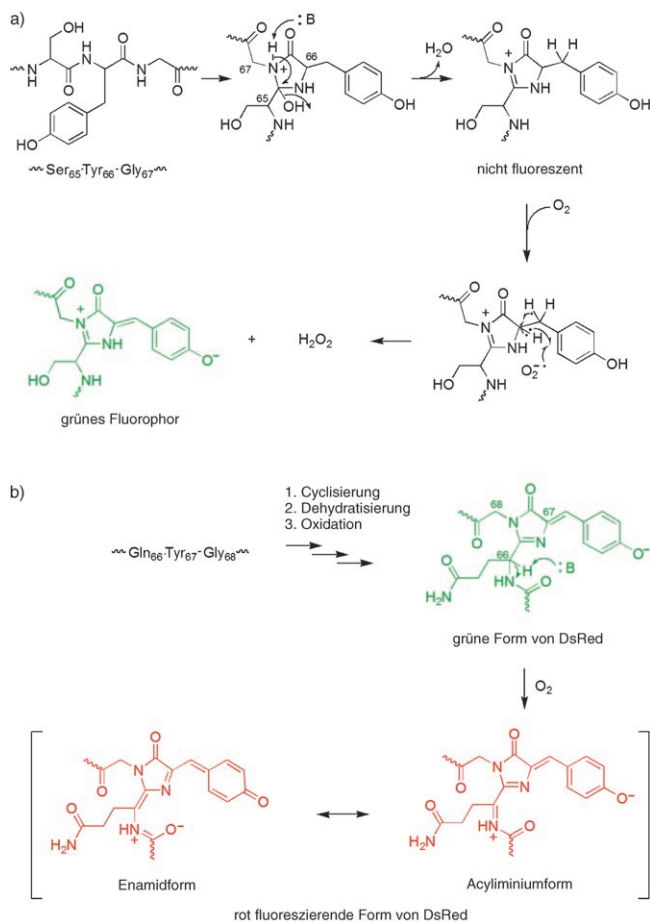
9.1. Bildung des Fluorophors im grünen Fluoreszenzprotein (GFP)

Eine spektakuläre Klasse von autokatalytischen posttranslationalen Umlagerungen des Peptidrückgrats gefalteter Proteine ist die Reifung von Chromoproteinen wie dem



Schema 35. Selbstspaltung, Exzision von Intein und Religation des Peptids während des Proteinspleißens: Nach Bildung des Thioesters während der Selbstspaltung der Peptidbindung folgt eine Transthiolierung auf das an der Intein-Extein₂-Grenze lokalisierte Cystein. Das Zwischenprodukt mit Lariatstruktur reagiert unter Beteiligung des am C-Terminus von Intein lokalisierten Asn weiter. Der resultierende Thioester bildet die Peptidbindung zwischen Extein₁-Extein₂ durch S-N-Acylverschiebung wieder zurück.

grünen und dem roten Fluoreszenzprotein (Schema 36a).^[116] Das Vorstufenprotein faltet sich in eine β -Zylinderstruktur, und nur in der nativen Konformation kann die Chromophorbildung stattfinden. In der gefalteten GFP-Vorstufe liegt



Schema 36. a) Umwandlung der Vorstufe des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) zur grün fluoreszierenden Form durch autokatalytische Umlagerung des Tripeptids $\text{Ser}_{65}\text{Tyr}_{66}\text{Gly}_{67}$: Nach Bildung eines cyclischen tetraedrischen Addukts und dessen Dehydratisierung entsteht ein noch nicht fluoreszierender Heterocyclus. Vervollständigt wird die Fluorophorbildung durch langsame, sauerstoffabhängige Oxidation, die das konjugierte System erweitert und das Tyr-Chromophor mit dem Heterocyclus in Konjugation bringt; b) Das Protein DsRed aus Korallen ist ein ähnliches Protein und enthält als Fluorophor statt der SerTyrGly -Sequenz das Tripeptid $\text{Gln}_{66}\text{Tyr}_{67}\text{Gly}_{68}$. Der Weg zur endgültigen roten Form verläuft über eine grüne Zwischenstufe.

