

Ubikvitóny

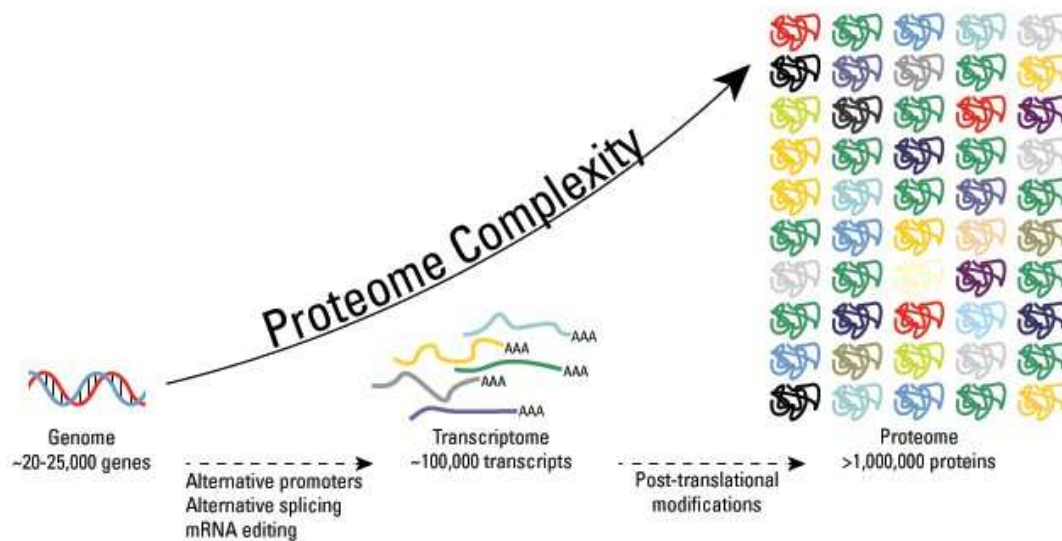
a tvorba proteínových komplexov

Peter Kolesár

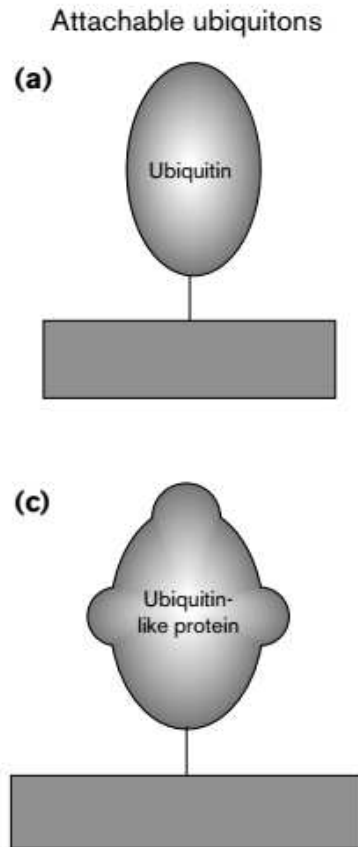
25.3.2021

Post-translačné modifikácie proteínov

- (len) u eukaryotických buniek
- mnohonásobne zvyšujú repertoár proteínov a ich komplexov
- rýchle a reverzibilné adaptácie na zmeny
- pripojenie - malých molekúl - fosforylácia, acetylácia, metylácia, ...
 - proteínových molekúl - ubikvitíny



Ubikvitóny = ubikvitín a ubikvitínu podobné proteíny (ubiquitin-like proteins, UBLs)



Ubiquitons are everywhere!

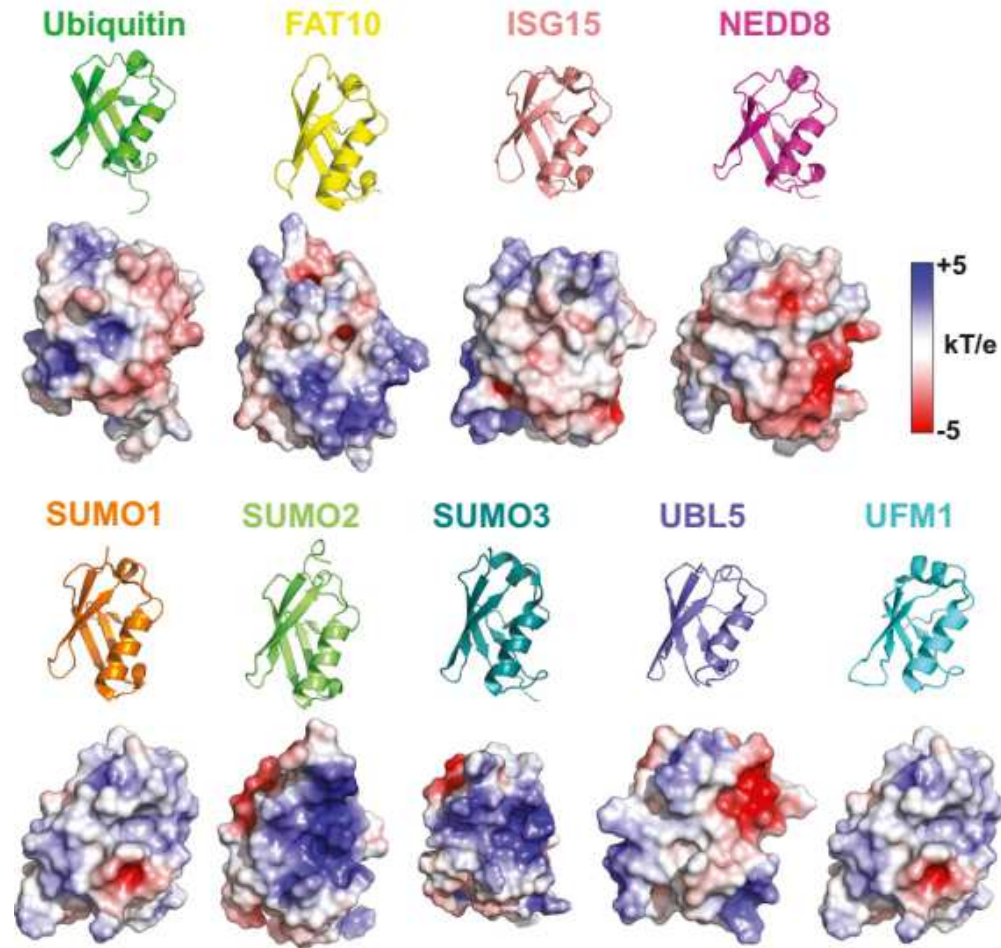
Ubiquitin superfolds: intrinsic and attachable regulators of cellular activities?

R John Mayer, Michael Landon and Robert Layfield

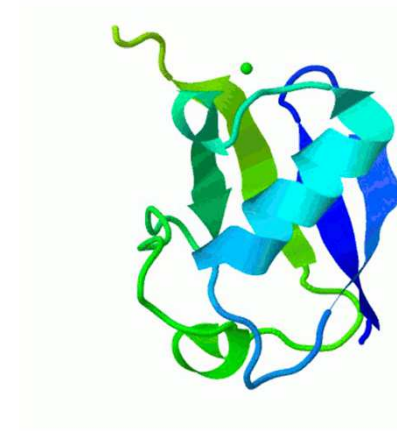
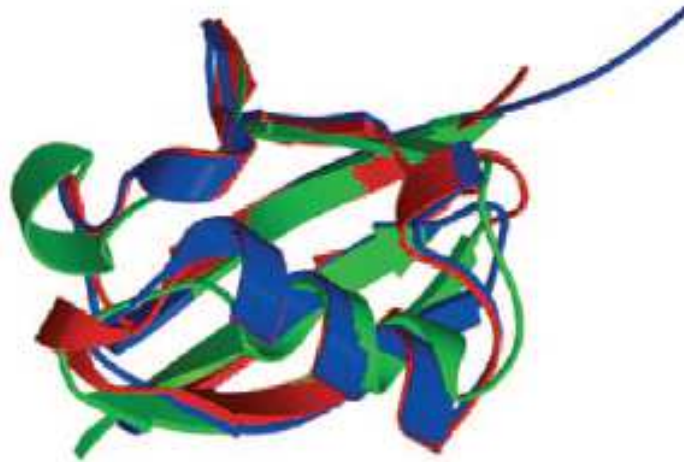
Ubikvitóny

Modification	Modifier encoding gene	Mature modifier protein	E1	E2	E3	Active protease
Ubiquitination	UBB, UBC, UBA52 and RPS27A	76 amino acids	2 (UBA1 and UBA6)	~40	Over 600	Dozens (USPs,UCHs,OTUs,MJD,JAMM)
Sumoylation	SUMO1-4	varies from SUMO1-4	1 (SAE)	1 (UBC9)	A dozen	6 (SENPs)
Neddylation	NEDD8	76 amino acids	1 (NAE)	2 (UBC12 and UBE2F)	Over 600	3 (UCHL1, UCHL3 and USP21)
Ufmoylation	UFM1	83 amino acids	1 (UBA5)	1 (UFC1)	1 (UFL1)	1 (UFSP2)
Isgylation	ISG15	163 amino acids	1 (UBE1L)	1 (UBCH8)	2 (HERC5 and TRIM25)	5 (USP18, USP2, USP5, USP13 and USP14)
Fatylation	FAT10	165 amino acids	1 (UBA6)	1 (USE1)	Unknown	Unknown

Ubikvitóny



Ubikvitóny - β -grasp fold

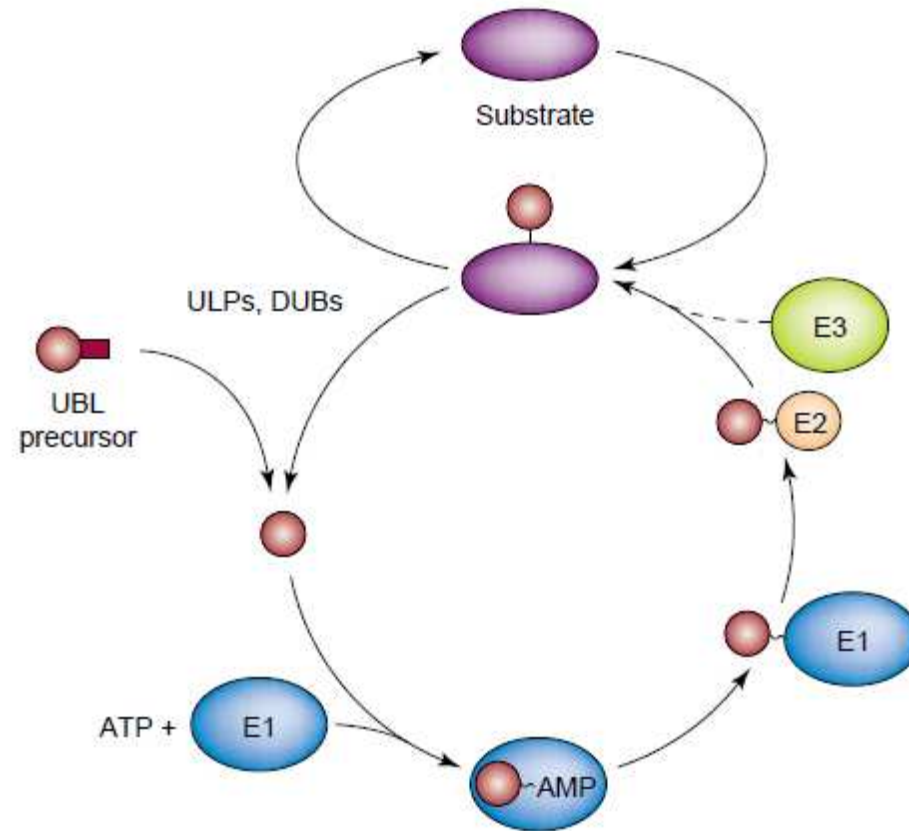


Ubikvitín

SUMO-1

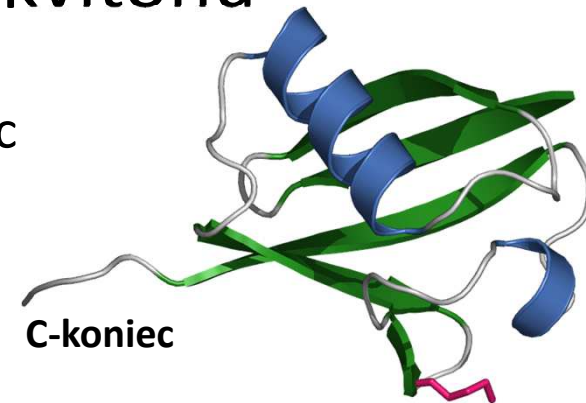
NEDD-8

Konjugačný cyklus ubikvitónov



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 ubikvitón (ubiquitin binding domain, UBD)



- interakcia medzi ubikvitónom a UBD je hlavným mechanizmom funkcie týchto modifikácií

Ubikvitín

The Nobel Prize in Chemistry 2004



Photo: D. Porges

Aaron Ciechanover

Prize share: 1/3



Photo: D. Porges

Avram Hershko

Prize share: 1/3



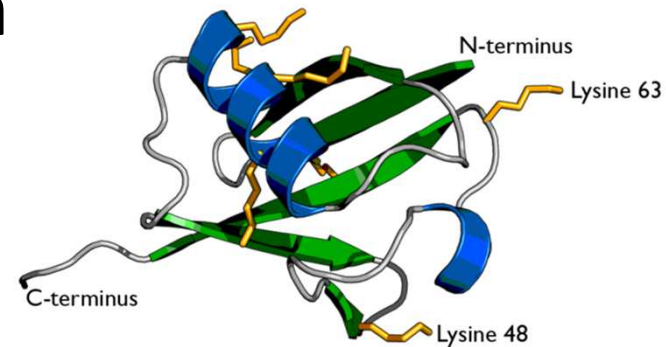
Photo from the Nobel Foundation archive.

