



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Manipulations of the ubiquitin proteasome system and their effects on antigen presentation

Groothuis, T.A.M.

Citation

Groothuis, T. A. M. (2006, November 1). *Manipulations of the ubiquitin proteasome system and their effects on antigen presentation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4956>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4956>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary and Discussion

Surgery is the most effective cancer therapy, followed by radiotherapy. These techniques usually target tumour specific tissue only, unlike most forms of chemotherapy as is best illustrated by the relatively moderate side effects of such treatments. When the immune system could find and destroy tumour cells, they (and their metastases) would be selectively destroyed without to many side effects as well. But then tumour cells have to be recognized and this requires presentation of tumour specific proteins to the immune system. This process called antigen presentation by the MHC class I molecules is studied here.

Chapter 1 and **2** form an introduction to the ubiquitin proteasome system and the MHC class I antigen presentation route, which is operational in most cell types and is involved in presentation of antigens derived from degraded intracellular proteins (of self, tumour or viral origin). Proteins are not randomly degraded, but targeted for degradation by ubiquitin or ubiquitin-like post-translational modifications and subsequently degraded by the major cellular protease, the proteasome. Proteins are not only targeted for degradation because they are old, they may also be targeted for example in a cell cycle specific way or just because they have not been folded correctly during protein synthesis. Further trimming to free amino acids by other proteases follows degradation of cellular proteins by the proteasome. Only a minor pool of peptides that meets the requirements for antigen presentation may circumvent further degradation by binding to proteins involved in MHC class I presentation, like the transporter associated with antigen presentation (TAP), and MHC class I itself. Once the peptide is loaded onto MHC class I, the MHC class I-peptide complex can be transported to the plasma membrane. Here, the peptide is presented to cytotoxic T-cells (CTLs), which can in this way examine the intracellular protein content in their search for foreign content.

The first step in antigen presentation by MHC class I is the decoration of target proteins with a degradation signal. The first discovered and best-studied degradation signal is a polymer of ubiquitin proteins. A ubiquitin polymer of more than four ubiquitin proteins can be recognized by the proteasome and subsequently unfolded, de-ubiquitylated

and degraded by the proteasome. Free ubiquitin and mono-ubiquitylated proteins are not targets for degradation, but serve other functions. Most studies on ubiquitin have been of biochemical nature, but the introduction of the green fluorescent protein (GFP) allowed the study of ubiquitin behaviour in living cells.

It was shown before that a GFP-ubiquitin construct could be stably expressed in human cells. In **chapter 4**, we have used this chimeric protein to study ubiquitin in living cells under normal cell culture conditions and during proteotoxic cell stress as the result of proteasome inhibition, and heat shock. In untreated cells we were able to confirm previous biochemical experiments showing that a large pool of ubiquitin molecules is coupled to histone 2A and 2B in the nucleus, whereas a small pool of ubiquitin is present as free monomers in both nucleus and cytosol. A third pool of ubiquitin was present in the form of ubiquitin polymers in both the nucleus and the cytosol. Manipulation of the cells with different proteotoxic stress conditions revealed a rapid de-ubiquitylation of the histone-bound ubiquitin pool in favour of poly-ubiquitin chains, which may even reach a size similar to the proteasome complex, which is at least one hundred times bigger as a single ubiquitin molecule. These rapid changes in the ubiquitin equilibrium do not only affect proteasomal degradation, but also induce chromatin condensation and altered gene transcription, thus establishing cross talk between these, at first sight unrelated, cellular processes.

Alterations in the UPS are correlated with a variety of human pathologies, like cancer, immunological disorders, inflammation and neurodegenerative diseases. The exact role of the UPS in the pathophysiology of these diseases however, remains poorly understood. Because ubiquitin and the ubiquitin proteasome system are involved in several neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease and polyglutamine diseases like Huntington's disease we set out our hypothesis of a sensitive ubiquitin equilibrium in the cell in **chapter 5**.