die Tripeptidschleife $\text{Ser}_{65}\text{Tyr}_{66}\text{Gly}_{67}$ in sterisch komprimierter Form vor, die den Angriff der NH -Funktion des Gly_{67} -Amids an die benachbarte Peptidcarbonylfunktion ermöglicht. Daraus resultiert ein fünfgliedriges tetraedrisches Addukt, das an die Anfangsreaktionen der Umlagerungen von Abschnitt 8 erinnert. Dieses Addukt wird zu einer stabilen cyclischen Spezies dehydratisiert, die langsam unter Bildung einer mit dem Phenolring von Tyr_{66} konjugierten Doppelbindung autooxidiert. Bei diesem letzten oxidativen Schritt entsteht das Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 506 nm und grüner Fluoreszenz, die von bestimmten Coelenteraten (Hohltieren) zur Energiespeicherung genutzt

werden. Bei verwandten Coelenteraten findet sich eine ähnliche Vorstufe mit der Anfangstripeptidsequenz QYG, aus der nach Umlagerung und oxidativer Reifung das DsRed-Fluorophor hervorgeht (Schema 36b).^[117] Fluorophore mit veränderten Farbtönen, einschließlich Cyan und Gold, wurden durch Protein-Engineering und evolutionsmimetische Verfahren hergestellt und in Untersuchungen des resonanten Fluoreszenzenergietransfers zwischen Paaren von GFP-Varianten genutzt.

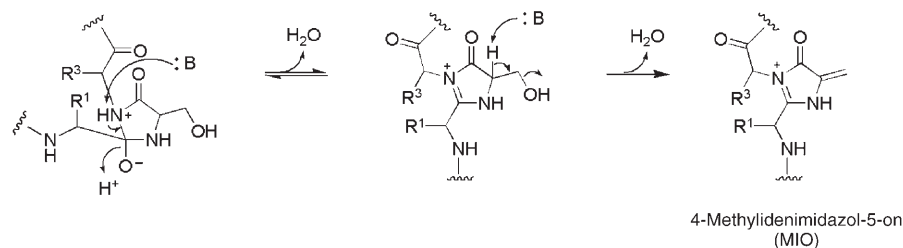
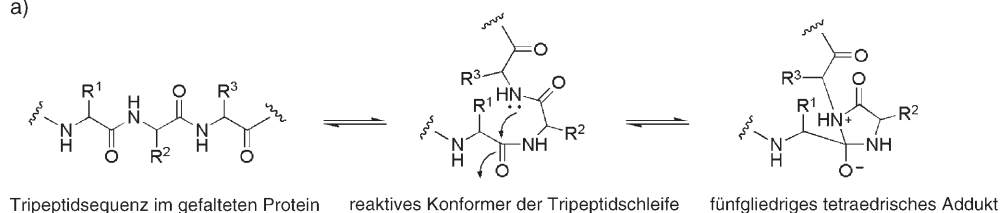
9.2. Das Methylenimidazonchromophor

