

Protein-Turnover

Proteinstabilität und Fruchtkörper bei Pilzen

GERHARD BRAUS

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND GENETIK, GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN

Fruchtkörper gehören zu den komplexesten Strukturen, die ein Pilz bilden kann. Der Umbau des Pilzfilaments erfordert den Abbau von Proteinen, und dieser Prozess muss sorgfältig kontrolliert werden. Da Pilze mit Defekten in der Fruchtkörperbildung immer noch vegetativ vermehrt werden können, bildet die Fruchtkörperbildung ein interessantes Modell zum Studium entwicklungsbiologischer Vorgänge bei einem Vielzeller.

■ Die pilzliche Hyphe ist ein Zellfaden, der an der Spitze wächst und invasiv Substrate oder Wirtsgewebe durchdringen kann. Dieses Durchwachsen von Lebensräumen gehört ebenso zum evolutionären Erfolg der Pilze wie deren Aufarbeitung durch die Abgabe von Exoenzymen und Sekundärmetaboliten. Damit spielen Pilze eine ganz wesentliche ökologische Rolle für die Aufrechterhaltung von Stoffkreisläufen im Boden. Aus dem Pilzfaden können komplexe, gewebeartige Strukturen gebildet werden. Diese dienen der Überdauerung, Verbreitung oder der sexuellen Reproduktion, am deutlichsten erkennbar im Herbst an den großen Fruchtkörpern unserer Wälder. Die Pilzgewebe der Fruchtkörper entstehen über einen drastischen Umbau des Organismus, bei dem die Hyphe als morphologisches Grundelement erhalten bleibt. Bei diesem Umbau scheint der Ubiquitin-abhängige Protein-Abbau und dessen Kontrolle^[1] von besonderer Bedeutung zu sein.

Aspergillus nidulans als Modellsystem für die Fruchtkörperbildung

Eines der Modellsysteme zur Fruchtkörperbildung von Pilzen ist der Gießkannenschimmel *Aspergillus nidulans* (*A. n.*). *A. n.* lebt normalerweise als saprophytischer Bodenorganismus, kann aber auch als opportunistisches Pathogen systematische Pilzinfektionen (Aspergillosen) hervorrufen. Dies passiert seltener als beim Schwesterorganismus *A. fumigatus*. *A. n.* wurde in den 50er-Jahren des vorigen Jahrhunderts in die Wis-

senschaft eingeführt^[2]. Die Hyphen von *A. n.* können als Homokaryon (mit genetisch gleichen Zellkernen) oder als Heterokaryon (mit zwei Kernen unterschiedlicher Herkunft) wachsen. Heterokarya bilden sich nach der Fusion unterschiedlicher Hyphen in einem Prozess, den man Parasexualität nennt. Dadurch wird der Austausch von genetischer Information ohne einen meiotischen Zyklus ermöglicht. *A. n.* ist der einzige von drei Aspergillen (*A. n.*, *A. fumigatus*; *A. oryzae*), deren Genom vor kurzem entschlüsselt wurde^[3], der zusätzlich einen sexuellen Zyklus zeigt^[4]. Dadurch kann man mit *A. n.* Kreuzungsexperimente durchführen, was einer der Gründe ist, warum sich *A. n.*, zusammen mit dem von Louis Pasteur in die Wissenschaft eingeführten Brotschimmel *Neurospora crassa*, zu einem der Modellsysteme für filamentöse Schlauchpilze (Ascomyceten) wurde.