Irwin Rose

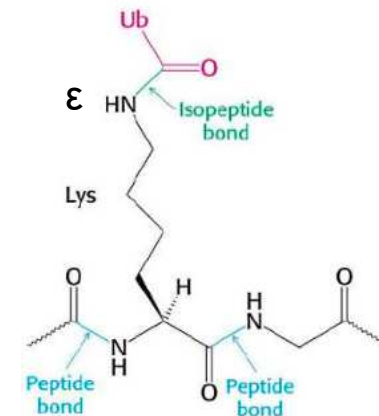
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2004 was awarded jointly to Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose "for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation."

Ubikvitín



- malý proteín (8.5 kDa, 76 aminokyselín)
- *ubique* = všade – je hojný vo všetkých eukaryotických bunkách
- globulárna štruktúra
- Sekvencia je vysoko konzervovaná
- kovalentné pripojenie k iným proteínom: karboxylový (C) koniec ubikvitínu (glycín) sa kovalentne pripojí k ϵ -amino skupine lyzínového zvyšku vnútri cieľového proteínu izopeptidovou väzbou / k amino-skupine N-konca proteínu peptidovou väzbou



Ubikvitín - prekurzory

- ubikvitín nevzniká samostatne, ale ako fúzny proteín
- u ľudí je kódovaný štyrmi lokusmi
 - Dva lokusy kódujú polyubikvitín - expresia pri stresových podmienkach
 - Dva lokusy kódujú fúziu ubikvitínu s ribozomálnym proteínom – spoločná regulácia ubikvitínového systému s translačnou aktivitou bunky
- fúzne translačné produkty sú rýchlo spracované aktivitou ubikvitínových C-terminálnych hydroláz → voľný ubikvitín

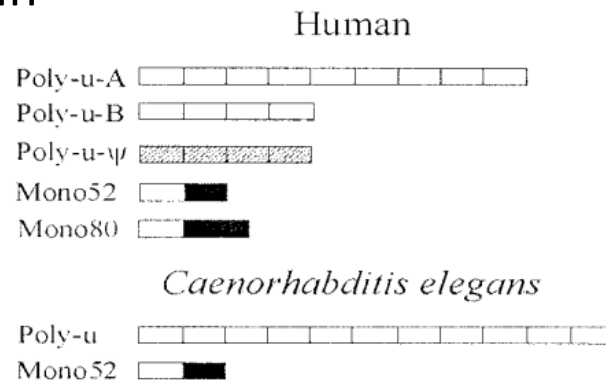
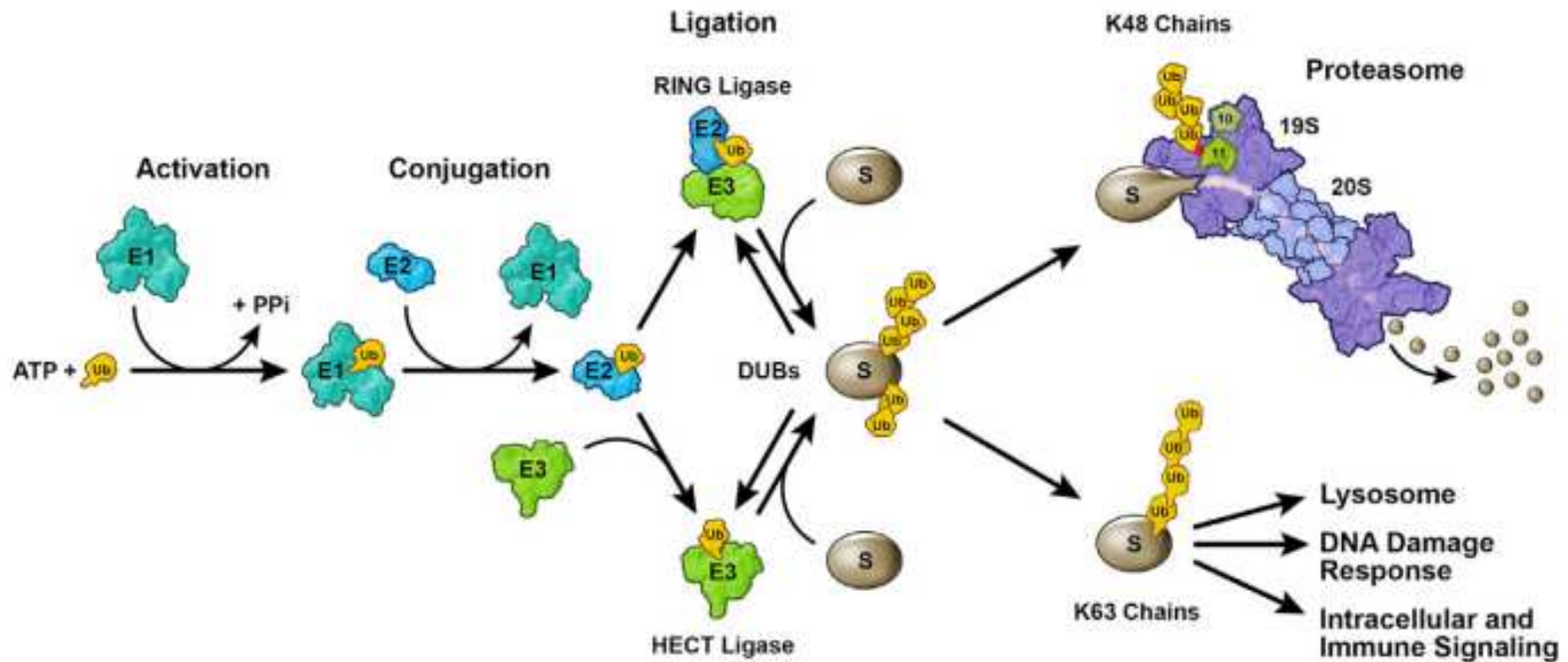


Fig. 1. Ubiquitin polymeric (poly-u) loci in humans and *C. elegans*. A poly-u locus consists of a number of ubiquitin genes that are concatenated with no intervening sequences. A monomeric locus is composed of a ubiquitin gene and a ribosomal protein gene with either 52 or 80 codons. The proteins encoded by polymeric and monomeric genes are identical. Poly-u ψ is a pseudogene locus.

Ubikvitín - konjugačný systém

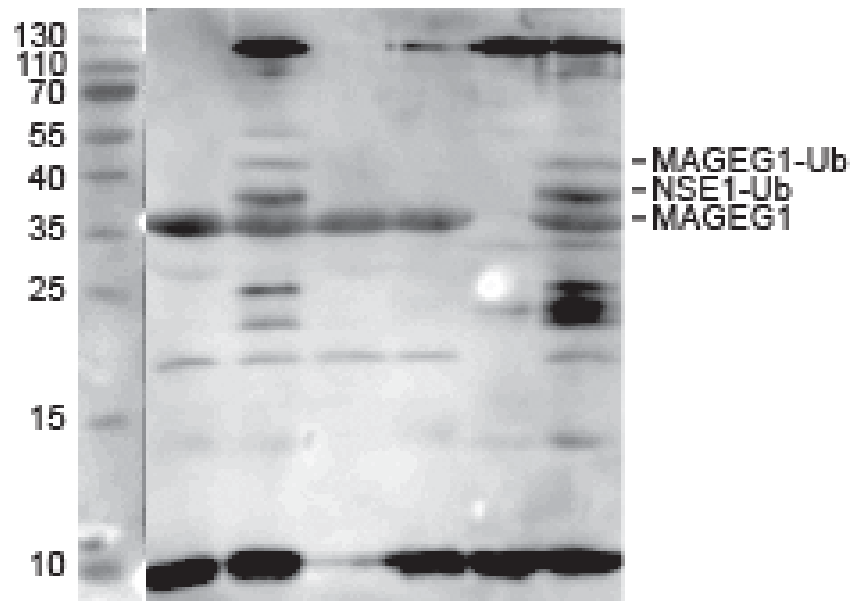


E1, E2 – Ub sa viaže na katalytický Cys / na substrát sa viaže cez Lys

Ľudia: E1 – 2 ks; E2 – 35 ks; E3 > 600 ks

Úloha - nájdi problém ubikvitinácie NSE1/MAGEG1

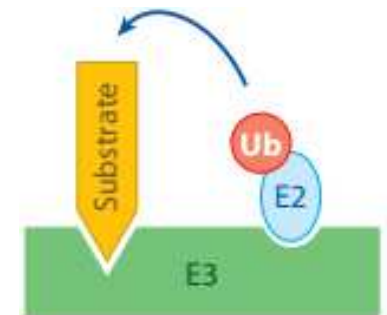
	-	+	+	+	+	+	E1 (110 kDa)
	+	-	+	+	+	+	E2 (Ubc13 -17kDa / Mms2 -21kDa)
	+	+	-	+	+	+	Ub(-biotinylated -8.5 kDa)
	+	+	+	-	+	+	ATP
HMW	+	+	+	+	-	+	NSE1 (30kDa) / MAGEG1 (36kDa)



Streptavidin-HRP

E3 ubikvitín ligázy

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

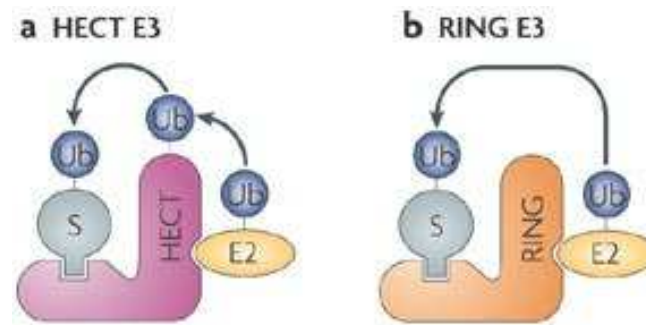


Deshaies & Joazeiro, 2009

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



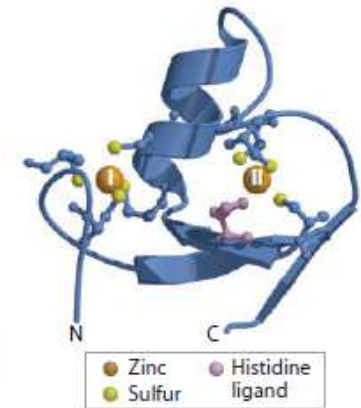
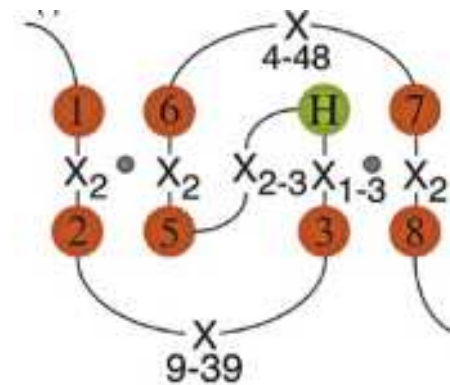
Rotin & Kumar, 2009

Rozdiel v prenose ubikvitínu na substrát:

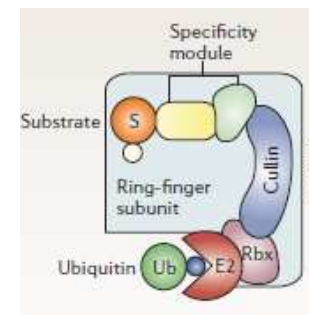
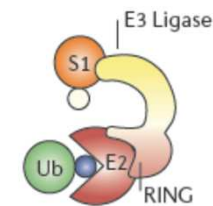
- HECT – obsahujú konzervovaný katalytický cysteín, ktorý funguje ako akceptor ubikvitínu z E2. Ubikvitín je následne prenesený na špecifický lyzín substrátu
- RING – ubikvitín je prenesený z E2 priamo na substrát

RING E3 ligázy

- **RING doména:**
 - 7 x Cys + 1 x His / 6 x Cys + 2 x His - koordinujú dva atómy Zn^{2+}
 - viaže sa s E2
- **2 veľké podskupiny:**
 - Jednoduché RING E3 – na jednom polypeptide sa nachádza RING doména aj doména pre väzbu substrátu
 - Zložené Cullin-RING E3 – tvorené modulárnymi podjednotkami – RBX (RING box protein), Cullin a ďalšie substrát-rozoznávajúce proteíny



