

# Ubikvitóny

## a tvorba proteínových komplexov

Peter Kolesár

26.2.2015

# Post-translačné modifikácie proteínov

- u eukaryotických buniek
- zvyšujú repertoár proteínov kódovaných bunkovým genómom
- rýchle a reverzibilné adaptácie na zmeny
- Pripojenie - malých molekúl - fosforylácia, acetylácia, metylácia, ...
  - proteínových molekúl: ubikvitín + ubikvitínu podobné proteíny (ubiquitin-like proteins, UBLs) = ubikvitóny

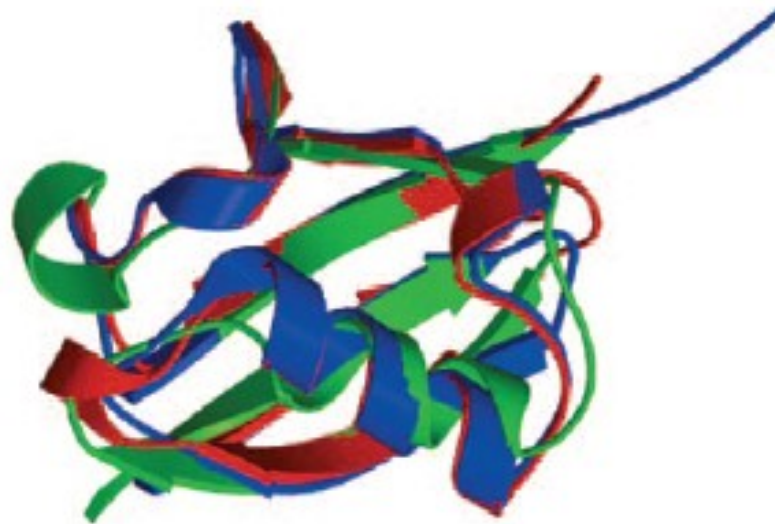
# Ubikvitóny

**Table 1 | Known and putative UBLs and their activating and conjugating enzymes**

UBL*	Identity with ubiquitin (%)	E1 (UBL-activating enzyme)*	E2 (UBL-conjugating enzyme)*	Comments on UBL
<b>Known UBLs</b>				
Ubiquitin	100	Uba1 (UBA6)	Many	Precursors encoded by multiple genes
Rub1 (NEDD8)	55	Uba3-Uba1 heterodimer	Ubc12	Substrates are cullins and p53
FUBI (also known as MNSF- $\beta$ or FAU)	38	NI	NI	Derived from a ribosomal-protein precursor
FAT10	32 and 40†	UBA6	NI	Contains a $\beta$ -grasp fold Substrates unknown
ISG15	32 and 37†	UBE1L	UBCH8	Production induced by type I interferons
Smt3 (SUMO1, SUMO2, SUMO3)	18	Uba2-Aos1 heterodimer	Ubc9	SUMO encoded by 3–4 genes in vertebrates, depending on the species
Atg8	ND	Atg7	Atg3	Three known isoforms in humans Contains a $\beta$ -grasp fold
Atg12	ND	Atg7	Atg10	~20% identical to Atg8
Urm1	ND	Uba4	NI	Related to the small sulphur-carrying proteins MaaD and ThiS Contains a $\beta$ -grasp fold
UFM1	ND	UBA5	UFC1	Contains a $\beta$ -grasp fold
<b>Putative UBLs</b>				
BUBL1, BUBL2	Variable (up to 80%)	NI	NI	Putative autoprocessed proteins in ciliates
UBL-1	40	NI	NI	A precursor to ribosomal proteins in nematodes
SF3A120	30	NI	NI	UBL domain at C terminus No data about conjugation
Oligoadenylate synthetase	30 and 42†	NI	NI	UBL domain at C terminus No data about conjugation

ND, not detectable by standard BLAST searches. NI, not identified. \*UBLs are listed as the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) symbol if the UBL is present in yeast, otherwise vertebrate symbols are listed. Known vertebrate orthologues with symbols that differ from yeast proteins are listed in parentheses. For E1s and E2s, yeast symbols are listed if the protein is found in yeast. (UBA6 has a much more limited phylogenetic distribution than Uba1.) †The identities listed are for each of two ubiquitin-related domains.

# Ubikvitóny - $\beta$ -grasp fold

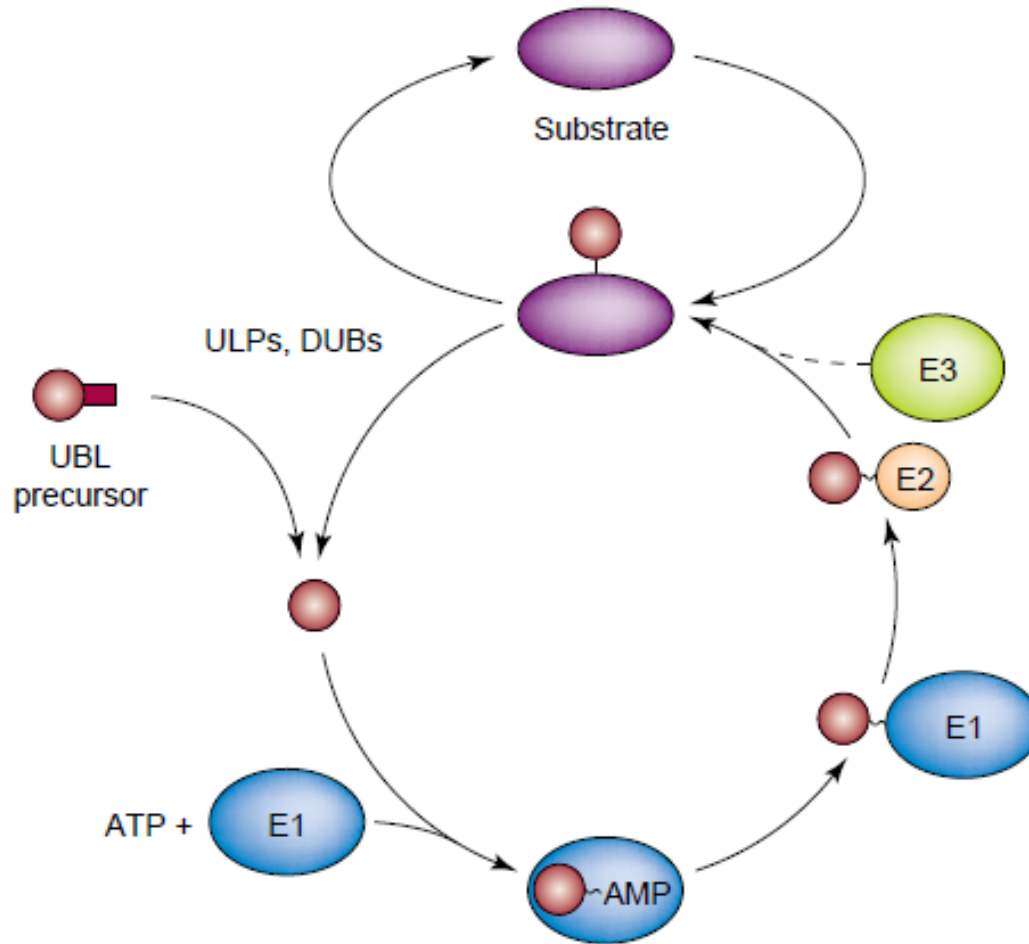


Ubikvitín

SUMO-1

NEDD-8

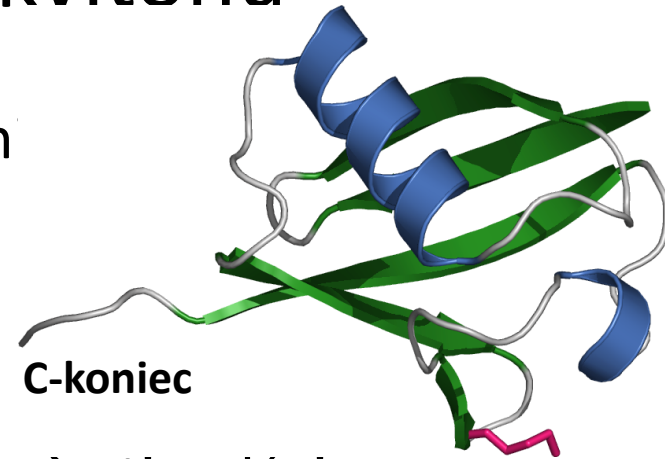
# Konjugačný cyklus ubikvitónov



T/BS

# Dopad pripojenia ubikvitónu

- Pripojenie na proteín cez flexibilný C-koniec  
→ priame ovplyvnenie proteínu zriedkavé

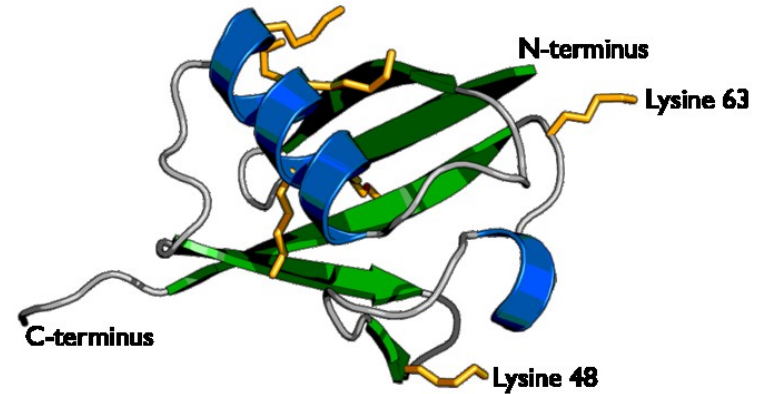


- Prináša povrch pre proteínové interakcie → stimulácia proteín-proteínových interakcií a tvorby proteínových komplexov
- Interakčný partner obsahuje nekovalentné väzobné miesto špecifické pre daný ub. (ubiquitin binding domain, UBD)



- interakcia medzi ub. a UBD je hlavným mechanizmom funkcie týchto modifikácií

# Ubikvitín



- malý proteín (76 aminokyselín)
- hojný vo všetkých eukaryotických buňkách
- globulárna štruktúra
- primárna sekvencia je vysoko konzervovaná
- kovalentné pripojenie k iným proteínom: karboxylový (C) koniec ubikvitínu (glycín) sa kovalentne pripojí k  $\epsilon$ -amino skupine lyzínového zvyšku vnútri cieľového proteínu izopeptidovou väzbou / k amino-skupine N-konca proteínu peptidovou väzbou

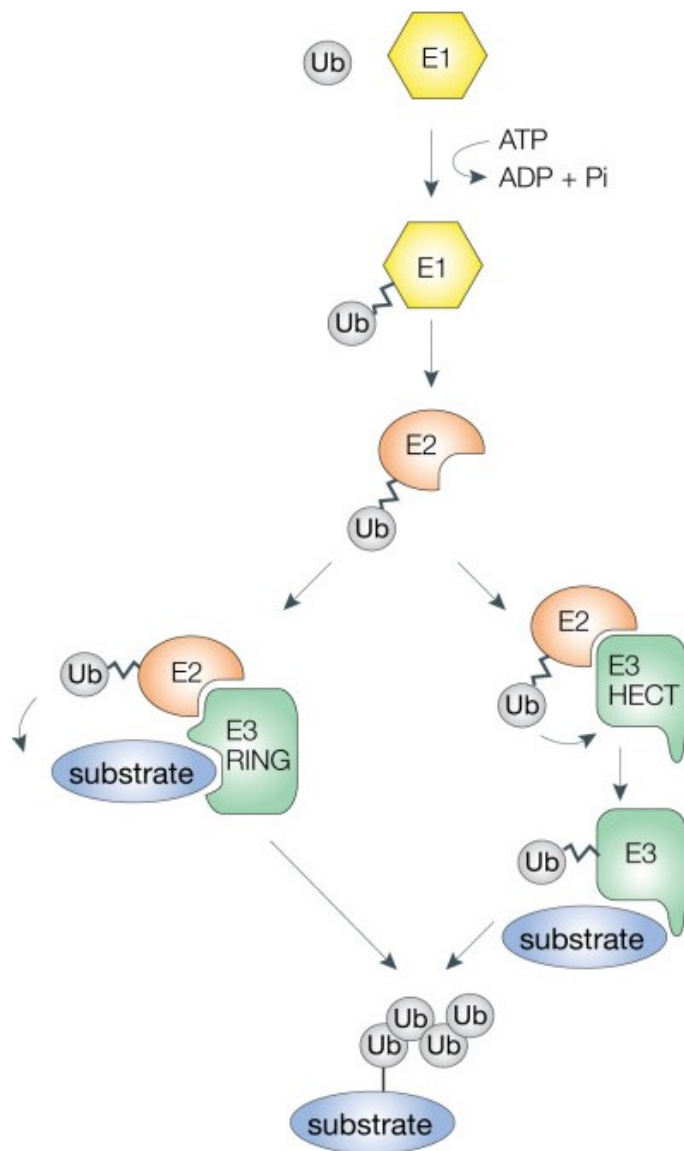
# Ubikvitín - prekurzory



- Ubikvitín je kódovaný génovou rodinou, ktorej primárne translačné produkty sú fúzne proteíny
- fúzie s ribozomálnymi proteínmi / polyubikvitín
  - Ub + ribozomálny proteín – spoločná regulácia ubikvitínového systému s translačnou aktivitou bunky
  - polyubikvitínové gény - exprimované pri stresových podmienkach
- fúzne translačné produkty sú rýchlo spracované aktivitou ubikvitínových C-terminálnych hydroláz → voľný ubikvitín