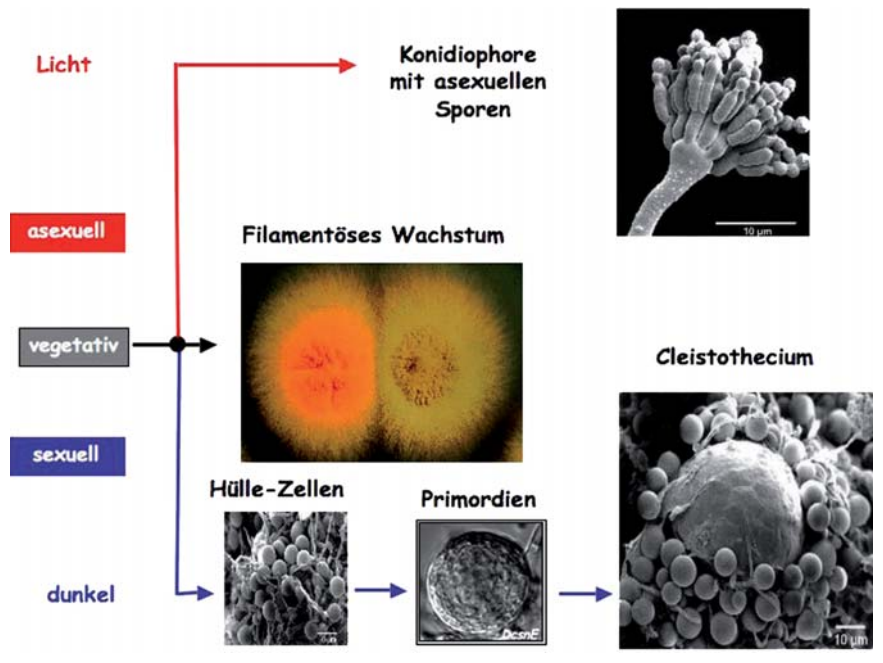
Die Lebensphasen von *A. n.* sind in **Abbildung 1** dargestellt. Beleuchtung fördert die Bildung von asexuellen Sporen (Konidien) an Sporenträgern, die durch ihr Aussehen dieser Pilzgruppe ihren Namen (Gießkannenschimmel) gegeben haben. Sexuelle Sporen werden bevorzugt im Dunkeln und in einem längeren Zeitraum gebildet (unter Laborbedingungen etwa 100 Stunden nach der Sporenkeimung). Es entstehen komplexe, geschlossene Fruchtkörper (Cleistothezien: griech.: kleistos = geschlossen; theke = Behältnis), in deren Inneren die Kernfusion und die Meiose stattfinden^[4]. Die Fruchtkörperbildung

benötigt verschiedene spezialisierte Zellen wie die Hüllezellen, denen man eine unterstützende Funktion zuschreibt, oder die Zellen, die die resistente Fruchtkörperwand ausbilden, in deren Inneren die Sporenbildung erfolgt. Diese spezialisierten Zellen haben eine andere Proteinzusammensetzung als die Hyphe, was Neusynthese, aber auch den Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen erfordert. Die Fruchtkörperbildung wird durch Umweltfaktoren, Sexualhormone^[4] und den Ernährungszustand beeinflusst. Bei Aminosäuremangel werden keine Fruchtkörper gebildet, wahrscheinlich weil die Bausteine für die benötigten Proteine fehlen^[5, 6].

Abbau von Proteinen

Der Abbau von Proteinen zu Aminosäuren findet in der Vakuole und im Proteasom von Pilzen statt. Die Pilz-Vakuole vereint Eigenschaften der pflanzlichen Vakuole und des tierischen Lysosoms. Sie dient sowohl dem gezielten als auch dem ungezielten Abbau von Proteinen. Bei völligem Nährstoffmangel sind Pilze in der Lage, ganze zelluläre Kompartimente von der Größe eines Mitochondriums in Membranen einzuschließen, sodass Autophagosomen entstehen, deren Inhalt in der Vakuole abgebaut wird. Über die Rolle des vakuolären Proteinabbaus bei der pilzlichen Fruchtkörperbildung ist wenig bekannt.

Proteasomen sind Proteinkomplexe, die in ihrem Inneren Proteine abbauen können und die sich sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern einer eukaryotischen Zelle befinden. Proteasomen erlauben den schnellen Abbau von Proteinen und erfordern eine kovalente Markierung durch eine Kette von vier bis sechs Ubiquitin-Molekülen an das abzubauenende Protein. Ubiquitin ist ein kleines Protein, das in allen Eukaryoten vorkommt und das eine ganze Klasse von Ubiquitin-Ähnlichen repräsentiert^[1]. Ubiquitin und seine Verwandten dienen der Markierung von Proteinen^[7] für unterschiedliche zelluläre Vorgänge vom Abbau über den Transport bis zur Regulation einer Enzymaktivität.