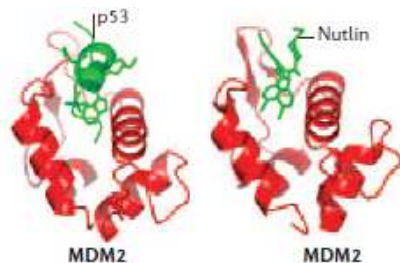
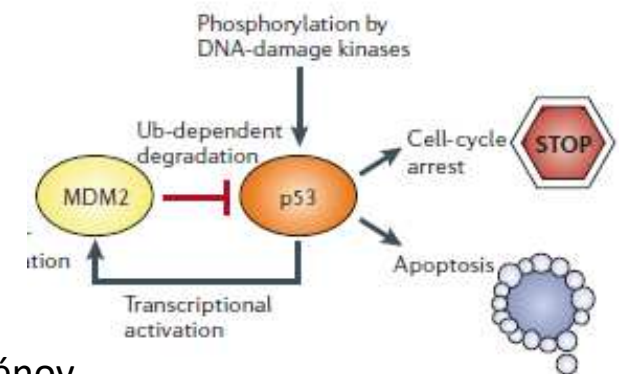
Deshaies & Joazeiro, 2009



Nalepa et al., 2006

Príklad jednoduchej RING E3 ligázy – MDM2

- **p53** – ‘strážca genómu’
 - zabraňuje mutagenéze a následnej karcinogéze zástavou bunkového cyklu alebo apoptózou
 - asi 50% ľudských nádorov obsahuje mutáciu v jeho géne
- **MDM2** - hlavná ubikvitín ligáza pre p53, onkogénny RING E3 enzým
- expresia je indukovaná p53 (negatívna sľučka)
- MDM2 inaktivuje p53 najmenej 3 mechanizmami:
 - fyzicky blokuje transaktivačnú doménu p53
 - podporuje transport p53 z jadra, čo ho udržuje ďaleko od cieľových génov
 - stimuluje ubikvitín – závislú degradáciu
- Cílená liečba nádorov – vyradenie MDM2 / inhibícia MDM2 interakcie s p53 malými molekulami (Nutlin, PRIMA-1 – klinické testy) → stimulácia tumor-supresorovej aktivity p53

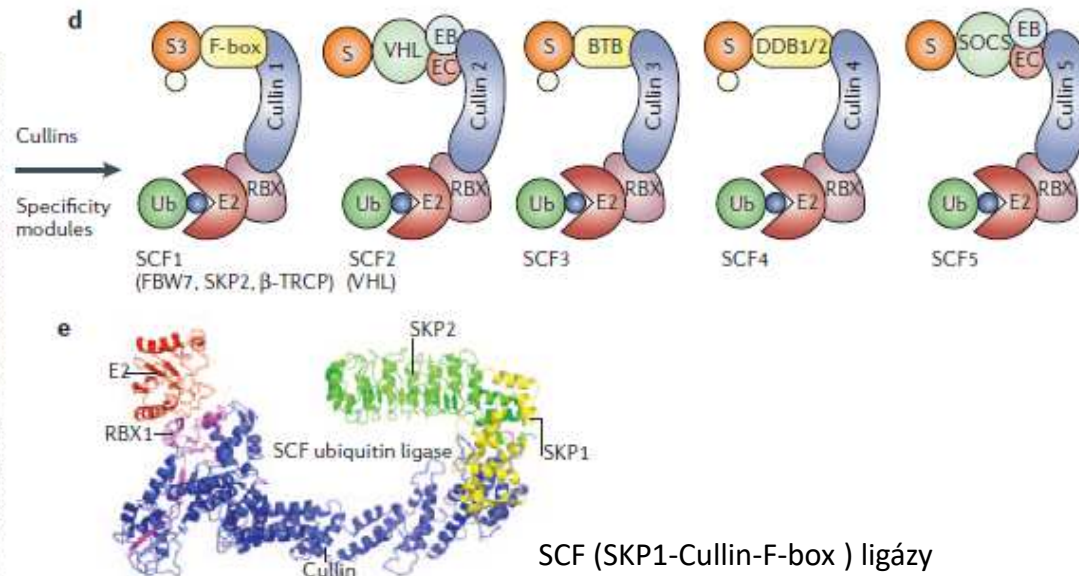
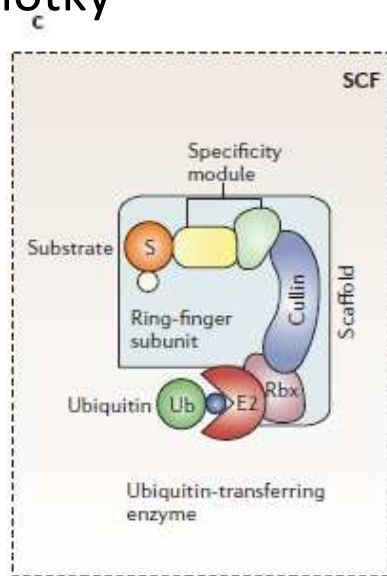


Cullin-RING E3 ligázy

- multi-podjednotkové ligázy zostavené na Cullin-ovom lešení
- u ľudí 7 Cullinov - každý súčasť viacerých ligáz
- RBX obsahuje RING – interakcia s E2
- Variabilné substrát-rozoznávajúce podjednotky

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

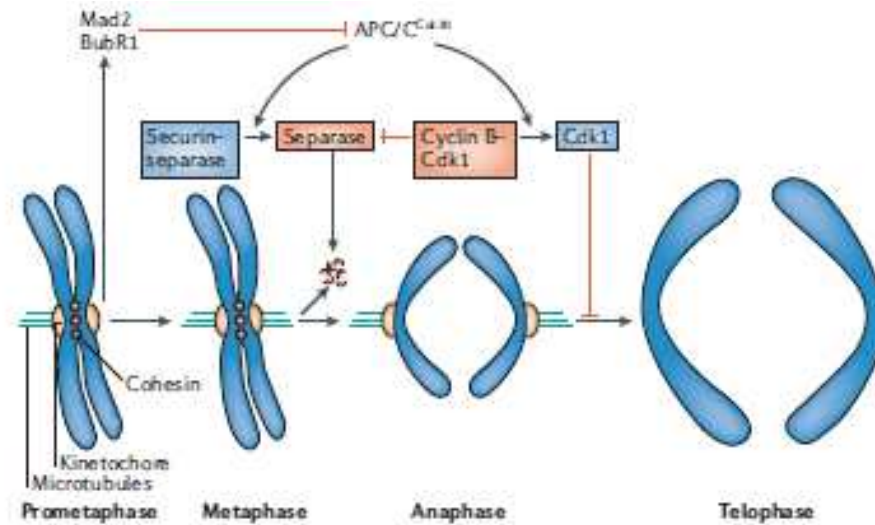
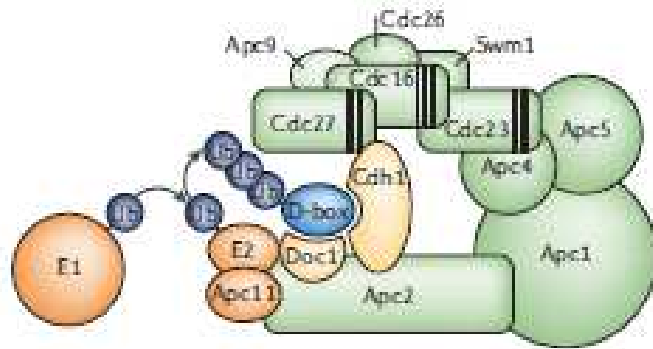


Petorski et al., 2005

SCF (SKP1-Cullin-F-box) ligázy

Nalepa et al., 2006

Príklad Cullin-RING E3 ligázy

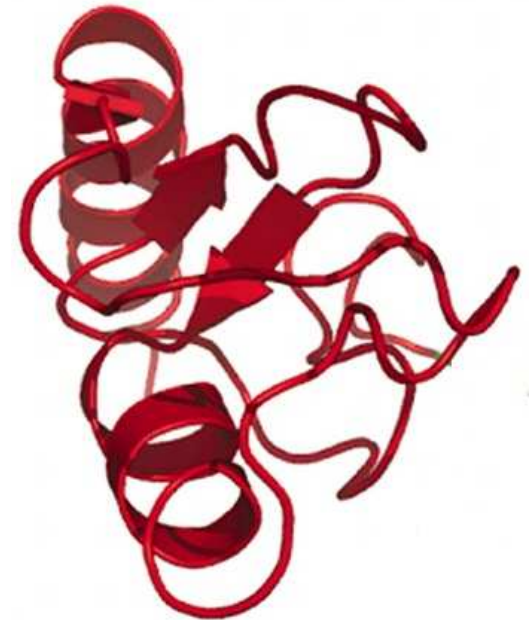


Peters et al., 2006

- **APC (Anaphase promoting complex) /cyklozóm**
 - Komplex nevyhnutný pre správny priebeh bunkového cyklu - separáciu sesterských chromatíd
 - 1,5 MDa komplex (asi 13 podjednotiek – obsahuje 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 sekurin, S a M cyklíny, ...
 - ubkvitinácia sekurínu (inhibítora separázy) → aktivácia separázy - štípi Scc1 podjednotku kohezínu (drží sesterské chromatídy pohromade), odstránenie kohezínu uvoľní väzbu sesterských chromatíd – presun k pólom bunky

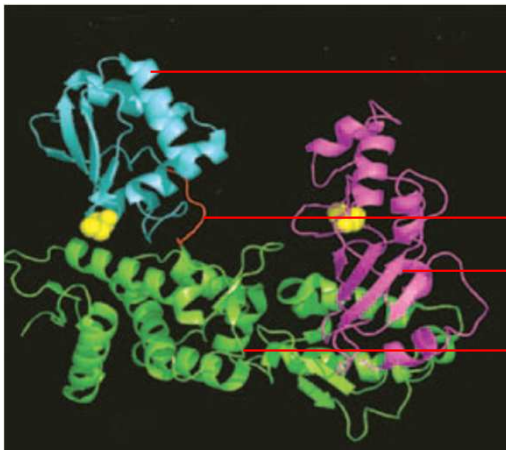
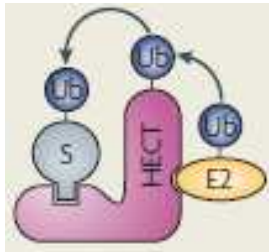
U-box E3 ligázy

- U-box motív je štruktúrne podobný RING doméne a viaže E2 enzýmy
- U-box neviaže ióny kovu, priestorovú konformáciu určujú intramolekulárne vodíkové väzby
- CHIP (STUB1) – U-box ligáza dôležitá pri odstraňovaní nesprávne poskladaných proteínov ako je CFTR pri cystickej fibróze a tau proteíny pri niektorých neurodegeneratívnych chorobách (Alzheimer)



HECT E3 ligázy

- U ľudí približne 30 HECT ligáz
- HECT doména (homologous to E6-AP C-terminus) – 350 aminokyselín na C-konci

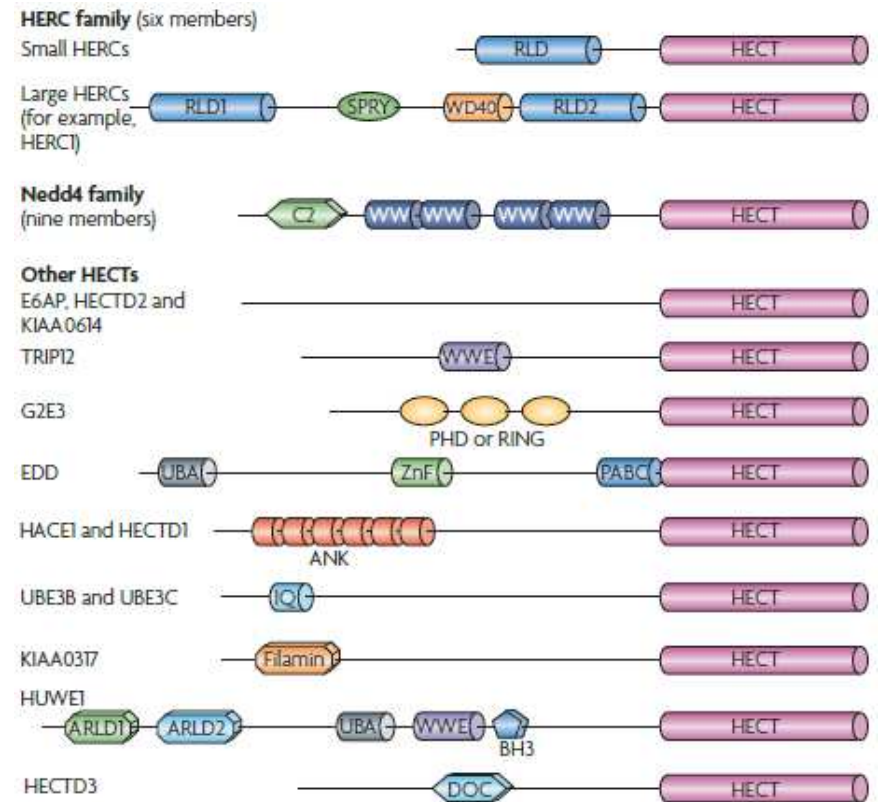


N-terminálna katalytická doména
(obsahuje aktívny cysteín - viaže Ub)

ohybová doména

E2 (Ubc7)

