

Ubikvitóny

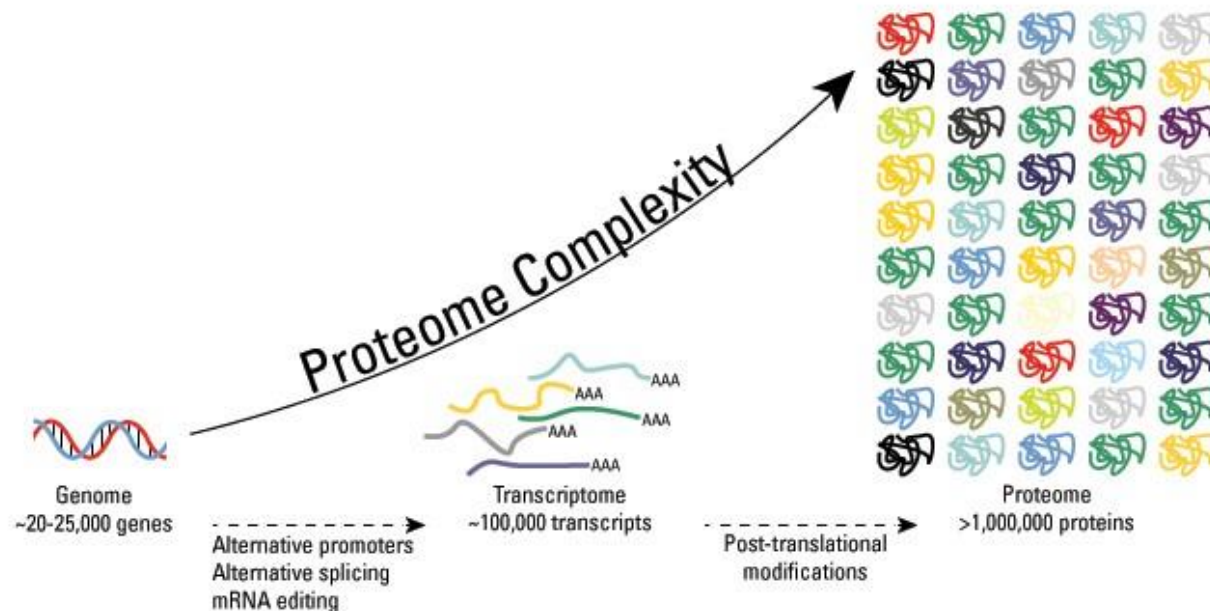
a tvorba proteínových komplexov

Peter Kolesár

16.3.2023

Post-translačné modifikácie proteínov

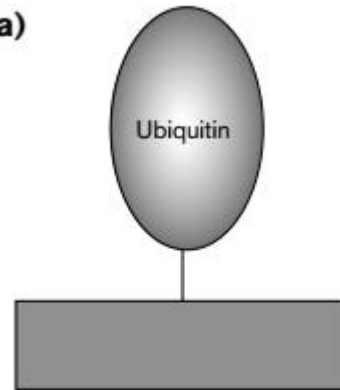
- (len) u eukaryotických buniek
- mnohonásobne zvyšujú repertoár proteínov a ich komplexov
- rýchle a reverzibilné adaptácie na zmeny
- pripojenie - malých molekúl - fosforylácia, acetylácia, metylácia, ...
- proteínových molekúl - ubikvitóny



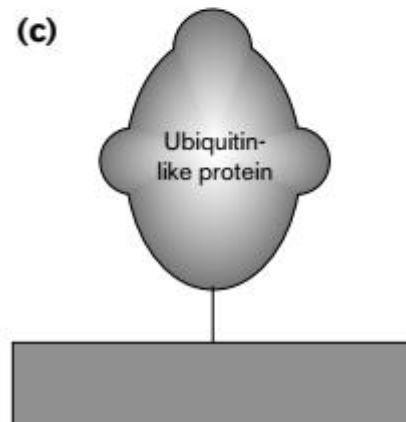
Ubikvitóny = ubikvitín a ubikvitínu podobné proteíny (ubiquitin-like proteins, UBLs)

Attachable ubiquitons

(a)



(c)



Ubiquitons are everywhere!