# Konjugačný systém



Ľudia:

- E1 – 2

- E2 – 35

- E3 > 1000

- Deubikvitinačné enzýmy (DUBs)  
odštepujú ubikvitín zo substrátu

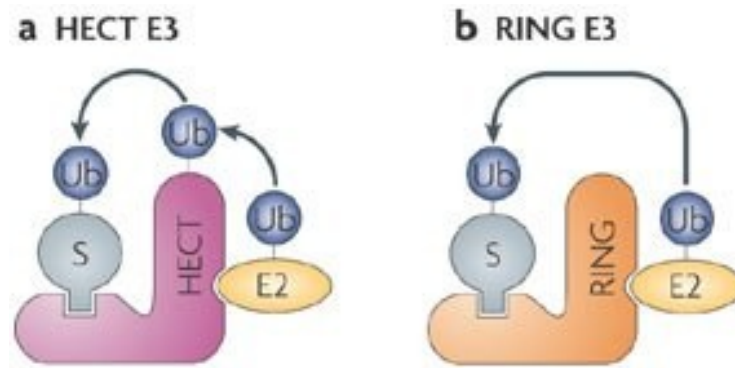
# E3 ubikvitín ligázy

- udeľujú špecificitu tým že rozoznávajú cieľové substráty
- väzobné miesto pre cieľový proteín + pre špecifický E2 enzým
- priblížia substrát a E2 - tým sprostredkovávajú prenos ubikvitínu

## 2 hlavné triedy:

- RING (Really interesting new gene) E3 ligázy (95%)
- HECT (homologous to E6-AP COOH terminus) E3 ligázy

# Rozdiel medzi HECT a RING E3 ligázami



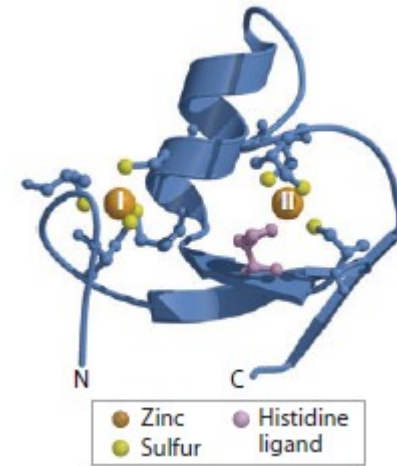
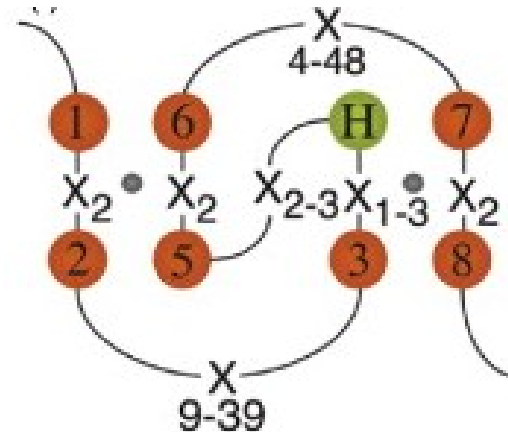
Rotin & Kumar, 2009

Rozdiel v prenose ubikvitínu na substrát:

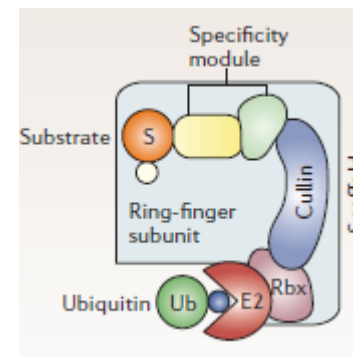
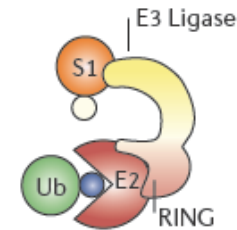
- HECT – obsahujú konzervovaný katalytický cysteín, ktorý funguje ako akceptor ubikvitínu z E2. Ubikvitín je následne prenesený na špecifický lyzín substrátu
- RING – ubikvitín je prenesený z E2 priamo na substrát

# RING E3 ligázy

- RING doména obsahuje 7 cysteínov a 1 histidín alebo 6 cysteínov a 2 histidíny, ktoré držia dva atómy zinku v charakteristickej konformácii (cross-brace motif)
- RING sa viaže s E2
- **2 veľké podskupiny:**
  - jednoduché RING E3 – na jednom polypeptide sa nachádza RING doména aj doména pre väzbu substrátu
  - cullin-RING E3 – tvorené modulárnymi podjednotkami - využívajú RING box protein 1 (RBX1) a RBX2 v komplexe s cullinom a ďalšími substrát-rozoznávajúcimi proteínmi

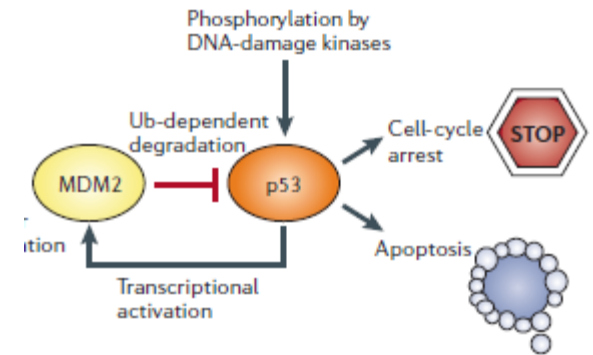


Deshaies & Joazeiro, 2009



Nalepa et al., 2006

# Jednoduché RING E3 ligázy



- **MDM2**

- hlavná ubikvitín ligáza pre p53

- p53= „ochranca genómu,, - zabraňuje mutagenéze a následnej karcinogéneze zástavou bunkového cyklu alebo apoptózou, asi 50% ľudských nádorov obsahuje mutáciu v jeho géne

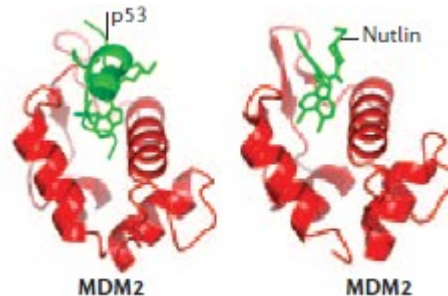
- onkogénny RING E3 enzým - expresia je transkripčne indukovaná proteínom p53 → negatívna sľučka (MDM2 degraduje p53)

- MDM2 inaktivuje p53 najmenej 3 mechanizmami:

- fyzicky blokuje transaktivačnú doménu p53
    - podporuje transport p53 z jadra, čo ho udržuje ďaleko od cieľových génov
    - ubikvitín – dependentnou degradáciou

- môže pôsobiť ako ubikvitín ligáza aj pre iné tumor supresory

- Cielená liečba – vyradenie MDM2 / inhibícia MDM2 interakcie s p53 malými molekulami → stimulácia tumor-supresorovej aktivity p53 (nutlin, PRIMA-1 – fáza II klinických testov)



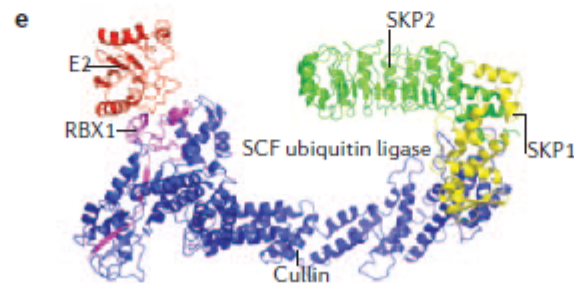
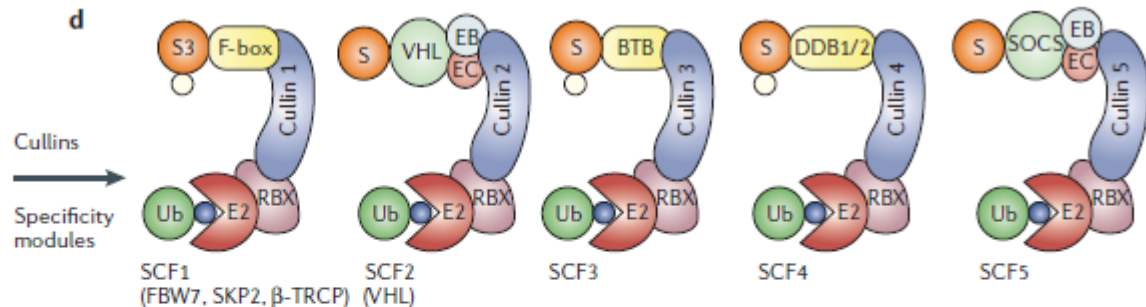
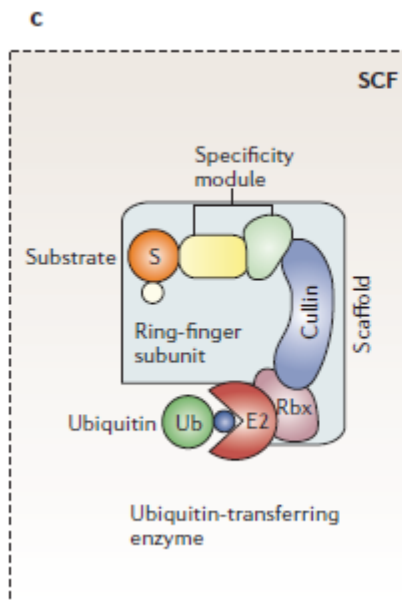
# Cullin-RING E3 ligázy

- multi-podjednotkové E3 ligázy zostavené na cullino-ovom lešení
- 7 cullinov v ľudských bunách - každý súčasťou množstva E3 ligáz

Table 1 | **The cullin-RING-ligase family**

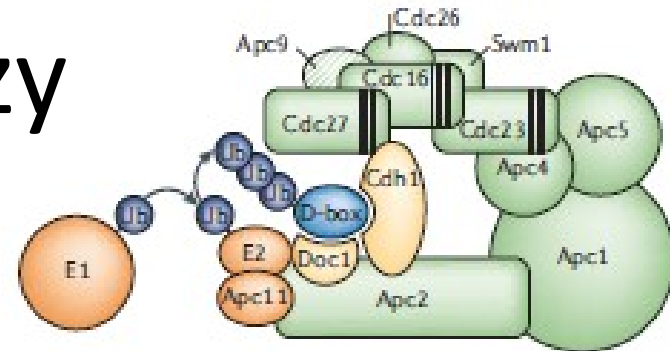
Cullin	Subunit organization	Names
CUL1	F-box protein/SKP1/CUL1/RING	SCF, CDL1
CUL2	SOCS/BC-box protein/elongin BC/CUL2/RING	VBC, CBC, ECS, SCF2, CDL2
CUL3	BTB-domain protein/CUL3/RING	BCR3, SCF3, CDL3
CUL4A	Receptor/DDB1/CUL4A/RING	VDC, DCX, SCF4, CDL4
CUL4B	?/CUL4B/RING	None
CUL5	SOCS/BC-box protein/elongin BC/CUL5/RING	SCF5, CDL5
CUL7	FBX29/SKP1/CUL7/RING	SCF7, CDL7