Ubc väzobná HECT doména



Príklad HECT E3 ligázy

- **E6-AP ubikvitín ligáza**

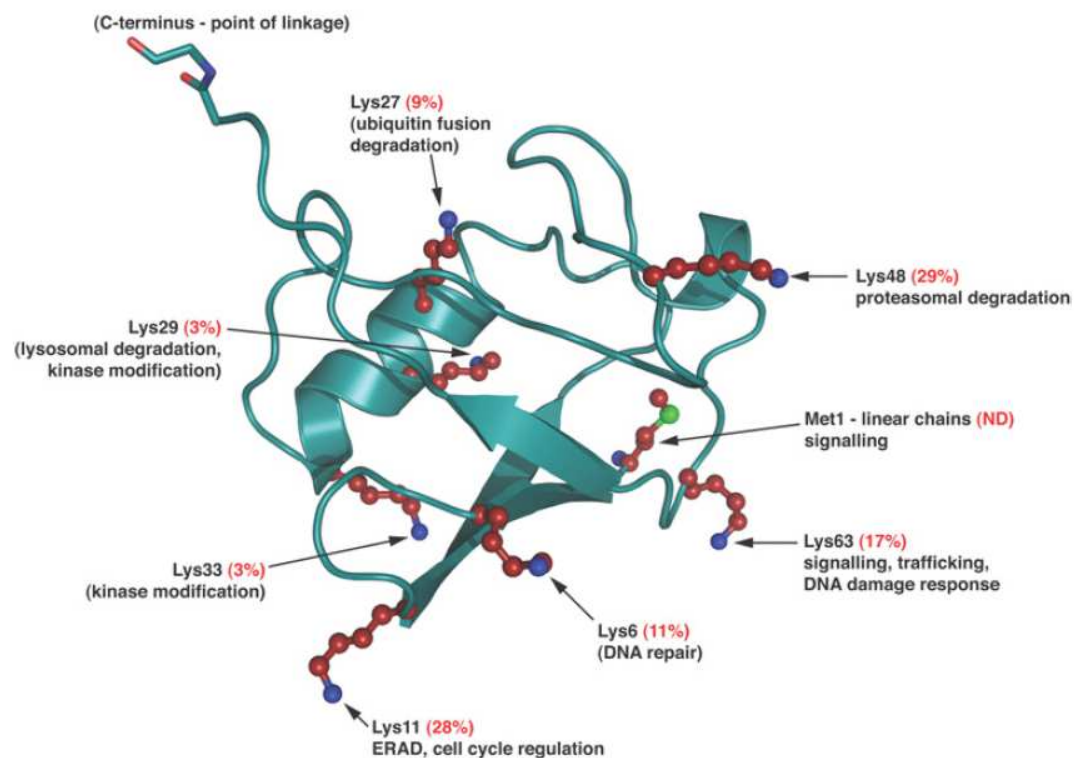
- rakovina krčku maternice = děložního čípku
 - HPV (human papillomavirus) nesie gén pre proteín E6
 - E6 sa po infekcie exprimuje v bunke a viaže na E6-AP ligázu
 - E6-AP ubikvitínuje p53, čo vedie k jeho degradácii a napomáha vzniku rakoviny
- Angelmanov syndróm
 - spôsobený mutáciou pri aktívnom mieste E6-AP
 - mentálna retardácia, záchvaty smiechu



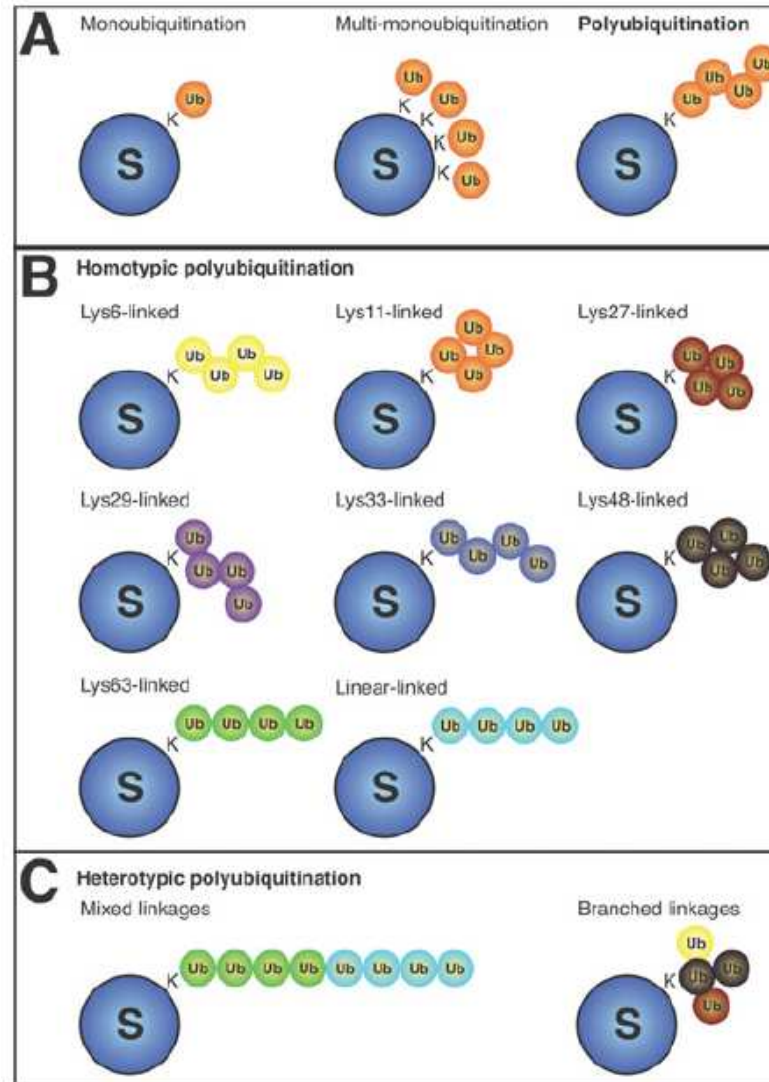
Giovanni Francesco Caroto – Dieťa s kresbou (1520)

Monoubikvitinácia / polyubikvitinácia

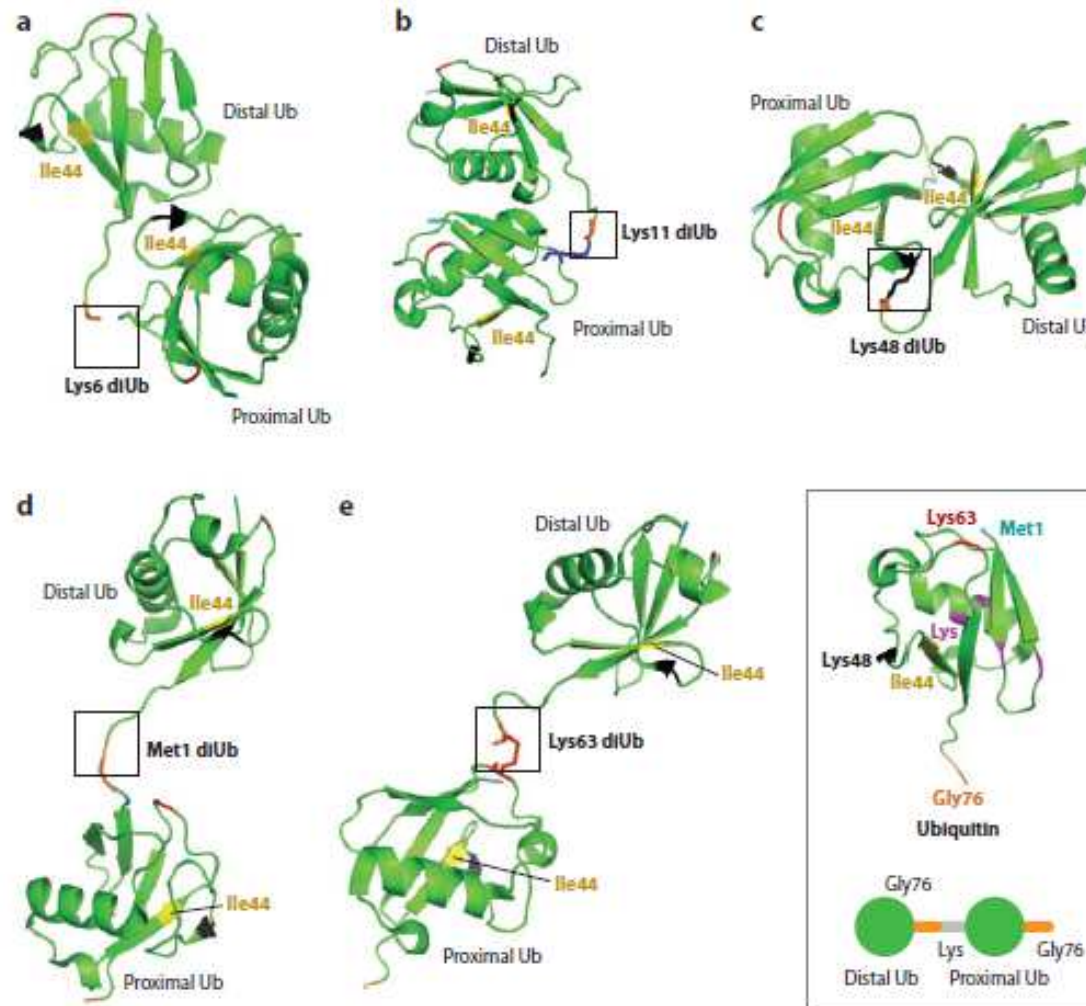
- Polyubikvitinácia – samotný ubikvitín je substrátom ubikvitinácie
- Ubikvitín má 7 lyzínov ktoré môžu byť modifikované + N-koniec