In einer Schleife der gefalteten Proenzymform der Phenylalanin- und Histidin-Desaminasen ist ein ähnliches Tripeptidsequon lokalisiert, das mit einer verwandten Umlagerung einen Imidazonring erzeugt, der dann bei der Desaminierung des Amins substrats als ein im aktiven Zentrum lokalisierter Elektrophil fungiert (Schema 37a).^[118,119] Bei der Histidin-Desaminase aus *Pseudomonas* wandelt sich das in einer Schleife lokalisierte Tripeptid $\text{Ala}_{142}\text{Ser}_{143}\text{Gly}_{144}$ in einen kompakten Heterocyclus um, wobei vermutlich der Stickstoff von Gly_{144} die Carbonylfunktion von Ala_{142} angreift. Das cyclische tetraedrische Addukt gibt ein Wassermolekül ab und bildet die $\text{C}=\text{N}$ -Bindung des Imidazolons. Unter Verlust der OH -Gruppe aus der Ser_{143} -Seitenkette wird die neue Doppelbindung in Konjugation gebracht und die prosthetische Gruppe 4-Methylen-5-imidazon (MIO) hergestellt. Dieses Bündel an Transformationen macht aus einer Tripeptidschleife einen elektrophilen heterocyclischen Cofaktor und stellt somit das aktive Enzym her. Im reifen, aktiven Enzym kann der MIO-Heterocyclus durch ein Amins substrat angegriffen werden, worauf zunächst das H_β abgespalten wird und dann nach Ammoniak-Eliminierung Urocaninsäure sowie der Cofaktor mit nach wie vor gebundener Aminfunktion gebildet werden (Schema 37b). Nach der Freisetzung von NH_3 steht somit der MIO-Cofaktor wieder für den nächsten Katalysezyklus bereit.^[120]

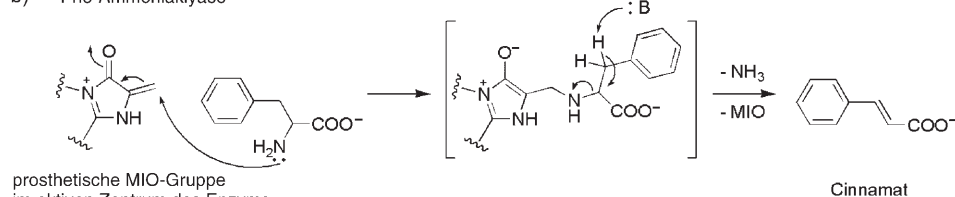
10. Schlussfolgerungen

Dieser Aufsatz über posttranslationale Proteinmodifikationen hat nicht den Anspruch, die mehr als 200 bekannten kovalenten Modifikationen erschöpfend zu behandeln (siehe Lit. [3] für eine breitere Übersicht). Schwerpunktmäßig interessiert uns vielmehr, wie chemische Gruppen verbreiteter Cofaktoren und Coenzyme an die Seitenketten von 15 der 20 proteinogenen Aminosäuren angefügt werden und so das Proteom strukturell und funktional erweitern. Die Kapazitäten des ursprünglichen, genetisch codierten Proteininventars werden so drastisch erweitert. Modifizierte Proteine haben vielseitigere Möglichkeiten in der Katalyse, beim Auslösen und Beenden von Signalkaskaden, bei der Informationsintegration an vielen metabolischen Schnittstellen und bei der Veränderung zellulärer Adressen. Die posttranslationale Proteomdiversifizierung kann die molekularen Mechanismen beleuchten, die hinter dem epigenetischen Erwerb von neuen Proteinfunktionen stecken.

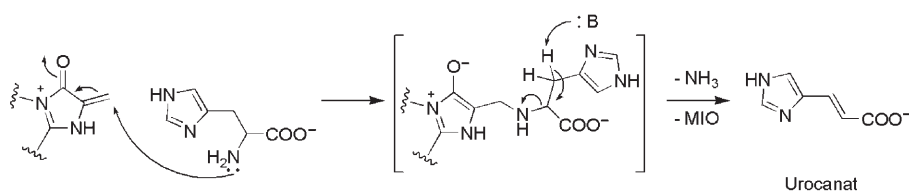
a)



b) Phe-Ammoniaklyase



His-Ammoniaklyase



Schema 37. a) Bei der Selbstaktivierung von Histidin- und Phenylalanin-Ammoniaklyasen wird analog zur GFP-Reifung eine Tripeptidschleife umgelagert. Ala₁₄₂Ser₁₄₃Gly₁₄₄ lagert sich zu dem kompakten Heterocyclus 4-Methylen-5-imidazol-5-on (MIO) um; b) MIO ist ein elektrophiler Cofaktor und wird von den Aminogruppen von Phe oder His angegriffen. Daran schließt sich eine α,β -Eliminierung von NH₂ und H zu Ammoniak und den olefinischen, desaminierten Säuren Urocaninsäure und Zimtsäure an.