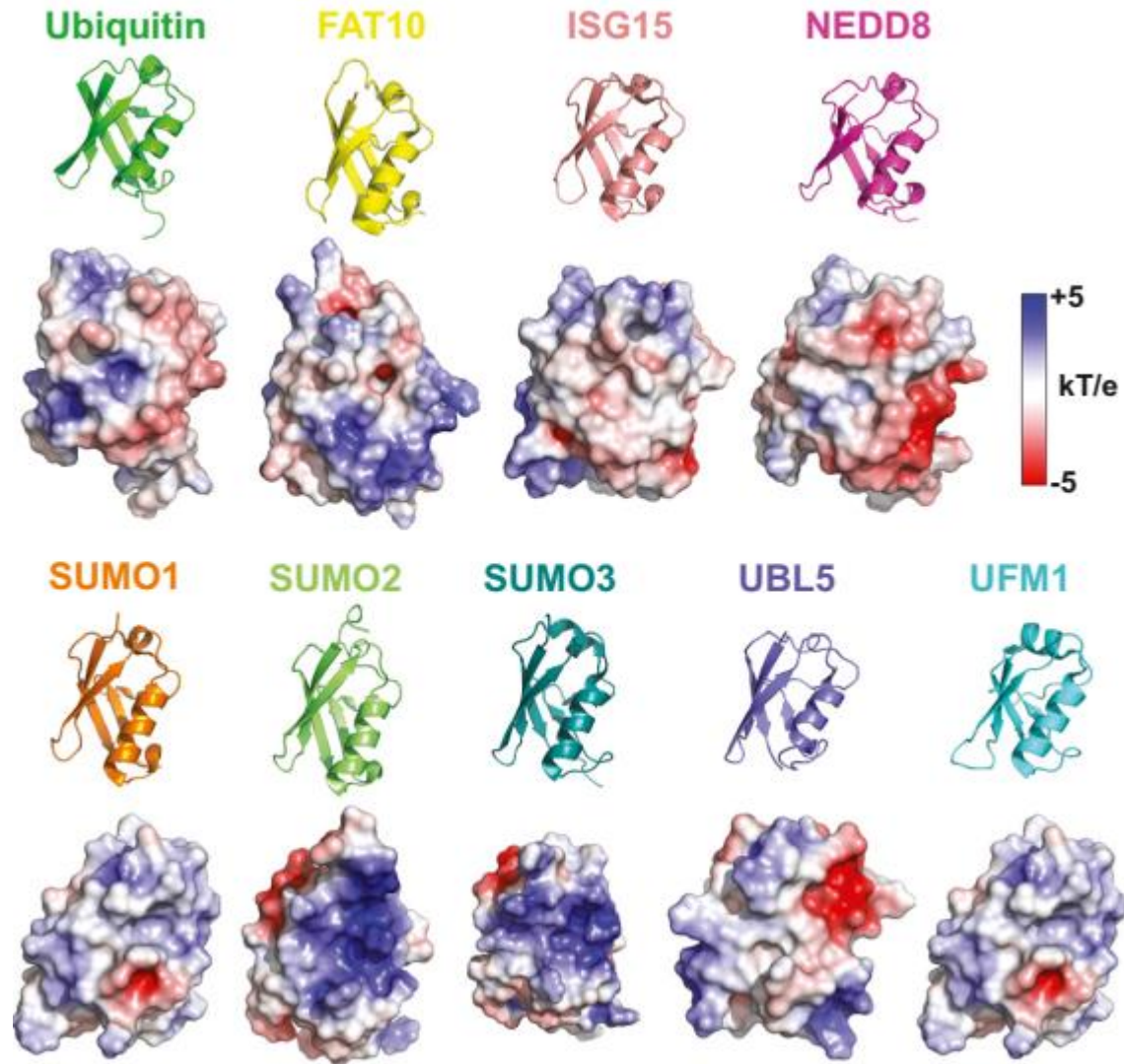
Ubiquitin superfolds: intrinsic and attachable regulators of cellular activities?