Besides surgery, radiotherapy is one of the most effective ways of anticancer treatment. The main effects of radiotherapy on cells are induction of double-stranded DNA breaks and the formation of reactive radical species, which may lead to protein modifications like amino acid side-chain oxidation and breakage of di-sulphide bonds. These modifications will hopefully lead to DNA and protein damage, sufficient for cells to enter apoptosis or cell arrest. In **chapter 6** we have shown that following exposure to γ -irradiation, cell surface MHC class I-peptide complex expression is dose dependently upregulated in two phases. In the first phase of upregulation, proteins are degraded and presented that were directly damaged by the radiation and subsequent radical formation. The second phase is caused by a radiation driven activation of the mTOR pathway, which results in enhanced protein synthesis. This leads to the formation of malformed proteins called rapidly degraded proteins (RDPs) or defective ribosomal products (DRiPs) that are subsequently degraded by the proteasome and presented by MHC class I. The second phase does not only quantitatively alter MHC class I expression, but because of the mTOR pathway-specific protein expression also qualitatively. In addition, proteins may be upregulated to γ -irradiation especially DNA repair proteins, resulting in more specific peptides. CTLs directed against these radiation-specific peptides were found in peripheral blood, but appeared in an anergic state. The existence of these CTLs and the expression of radiation-specific peptides may explain the inhibition of distant tumours after local radiotherapy if these CTLs could be activated. This effect is known as the abscopal effect of local radiotherapy. If these CTLs could be activated prior to irradiation in a combina-

tion therapy, these could induce a potent immune response against the irradiated cells. We show that prior radiation of a local tumour strongly improves the response to immunotherapy (adoptively transferred CTLs), showing the feasibility of a novel combination therapy: radio-immuno therapy.

The majority of MHC class I loaded peptides is derived from cytosolic proteins. But it has been shown that MHC class I also presents peptides derived from extracellular sources like bacteria and proteins from neighbouring cells. This phenomenon is called cross-presentation and many pathways have been postulated to explain how proteins from extracellular sources may intersect with the MHC class I loading machinery. Examples are endosome to cytosol relocation, intercellular peptide transport through gap-junctions, exosomes and ER-phagosome fusion. In **chapter 3**, we have evaluated the evidence for and against the ER-phagosome theory and concluded that cross-presentation via fusion of phagosomes with the ER is very inefficient if at all possible. Our evaluation of the ER-phagosome theory was a commentary on a study by Touret et al, 2005. This study attempted to validate previous results leading to the ER-phagosome fusion theory, but failed to do so. We have also tried to show ER-phagosomal fusion in dendritic cells, but the best near-fusion event of the ER we could find was a close encounter of ribosome containing ER membranes with a mitochondrion. Also our calculations on the odds of presentation of phagosome-derived peptides were not in favour of antigen presentation via ER-phagosome fusion events. We conclude that cross-presentation to support vaccination should find a different route.

Nederlandse Samenvatting

Opereren is de meest effectieve kanker therapie, gevolgd door bestralingstherapie. Deze twee vormen van kanker bestrijding zijn relatief tumor specifiek, dit in tegenstelling tot de meeste vormen van chemotherapie, waarbij naast de tumor cellen veel gezonde lichaamscellen worden getroffen met vele bijwerkingen tot gevolg. Als het immuunsysteem specifiek tumor cellen zou kunnen herkennen en verwijderen, zouden tumor cellen en mogelijke metastases kunnen worden verwijderd zonder veel bijwerkingen. Om dit te bereiken zouden tumor specifieke eiwitten moeten worden gepresenteerd aan het immuunsysteem. Het proces dat hier genoemd wordt heet antigeen presentatie door MHC klasse I moleculen en wordt in dit proefschrift onderzocht.

Aan het eind van de levenscyclus van eiwitten worden ze afgebroken tot enkelvoudige aminozuren, die opnieuw gebruikt kunnen worden voor het maken van nieuwe eiwitten. Het einde wordt niet alleen door 'veroudering' bereikt, maar ook door incorrecte vouwing van het eiwit bij de synthese of als een cel het eiwit niet (meer) nodig heeft. Eiwitten worden gemarkeerd voor afbraak door een familie van ubiquitine en op ubiquitine lijkende eiwitten. Ubiquitine wordt gekoppeld aan het af te breken eiwit, waarna nog meer (minstens vier) ubiquitine eiwitten worden gekoppeld die samen een poly-ubiquitine keten vormen. De keten wordt herkend door een eiwit complex dat het gemarkeerde eiwit ontvouwd en in stukken knipt, dit complex heet het proteasoom. De stukken eiwit, ook peptiden genaamd, worden daarna verder afgebroken tot enkelvoudige aminozuren.