Die Präzision, mit der die Proteasen spezifische Peptidbindungen von ausgewählten Proteinsubstraten schneiden – speziell von solchen, die gerade die Sekretionskompartimente passieren –, macht deutlich, dass die Proteasen nicht als „stumpfe Werkzeuge“ des Zellkontrollsystems anzusehen sind. Der Umstand, dass Proteine während ihres Lebenszyklus durch aufeinander folgende Runden limitierter Proteolyse an die Zelloberfläche sekretiert, dort von Liganden empfangen und wieder zum Kern zurückgeschickt werden, zeigt, wie ausgeklügelt die molekularen Mechanismen bei der Proteolyse der Vorstufenproteine arbeiten.

Proteine helfen sich selbst beim Aufbau von neuen funktionalen Gruppen. Gefaltete Proteinvorstufen weisen die bemerkenswerte Fähigkeit auf, für katalytische Aktivitäten oder den Einfang von Lichtenergie autokatalytisch Peptidschleifen in cyclische Derivate umzuwandeln. Durch kontrollierte autokatalytische Spaltungen, eine wahrscheinlich rudimentäre Fähigkeit von Proteinen, werden N-terminale Nucleophile, N-terminale Elektrophile (Pyruamidgruppen)

und C-terminale Cholesterinester aufgebaut, wobei gemeinsame Zwischenprodukte verschiedene Abbauewege nehmen. Das Ergebnis dieser Selbstspaltungsprozesse ist dann die fehlerfreie Religation während des Proteinspleißens, bei dem das Protein durch Intein-Exzision und In-Frame-Selbstsplicing von Extein von der inaktiven Vorstufe in die reife Form überführt wird. Das Spleißen war wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus zum Shuffling von Proteindomänen innerhalb eines Proteins als Teil der evolutionären Entwicklung von Multidomänenproteinen.

Proteine können an mehreren Resten durch die gleiche chemische Gruppe posttranslational modifiziert werden. Beispiele sind die elf Phosphorylierungen an Abl und die fünf C-terminalen Acetylierungen von p53. Auch mehrere unterschiedliche Gruppen können als Tandemmodifikation in ein Protein eingeführt werden, z.B. zwei Lipidierungen mit anschließender regiospezifischer Proteolyse und C-terminaler O-Methylierung am Ras-Protein oder die Mehrfachmodifikationen am Rho-Protein durch Bakterientoxine, die das Cytoskelett von eukaryotischen Zellen zerstören. Die präzise koordinierte Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung der Histon-Enden im Nucleosom verdeutlicht, wie fein abgestimmt die molekularen Mechanismen

posttranslationaler Proteinmodifikationen zur Steuerung der Genexpression sein müssen.

Mit dem Aufkommen vieler Varianten der hochauflösenden Massenspektrometrie können nun kovalente Veränderungen in Proteinen außerhalb der genetisch codierten Sequenz nachgewiesen und lokalisiert werden. Eine Katalogisierung der Proteinvarianten, die in den verschiedenen Subproteomen vorhanden sind (im Phosphoproteom, im ubiquitinierten Proteom und bei den molekularen Modifikationsvarianten der Histone im Nucleosom, die zu unterschiedlicher Transkriptionsaktivität führen), liefert stets wichtige Parameter, die zur vollständigen Beschreibung der Proteinzusammensetzung des Proteoms hilfreich sind.

Wir danken M. Fischbach für seine Unterstützung bei der Erstellung des Vortitels.