Petorski et al., 2005



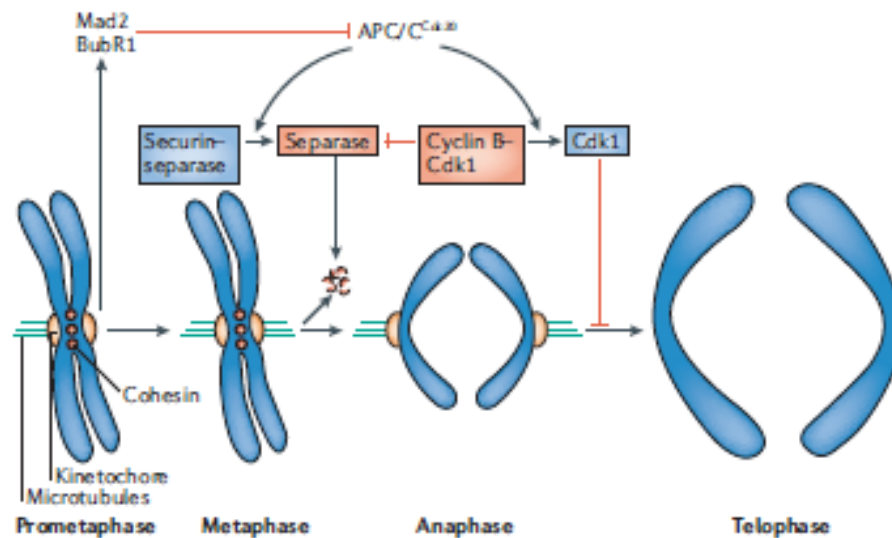
Nalepa et al., 2006

# Cullin-RING E3 ligázy



- **APC/cyklozóm (Anaphase promoting complex)**

- 1,5 MDa komplex (asi 13 podjednotiek – obsahuje aj cullin (APC2) a RING (APC11) podjednotku)
- s APC/C sa prechodne asociujú E2 enzýmy UBCH5 alebo UBCH10
- aktivita závisí na aktivátoroch – napr. CDC20, ktorý je aktívny od metafázy do telofázy
- Spúšťa prechod z metafázy do anafázy – ubikvitináciou proteínov ako securin, S a M cyklíny, ...
- v metafáze APC/C<sup>CDC20</sup> iniciuje ubikvitináciu securinu (inhibitor separázy) → aktivovaná separáza štiepi Scc1 podjednotku kohezínu (drží sesterské chromatidy pohromade), čo umožňuje rozchod sesterských chromatíd k pólom bunky



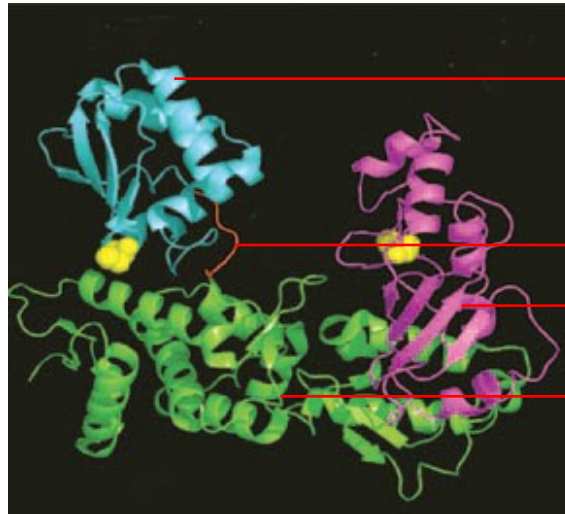
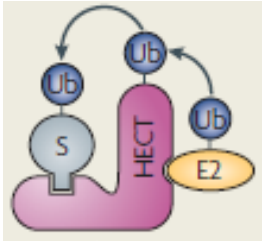
# U-box E3 ligázy

- U-box motif je štruktúrne podobný RING doméne a viaže E2 enzýmy
- U-box neviaže ióny kovu, priestorovú konformáciu určujú intramolekulárne vodíkové väzby
- CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) = STUB1 – U-box ligáza dôležitá pri odstraňovaní abnormálnych proteínov ako je nesprávne poskladaný CFTR pri cystickej fibróze a tau proteíny ktoré sa vyskytujú pri niektorých neurodegeneratívnych chorobách (AD)
- málo preskúmané





# HECT E3 ligázy



→ N-terminálna katalytická doména  
(obsahuje aktívne miesto cysteínu - žlté)

→ ohybová doména

→ Ubc7

→ Ubc väzobná doména

- U ľudí približne 30 HECT ligáz
- HECT doména – 350 aminokyselín na C-konci proteínov
- HECT doména (homologous to E6-AP COOH terminus) – prvý-krát objavená u ubikvitín ligázy E6-AP, ktorá sa asociuje s E6 HPV (human papillomavirus) onkoproteínom, čo vedie k ubikvitinácii a degradácii p53 v bunkách exprimujúcich HPV-E6 → možná tvorba nádorov (rakovina krčku maternice = děložního čípku)
  - mutácie pri aktívnom mieste E6-AP – Angelmanov syndrom – mentálna retardácia, nadmerný smiech, ....

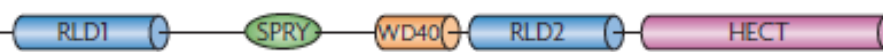
# Príklady HECT E3 ligáz

## HERC family (six members)

Small HERCs



Large HERCs  
(for example,  
HERC1)



## Nedd4 family

(nine members)



## Other HECTs

E6AP, HECTD2 and  
KIAA0614



TRIP12



G2E3



PHD or RING

EDD



HACE1 and HECTD1



ANK

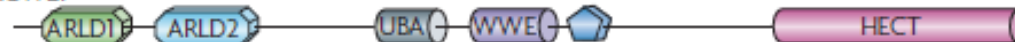
UBE3B and UBE3C



KIAA0317



HUWE1



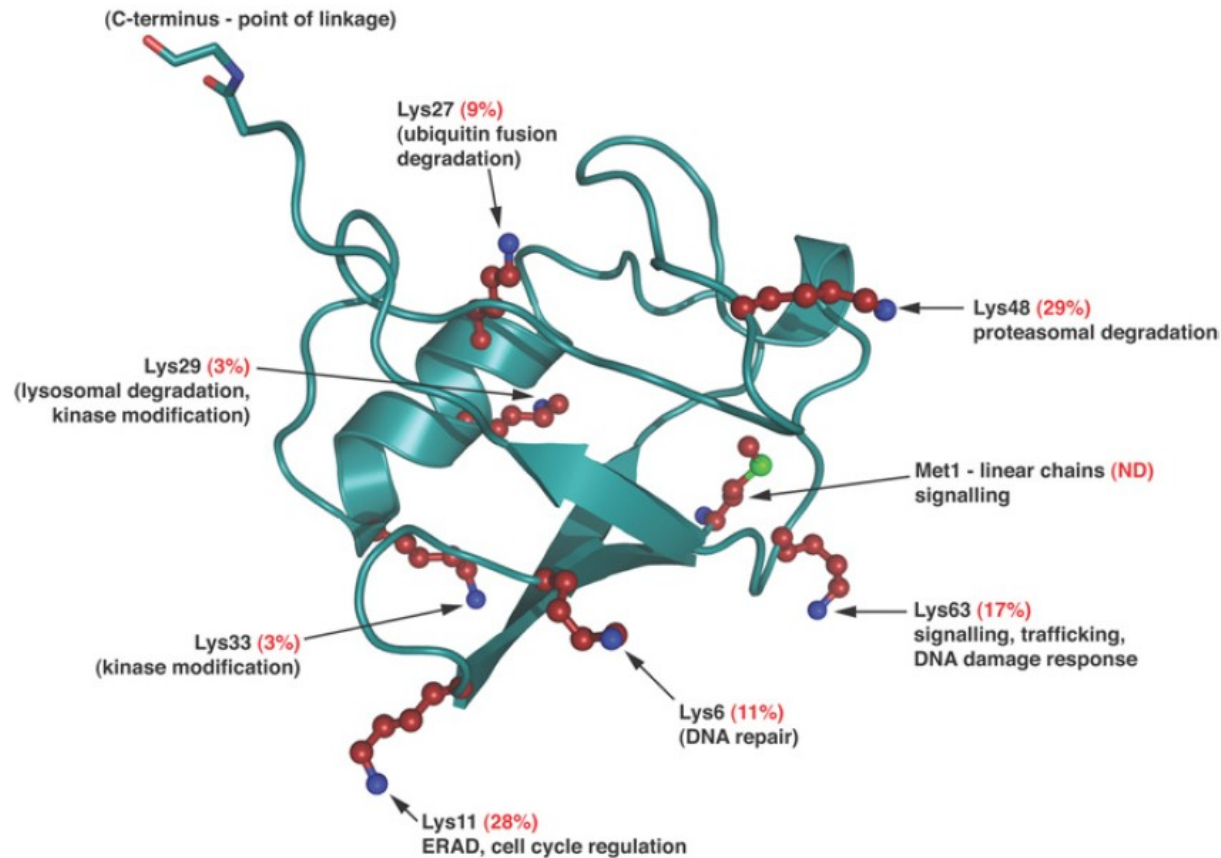
BH3

HECTD3

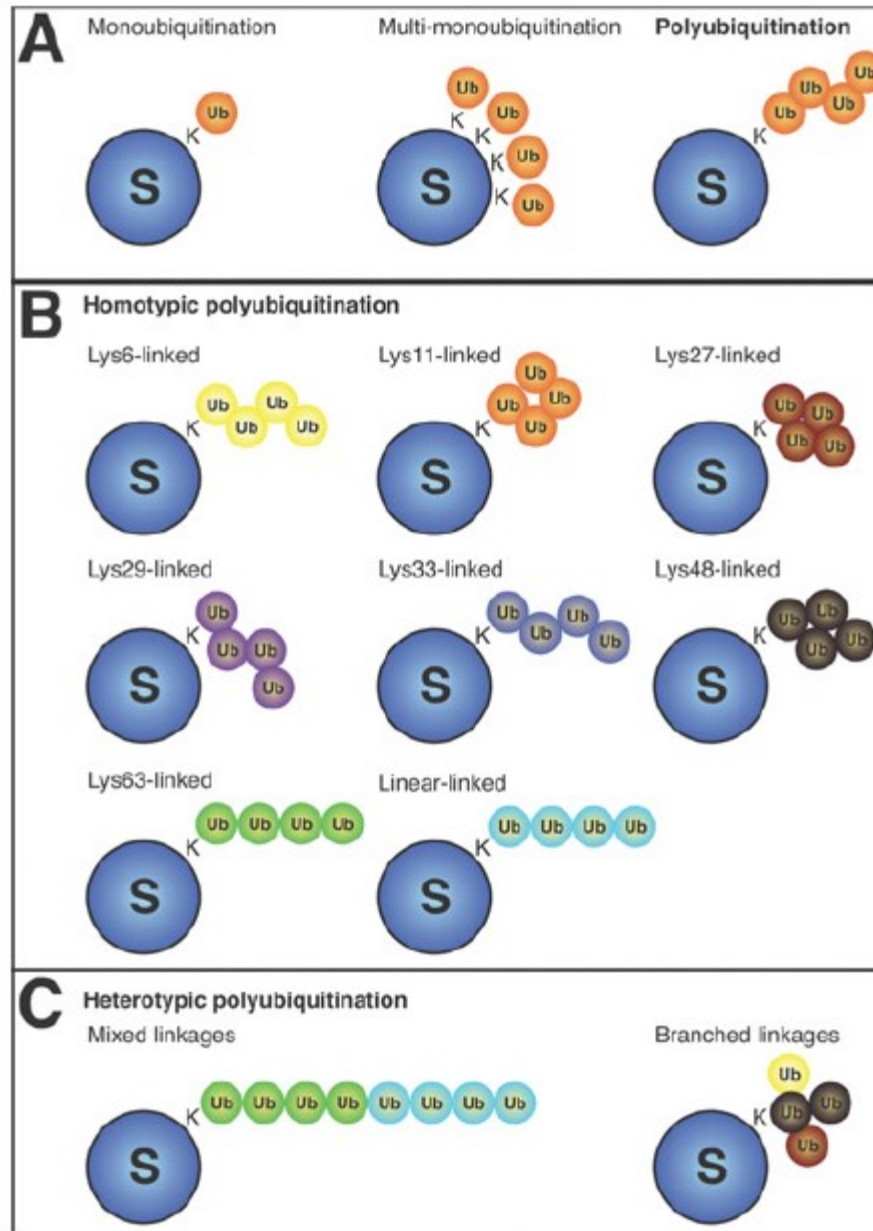


# Monoubikvitinácia / polyubikvitinácia

- Polyubikvitinácia – samotný ubikvitín je substrátom ubikvitinácie
- Ubikvitín má 7 lyzínov ktoré môžu byť modifikované + N-koniec