De MHC klasse I route van antigeen presentatie is ontstaan na de hierboven beschreven eiwit afbraak machinerie en maakt hier dankbaar gebruik van voor zijn eigen functie: presentatie van peptiden aan het immuunsysteem. Een heel klein deel (ongeveer 1 procent) van de peptiden die gemaakt zijn door het proteasoom bindt aan een eiwit complex dat zich in de membraan van het subcellulaire compartiment genaamd endoplasmatisch reticulum (ER) bevindt. Dit complex heet TAP en kan peptiden vrijwaren van een gewisse afbraak door ze in het ER te transporteren, waar MHC klasse I eiwitten wachten op peptiden die aan de MHC eiwitten kun-

nen binden. Als een peptide aan MHC klasse I bindt verandert de structuur van het MHC eiwit en kan het geheel (MHC en peptide) naar de buitenkant van de cel getransporteerd worden, waar het complex gepresenteerd wordt aan surveillerende witte bloedcellen. Mocht een witte bloedcel het peptide herkennen als lichaamsvreemd, dan zal de cel waaruit het MHC-peptide complex afkomstig is worden aangezet tot zelfdestructie. Omdat de MHC klasse I route gebruik maakt van de eiwit afbraak machinerie zal een cel niet alleen peptiden presenteren van eiwitten afkomstig van de cel zelf, maar ook peptiden van intracellulaire eiwitten, zoals eiwitten afkomstig van een virus tijdens infectie, van vreemde afkomst (in feite kan het MHC systeem het verschil tussen beiden niet eens onderscheiden).

Het probleem van de meeste kanker therapieën is de specifieke manier waarop ze hun doel bereiken. Opereren is een zeer effectieve therapie om visueel zichtbare tumoren te verwijderen, maar omdat de meeste tumoren niet (volledig) operatief verwijderd kunnen worden zijn additionele behandelingen zoals bestraling (radiotherapie), chemotherapie en immunotherapie ontwikkeld. Deze behandel methodes hebben een groot voordeel ten opzichte van opereren, maar dit voordeel is meteen ook een groot nadeel: ze zijn werkzaam op vele (in de meeste gevallen onschuldige) cellen buiten de tumor met alle gevolgen van dien. Het hoofddoel van kanker therapieën is het stoppen van de ongeremde groei van tumor cellen. Dit kan op vele verschillende manieren worden bereikt, waardoor verschillende effectieve therapieën zijn ontwikkeld. In sommige gevallen alleen zonder volledig inzicht in de exacte mechanismen waarop de therapieën werkzaam zijn. In dit proefschrift wordt onderzoek beschreven naar de mechanismen van verschillende kanker therapieën zoals radiotherapie, chemotherapie en immunotherapie. De **hoofdstukken 1 en 2** vormen een uitgebreide introductie van de MHC klasse I antigeen presentatie route, met daarin de specifieke rollen van ubiquitine en het proteasoom verwerkt.

MHC klasse I presenteert in principe peptiden afkomstig van intracellulaire eiwitten, maar meerdere publicaties hebben aangetoond, dat ze ook in staat zijn peptiden van extracellulaire eiwit-

ten te presenteren, als deze in de eiwit afbraak machinerie terecht weten te komen. Dit proces wordt ook wel kruispresentatie genoemd. Over de manier waarop extracellulaire eiwitten dit doen zijn meerdere theorieën ontstaan, waarvan wij er één, namelijk de fusie van het ER met fagosomen, hebben geëvalueerd in **hoofdstuk 3**. Wij komen door middel van een wiskundige benadering tot de conclusie dat voor functionele kruispresentatie die gebruikt kan worden voor vaccinatie, eiwitten een andere route dienen te nemen dan via fusie van het ER met fagosomen.

Het ubiquitine eiwit is onderwerp geweest van vele studies die veel verschillende technieken hebben gebruikt, die vaak biochemisch van aard waren. De ontdekking van een groen fluorescerend eiwit (GFP) uit een kwal heeft het mogelijk gemaakt om op een simpele manier eiwitten te bestuderen in levende cellen, door dit groene eiwit te koppelen aan het te onderzoeken eiwit en tot expressie te brengen in levende cellen. Het GFP eiwit kan meer inzicht geven in de dynamiek en distributie van het gekoppelde eiwit, dan 'oude' biochemische technieken. In **hoofdstuk 4** beschrijven wij een onderzoek waarbij we het GFP eiwit aan ubiquitine hebben gekoppeld en zo de lokalisatie en de dynamiek van ubiquitine hebben bestudeerd onder normale omstandigheden en tijdens behandeling met proteasoom remmers. De toediening van deze remmers is namelijk een goede kanker therapie gebleken voor de behandeling van een witte bloedcel kanker genaamd multiple myeloom (ook wel plasmacytoma).