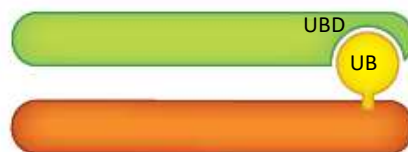
Druhy ubikvitinací



Rôzne ub reťazce majú odlišnú topológiu

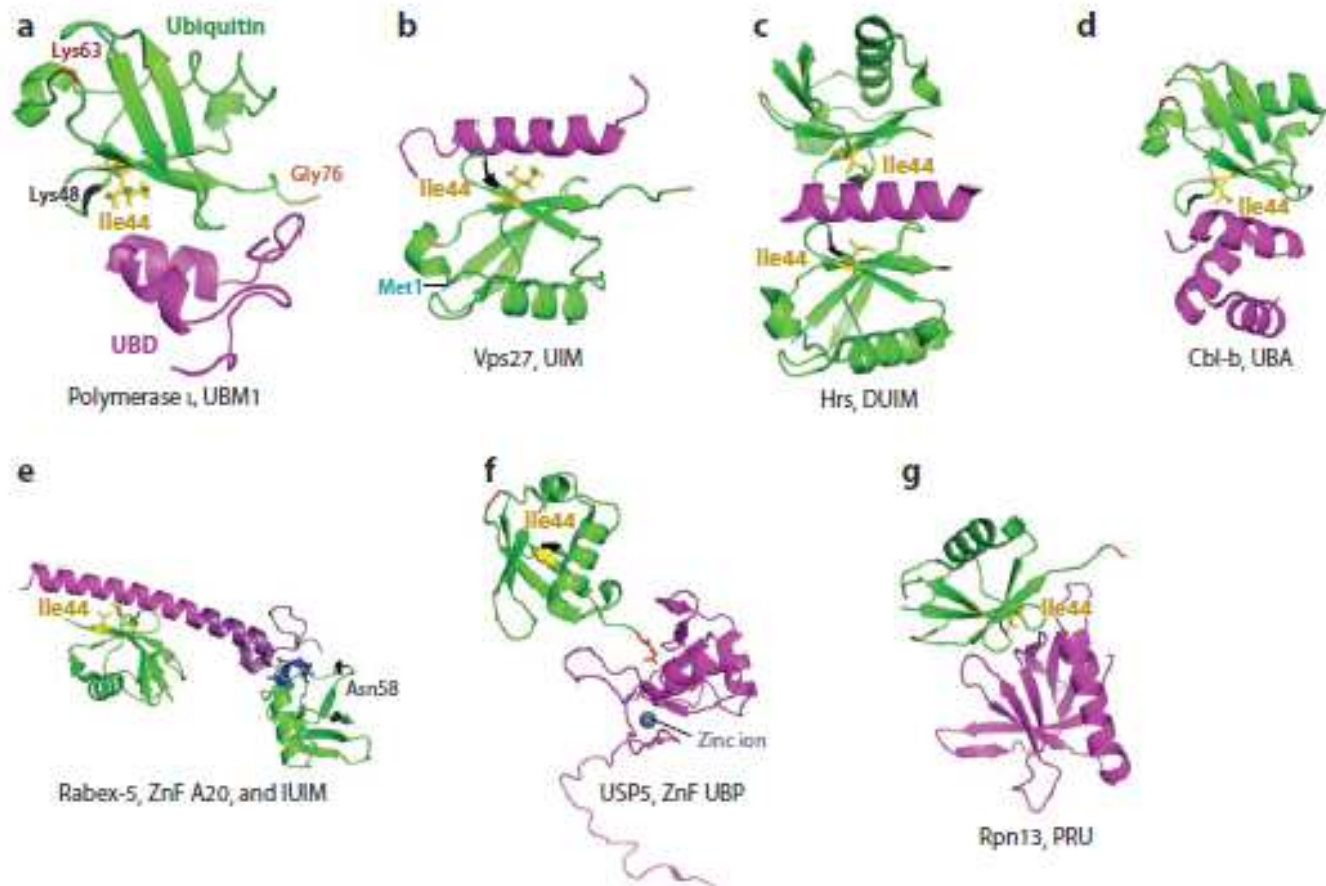


Dopad pripojenia ubikvitínu



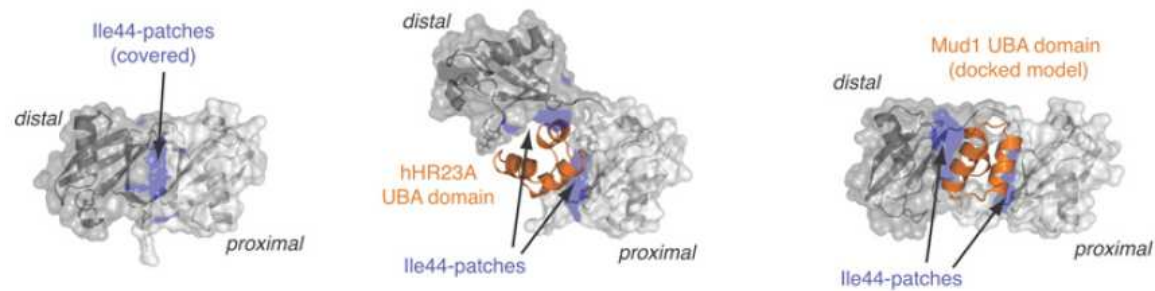
- stimulácia proteín-proteínových interakcií, tvorba komplexov
- Interakčný partner (ubikvitínový receptor) obsahuje nekovalentné väzobné miesto špecifické pre ubikvitín (**ubiquitin binding domain, UBD**)
- Asi 20 rôznych typov UBD s rôznymi štruktúrami a veľkosťou
- Väčšina UBD sa viaže s hydrofóbnou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

UBD – väzba s monoubikvit nom

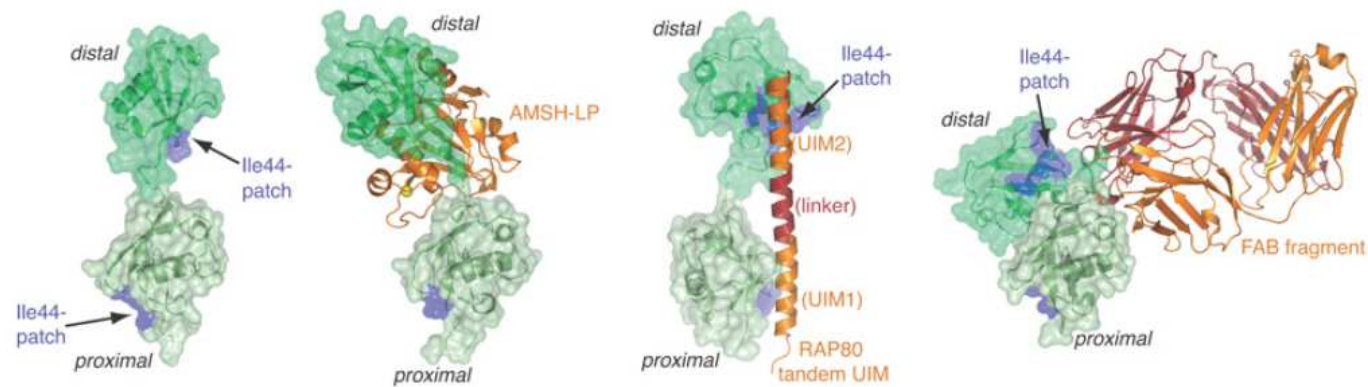


UBD - odlišenie rôznych typov ub reťazcov

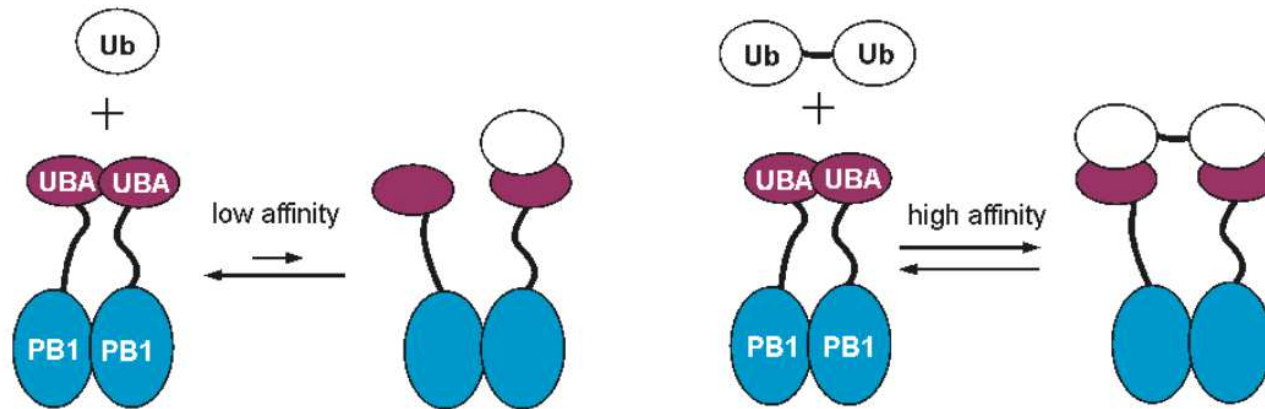
A Lys48 diubiquitin complex



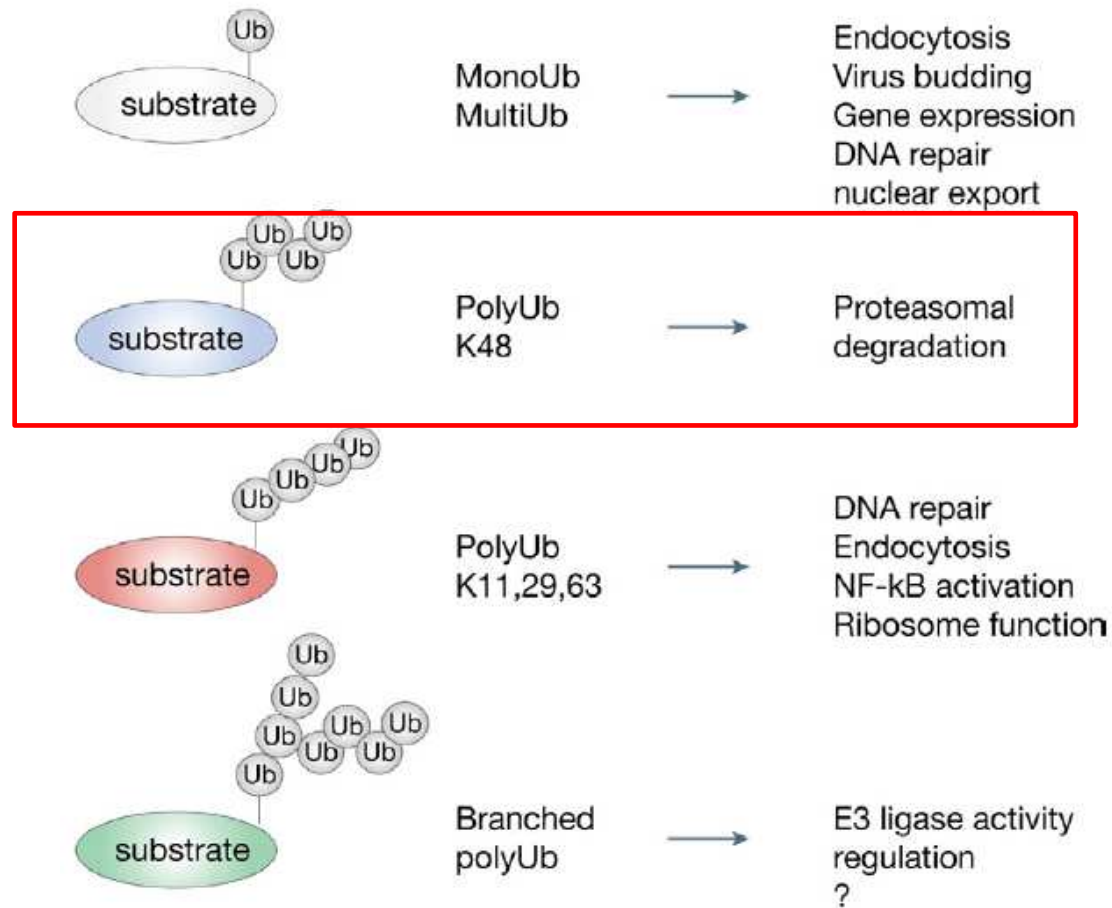
B Lys63 diubiquitin complexes



Viacnásobné slabé interakcie významne zvyšujú afinitu

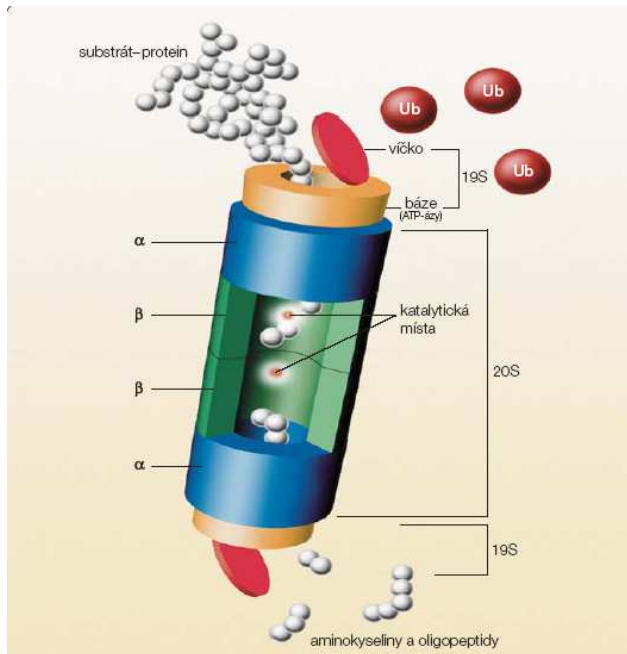


Funkcie ubikvitinácie



Cytozolická degradácia proteínov v proteazómoch

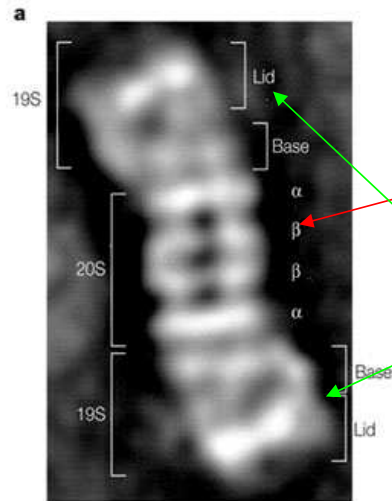
- Konjugácia ubikvitínu - hlavná nelyzozomálna proteolytická dráha
- Po selektívnom označení proteínu konjugáciou ubikvitínového reťazca K48 (na rozoznanie treba 4 a viac ubikvitínov v reťazci) dochádza k jeho degradácii v proteazóme
- odstránenie abnormálnych proteínov, riadi dĺžku života dôležitých regulačných proteínov (transkripčné faktory (p53), cyklíny, securin,...)