R John Mayer, Michael Landon and Robert Layfield

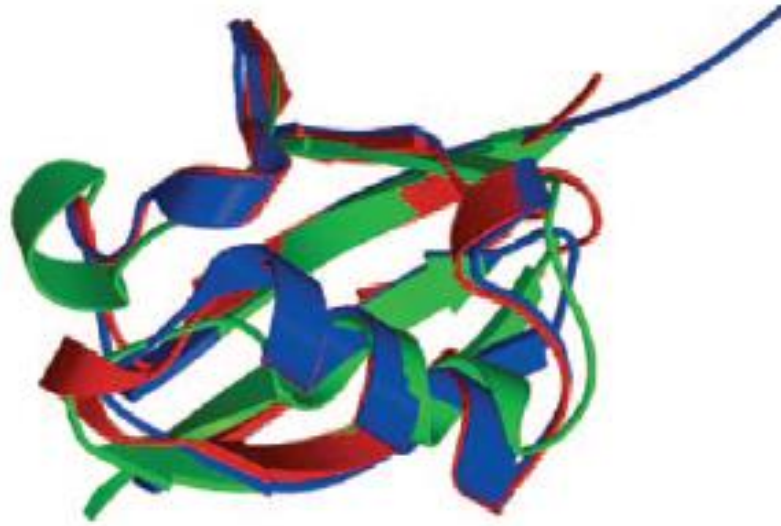
Ubikvitóny

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



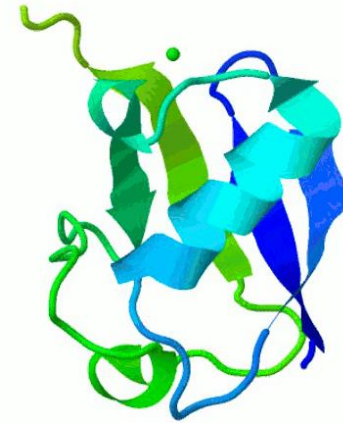
Ubikvitóny - β -grasp fold



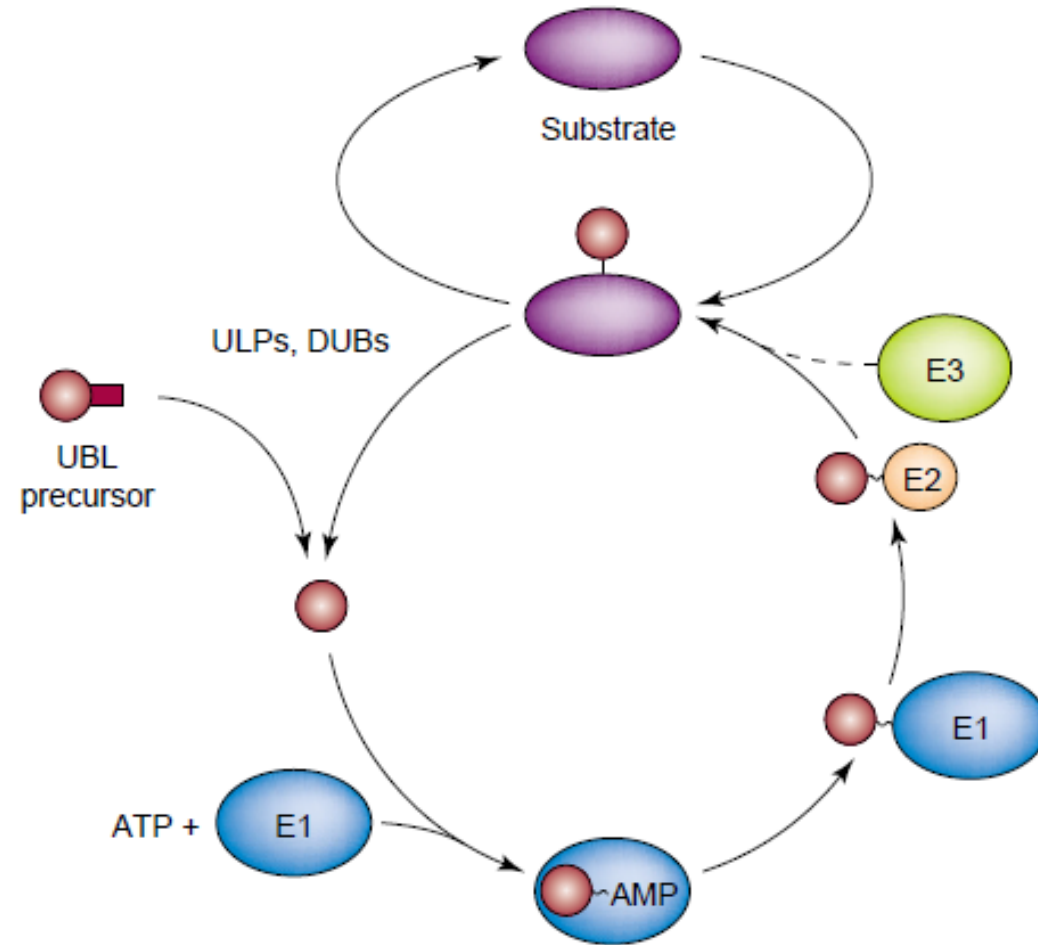
Ubikvitín

SUMO-1

NEDD-8

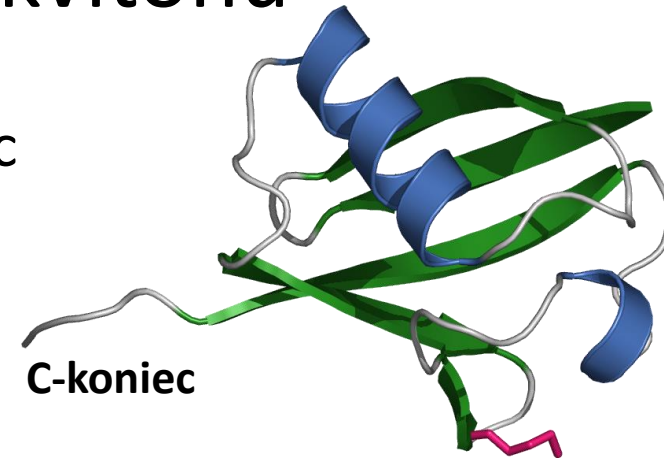