Verstoring van het eiwit-afbraak systeem van ubiquitine en het proteasoom is gecorreleerd met een aantal menselijke ziektes, zoals kanker, immunologische afwijkingen en neurodegeneratieve ziektes zoals de ziektes van Parkinson en Alzheimer. De exacte rol van het ubiquitine-proteasoom systeem bij deze ziektebeelden is echter niet geheel duidelijk. In **hoofdstuk 5** hebben wij naar aanleiding van de gegevens uit het voorgaande hoofdstuk een hypothese gepostuleerd waarin de geringe hoeveelheid ubiquitine in de cel een centrale rol speelt in een gevoelig evenwicht van ubiquitine. Verstoring van het evenwicht door bijvoorbeeld proteasoom remmers of de vorming van eiwit aggregaten in het geval van neurodegeneratieve ziektes heeft in dat geval niet alleen effect op de afbraak van eiwitten, maar ook op andere processen waarbij ubiquitine betrokken is zoals het herstel van DNA schade en cel deling.

Radiotherapie is al bijna een eeuw één van de meest effectieve kanker therapieën en wordt daarom nog steeds vaak toegepast al is het in aangepaste vorm. Hoewel de effecten van bestraling op cellen ongeveer net zo lang wordt onderzocht, zijn er nog steeds effecten die niet goed konden verklaard. In **hoofdstuk 6** worden de effecten van radiotherapie op antigeen presentatie in bestraalde cellen behandeld en hebben we laten zien hoe dit kan worden gecombineerd met immunotherapie om succesvol tumor cellen te verwijderen ook al bevinden deze zich niet altijd in het bestraalde gebied.

**" 't Leids kleenkt nog vól slimmer as 't Tweants,
meer joa, 't lik meer op Hooghaarlemmerdieks. "**

Willem Wilmink

Addendum Nederlandse Samenvatting

Nobelprijs Scheikunde 2004 voor de ontdekking van ubiquitine-gemedieerde eiwitafbraak

Aangepaste versie van het Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde

Nobelprijs Scheikunde 2004 voor de ontdekking van ubiquitine-gemedieerde eiwitafbraak

Jacques Neefjes, Tom Groothuis en Nico Dantuma

Dit jaar is de Nobelprijs voor Scheikunde toegekend aan Aaron Ciechanover, Avram Herskho and Irwin Rose voor de ontdekking van ubiquitine-gemedieerde eiwitafbraak. Met een serie door-slaggevende experimenten hebben deze wetenschappers de basis principes beschreven van een unieke posttranslationale modificatie die gebaseerd is op de binding van een klein eiwit genaamd ubiquitine aan eiwitten die dienen te worden afgebroken. Alhoewel ubiquitine in 1980 begon als een ongebruikelijke modificatie van bepaalde eiwitten, is het nu duidelijk dat het functioneert als een signaal voor afbraak als het een polymeer vormt. Honderden eiwitten zijn betrokken in de gecontroleerde afbraak van ubiquitine-gemodificeerde eiwitten in de cel. Terwijl honderden andere eiwitten betrokken zijn bij eiwitmodificatie door een enkel ubiquitine molecuul, waardoor andere processen, zoals de vorming van andere afbraak compartimenten, voortgang kunnen vinden.

Zoals vaak is het aantrekkelijker om aan opbouw dan aan afbraak te werken. Dit is ook het geval in de biochemie waar de vraag hoe eiwitten afgebroken worden lange tijd werd genegeerd. Natuurlijk was in 1980 al bekend dat eiwitten in lysosomen afgebroken worden en dat dit een structuur is waar proteasen alle geëndocyteerde eiwitten tot aminozuren afbreken, zodat de cel deze aminozuren voor nieuwe eiwitten kan gebruiken. Maar hoe zit het met de afbraak van gewone eiwitten uit een cel?