Eingegangen am 21. März 2005

Online veröffentlicht am 3. November 2005

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Krefeld

- [1] D. L. Black, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 291–336.
- [2] T. Maniatis, B. Tasic, *Nature* **2002**, 418, 236–243.
- [3] C. Walsh, *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory*, B. Roberts, Colorado, **2005**.
- [4] M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 261–268.
- [5] J. A. Hoch, T. J. Silhavy, *Two Component Signal Transduction*, ASM, Washington, **1995**.
- [6] A. Rodrigue, Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, M. Foglino, *Trends Microbiol.* **2000**, 8, 498–504.
- [7] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, 298, 1912–1934.
- [8] L. N. Johnson, R. J. Lewis, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2209–2242.
- [9] K. Zhang, K. E. Williams, L. Huang, P. Yau, J. S. Siino, E. M. Bradbury, P. R. Jones, M. J. Minch, A. L. Burlingame, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1, 500–508.
- [10] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1451, 1–16.
- [11] M. J. Bijlmakers, M. Marsh, *Trends Cell Biol.* **2003**, 13, 32–42.
- [12] C. L. Brooks, W. Gu, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, 15, 164–171.
- [13] M. Li, J. Luo, C. L. Brooks, W. Gu, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 50607–50611.
- [14] B. M. Turner, *Cell* **2002**, 111, 285–291.
- [15] D. R. Johnson, R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, J. I. Gordon, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 869–914.
- [16] S. McLaughlin, A. Aderem, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 272–276.
- [17] D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, M. Madhusudan, S. S. Taylor, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2243–2270.
- [18] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens, *Science* **2005**, 307, 1746–1752.
- [19] C. M. Pickart, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 503–533.
- [20] C. M. Pickart, R. E. Cohen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 177–187.
- [21] N. Zheng, B. A. Schulman, L. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper, N. P. Pavletich, *Nature* **2002**, 416, 703–709.
- [22] T. Cardozo, M. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 739–751.
- [23] J. D. Schnell, L. Hicke, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 35857–35860.
- [24] J. S. Bonifacino, L. M. Traub, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 395–447.
- [25] L. Hicke, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 195–201.
- [26] D. J. Katzmann, G. Odorizzi, S. D. Emr, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 893–905.
- [27] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425–479.
- [28] S. I. Reed, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 855–864.
- [29] A. W. Murray, *Cell* **2004**, 116, 221–234.
- [30] R. Marmorstein, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 303, 1–7.
- [31] R. Roskoski, Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 303, 1–7.
- [32] S. Khorasanizadeh, *Cell* **2004**, 116, 259–272.
- [33] C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco, **1979**.
- [34] J. A. Glomset, M. H. Gelb, C. C. Farnsworth, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 139–142.
- [35] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 241–269.
- [36] O. Pylypenko, A. Rak, R. Reents, A. Niculae, V. Sidorovitch, M. D. Cioaca, E. Bessolitsyna, N. H. Thoma, H. Waldmann, I. Schlichting, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Mol. Cell* **2003**, 11, 483–494.