# Monoubikvitinácia / polyubikvitinácia

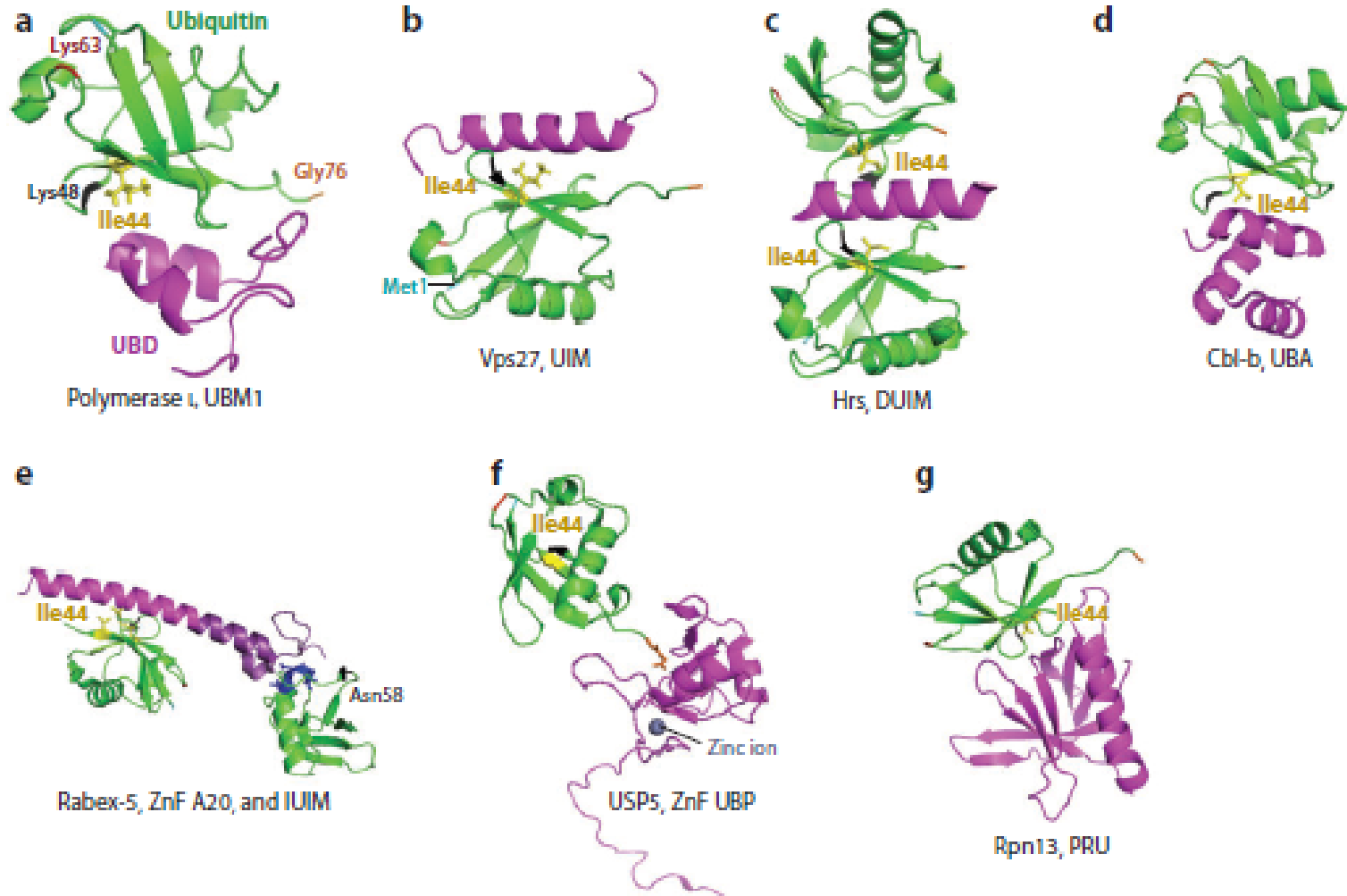


# Dopad pripojenia ubikvitínu

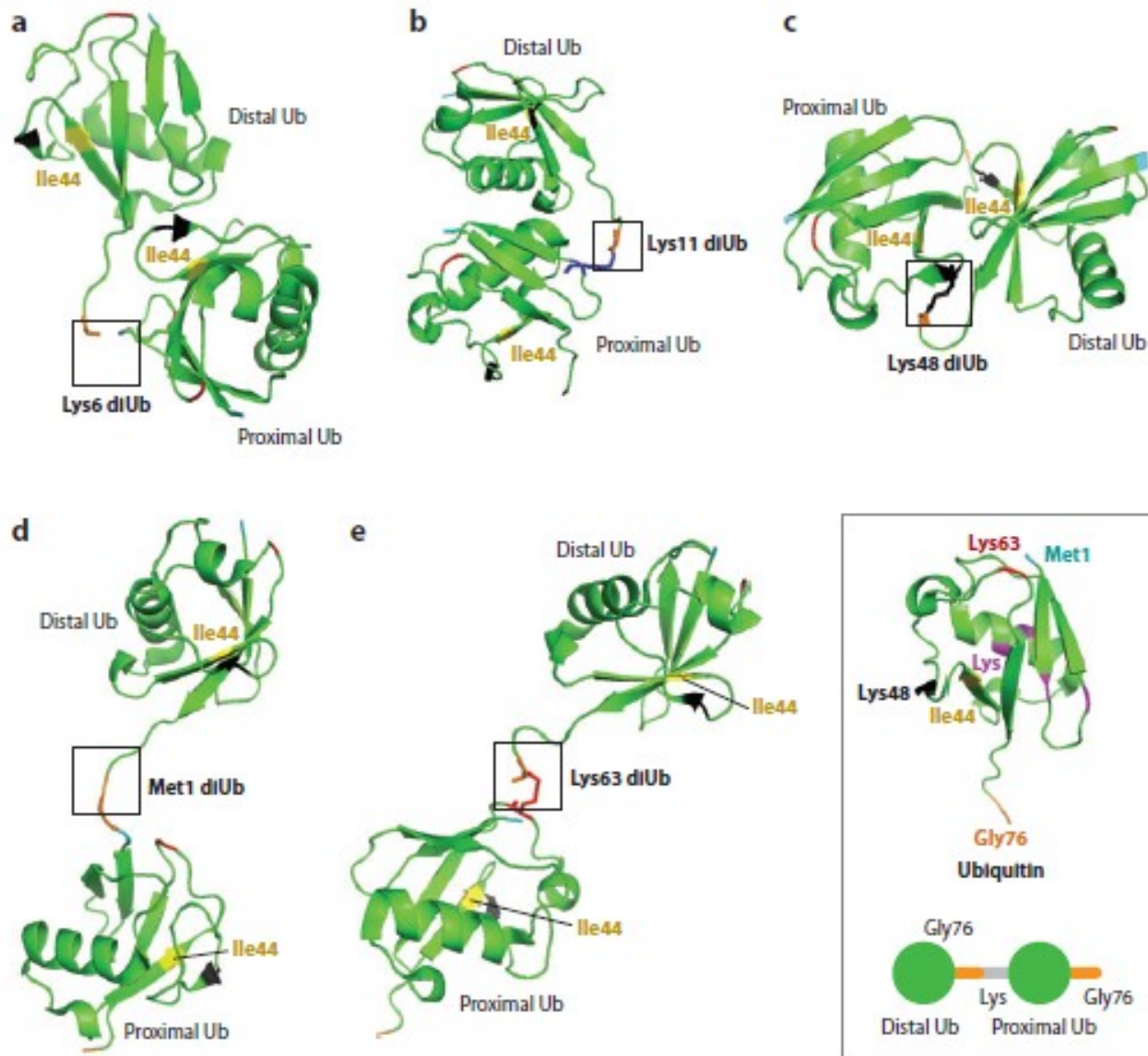


- stimulácia proteín-proteínových interakcií
- Interakčný partner (ubikvitínový receptor) obsahuje nekovalentné väzobné miesto špecifické pre ubikvitín (**ubiquitin binding domain, UBD)**)
- Asi 20 rôznych typov UBD s rôznymi štruktúrami a veľkosťou
- Väčšina UBD sa viaže s hydrofóbnym miestom ubikvitínu okolo Ile44 (Leu8, Ile44, Val70) (zvyšok ubikvitínu je polárny)