De 3 Nobelprijslaureaten Aaron Ciechanover (Israël), Avram Herskho (Israël) en Irwin Rose (Californië, VS) beschreven in 1980 hoe een klein eiwit genaamd 'ubiquitine' (van 'ubiquitous', dit is 'alomtegenwoordig', omdat het in vrijwel alle cellen in hoge concentraties aanwezig is) een cruciale rol speelt in de regulatie van de afbraak van gewone eiwitten (1,2). Door het baanbrekend onderzoek van dit drietal werd duidelijk dat ubiquitine fungeert als een herkenningssignaal voor intracellulaire eiwitafbraak. Dit ubiquitine-gemedieerde afbraakmechanisme is tegenwoordig beter bekend onder de naam van de twee hoofdrolspelers, als 'het ubiquitine-proteasoomsysteem'. Tijdens de afgelopen jaren is duidelijk geworden dat het ubiquitine-proteasoomsysteem betrokken is bij veel verschillende pathologische processen, waaronder maligniteiten, ontstekingsreacties, infecties, autoimmunititeit en neurodegeneratieve aandoeningen, zoals de ziekten van Alzheimer en Parkinson. Het eerste medicijn dat is gebaseerd op remming van het ubiquitine-proteasoomsysteem

(bortezomib) is vorig jaar geïntroduceerd in de kliniek en wordt nu toegepast bij de behandeling van patiënten met multipole myeloma's.

In dit artikel zullen wij ingaan op de functie van ubiquitine, hoe dit de eiwitafbraak stuurt en tot welke nieuwe inzichten de ontdekking van ubiquitine-gemedieerde afbraak heeft geleid. Wij willen laten zien waarom het Nobelcomité heeft besloten om de prijs toe te kennen aan deze drie wetenschappers die hun carrière in het teken hebben gesteld van een van de kleinste eiwitten in de humane cel, ubiquitine.

Enkele getallen

Iedere seconde worden in ons lichaam grote hoeveelheden eiwitten afgebroken. Een eenvoudige rekensom laat dit zien. Een menselijk lichaam van ongeveer 100 kg bestaat uit 10^{14} (100×1 miljoen $\times 1$ miljoen) cellen. Als men het gewicht van een cel weet, in ogenschouw neemt dat cellen voor ongeveer 10% bestaan uit eiwitten van gemiddeld 50.000 Da en het getal van Avogadro kent (circa 6×10^{23} ; elke mol van een stof bevat dat aantal moleculen), dan kan men uitrekenen dat één cel 1-2 miljard eiwitten bevat (3). Dit getal komt aardig overeen met de experimentele waarden (4). De gemiddelde levensduur van eiwitten ligt rond de 16 uur. Omdat een cel een evenwicht is, houdt dit in dat iedere 16 uur deze eiwitten vervangen moeten worden door nieuwe eiwitten. Als men ook in ogenschouw neemt dat cellen zo nu en dan delen, dan kan men uitrekenen dat iedere minuut 1-2 miljoen eiwitten in iedere lichaamscel afgebroken

worden (3). Met andere woorden, in ons lichaam worden iedere minuut ongeveer 2×10^{20} (200×1 miljoen $\times 1$ miljoen $\times 1$ miljoen) eiwitten afgebroken.

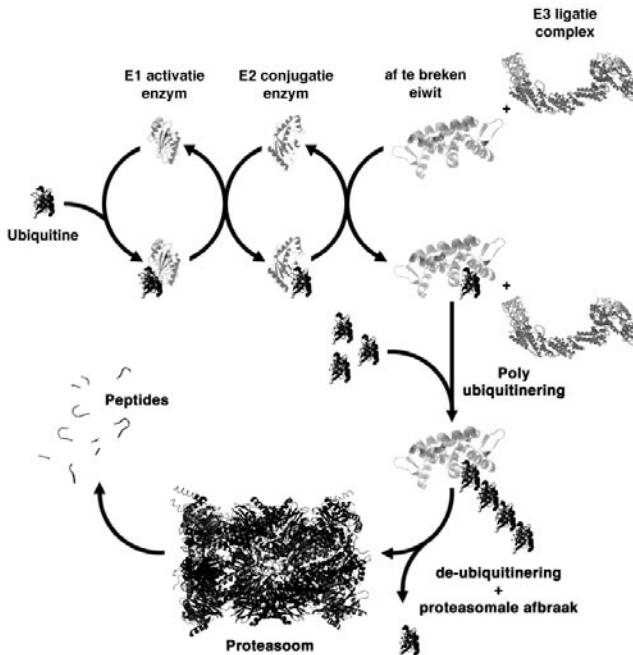
Een deel van deze eiwitten is beschadigd of functioneert niet meer normaal en vormt derhalve een gevaar voor de cel. Daarnaast worden ook veel eiwitten afgebroken waaraan niets mankeert. Dit lijkt op het eerste gezicht pure verspilling. Het is echter nog erger. Ongeveer 1 op de 3 eiwitten die in de cel gemaakt worden, heeft geen goede bouw en wordt direct afgebroken zonder ooit in bedrijf te zijn geweest (3). Waarschijnlijk is het voor een cel heel moeilijk om een snelle productielijn te maken waar alleen maar geslaagde eiwitproducten vanaf lopen.