26S proteazóm

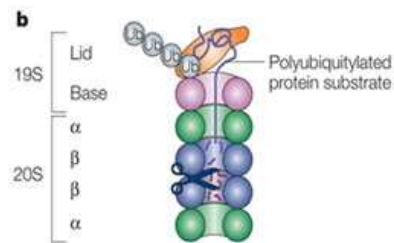
- veľký (2 MDa) multipodjednotkový (60) proteázový komplex na degradáciu proteínov

Štruktúra 26S proteazómu



Skláda sa z 2 subkomplexov:

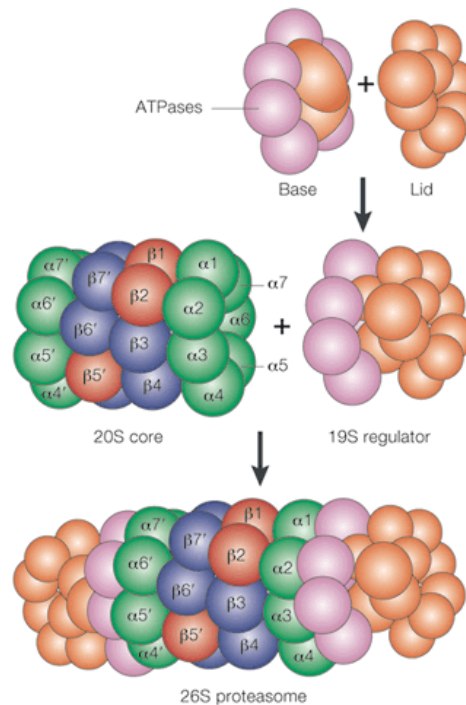
- 20S centrálna časť (core particle) – vykazuje katalytickú aktivitu
- 19S regulačná časť (regulatory particle)



Štruktúra 26S proteazómu

19S regulačná časť

- zložená najmenej z 18 rôznych podjednotiek, ktoré tvoria subkomplexy bázu (base) a veko (lid)
- veko 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 hydrolýzy ATP ich rozbaľujú a posúvajú do 20S



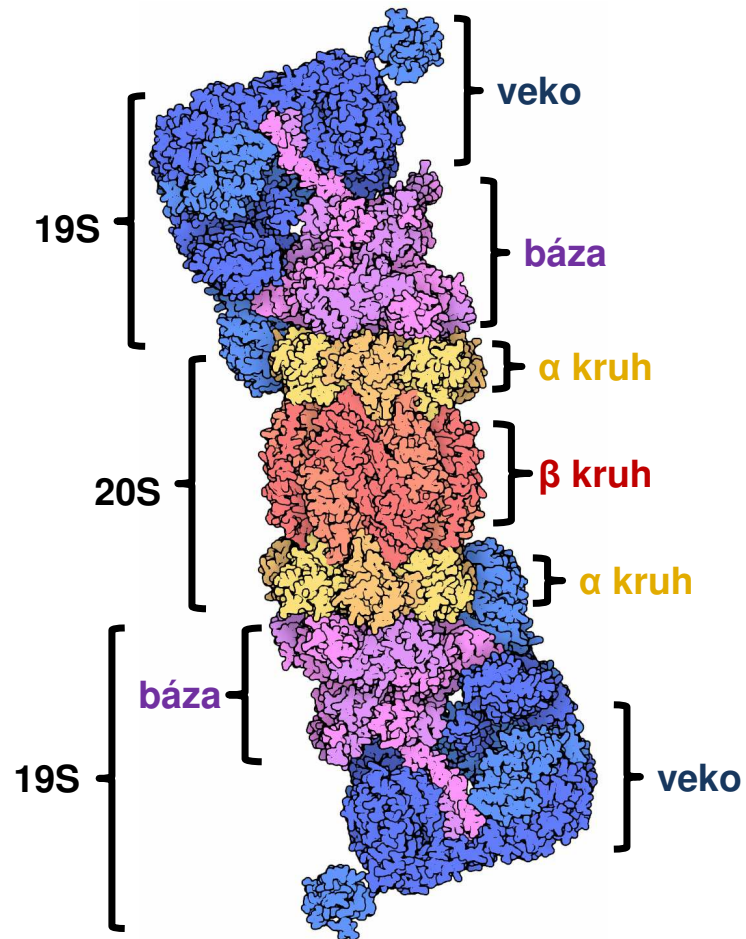
20S centrálna časť

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

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

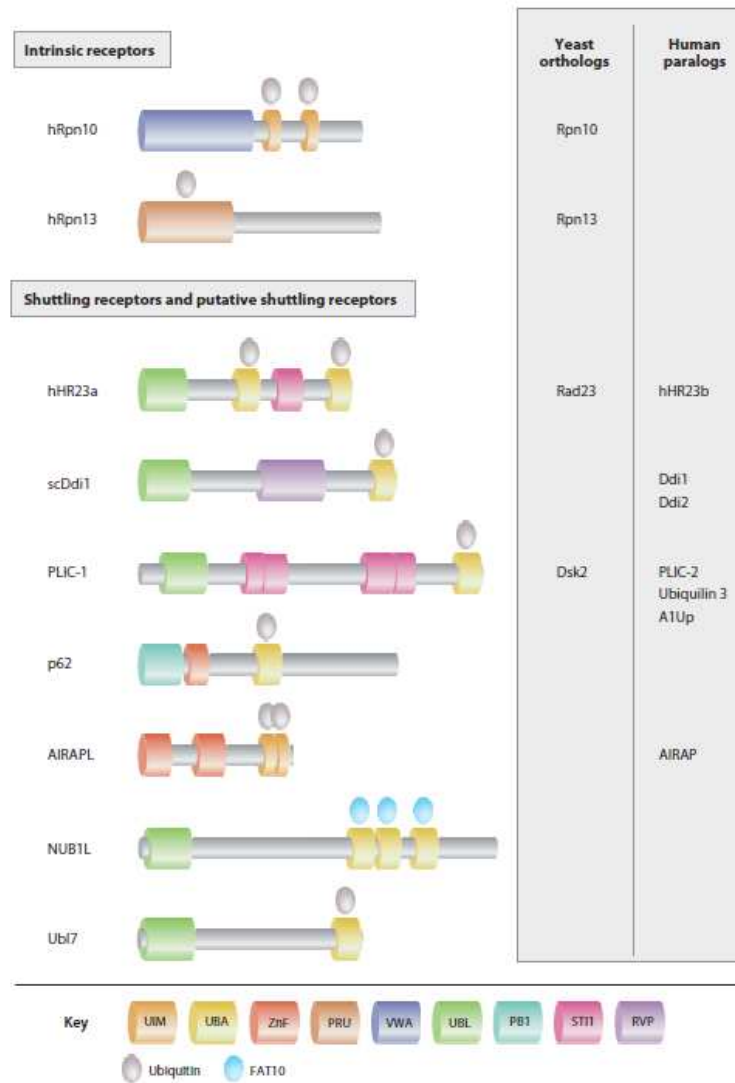
Kloetzel, 2001

Architektúra 26S proteazómu



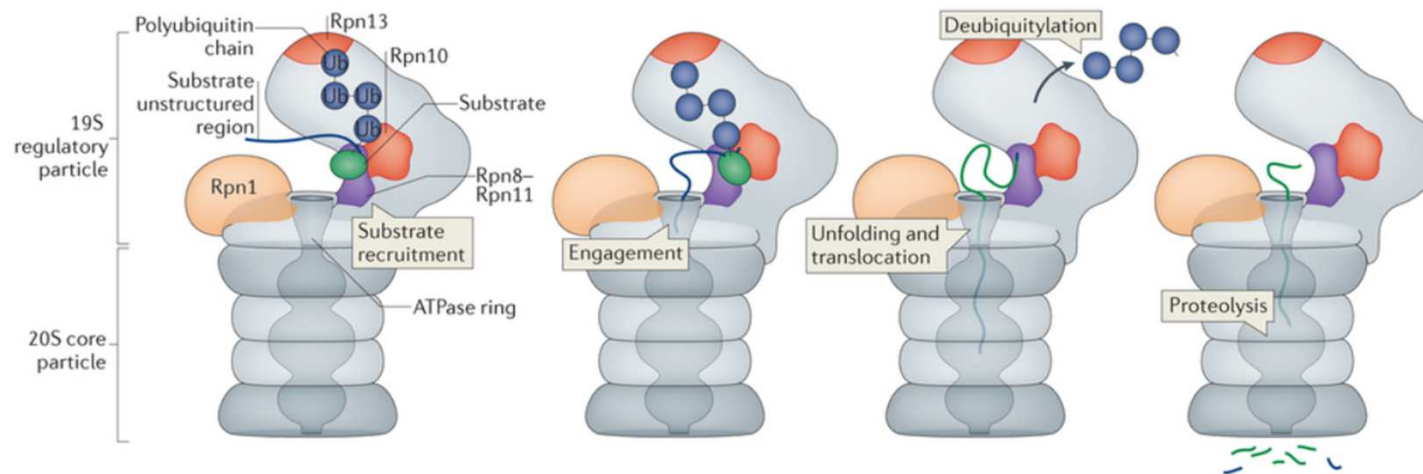
<http://pdb101.rcsb.org/motm/166>

Ubikvitínové receptory proteazómu



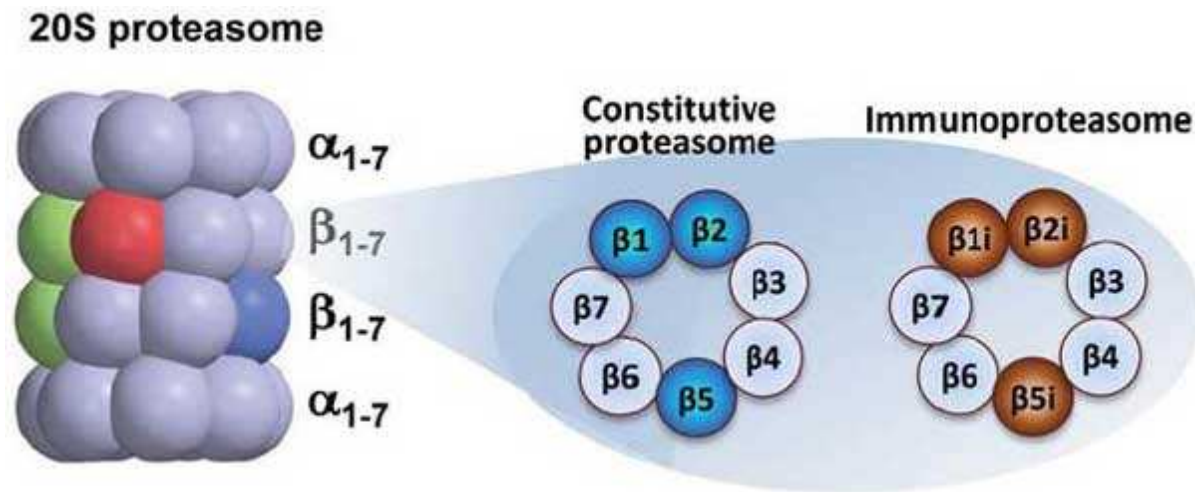
Priebeh degradácie

1. substrát určený k degradácii sa pomocou ubikvitínového K48 reťazca naviaže na 19S, kde sa polyubikvitínový reťazec odštiepi a recykluje
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 na krátké peptidy (štiepia za hydrofóbnymi, bázickými, kyslými aminokyselinami)
4. peptidy (7 – 9 a.k.) sú uvoľnené z proteazómu a sú degradované cytozolickými endopeptidázami a aminopeptidázami na jednotlivé aminokyseliny a využité pre syntézu nových proteínov či metabolizmus

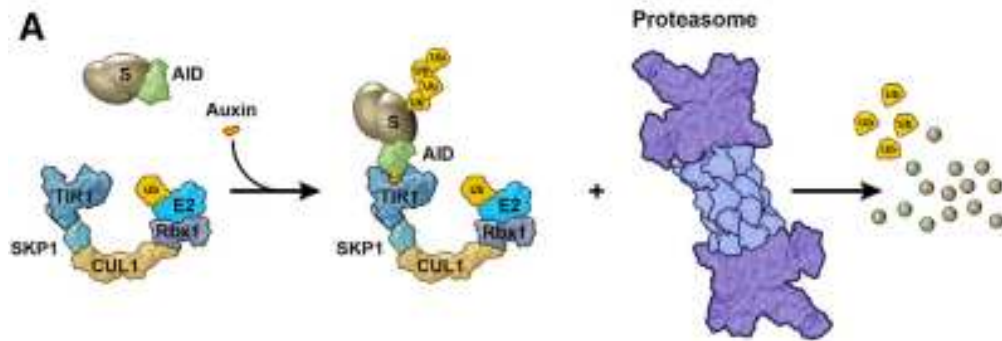


Imunoproteazóm - 20S

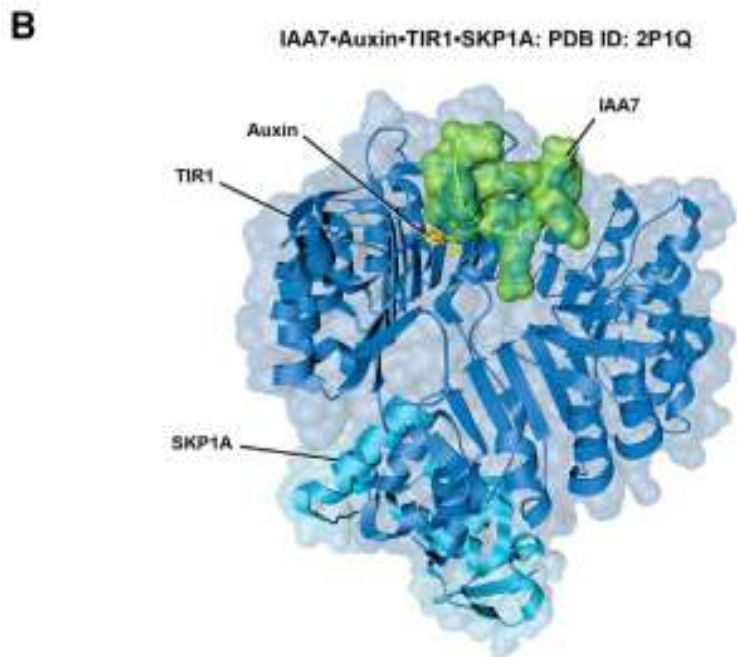
- špeciálny typ proteazómu
- exprimuje sa v bunkách pri zápalovej odpovedi (expresia spustená interferónom) a v antigén-prezentujúcich bunkách imunitného systému
- Je hybridom pozostávajúcim zo štandardných proteazómových podjednotiek a 3 katalytických β -podjednotiek špecifických pre imunoproteazóm
- Štiepi odlišne od 26S - tvorí dlhšie peptidy schopné slúžiť ako antigénne peptidy
- Peptidy sú na povrchu bunky naviazané na MHC I (major histocompatibility complex) molekuly a prezentované pre cytotoxické T ($CD8^+$) lymfocyty