# UBD – vazba s monoubikvitinom

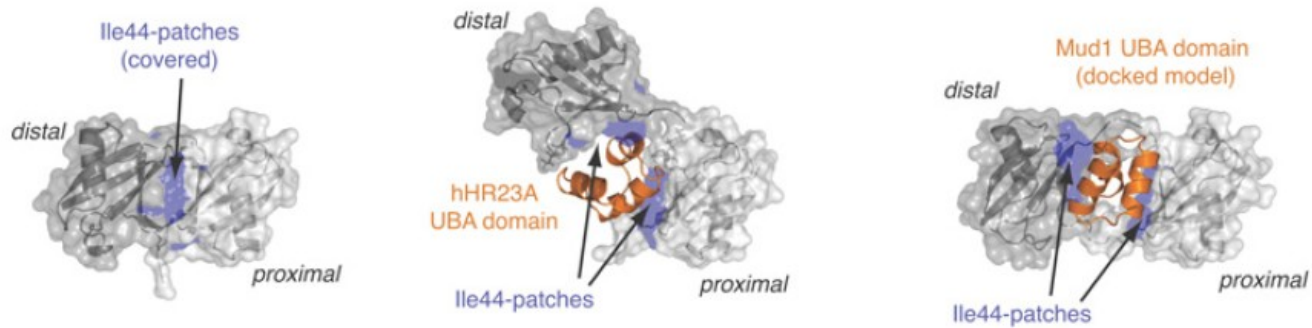


# Rôzne ub reťazce majú odlišnú topológiu

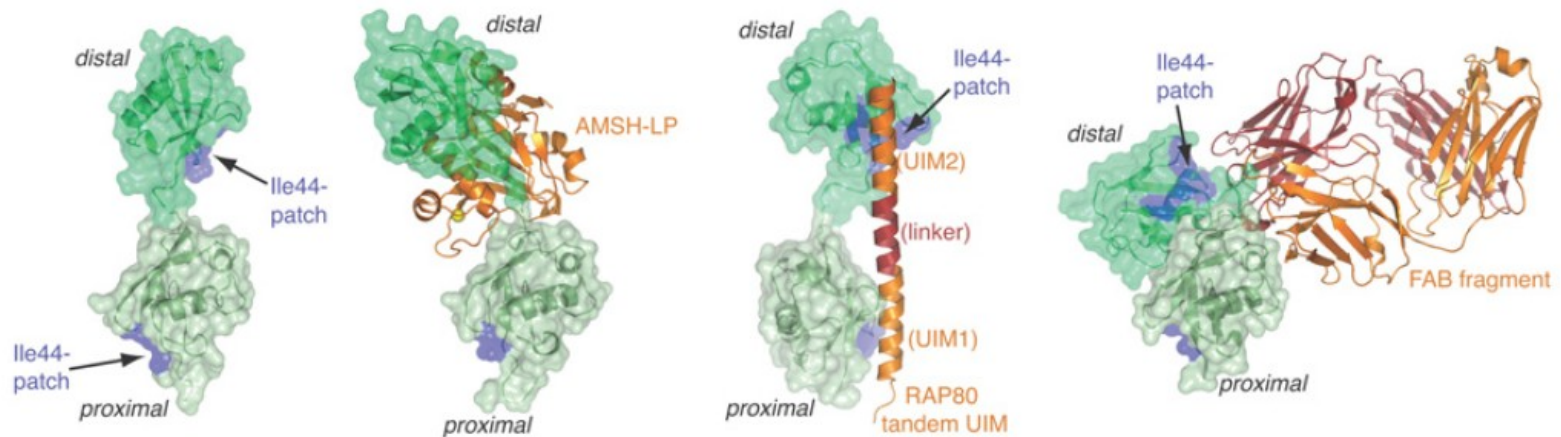


# UBD - odlišenie rôznych ub reťazcov

## A Lys48 diubiquitin complex

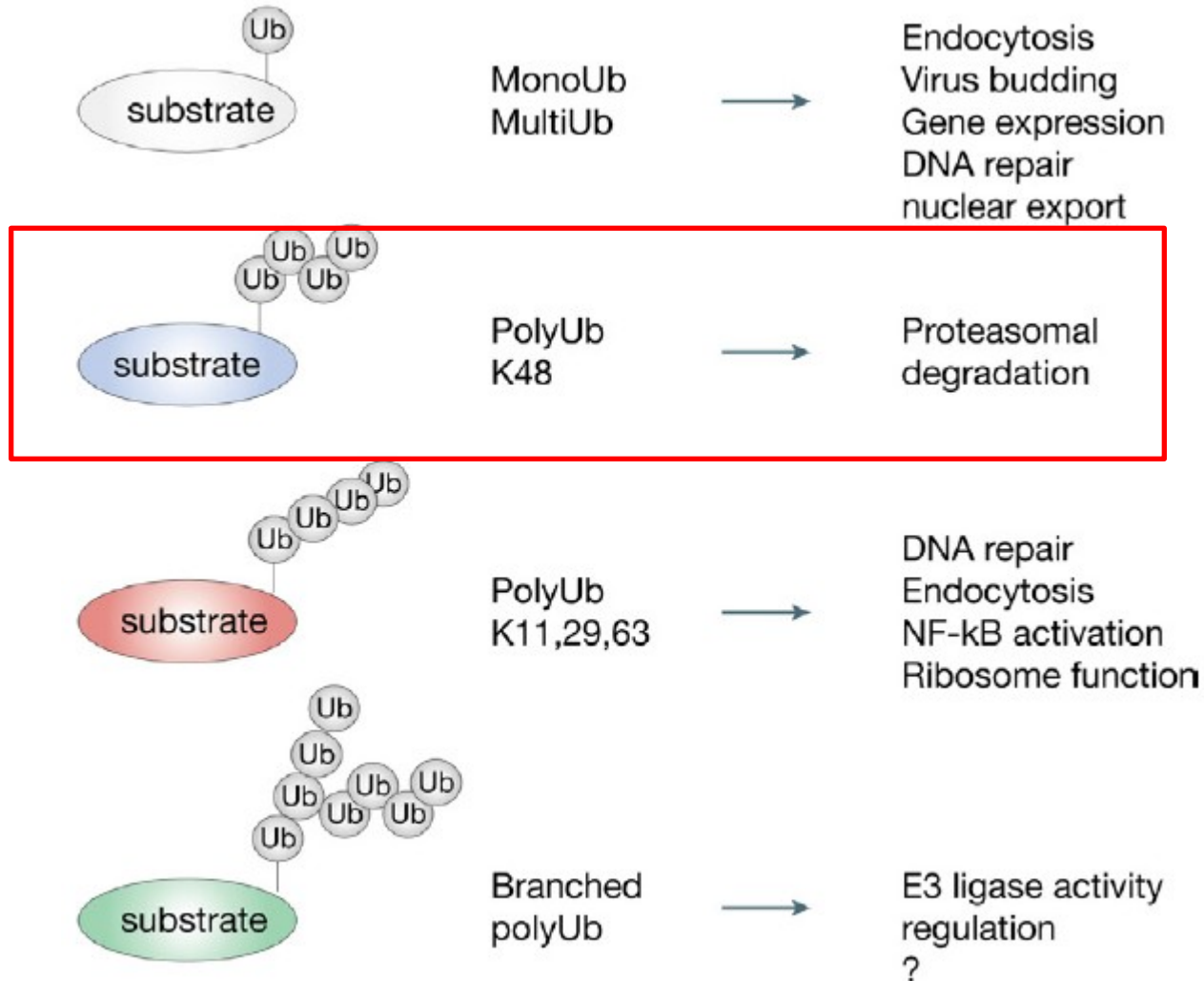


## B Lys63 diubiquitin complexes



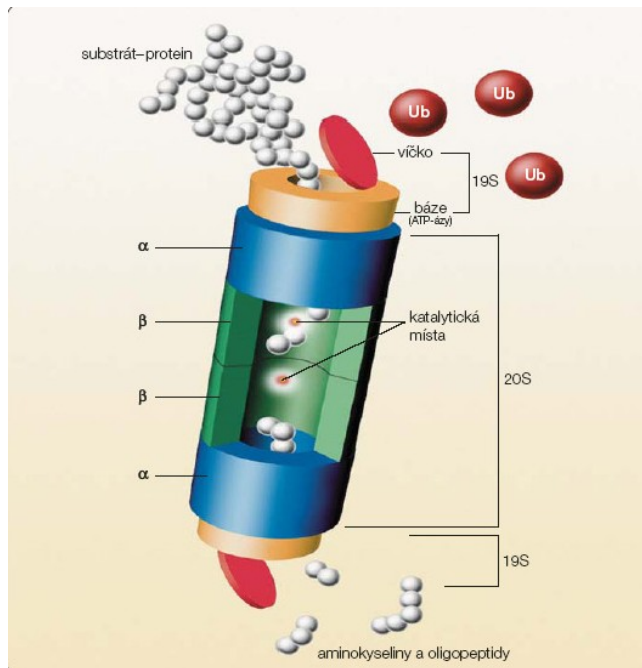


# Funkcie ubikvitinácie



# Cytozolická degradácia proteínov v proteazómoch

- Konjugácia ubikvitínu - hlavná nelyzozomálna proteolytická dráha
- Po selektívnom označení proteínu konjugáciou ubikvitínového reťazca K48 dochádza k jeho degradácii v proteazóme
- odstránenie abnormálnych proteínov, riadi dĺžku života dôležitých regulačných proteínov (transkripčné faktory (p53), cyklíny, securin,...)

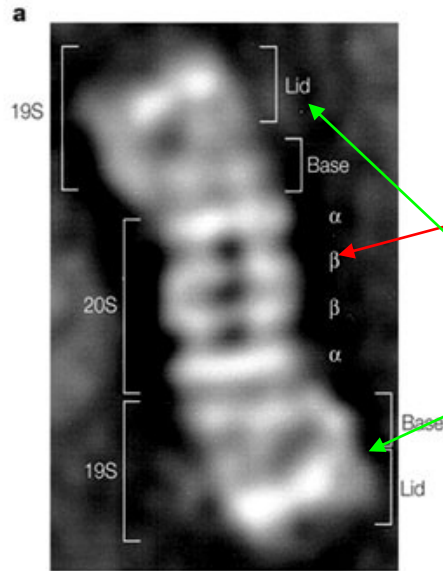


## 26S proteazóm

- veľký (2 MDa) multipodjednotkový proteázový komplex na degradáciu proteínov
- cielene degraduje proteíny označené K48 polyubikvitináciou (4 a viac ubikvitínov v reťazci)

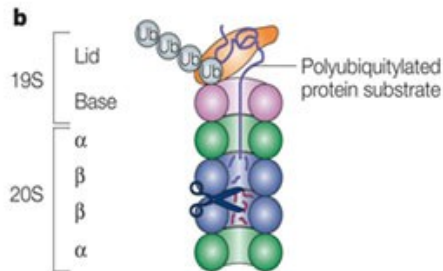
2004 Nobelova cena za chémiu – objav ubikvitín-dependentnej proteazomálnej degradácie proteínov - Avram Hershko, Aaron Ciechanover, Irwin Rose

# Štruktúra 26S proteazómu

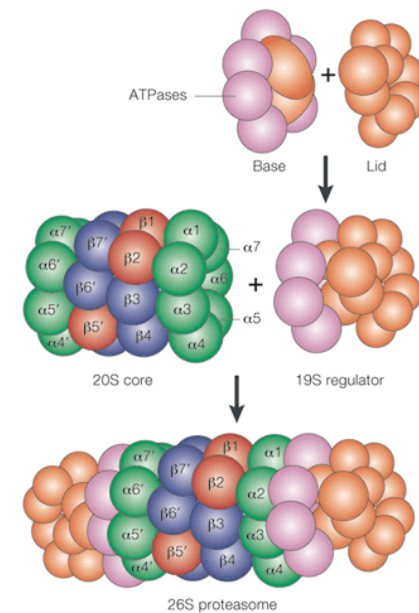


## Skládá se z 2 subkomplexov:

- 20S centrálna časť (core particle) – vykazuje katalytickú aktivitu
- 19S regulačná časť (regulatory particle)



# Štruktúra 26S proteazómu



Kloetzel, 2001

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

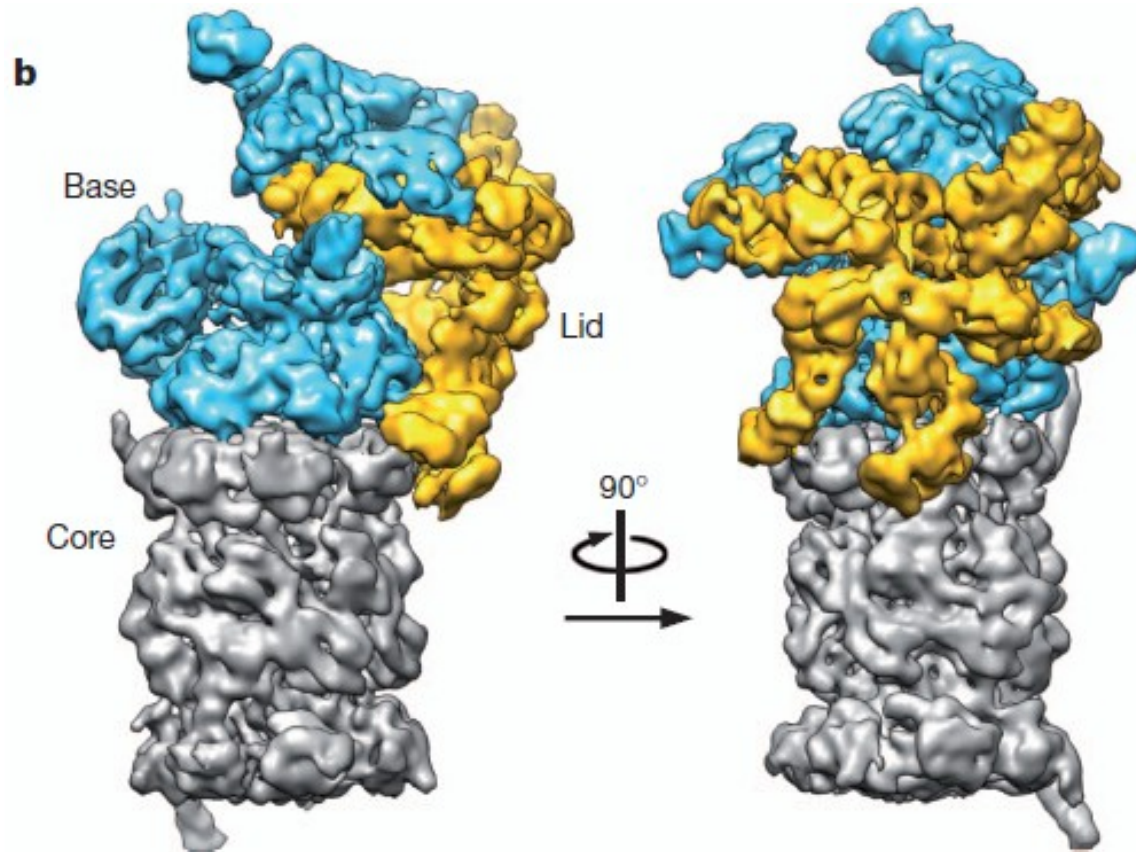
## • 19S regulačná časť

- zložená najmenej z 18 rôznych podjednotiek, ktoré tvoria subkomplexy bázu (base) a viečko (lid)
- viečko obsahuje podjednotky, ktoré viažu ubikvitinované reťazce a 2 deubikvitinačné enzýmy (izopeptidázy) odstraňujúce ubikvitíny (recyklácia)
- báza obsahuje 6 ATPáz priliehajúcich k vonkajšiemu kruhu 20S
- ATPázy viažu proteíny, ktoré majú byť degradované a za hydrolyzy ATP ich rozbaľujú a posúvajú do 20S