De bovenstaande berekening blijkt behoorlijk accuraat te zijn, hoewel er enige aannamen in staan. Hieronder valt niet het getal van Avogadro. De belangrijkste aanname is de gemiddelde levensduur van een eiwit. Die is moeilijk vast te stellen, aangezien sommige eiwitten een levensduur van enige minuten hebben, terwijl andere eiwitten dagen bestaan. Bovendien is de levensduur van één en hetzelfde eiwit sterk afhankelijk van de locatie in het lichaam, het celtype of de fase in de celcyclus. Sommige eiwitten bijvoorbeeld worden afgebroken tijdens het delen van de cel, terwijl andere eiwitten juist daarna afgebroken worden.

Hoe wordt een eiwit afgebroken?

De situatie in een cel is complex, want alleen bepaalde eiwitten in een cel moeten worden afgebroken, terwijl andere dan nog aanwezig moeten zijn. Dit houdt in dat de afbraak sterk gecontroleerd moet zijn. Ciechanover, Hershko en Rose beschreven in 1980 dat ubiquitine op een speciale wijze aan andere eiwitten gekoppeld wordt. Ubiquitine wordt namelijk via de zijketen van het aminozuur lysine gekoppeld in plaats van via de gebruikelijke peptidenbinding (1,2). Aangezien ubiquitinen ook bevestigd worden aan lysinen in ubiquitine zelf, wordt vervolgens stap voor stap een keten van ubiquitinen opgebouwd, 'polyubiquitine' genaamd. De functie hiervan was eerst niet duidelijk, maar vervolgprouwen toonden aan dat het ubiquitine als een soort afbraaksignaal werkte. Een keten van minimaal vier ubiquitinen is nodig voor het vormen van een afbraaksignaal (5). Dit is de ubiquitinevlag. Vier is echter niet de maximale lengte en eiwitten die afgebroken moeten worden kunnen makkelijk een vlag van meer dan 50 ubiquitinen krijgen.

Het eiwit moet in de cel vervolgens afgebroken worden en wel zo dat alleen het eiwit met de ubiquitinevlag afgebroken wordt, en de andere eiwitten niet. De afbraak van eiwitten voorzien van een ubiquitinevlag wordt uitgevoerd door het proteasoom. Het proteasoom is een groot complex, dat een soort kamer vormt waarin eiwitten worden afgebroken (6).



Een overzicht van het systeem van eiwitafbraak door het ubiquitine-proteasoomsysteem door 3 typen ubiquitinyleringsenzymen. Eerst activeert een E1-enzym het ubiquitine, vervolgens brengt een E2-conjugatiecomplex het over naar een E3-ligatiecomplex, dat het daarna koppelt aan een af te breken eiwit. Ubiquitine wordt gepolymeriseerd tot een polyubiquitine, dat door het proteasoom herkend wordt. Het proteasoom verwijdert de ubiquitineketen, waarna die opnieuw gebruikt kan worden, en breekt het eiwit af tot peptidefragmenten. De ubiquitinecyclus is essentieel voor de ombouw van eiwitten in de cel.

De ubiquitinevlag wordt herkend door het proteasoom en vervolgens worden de meegevoerde eiwitten ontvouwen, zodat ze door de deur van de kamer kunnen waarin ze worden afgebroken. Op deze wijze worden alleen eiwitten met een ubiquitinevlag afgebroken, terwijl andere eiwitten gespaard worden.