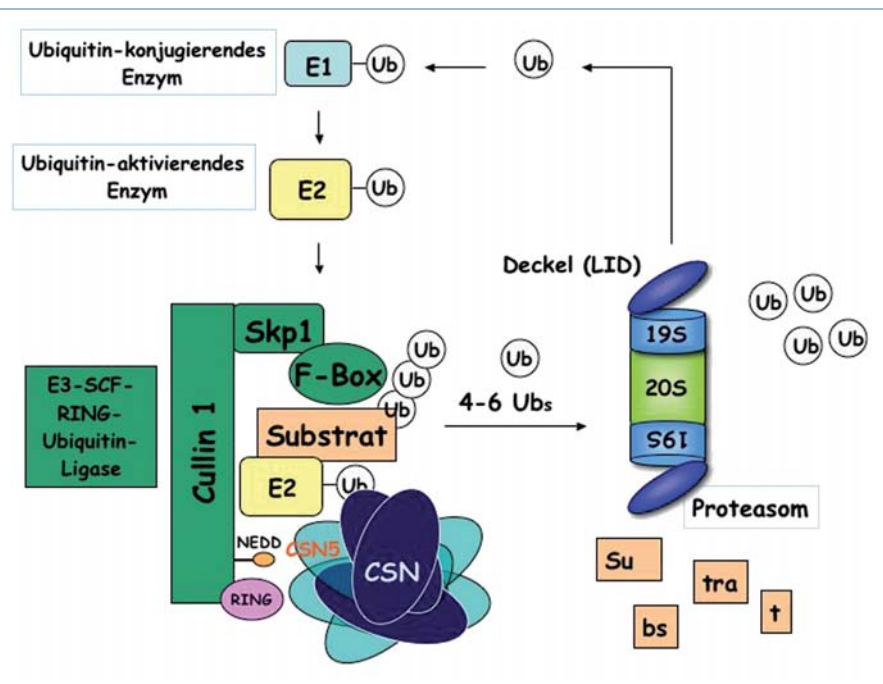
▲ **Abb. 1:** Lebenszyklus des Gießkannenschimmels *Aspergillus nidulans*. *A. nidulans* ist ein Hyphen-Pilz, der ein vegetatives Myzel von Pilzfilamenten ausbilden kann und mit den Hyphen eines anderen Individuums nach Hyphenfusion Kerne austauschen kann (Parasexualität). Daneben und bevorzugt im Licht bildet der Pilz asexuelle Sporen (Konidien) an Sporenträgern (Konidiphoren) aus. Die Bildung der sexuellen Fruchtkörper (Cleistothezien) wird durch Licht inhibiert und erfordert die Bildung eines eigenen unterstützenden Zelltyps (Hülle-Zellen). Die Cleistothezien entwickeln sich aus Zellhaufen, die die Kerne, die in die Meiose gehen, enthalten (Primordien).

Markierung von Proteinen für den Abbau

Die kovalente Bindung von Ubiquitin erfordert die ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin durch ein aktivierendes Enzym E1 (**Abb. 2**) und die Konjugation an das Substrat durch das Enzym E2. E3-Enzyme sind die SCF-Ubiquitin-Ligasen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und denen eine kritische Rolle für die Spezifität des Protein-Abbaus zukommt^[8]. SCF bezeichnet drei der Untereinheiten dieser Enzyme: das Skp1-Protein, das Cullin und das F-box-Protein. E3-SCFs binden das beladene E2 in der Nähe einer weiteren Untereinheit, der RING-Domäne am C-terminalen Teil des zentralen Cullins. E3-SCFs erhalten ihre Spezifität durch unterschiedliche F-Box-Proteine, die mit dem N-terminalen Teil des Cullins über das Skp1-Protein verbunden sind und ihrerseits die Substrate binden. Aus den Genomen der Aspergillen ergibt sich ein Potenzial von etwa 70 Genen für mögliche F-Box-Proteine^[9]. Diese Zahl entspricht der Größenordnung der für den Menschen vorhergesagten F-Box-Proteine, ist aber um mindestens eine Größenordnung kleiner als für Pflanzen wie *Arabidopsis* beschrieben. Für die meisten F-Box-Proteine sind die Substrate und damit die genaue Funktion unbekannt. Die Bildung von Fruchtkörpern mit intakten sexuellen Sporen benötigt entwicklungspezifische F-Box-Proteine in Pilzen. Eines davon ist das *grrA*-Gen von *A. n.*, das für ein F-Box-Protein kodiert, das erst spät in der Fruchtkörperbildung exprimiert wird^[10]. Wird dieses Gen deletiert, können zwar noch Fruchtkörper ausgebildet werden, in deren Inneren befinden sich aber keine lebensfähigen sexuellen Sporen. Dies weist auf eine essentielle Rolle des *grrA*-Proteins in der Sporenbildung hin. Welches Substrat durch das *grrA*-F-Box-Protein der Ubiquitinierungsmaschinerie präsentiert und damit abgebaut werden muss, damit die Sporenbildung innerhalb der Fruchtkörper störungsfrei ablaufen kann, ist gegenwärtig unklar.