Konjugačný cyklus ubikvitónov



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

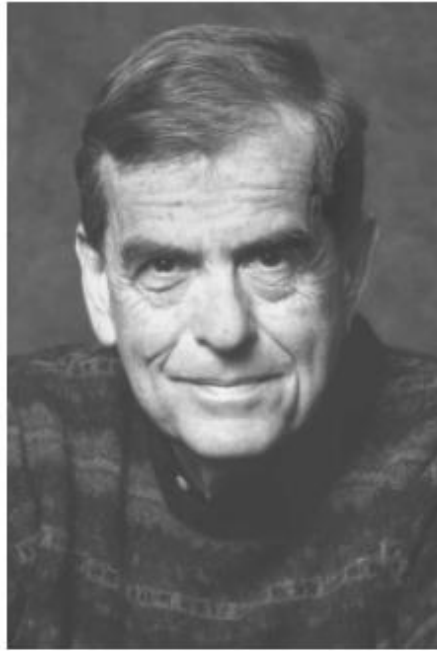


Photo: D. Porges

Aaron Ciechanover

Prize share: 1/3



Photo: D. Porges

Avram Hershko

Prize share: 1/3



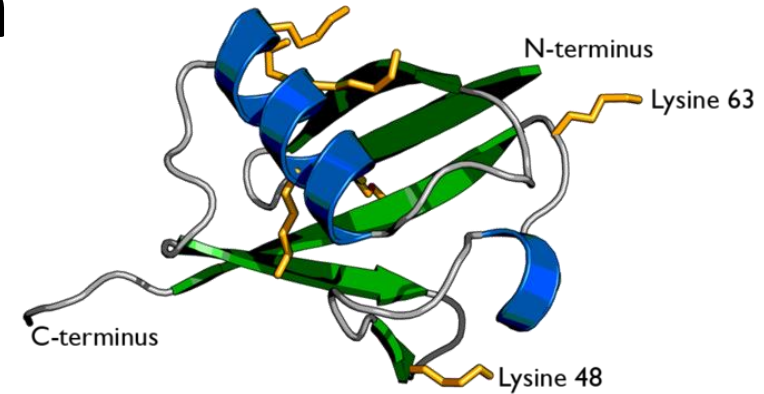
Photo from the Nobel Foundation archive.