De ontdekking van deze herkenningsvlag was een conceptuele doorbraak, maar lost het probleem waarom een bepaald eiwit op een bepaald moment afgebroken moet worden niet op. Hoe gaat dit? Zoals weergegeven in de figuur hebben alle cellen een systeem bestaande uit 3 typen ubiquityleringsenzymen die in een estafetteverband het ubiquitine activeren (E1-enzym), doorgeven (E2-enzym) en vervolgens aan een eiwit koppelen (E3-enzym). Een cel heeft volgens de laatste gissingen honderden E3-enzymen die elk bepaalde eiwitten herkennen en van ubiquitine voorzien. Zo zijn er onder andere E3-enzymen die alleen in bepaalde cellen aanwezig zijn en daarmee het gedrag van de cellen bepalen, E3-enzymen die actief zijn tijdens specifieke fasen van de celcyclus en E3-enzymen die beschadigde eiwitten herkennen (7). De ubiquitinevlag wordt trouwens niet afgebroken, maar verwijderd door het proteasoom en hergebruikt om nieuwe eiwitten te labelen voor afbraak.

Waarom is afbraak van eiwitten cruciaal? De celcyclus en kanker

In 1983 zijn eiwitten ontdekt die op bepaalde momenten in de celcyclus tot expressie kwamen, de zogenaamde cyclinen (reden voor een andere Nobelprijs) (8). Later zijn er nog vele andere eiwitten ontdekt die periodiek gedurende de celdeling en -groei tot expressie kwamen. Deze periodiciteit is essentieel voor normale celgroei en deze eiwitten (bijvoorbeeld de cyclinen) worden afgebroken op een gedefinieerd moment om daarmee celgroei te controleren. Deze afbraak gebeurt nadat er een ubiquitinevlag op het eiwit gezet is, waarna het door het proteasoom herkend en afgebroken wordt.

Dit moet uiterst nauwgezet gebeuren, omdat het anders tot ongecontroleerde celgroei leidt. Fouten in dit systeem worden dan ook in vele tumoren gevonden. Bijvoorbeeld: het tumorsuppressoreiwit p53 krijgt ubiquitinen van het eiwit MDM2 en dit wordt door p14^{ARF} gecontroleerd; p14^{ARF} is vaak gedeleteerd en/of MDM2 komt tot overexpressie in veel typen tumoren, zoals sarcomen, hersentumoren en longcarcinomen. Hierdoor wordt de tumorsuppressor p53 'te goed' herkend door de ubiquitineringsmachine en afgebroken, zodat deze de celgroei niet meer controleert (9). Bij andere tumoren, onder andere mamma- en coloncarcinoom, wordt de concentratie van een signaaleiwit β -catenine, dat aanzet

tot celgroei, bepaald door de interactie met de eiwitten 'adenomatous polyposis coli' (APC) en axine. Deze zorgen ervoor dat de gefosforyleerde β -cateninevorm herkend wordt door een ander eiwit, β -'transducin repeat-containing protein' (β -TrCP), dat er een ubiquitine-groep opzet, waarna het herkend en afgebroken wordt door het proteasoom. Hiermee wordt voorkomen dat β -catenine naar de kern gaat, waar het transcriptiefactoren als TCF activeert die uiteindelijk de cel tot groei aanzetten. Mutaties in APC, axine en β -catenine worden in verschillende tumoren gevonden. Deze mutaties voorkomen de afbraak van β -catenine, wat resulteert in ongecontroleerde transcriptie door TCF en uiteindelijk in ongecontroleerde celgroei (10).

Dit zijn slechts twee voorbeelden. De ubiquitinmodificatie gekoppeld aan eiwitaafbraak speelt een belangrijke rol bij vrijwel alle aspecten van celgroei. Het is daarom ook niet helemaal onverwacht dat er nu remmers van dit systeem (eigenlijk proteasoomremmers) ontwikkeld zijn die getest worden als chemotherapeutica. Zoals gezegd, wordt één zo'n remmer momenteel met redelijk succes gebruikt bij multipole myeloma, hoewel niet precies duidelijk is waarom het zo goed tegen deze tumoren werkt (11).

Neurodegeneratie en ubiquitine

Een niet te verwaarlozen functie van het ubiquitine-proteasoomsysteem is het recyclen van beschadigde eiwitten. Met name eiwitten met een incorrecte vouwing kunnen een desastreus effect op cellen hebben, omdat ze de neiging hebben om te aggregeren in grote onoplosbare structuren. Het ubiquitine-proteasoomsysteem is erop gericht om deze potentieel gevaarlijke eiwitten zo snel mogelijk te herkennen, te markeren met de ubiquitinevlag en af te breken in kleine fragmenten. Cellen bevatten grote hoeveelheden ubiquitine en proteasomen om dit proces zo voorspoedig mogelijk te laten verlopen.