Aktivität der Proteinmarkierung für den Abbau

Die Aktivität von E3-Ligasen hängt ihrerseits an der Modifikation der Enzyme durch ein Ubiquitin-ähnliches Protein. Dieses Protein (NEDD8/Rub1) ist unter der Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine seinerseits das dem Ubiquitin Ähnlichste^[7]. Es sind bisher keine Substrate bekannt, die durch die kovalente Modifikation durch NEDD8/Rub1 für die Proteindegradation markiert werden. NEDD8/



▲ **Abb. 2:** Protein-Turnover. Das COP9-Signalosom (CSN) kontrolliert über seine auf der fünften Untereinheit liegende DeNEDDylase-Aktivität E3-SCF-Ubiquitin-Ligasen. E3-Ligasen bestimmen über ihr F-Box-Protein, welche Substrate gebunden und damit über Poly-Ubiquitinierung für den Abbau im Proteasom markiert werden. Das Proteasom besitzt im Inneren des 20S-Teils, der nach oben und unten abgeschlossen ist, eine effiziente Protease-Aktivität. Die Aktivität der E3-Ligasen wird ihrerseits über ein Ubiquitin-ähnliches Protein (NEDD) kontrolliert, das kovalent an die Cullin-Untereinheit gebunden (NEDDylierung) oder wieder losgelöst wird (DeNEDDylierung). Um ein Substrat ubiquitinylieren zu können, muss Ubiquitin (Ub) unter ATP-Verbrauch aktiviert werden (E1) und dann vom E2-Enzym übernommen werden, sodass Ub dann am E3 auf das Substrat übertragen werden kann.

Rub1 muss an ein spezifisches Lysin im C-terminalen Bereich des zentralen Cullins des SCF-Komplexes kovalent gebunden sein, damit isolierte SCF-Komplexe *in vitro* ihre Aktivität entfalten können. Diese NEDDylierung erfolgt nach dem gleichen dreistufigen Mechanismus wie oben für die Ubiquitylierung beschrieben. In der Zelle selbst scheint die NEDDylierung für eine kontrollierte Aktivität der SCF-Ubiquitin-Ligasen noch nicht auszureichen, sondern es bedarf der kontrollierten NEDDylierung in Abstimmung mit der kontrollierten DeNEDDylierung durch eine spezifische Protease. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die F-Box-Proteine von SCF-Komplexen genauso wie die Substrate immer wieder ausgetauscht und damit die SCF-Komplexen häufig auf- und wieder abgebaut werden müssen. Sollte die pilzliche Fruchtkörperbildung in besonderer Weise einen kontrollierten Abbau von Proteinen benötigen, so sollten sich Störungen der SCF-Aktivität stärker auf die Fruchtkörperbildung als auf die Bildung der Pilz-Hyphe auswirken.

Pilzliches Signalosom

Die Suche nach Genen, deren Fehlen zu Defekten in der Fruchtkörperbildung führt, resultierte in der Identifikation von zwei miteinander interagierenden Proteinen^[11]. Diese beiden Proteine sind bei höheren Eukaryoten bis zu Pflanzen und Menschen Teil eines Komplexes aus acht Untereinheiten, der als das COP9-Signalosom CSN bezeichnet wird. Der CSN-Komplex hat eine ähnliche Struktur wie der Deckel (Lid) des Proteasoms, und es wurde vorgeschlagen, dass CSN auch als alternativer Deckel fungieren könnte^[12]. CSN wurde ursprünglich in Pflanzen als Regulator der Licht-abhängigen Entwicklung isoliert^[13]. Defekte in CSN führen bei Pflanzen und Tieren zum embryonalen Tod des Organismus, sodass eine genauere genetische Untersuchung des Effektes schwierig ist. In Hefen ist CSN im Gegensatz zu *A. n.*, Tieren und Pflanzen nur teilweise konserviert, und Defekte in den entsprechenden Genen zeigen keinen sehr auffälligen Phänotyp. CSN ist daher für mehrzellige Organismen von besonderer Bedeutung^[14]. Die Deletion von mehreren Genen für CSN-Untereinheiten in *A. n.* führte bisher immer zum gleichen Phänotyp: Der Prozess der Fruchtkörperbildung wird zwar gestartet, hält aber nach der Primordienbildung an. Daneben sind die Pilzzellen auch in ihrer Antwort auf DNA-Schäden beeinträchtigt^[15]. Vergleichbar wie es in Pflanzen beob-

achtet wurde^[13], ist auch in den Pilz-*csn*-Mutanten die Lichtregulation gestört: Die Fruchtkörperbildung wird in *csn*-Mutanten von *A. n.* im Gegensatz zum Wildtyp durch Licht nicht mehr inhibiert.

