

Split-Ubiquitin-System

Josef Riedl (Gr. 7) – 06/2004

Einführung

Das Split-Ubiquitin-System ist eine Weiterentwicklung des 2-Hybrid-Systems und damit ein typisches Zwei-Komponenten-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Das heißt: Zwei potentielle Interaktionspartner (*bait* und *prey*) tragen jeweils eine Komponente irgendeines Reportersystems; dessen Aktivität wird erst hergestellt, wenn *bait* und *prey* sich zu einem Komplex zusammenlagern und damit auch die Verbindung zwischen den beiden Reporter-Komponenten herstellen.

Beim Two-Hybrid-System werden an *bait* und *prey* eine DNA-Bindedomäne und eine Aktivator-domäne gekoppelt. Bei der Bildung eines Komplexes formen *bait* und *prey* den Reporter, der seinem natürlichen Vorbild - einem DNA-Aktivierungsprotein - entspricht.

Dieses einfache Prinzip ist gleichzeitig der Nachteil des Systems, da sich der Interaktions-Komplex so verhalten muss wie das Reporterprotein. Da eine DNA-Aktivierung und somit eine Lokalisation im Kern erforderlich ist, scheiden alle Proteine, die nicht in den Kern gebracht werden können - z.B. Membranproteine aus.

Dieses Problem wird beim Split-Ubiquitin-System dadurch gelöst, dass der Interaktions-Komplex nicht selbst als Reporter wirkt, sondern einen Reporter freisetzt, der räumlich (und sogar zeitlich) unabhängig von den interagierenden Proteinen aktiv werden kann.

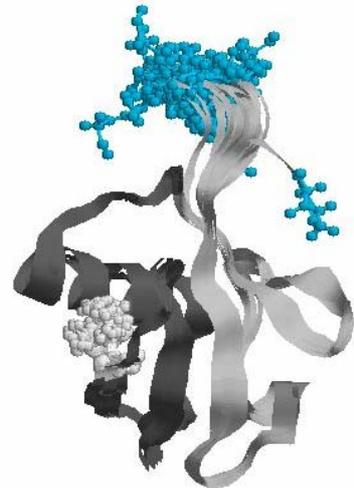
Der Schlüssel dazu ist das Molekül Ubiquitin.

Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines Protein (76 AS, 8.5 kDa), das in der Zelle als Proteinabbau-signal dient. Abzubauen Proteine werden an ein C-terminales Gly-Gly-Segment von Ub angekoppelt. Spezifische Proteasen (UBPs) erkennen diesen Komplex (anhand der 3D-Struktur) und spalten ihn (Bild 1).

Auf Strukturebene kann man Ub in zwei Hälften - Nub und Cub - unterteilen. Interessanterweise müssen diese Hälften nicht über die Peptidbindung verbunden sein. Man kann beide Hälften als getrennte Proteine exprimieren und stellt fest, dass sie sich zu einem funktionellen Ub-Molekül (Split-Ub) zusammenlagern (Bild 2, 3)

Die gezielte Mutation der Aminosäure Ile13 zu Gly13 im Nub-Teil (dann als NubG bezeichnet) verhindert das spontane Zusammenlagern der beiden Hälften (Bild 4). Allerdings können die beiden Hälften "mit Gewalt" angenähert werden und bilden dann doch - im Sinne eines *induced fit* - ein aktives Split-Ub.



Split-Ubiquitin als "Reporter-Adapter"

Das erwähnte Annähern unter Zwang kann zum Beispiel erreicht werden, wenn NubG und Cub an *bait* und *prey* eines Interaktionskomplexes gekoppelt sind. Nur bei Interaktion entsteht funktionelles Split-Ub. Wenn nun an die Cub-Hälfte zusätzlich ein beliebiges anderes Protein angehängt wird (alle diese Konstrukte erfolgen auf Genebene), so wird dieses in genau diesem Fall durch die zellulären UBPs abgespalten oder ganz abgebaut (Bild 5).

Beispielsweise kann man an zwei Membranproteine einerseits NubG, andererseits Cub und zusätzlich LexA, so wird durch die Interaktion das LexA-Protein freigesetzt, dringt in den Kern ein und wirkt dort in seiner Funktion als Transkriptionsaktivator (z.B. für das Lac-Operon).

Biochemie Großpraktikum II - Molekularbiologische Methoden

Einsatzgebiete

Ein vielversprechendes Einsatzgebiet sind alle Membranproteine und andere Proteine, die nicht in den Kern eindringen können. Dazu kommen Proteine, die mit DNA interagieren und daher mit 2-Hybrid nicht kompatibel sind. Darüber hinaus können auch vorübergehende Interaktionen erkannt werden, da der einmal freigesetzte Reporter weiter aktiv bleibt.

Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass Nub und Cub relativ kleine "Anhänge" sind, die wenig stören. - Ein Nachteil ist die derzeit noch fehlende Technologie für Massen-Screening wie bei 2-Hybrid.

Wertvoll ist auch die Möglichkeit, eine Vielzahl von Reportern unterschiedlichen Typs einsetzen zu können:

- R_{Ura3p}: führt nach der Spaltung zu Uracil-Auxotrophie, aber 5-FOA-Resistenz
- RGFP: verändert seine Fluoreszenzeigenschaften nach der Abtrennung (vgl. FRET)
- Immunglobulin: kann leicht isoliert werden und trägt je nach Abspaltung das Zielprotein oder nicht

Es gibt auch Versuche, Nub und Cub an die Enden desselben Proteins zu koppeln und damit die korrekte Faltung oder alternative Konformationen nachzuweisen.