Toch zijn er ziekten waarbij karakteristieke aggregaten van zulke abnormale eiwitten worden gevonden. Onder deze ziekten zijn opmerkelijk veel neurodegeneratieve, zoals de ziekten van Alzheimer en Parkinson, waarin deze eiwitophoping bekend staan als respectievelijk β -amyloïde plaques en de Lewy-lichaampjes (12).

De vraag is waarom het ubiquitine-proteasoom-systeem er bij deze aandoeningen niet in slaagt om de abnormale eiwitten op tijd op te ruimen. Hoewel een eenduidig bewijs nog niet geleverd is, vormen meerdere bevindingen aanwijzingen voor inefficiënte ubiquitine-gemedieerde afbraak als een mogelijke oorzaak voor neurodegeneratie. Zo zijn er bijvoorbeeld twee familiale vormen van de ziekte

van Parkinson ontdekt die veroorzaakt worden door mutaties in de enzymen parkin en 'ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1' (UCH-L1) (13). Deze zijn betrokken bij respectievelijk het koppelen van ubiquitine en het afbreken van de ubiquitineketens. Alles wijst erop dat mutaties in de betreffende genen de eiwitaafbraak verstoren. Veel onderzoeksgroepen zijn dan ook naarstig op zoek naar niet-familiaire vormen van deze ziekten, die verantwoordelijk zijn voor het leeuwendeel van de patiënten, in de hoop dat een beter begrip van de rol van dit systeem zal resulteren in specifiekere medicijnen voor deze ernstige ziekten.

Eiwitaafbraak en het afweersysteem

Van afgebroken eiwitten maakt het proteasoom fragmenten en deze fragmenten, die 30 aminozuren lang kunnen zijn, worden door andere proteasen verder afgebroken, zodat de aminozuren kunnen worden gebruikt in de synthese van nieuwe eiwitten. Echter, een klein deel van de fragmenten ontsnapt aan deze proteasen en komt terecht in de zogenaamde eiwitten van het klasse-I-'major histocompatibility complex' (MHC), de transplantatieantigenen. Hun functie is natuurlijk niet om transplantatie moeilijk te maken, maar om kleine stukjes van pathogenen aan het oppervlak van het afweersysteem te tonen. Wanneer een klasse-I-MHC een lichaamsvreemd fragment bevat, leidt dit tot de eliminatie van de betreffende cel door cytotoxische T-cellen. De fragmenten die het proteasoom maakt, vormen een goede mix van wat zich in de cel bevindt. In principe maakt ons afweersysteem dus gebruik van het veel oudere ubiquitine-proteasoomsysteem om een blauwdruk van de binnenkant van de cel, in de vorm van peptidefragmenten, te tonen aan de buitenkant van de cel in de context van MHC-klasse-I-eiwitten (3).

Meer dan afbraak alleen

Het heeft na de ontdekking van ubiquitine enige tijd geduurd voordat men begreep dat het een essentiële rol speelde in eiwitaafbraak door het proteasoom. De vorm waarin ubiquitine dit doet, is een polymeer van ubiquitinen die gemakkelijk uit 50 moleculen kan bestaan. Later werd ontdekt dat ubiquitine ook in de zogenaamde mono-ubiquitinevorm op verschillende eiwitten voorkomt. Deze vorm heeft een andere signaalfunctie en is betrokken bij vele processen, zoals de vorming van lysosomen en de structuur van chromatine (14).

Waar ubiquitine in 1980 begon als een ongebruikelijke modificatie van sommige eiwitten, is nu duidelijk dat het als een afbraaksignaal functioneert als het een poly-meer vormt. Honderden eiwitten zijn betrokken bij de gecontroleerde destructie van

eiwitten in de cel. En honderden andere eiwitten zijn betrokken bij de modificatie door mono-ubiquitine, waardoor andere processen goed verlopen, zoals de vorming van een ander afbraakcompartiment, het lysosoom.

Literatuur

1. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1365-1368.
2. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1783-1786.
3. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003;3:952-961.
4. Princiotta MF, et al. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003;18:343-354.
5. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002;416:763-767.
6. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82:373-428.
7. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004;379:513-525.
8. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983;33:389-396.
9. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.
10. Sancho E, Battle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:695-723.
11. Neefjes J, Dantuma NP. Fluorescent probes for proteolysis: tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:58-69.
12. Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 2004;10 Suppl:S2-9.
13. Hattori N, Mizuno Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:722-724.
14. Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 2003;28:598-603.