Von CSN ist bisher nur eine intrinsische Enzymaktivität bekannt, die auf der Untereinheit CSN5-liegende Zink-Ionen-abhängige DeNEDDylase-Aktivität^[14]. Die DeNEDDylase löst aus den Cullinen der SCF-Komplexe das Ubiquitin-ähnliche NEDD8 aus seiner kovalenten Bindung und sorgt damit dafür, dass die SCF-abhängige Ubiquitin-Ligase-Aktivität in der Zelle reibungslos funktioniert. Bei drastischen Umbaumaßnahmen eines Organismus – wie der Embryonalentwicklung von Pflanze, Mensch und Tier oder bei der pilzlichen Fruchtkörperbildung – scheint das reibungslose Ablaufen eines korrekten Protein-Turnover von besonderer Bedeutung zu sein.

Pilze als Modellsysteme

A. n. ist auf den sexuellen Zyklus nicht angewiesen, weil er in seinem vegetativen Wachstum auch noch über die asexuelle Sporenbildung und zusätzlich über den Mechanismus der Parasexualität verfügt. Dadurch ist dieser Pilz besonders geeignet, um den geregelten Protein-Abbau während der Entwicklung im Allgemeinen und die Rolle des CSN-COP9-Signalosoms im Besonderen zu untersuchen. *A. n.* könnte damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis komplexer molekularer Prozesse in der Entwicklung von Vielzellern liefern. ■

Danksagung

Die Arbeiten im Labor werden in erster Linie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, VW Vorab und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Literatur

- [1] Hershko, A., Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425–479.
- [2] Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5: 141–239.
- [3] Fischer, R., Braus, G.H. (2006): Genomsequenz von Schimmelpilzen bringt Sex ans Licht. *BIOspektrum* 3/06: 270–271.
- [4] Braus, G.H., Krappmann, S. and Eckert, S. (2002): Sexual development in ascomycetes: Fruit body formation in *Aspergillus nidulans*. In: Osiewacz, H.D. (Hrsg.) *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker Inc, New York: 215–244.
- [5] Hoffmann, B., Wanke, C., Kirchner, S.K., Braus, G.H. (2000): *c-Jun* and *RACK1* homologs regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 37: 28–41.
- [6] Hoffmann, B., Valerius, O., Andermann, M., Braus, G.H. (2001): Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of the amino acid regulator gene *cpcA* of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2846–2857.
- [7] Jentsch, S., Pyrowolakis, G. (2000): Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell. Biol.* 10: 335–342.
- [8] Jackson, P.K., Eldridge, A.G. (2002): The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol. Cell* 9: 923–925.
- [9] Galagan, J.E., et al. (2005): Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105–1115.
- [10] Krappmann, S., Jung, N., Medic, B., Busch, S., Prade, R.A., Braus, G.H. (2006): The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol. Microbiol.* 61: 76–88.
- [11] Busch, S., Eckert, S.E., Krappmann, S., Braus, G.H. (2003): The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 49: 717–730.
- [12] Bech-Otschir, D., Seeger, M., Dubiel, W. (2002): The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Cell. Sci.* 115: 467–473.
- [13] Wei, N., Chamovitz, D.A., Deng, X.W. (1994): Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 78: 117–124.
- [14] Cope, G.A., Deshaies, R.J. (2003): COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other Cullin-based ubiquitin-ligasens. *Cell* 114: 663–671.
- [15] Lima, J.F., Malavazi, I., Fagundes, M.R.Z.K., Savoldi, M., Goldman, M.H.S., Schwier, E., Braus, G.H., Goldman, G.H. (2005): The *csnDE* signalosome genes are involved in the *Aspergillus nidulans* DNA damage response. *Genetics* 171: 1003–1015.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Gerhard Braus
Georg-August-Universität Göttingen
Institut für Mikrobiologie und Genetik
Abt. Molekulare Mikrobiologie und Genetik
Grisebachstr. 8
D-37077 Göttingen
Tel.: 0551-39-3770
Fax: 0551-39-3330
gbraus@gwdg.de

AUTOR



Gerhard Braus

Studium der Biologie in Freiburg, 1987 Promotion und 1991 Habilitation in Mikrobiologie an der ETH Zürich, 1992 University of Georgia, Athens, USA, 1993–1996 Professor für Biochemie an der Universität Erlangen, seit 1996 Professor für Mikrobiologie an der Universität Göttingen (www.gwdg.de/~molmibio).