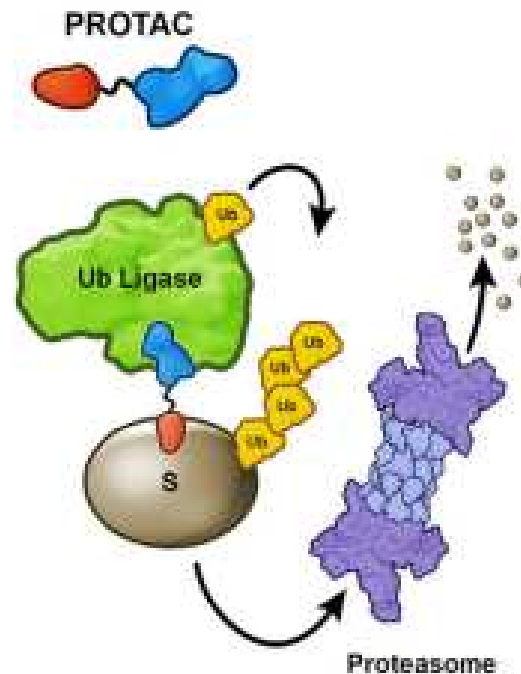
Využitie ubikvitín - proteazómového systému na cielenú degradáciu proteínov



- AID = auxínom indukovaný degrón
- za gén cieľového proteínu sa pridá AID - transláciou vznikne fúzia cieľový proteín-AID
- pridanie auxínu stimuluje interakciu medzi AID a TIR1-SCF ubikvitín ligázou
- ubikvitinácia a proteazomálna degradácia cieľového proteínu



Využitie ubikvitín - proteazómového systému na cieleňú degradáciu proteínov

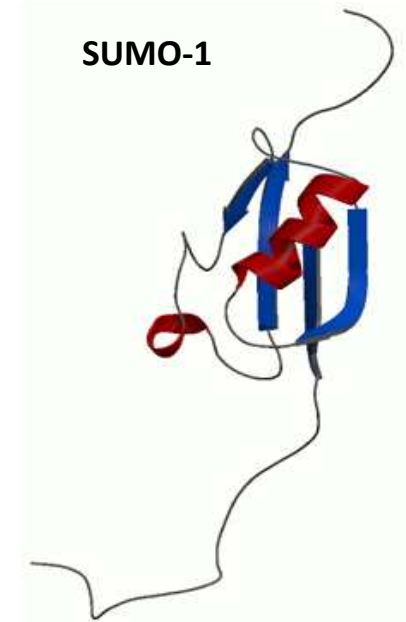


- PROTAC = PROteolysis Targeting Chimeric molecule
- chimerická molekula zároveň interaguje s cieľovým proteínom a s ubikvitín ligázou
- blízkosť ligázy vedie k ubikvitinácii a degradácii cieľového proteínu

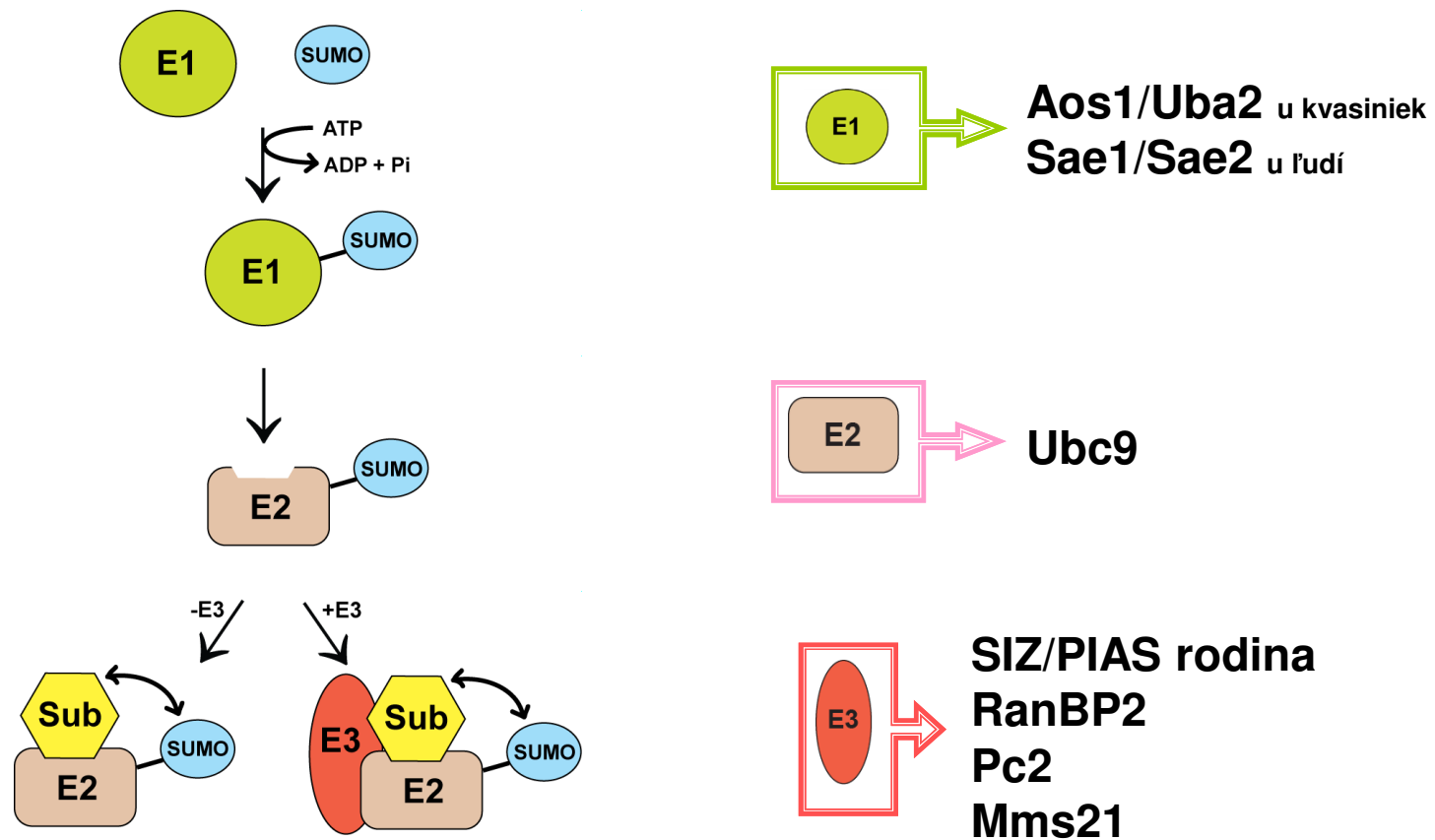
SUMO

SUMO proteíny

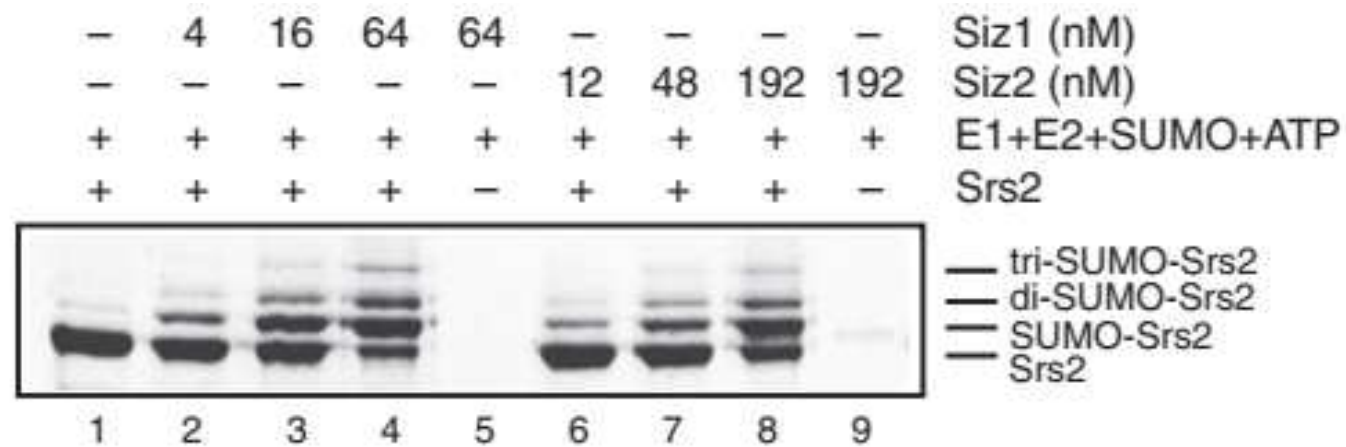
- Small Ubiquitin-like Modifiers
- Malé proteíny - 11 kDa, 100 aminokyselín
- 18-20% sekvenčná identita s ubikvitínom
- Kvasinky, bezstavovce – iba jeden SUMO proteín
- Cicavce – 3 izoformy: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3
- **Sumoylácia** – kovalentné pripojenie SUMO proteínu k lyzínu cieľového proteínu
 - esenciálna vo väčšine eukaryotov
 - väčšinou vo forme monomérov a nie reťazcov
 - nevedie k proteozomálnej degradácii



Sumoylácia

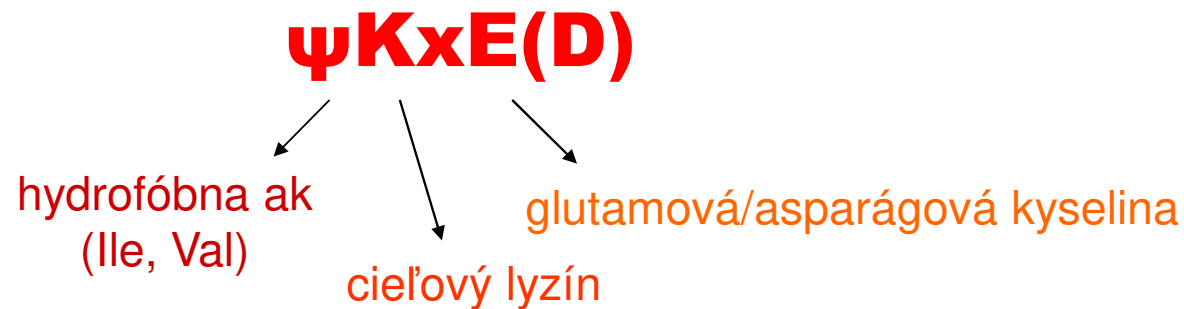


Príklad analýzy sumoylácie *in vitro*



Sumoylácia

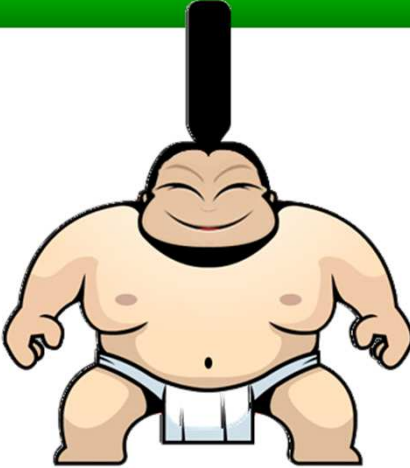
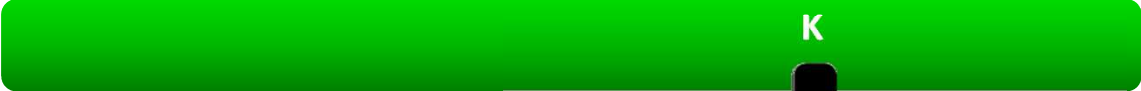
- Reverzibilný proces – SUMO dekonjugované pomocou ULP proteáz u kvasiniek / SENP proteáz u cicavcov
- Typické SUMO-akceptorové miesto:



- Dopad sumoylácie: SUMO stimuluje interakcie s proteínmi obsahujúcimi SUMO-interakčný motív (SIM) – 3-4 hydrofóbne a.k. + príľahlé **negatívne nabité zvyšky** (napr. **IVIEDD**)