- [37] A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsvelde, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, 302, 646–650.
- [38] A. Furmanek, J. Hofsteenge, *Acta Biochim. Pol.* **2000**, 47, 781–789.
- [39] Y. Mechref, M. V. Novotny, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 321–369.
- [40] A. Helenius, M. Aeby, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 1019–1049.
- [41] E. S. Trombetta, A. J. Parodi, *Adv. Protein Chem.* **2001**, 54, 303–344.
- [42] J. Roth, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 285–303.
- [43] E. S. Trombetta, A. J. Parodi, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, 19, 649–676.
- [44] P. M. Rudd, T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S. F. Wheeler, D. J. Harvey, M. R. Wormald, H. Serban, S. B. Prusiner, A. Kobata, R. A. Dwek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 13044–13049.
- [45] P. M. Rudd, A. H. Merry, M. R. Wormald, R. A. Dwek, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 578–586.
- [46] K. Vosseller, K. Sakabe, L. Wells, G. W. Hart, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 851–857.
- [47] D. J. Moloney, L. H. Shair, F. M. Lu, J. Xia, R. Locke, K. L. Matta, R. S. Haltiwanger, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 9604–9611.
- [48] D. J. Moloney, V. M. Panin, S. H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger, T. F. Vogt, *Nature* **2000**, 406, 369–375.
- [49] L. Wells, S. A. Whalen, G. W. Hart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 302, 435–441.
- [50] N. Haines, K. D. Irvine, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 786–797.
- [51] T. Okajima, A. Xu, K. D. Irvine, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 42340–42345.
- [52] N. M. Giles, A. B. Watts, G. I. Giles, F. H. Fry, J. A. Littlechild, C. Jacob, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 677–693.
- [53] C. Jacob, G. I. Giles, N. M. Giles, H. Sies, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4890–4907; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4742–4758.
- [54] P. T. L. Chivers, M. R. Raines, *Protein Disulfide Isomerase: Cellular Enzymology of the CXXC Motif*, Marcel Dekker, New York, **1998**, S. 487–505.
- [55] J. S. Stamler, S. Lamas, F. C. Fang, *Cell* **2001**, 106, 675–683.
- [56] M. Griffin, R. Casadio, C. M. Bergamini, *Biochem. J.* **2002**, 368, 377–396.
- [57] L. Lorand, R. M. Graham, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 140–156.
- [58] J. A. Vranka, L. Y. Sakai, H. P. Bachinger, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 23615–23621.
- [59] C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, *Nat. Med.* **2003**, 9, 677–684.
- [60] W. C. Hon, M. I. Wilson, K. Harlos, T. D. Claridge, C. J. Schofield, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Nature* **2002**, 417, 975–978.
- [61] L. A. McNeill, K. S. Hewitson, T. D. Claridge, J. F. Seibel, L. E. Horsfall, C. J. Schofield, *Biochem. J.* **2002**, 367, 571–575.
- [62] C. J. Schofield, P. J. Ratcliffe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 343–354.
- [63] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, P. J. Ratcliffe, *Nature* **1999**, 399, 271–275.
- [64] M. Ohh, C. W. Park, M. Ivan, M. A. Hoffman, T. Y. Kim, L. E. Huang, N. Pavletich, V. Chau, W. G. Kaelin, *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 423–427.
- [65] M. J. Ryle, R. P. Hausinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 193–201.
- [66] E. Chapman, M. D. Best, S. R. Hanson, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3610–3632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3526–3548.
- [67] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 426–450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 391–412.