## • 20S centrálna časť

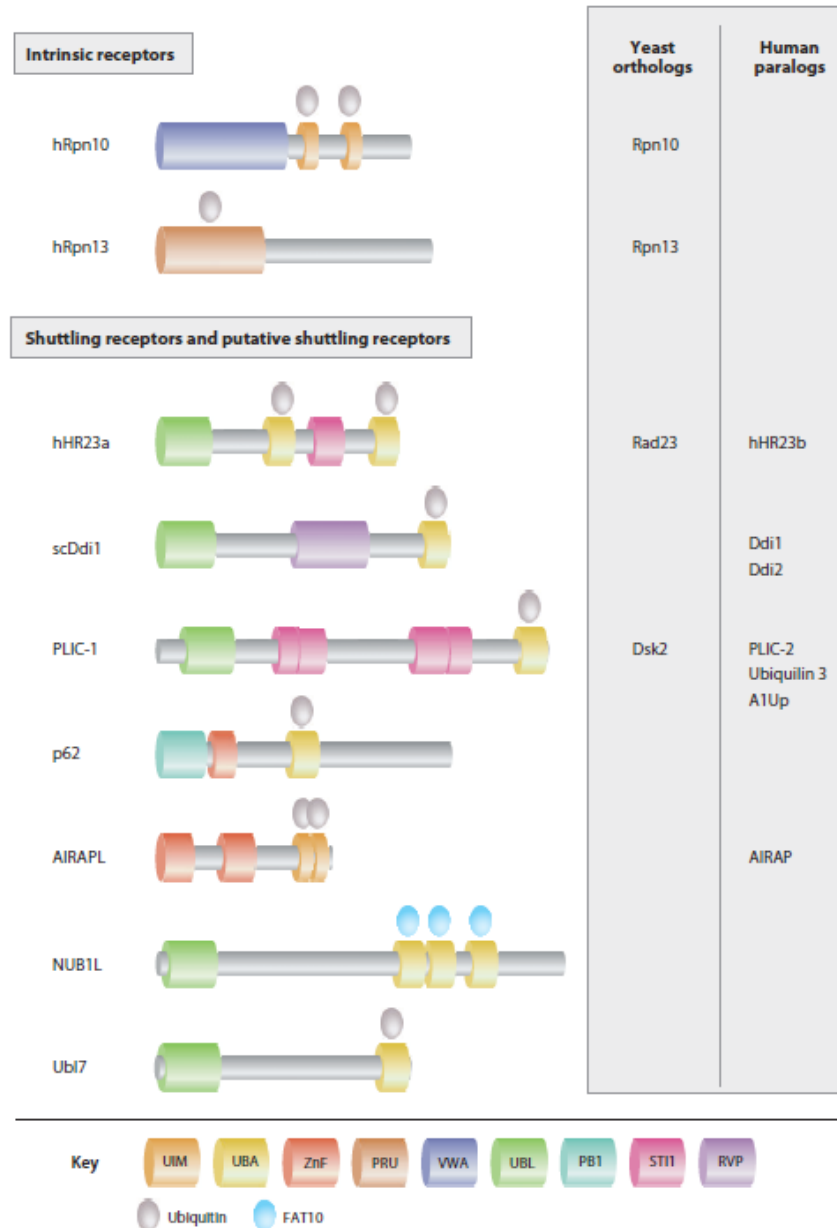
- tvar súdku → zložený zo 4 spojených kruhov → 2 identické vonkajšie  $\alpha$  kruhy a 2 vnútorné  $\beta$  kruhy
- každý kruh je zložený ze 7 rôznych podjednotiek -  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$
- proteolyticky aktívne miesto je na  $\beta$  podjednotkách ( $\beta 1, 2, 5$ )
- $\alpha$  podjednotky obklopujú vstup pre substrát a výstup pre produkt

# Architektura proteazómu



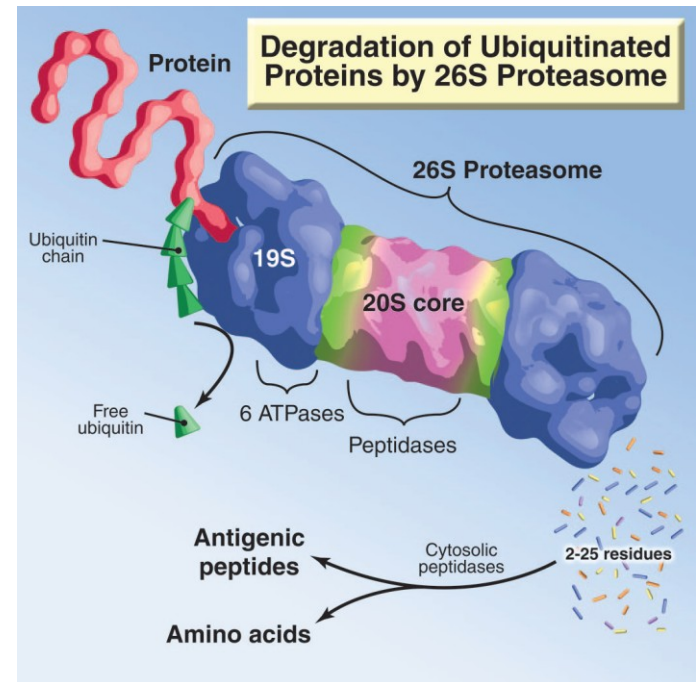
Lander et al, Nature, 2012

# Ubikvitínové receptory proteazómu



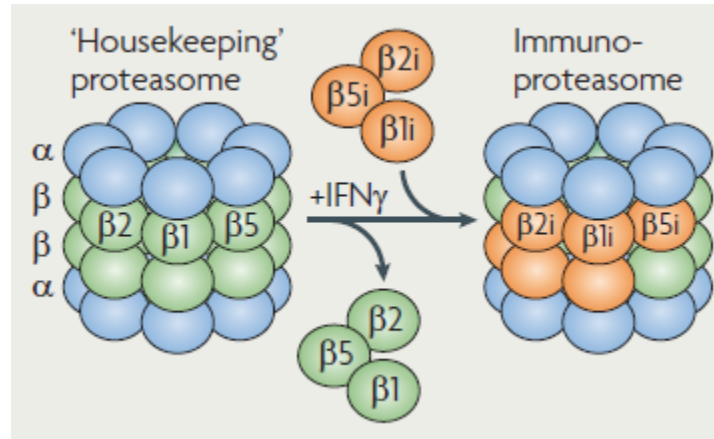
# Priebeh degradácie

1. substrát určený k degradácii sa pomocou ubikvitínového K48 reťazca naviaže na 19S, kde sa polyub reťazec odštiepi a zrecykluje
2. ATPázy linearizujú zbalený proteín (esenciálne pre vstup do 20S, globulárne proteíny sú príliš veľké) a zároveň regulujú otváranie vstupného kanáliku do 20S
3. po vstupe substrátu do centrálnej časti je polypeptid štiepený 6 proteolytickými miestami (2 štiepia preferenčne za hydrofóbnymi ak, 2 za bázickými ak, 2 za kyslými ak) na krátké peptidy
4. peptidy sú uvoľnené z proteazómu a sú degradované cytozolickými endopeptidázami a aminopeptidázami na jednotlivé ak a využité pre syntézu nových proteínov či metabolizmus



J Am Soc Nephrol 17: 1807-1819 (2006)

# Imunoproteazóm

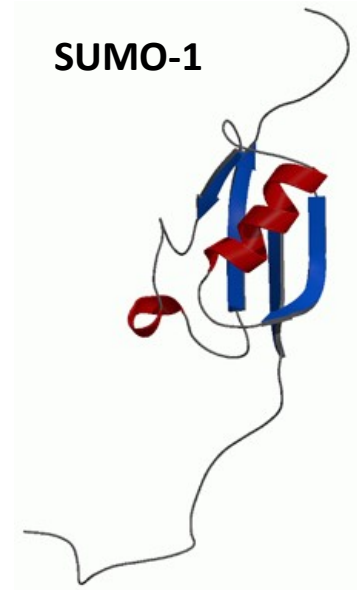


- exprimuje sa v bunkách pri zápalovej odpovedi (expresia spustená interferómom) a v antigén-prezentujúcich bunkách imunitného systému
- Je hybridom pozostávajúcim zo štandardných proteazómových podjednotiek a 3 katalytických  $\beta$ -podjednotiek špecifických pre imunoproteazóm
- Štiepi odlišne od 26S - tvorí väčšiu frakciu peptidov schopných slúžiť ako antigénne peptidy (viazať sa na MHC I molekuly)
- Antigénne peptidy sú na povrchu bunky naviazané na MHC I molekuly a prezentované pre cytotoxické T (CD8<sup>+</sup>) lymfocyty

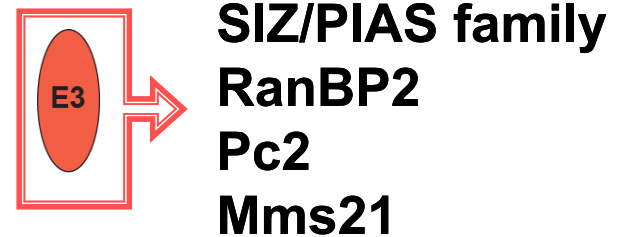
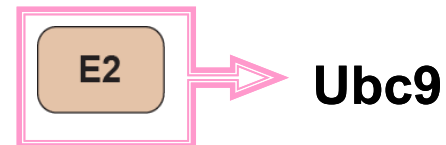
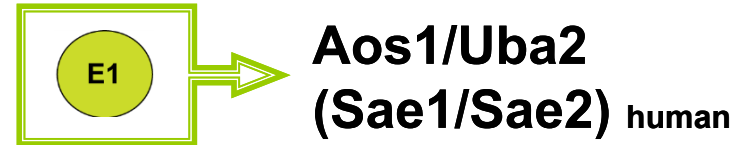
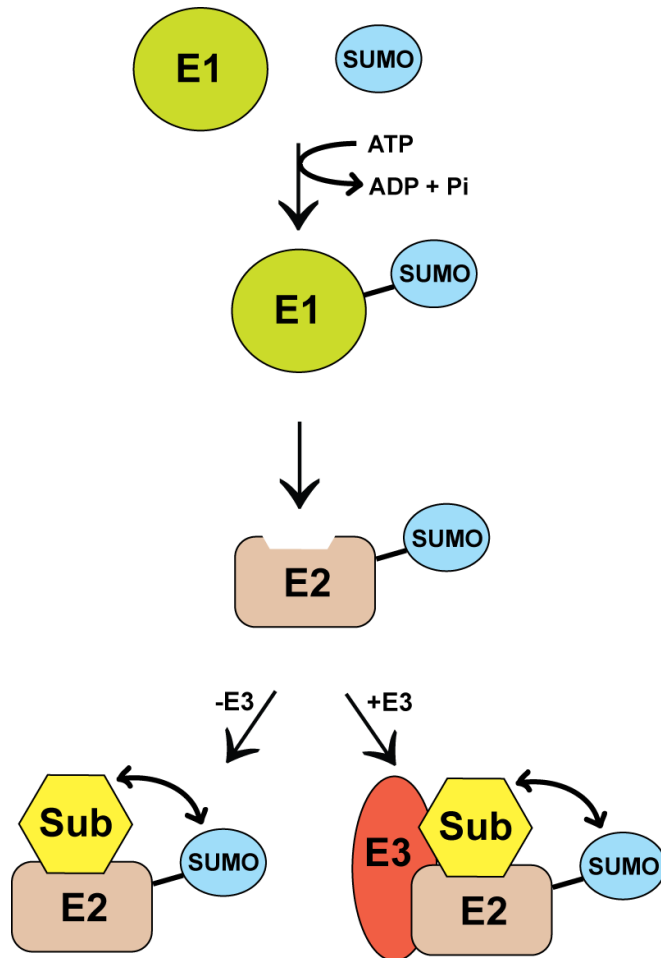