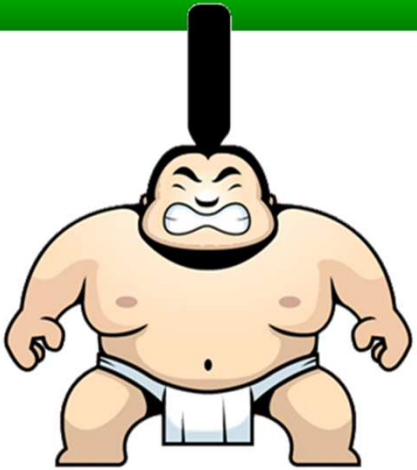
K

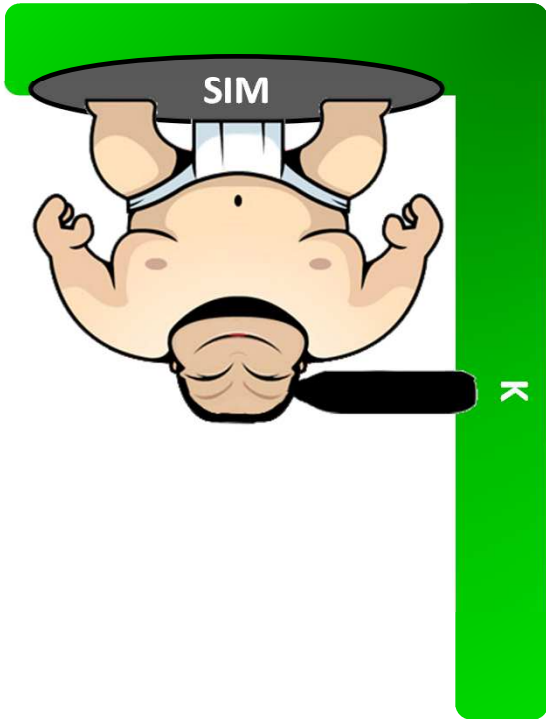


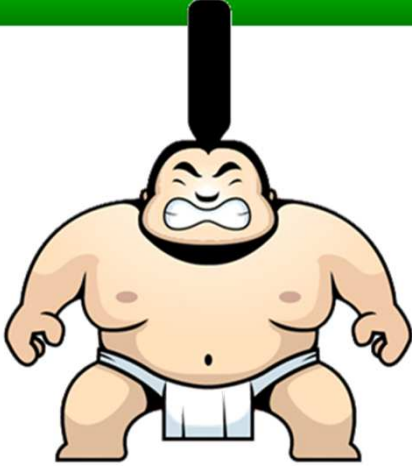
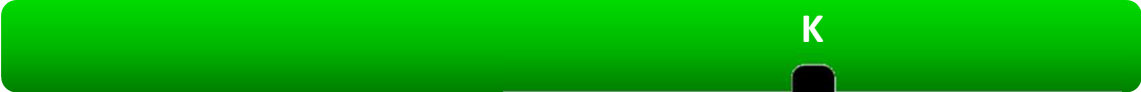


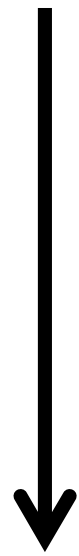
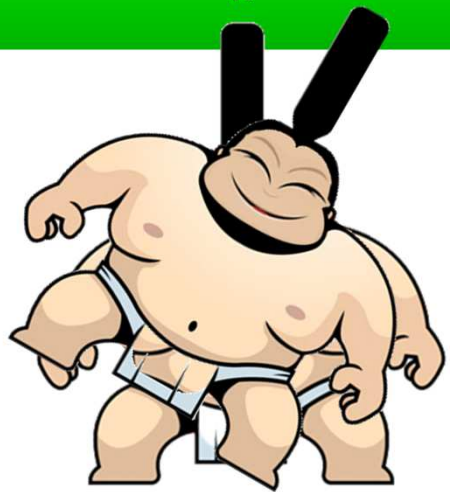


SIM







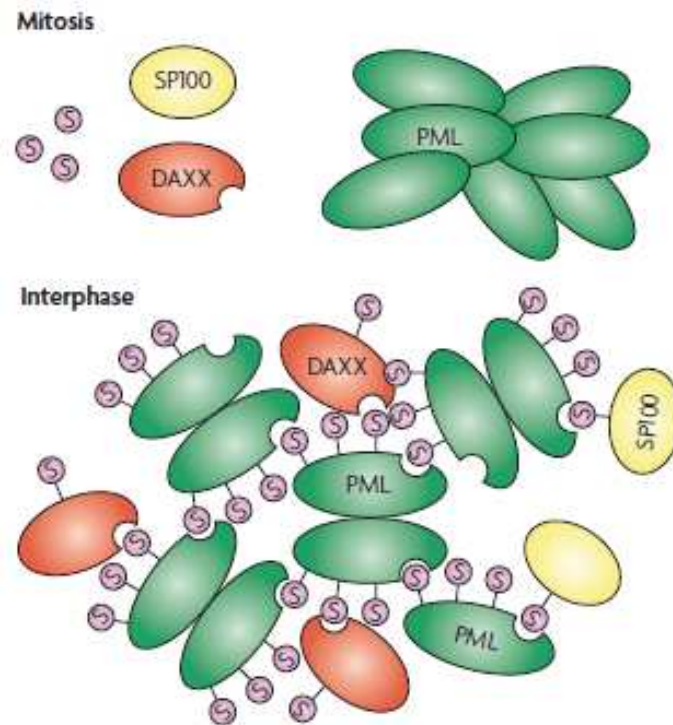


špecifickost' indukovatelnost'



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, proti-vírovej 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 vs Ubikvitín

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

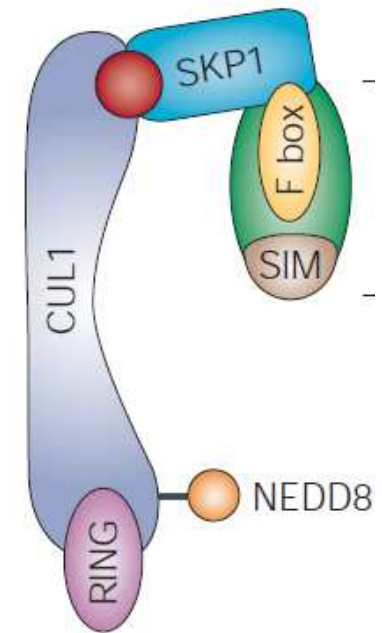
Protein	Function	Role of SUMOylation	Role of ubiquitination	Common lysine? ^a
IKB α	Signal transduction/ Inhibition of NFKB	Stabilizes IKB α by competition with ubiquitin	Promotes proteasome-mediated degradation	yes
NEMO	Signal transduction/ IKK regulation	Promotes nuclear localization	Required for IKK activation	
γ PCNA	DNA replication and repair	Regulates DNA repair during replication	Monoubiquitination promotes translesion DNA repair; polyubiquitination promotes error-free DNA repair	yes
PML	Tumor supressor	Regulates subnuclear localization; required for integrity of nuclear bodies	Promotes proteasome-mediated degradation	
p53	Transcription factor/ tumor supressor	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	

^aIndicates that competition by ubiquitin and SUMO for a common lysine in the substrate protein has been reported to impact activity.

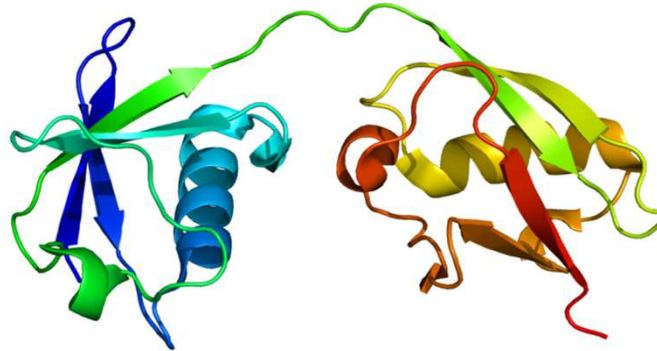
Iné ubikvitóny

NEDD8

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



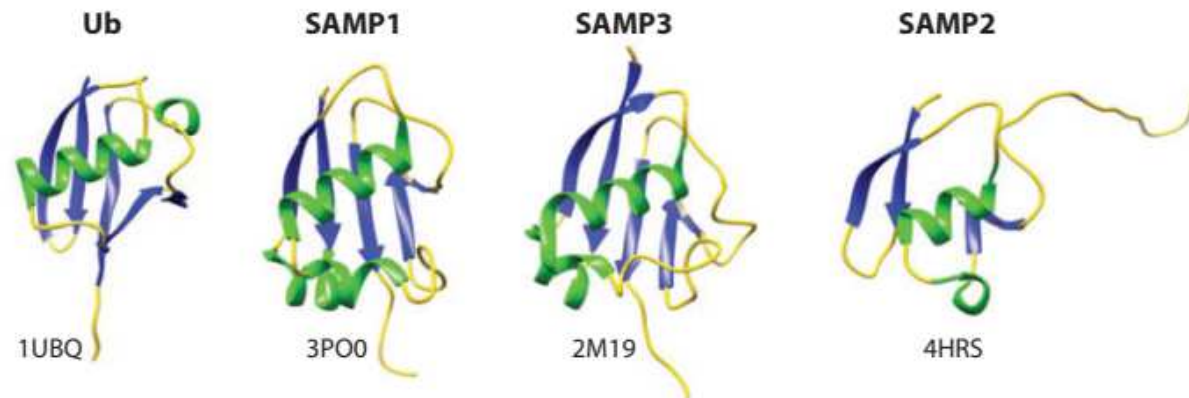
ISG15



- ISG15 = interferon stimulated gene
- Dve spojené domény s 30% sekvenčnou homológiou k ubikvitínu
- 165 aminokyselín, 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

Prokaryotické ubikvitóny

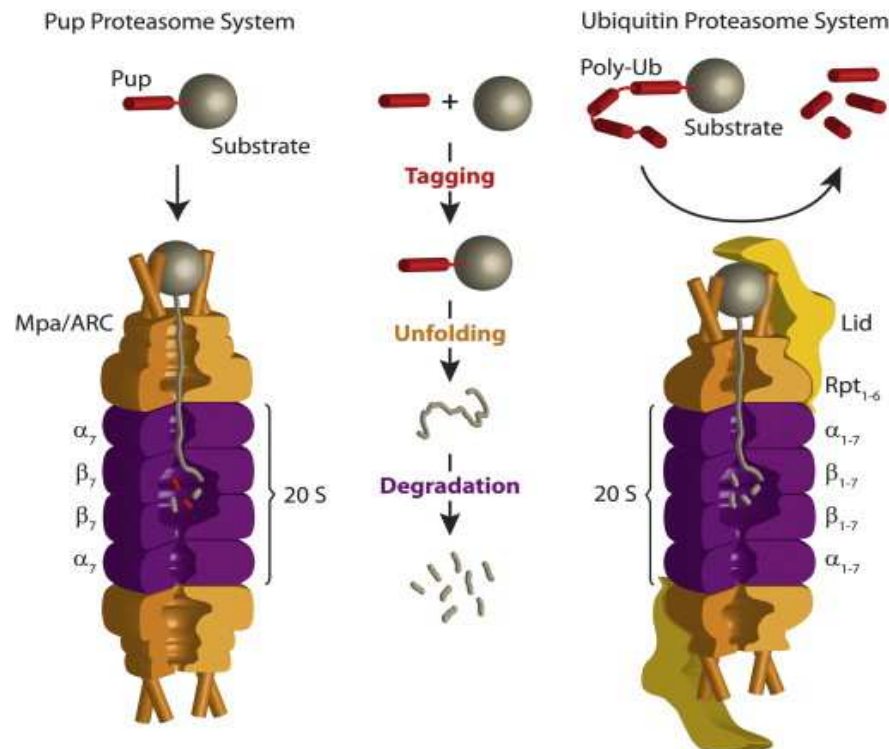
- **SAMPs** (small archaeal modifier proteins) u archaea / **TtuB** u rodu *Thermus*
- odlišná sekvencia od ubikvitínu, ale spoločný β -grasp fold



- **PUP** (prokaryotic ubiquitin-like protein)
 - u aktinobaktérií - bežné pôdne baktérie a tiež mnoho patogénov (*Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*)
 - 7 kDa, nezdieľa sekvenčný ani štruktúrny motív s ubikvitínom

PUPylácia

- pupylácia = pripojenie PUP proteínu na lyzín cieľového proteínu
- pupylovaný proteín je následne degradovaný prokaryotickým proteazómom
- iba 1 pupylačný enzým PufA a 1 depupylačný Dop



Take home message

- Ubikvitóny (ubikvitín, SUMO, ...) mnohonásobne zvyšujú repertoár proteínov a ich komplexov
- Ubikvitóny sa kovalentne viažu na **lyzíny** cieľových proteínov
- Na konjugácii sa podieľajú E1 (aktivačné), E2 (konjugačné) enzýmy a E3 ligázy
- E3 **ligázy** udeľujú dráhe **špecifickosť** tým že rozoznávajú cieľové substráty
- Modifikácia je **reverzibilná** a ubikvitóny sú odstraňované proteázami
- Ubikvitóny môžu, ale nemusia tvoriť **reťazce**
- Ubikvitóny môžu, ale **nemusia** viesť k proteazomálnej **degradácii**
- Ubikvitón substrátu prináša nový interakčný povrch a väčšinou vedie k **stimulácii** proteín-proteínových **interakcií** a tvorbe proteínových komplexov
- Ubikvitóny sprostredkovávajú slabé interakcie a pre efektívnu tvorbu komplexov je nutné väčšie množstvo ubikvitón – UBD interakcií