- [68] M. Farzan, T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, H. Choe, *Cell* **1999**, 96, 667–676.
- [69] K. von Figura, A. Hasilik, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 167–193.
- [70] K. von Figura, B. Schmidt, T. Selmer, T. Dierks, *Bioessays* **1998**, 20, 505–510.
- [71] S. R. Hanson, M. D. Best, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5858–5886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5736–5763.
- [72] R. von Bulow, B. Schmidt, T. Dierks, K. von Figura, I. Uson, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 269–277.
- [73] *Bacterial Protein Toxins* (Hrsg.: K. Aktories, I. Just), Springer, Berlin, **2000**.
- [74] I. R. Vetter, F. Hofmann, S. Wohlgemuth, C. Herrmann, I. Just, *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 1091–1095.
- [75] M. Geyer, C. Wilde, J. Selzer, K. Aktories, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2003**, 42, 11951–11959.
- [76] G. Schmidt, P. Sehr, M. Wilm, J. Selzer, M. Mann, K. Aktories, *Nature* **1997**, 387, 725–729.
- [77] R. N. Perham, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 961–1004.
- [78] C. T. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM, Washington, **2003**.
- [79] B. Furie, B. A. Bouchard, B. C. Furie, *Blood* **1999**, 93, 1798–1808.
- [80] C. Shang, T. Shibahara, K. Hanada, Y. Iwafune, H. Hirano, *Biochemistry* **2004**, 43, 6281–6292.
- [81] S. B. Ficarro, M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J. Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, F. M. White, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 301–305.
- [82] 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.
- [83] H. Steen, M. Fernandez, S. Ghaffari, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2, 138–145.
- [84] J. J. Pesavento, Y.-B. Kim, G. K. Taylor, N. L. Kelleher, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3386–3387.
- [85] F. Shao, J. E. Dixon, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, 529, 79–84.
- [86] L. Izzi, L. Attisano, *Oncogene* **2004**, 23, 2071–2078.
- [87] J. B. Shabb, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2381–2411.
- [88] M. D. Jackson, J. M. Denu, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2313–2340.
- [89] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, 117, 699–711.
- [90] M. Mann, R. C. Hendrickson, A. Pandey, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 437–473.
- [91] M. Mann, O. N. Jensen, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 255–261.
- [92] H. H. Ng, A. Bird, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 121–126.
- [93] C. M. Grozinger, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 3–16.
- [94] A. A. Sauve, I. Celic, J. Avalos, H. Deng, J. D. Boeke, V. L. Schramm, *Biochemistry* **2001**, 40, 15456–15463.
- [95] A. A. Sauve, V. L. Schramm, *Biochemistry* **2003**, 42, 9249–9256.
- [96] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, *Cell* **2004**, 119, 941–953.
- [97] K. D. Wilkinson, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2000**, 11, 141–148.
- [98] T. Gan-Erdene, K. Nagamalleswari, L. Yin, K. Wu, Z. Q. Pan, K. D. Wilkinson, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 28892–28900.
- [99] M. Paetzel, A. Karla, N. C. J. Strynadka, R. E. Dalbey, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4549–4579.
- [100] S. S. Molloy, E. D. Anderson, F. Jean, G. Thomas, *Trends Cell Biol.* **1999**, 9, 28–35.
- [101] N. C. Rockwell, D. J. Krysan, T. Komiyama, R. S. Fuller, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4525–4548.
- [102] G. A. Eberlein, V. E. Eysselein, M. T. Davis, T. D. Lee, J. E. Shively, D. Grandt, W. Niebel, R. Williams, J. Moessner, J. Zeeh, H. E. Meyer, H. Goebell, J. R. Reeve, Jr., *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 1517–1521.
- [103] J. Arribas, A. Borroto, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4627–4638.
- [104] Y. Ye, M. E. Fortini, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2000**, 11, 211–221.
- [105] K. Ohishi, N. Inoue, Y. Maeda, J. Takeda, H. Riezman, T. Kinoshita, *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 1523–1533.
- [106] S. K. Mazmanian, H. Ton-That, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2001**, 40, 1049–1057.
- [107] D. Stock, P. M. Nederlof, E. Seemuller, W. Baumeister, R. Huber, J. Lowe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, 7, 376–385.
- [108] E. Seemuller, A. Lupas, W. Baumeister, *Nature* **1996**, 382, 468–471.
- [109] H. Paulus, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 447–496.
- [110] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBioChem* **2005**, 6, 222–256.
- [111] Y. D. Kwon, I. Nagy, P. D. Adams, W. Baumeister, B. K. Jap, *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 233–245.
- [112] A. Albert, V. Dhanaraj, U. Genschel, G. Khan, M. K. Ramjee, R. Pulido, B. L. Sibanda, F. von Delft, M. Witty, T. L. Blundell, A. G. Smith, C. Abell, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 289–293.
- [113] J. A. Porter, S. C. Ekker, W. J. Park, D. P. von Kessler, K. E. Young, C. H. Chen, Y. Ma, A. S. Woods, R. J. Cotter, E. V. Koonin, P. A. Beachy, *Cell* **1996**, 86, 21–34.
- [114] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458–476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 450–466.
- [115] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705–6710.
- [116] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509–544.
- [117] D. Yarbrough, R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 462–467.
- [118] M. Baedeker, G. E. Schulz, *Structure* **2002**, 10, 61–67.
- [119] T. F. Schwede, J. Retey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, 38, 5355–5361.
- [120] J. C. Calabrese, D. B. Jordan, A. Boodhoo, S. Sariaslani, T. Vannelli, *Biochemistry* **2004**, 43, 11403–11416.
- [121] M. E. Fortini, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 673–684.
- [122] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950.