# SUMO proteíny

- Small Ubiquitin-like Modifiers
- Malé ~ 11 kDa proteíny
- 18-20% sekvenčná identita s ubikvitínom
- Kvasinky, bezstavovce – iba jeden SUMO proteín
- cicavce – 3 izoformy: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3
- **Sumoylácia** – kovalentné pripojenie SUMO proteínu k lyzínu cieľového proteínu
  - esenciálna vo všetkých eukaryotických bunkách
  - väčšinou vo forme monomérov a nie reťazcov
  - nevedie k proteozomálnej degradácii

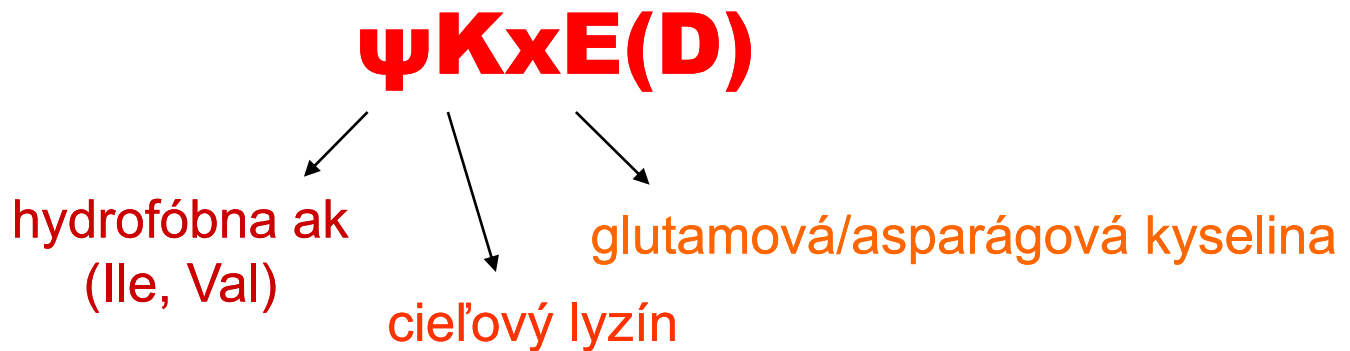


# Sumoyláció



# Sumoylácia

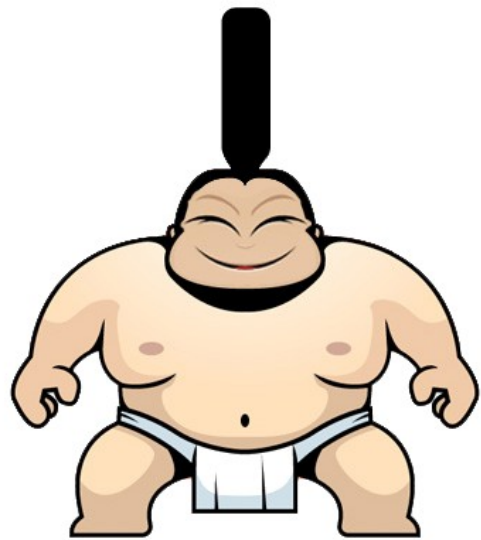
- Reverzibilný proces – SUMO dekonjugované pomocou ULP proteáz u kvasiniek / SENP proteáz u cicavcov
- Typické SUMO-akceptorové miesto:



- Dopad sumoylácie: SUMO stimuluje interakcie s proteínmi obsahujúcimi SUMO-interakčný motív (SIM) – 3-4 hydrofóbne ak + príslušné negatívne nabité zvyšky (napr. IVIIEDD)

K

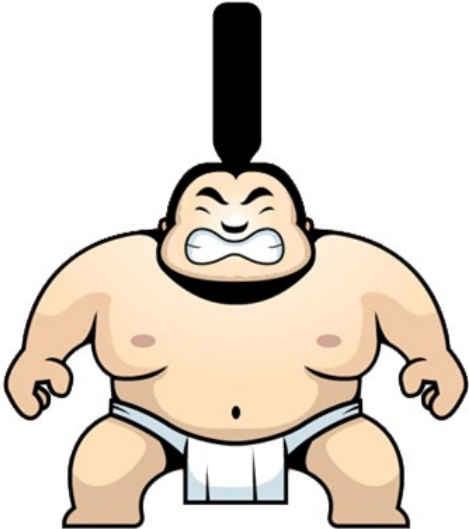


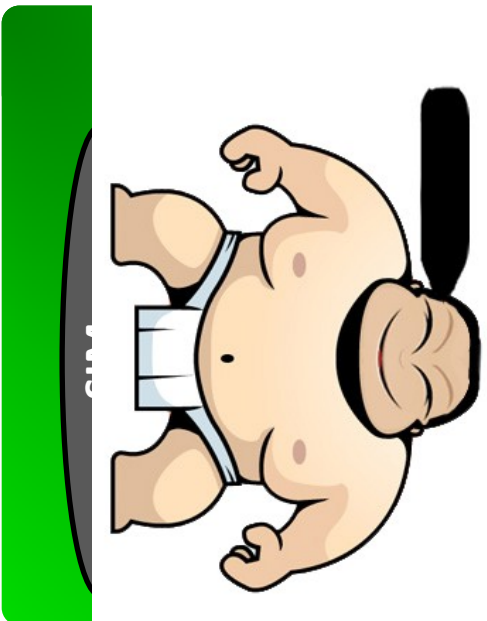


SIM

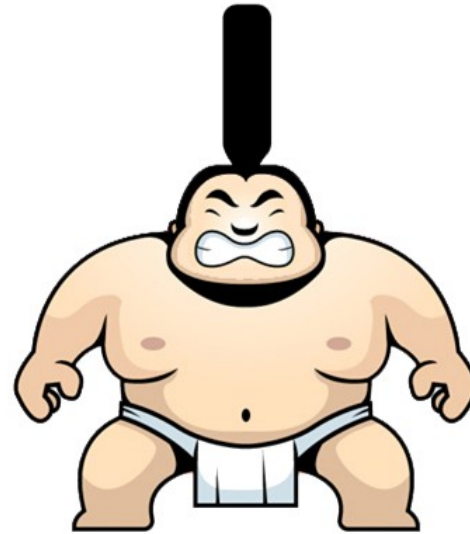


SIM



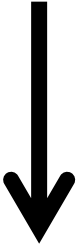
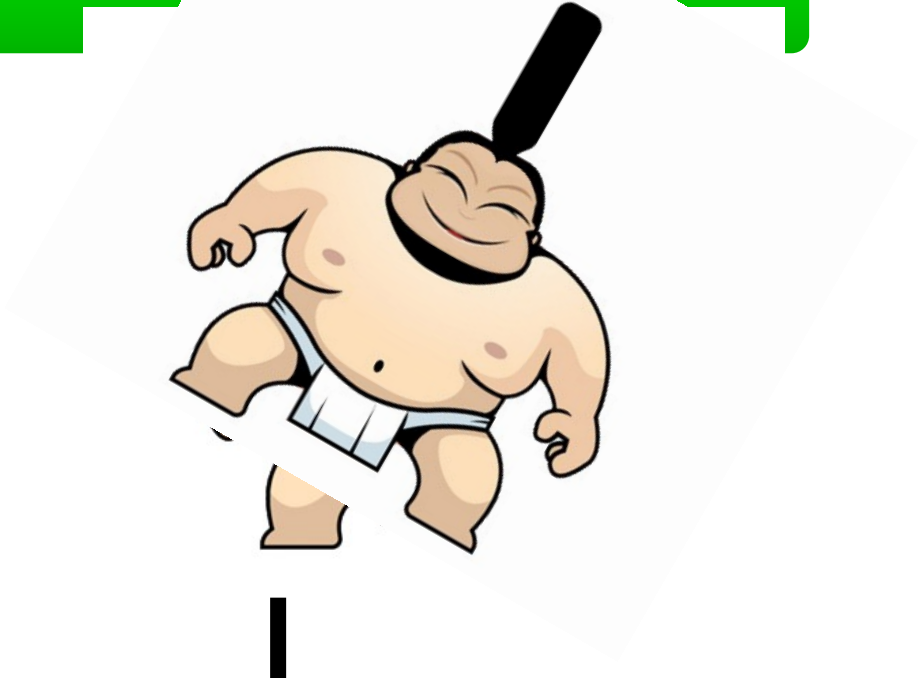


K



SIM





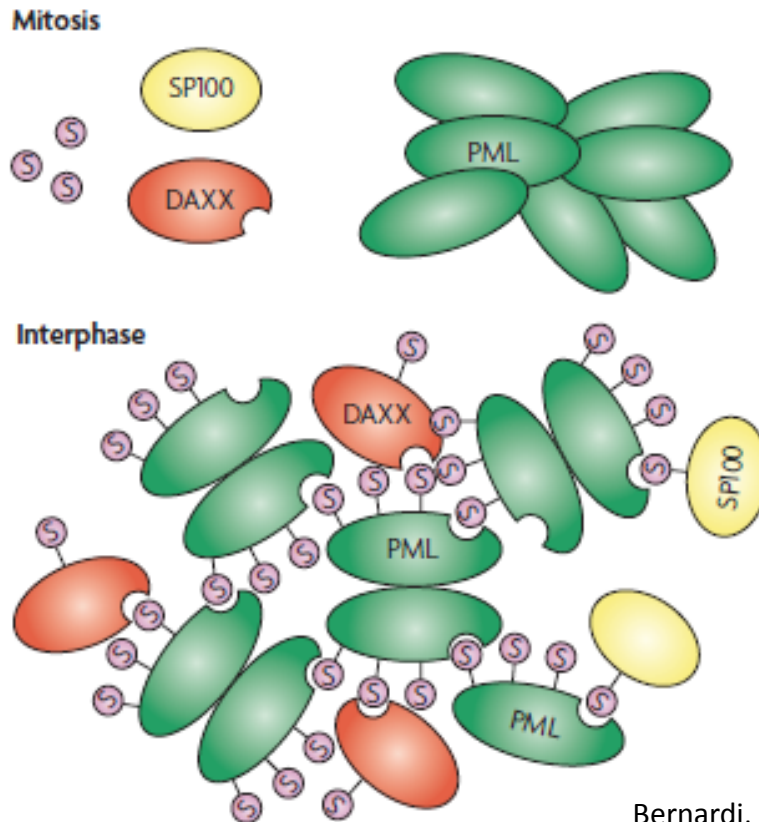
špecifickost' indukovatelnost'



SIM

# SUMO a PML telieska (bodies)

- PML proteín (promyelocytic leukemia) je tumor supresor, ktorý spolu s ďalšími interakčnými partnermi v jadre vytvára PML jadrové telieska
- PML telieska sú dôležité pri regulácii transkripcie, bunkového cyklu, posttranslačných modifikácií, protivírovej odpovedi, oprave DNA, apoptóze,...
- SUMO má centrálnu úlohu pri tvorbe PML teliesok – sumoylácia a následné nekovalentné SUMO – SIM interakcie medzi PML podjednotkami navzájom a s ďalšími proteínmi sú nevyhnutné pre tvorbu PML teliesok

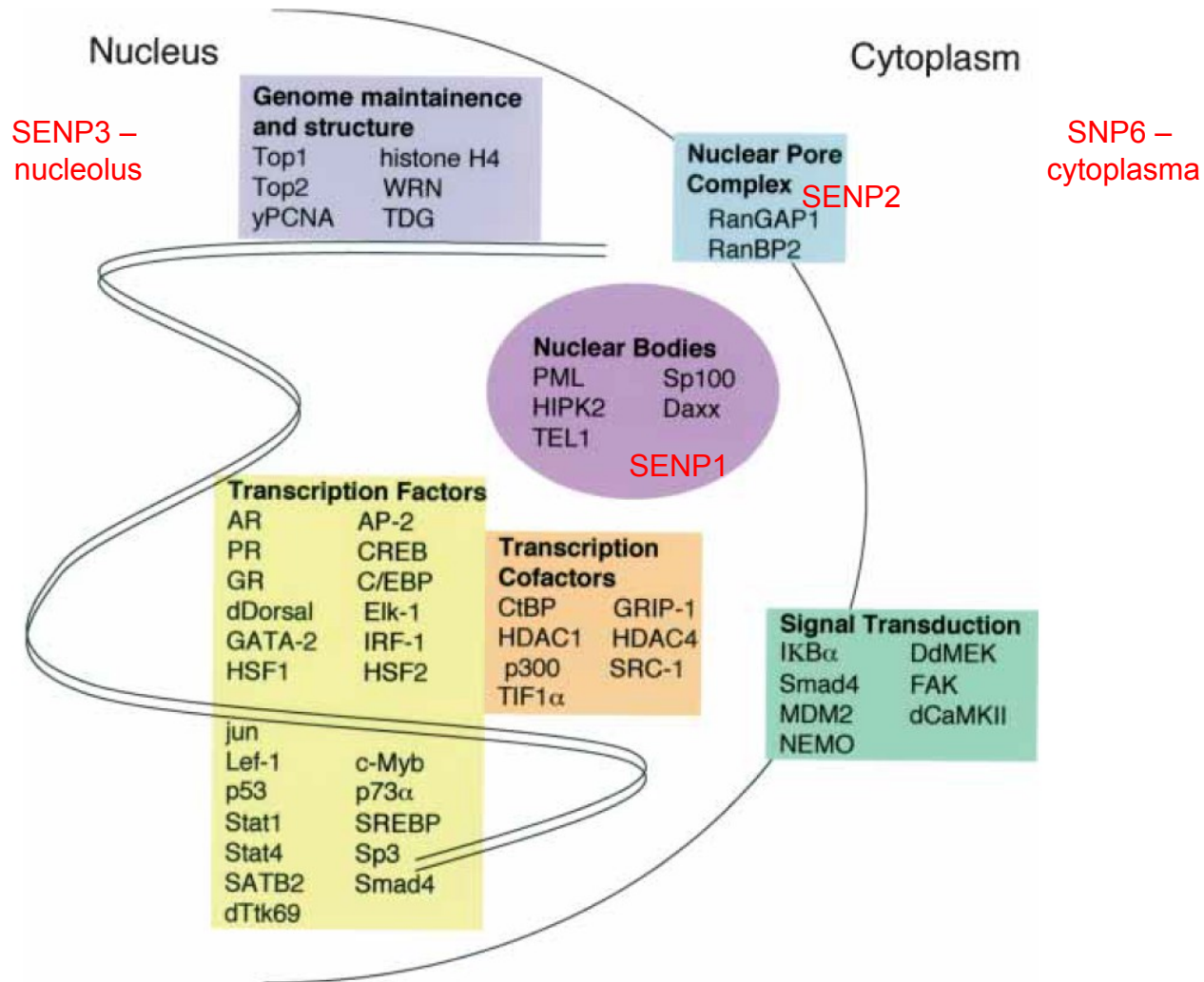


SUMO funguje ako lepidlo,  
ktoré drží komplex pohromade

# SUMO - funkcie

- SUMO má významnú úlohu vo viacerých bunkových procesoch:
  - Jadrový transport
  - Regulácia transkripcie
  - Prenos signálu
  - Metabolizmus DNA
  - Stabilita genómu

# SUMO



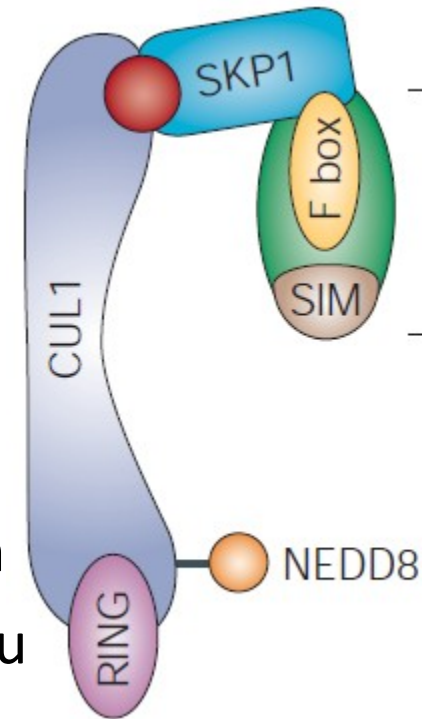
# SUMO vs Ubikvitín

- proteíny môžu byť modifikované SUMOm alebo ubikvitínom, často s odlišnými následkami
- v niektorých prípadoch SUMO súťaží s ubikvitínom o daný lyzínový zvyšok, ale často v regulačných dráhach spolupracujú

Protein	Function	Role of SUMOylation	Role of ubiquitination	Common lysine? <sup>a</sup>
IKB $\alpha$	Signal transduction/ Inhibition of NFKB	Stabilizes IKB $\alpha$ by competition with ubiquitin	Promotes proteasome-mediated degradation	yes
NEMO	Signal transduction/ IKK regulation	Promotes nuclear localization	Required for IKK activation	
yPCNA	DNA replication and repair	Regulates DNA repair during replication	Monoubiquitination promotes translesion DNA repair; polyubiquitination promotes error-free DNA repair	yes
PML	Tumor suppressor	Regulates subnuclear localization; required for integrity of nuclear bodies	Promotes proteasome-mediated degradation	
p53	Transcription factor/ tumor suppressor	Variable effects observed; reduces transcriptional activation in some contexts	Promotes proteasome-mediated degradation	
Glucocorticoid receptor (GR)	Transcription factor	Reduces transcriptional activation dependent on promoter context	Promotes proteasome-mediated degradation	
c-Myb	Transcription factor	Reduces transcriptional activation	Promotes proteasome-mediated degradation	
HDAC-1	Histone deacetylase/ transcriptional corepressor	Promotes deacetylase activity and transcriptional repression	Promotes proteasome-mediated degradation	

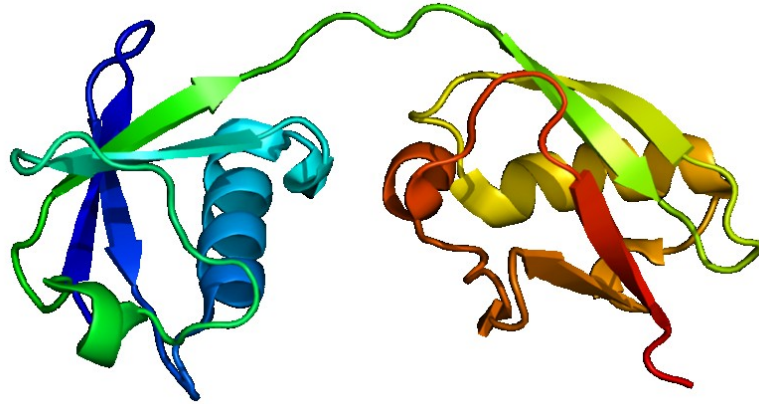
<sup>a</sup>Indicates that competition by ubiquitin and SUMO for a common lysine in the substrate protein has been reported to impact activity.

# NEDD8



- NEDD8 – 9 kDa, 60% sekvenčná identita s ubikvitínom
- Neddylačný cyklus:
  - štiepenie neaktívneho prekurzoru
  - E1 = NAE (APPBP1/UBA3)
  - E2 = Ubc12 / Ube2F
  - E3 ligázy
  - proteázy
- Substráty = cullinové podjednotky SCF E3 cullin-RING ligáz
- kovaletným pripojenie NEDD8 ku cullinu je nevyhnutné pre interakciu ligázy s E2, teda pre ubikvitináciu substrátu

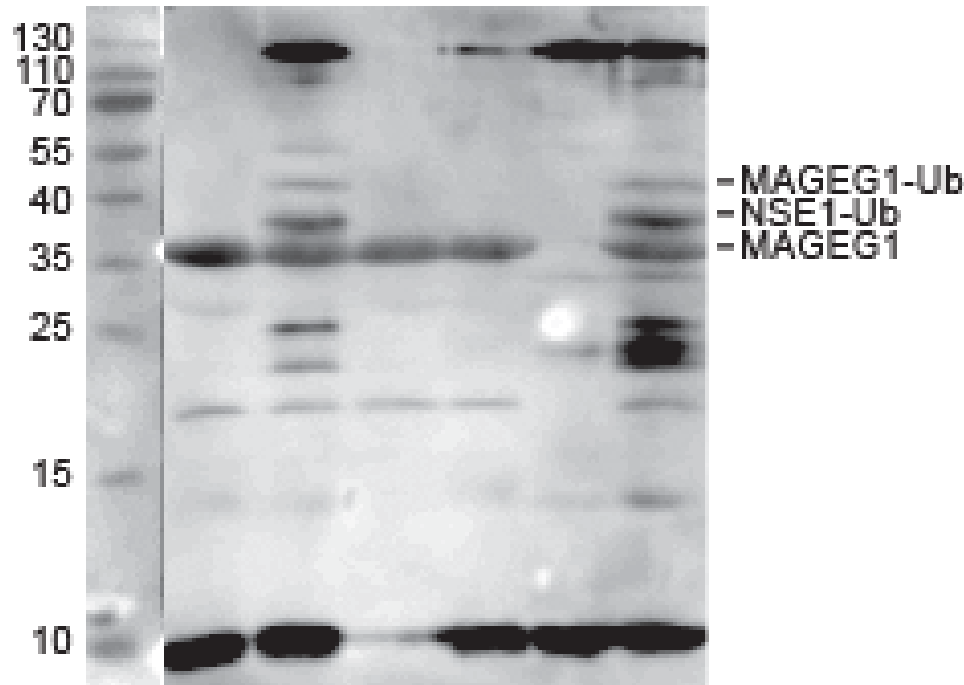
# ISG15



- ISG15 = interferon stimulated gene
- Dve spojené domény s vysokou sekvenčnou homológiou k ubikvitínu – 17 kDa
- Expresia stimulovaná interferónmi – ISG15 len u vyšších eukaryotov, ktoré používajú interferónovú signalizáciu
- E1 (Ube1L), E2 (UbcH6, UbcH8), E3 (Herc5) a deISGyláza (UBP43) sú tiež indukované interferónmi
- Úloha v obrane proti vírusom a baktériám – ISG15 modifikuje proteíny vírusu aj hostiteľa

# Úloha - ubikvitinácia NSE1/MAGEG1

	-	+	+	+	+	+	E1 (110 kDa)
	+	-	+	+	+	+	E2 (Ubc13 -17kDa / Mms2 -21kDa)
	+	+	-	+	+	+	Ub(-biotinylated -8.5 kDa)
	+	+	+	-	+	+	ATP
HMW	+	+	+	+	-	+	NSE1 (30kDa) / MAGEG1 (36kDa)



Streptavidin-HRP