Irwin Rose

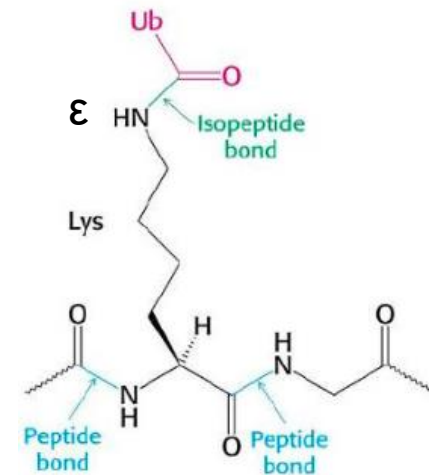
Prize share: 1/3

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."

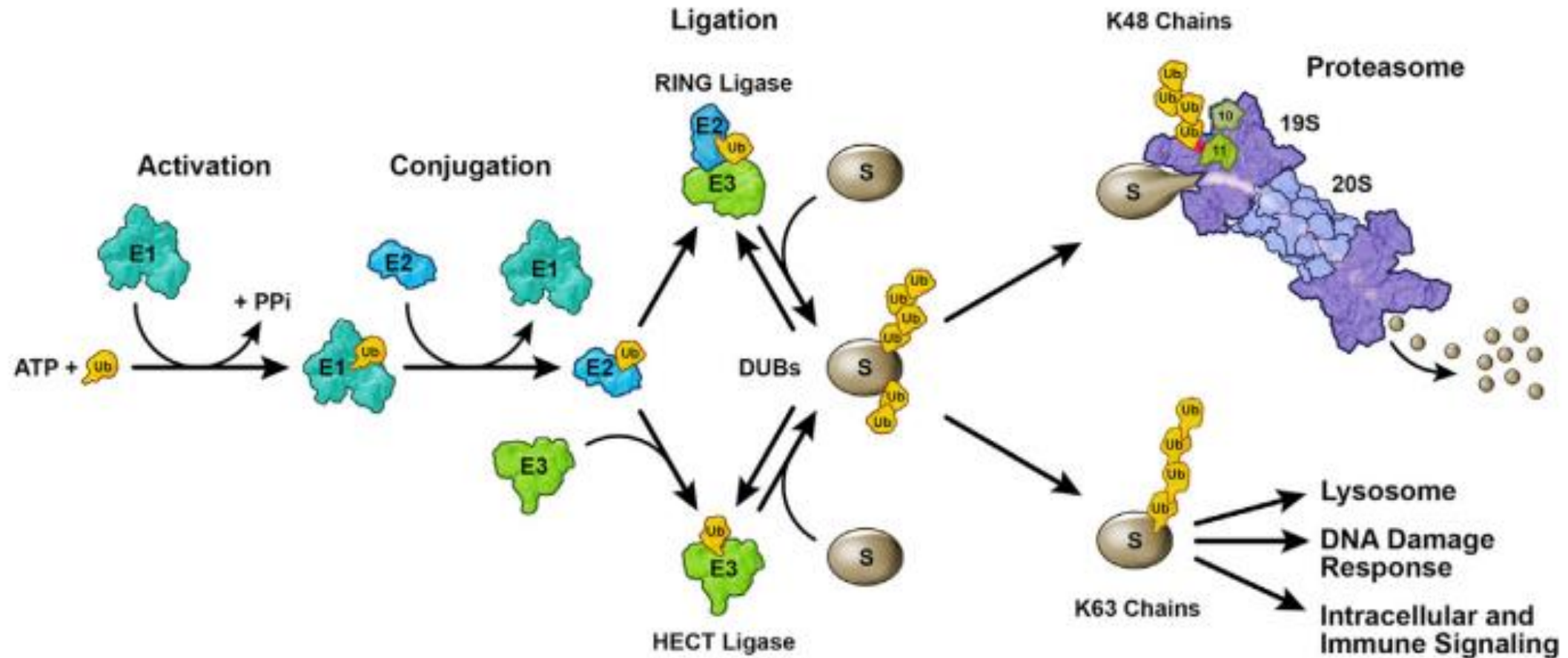
Ubikvitín



- 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



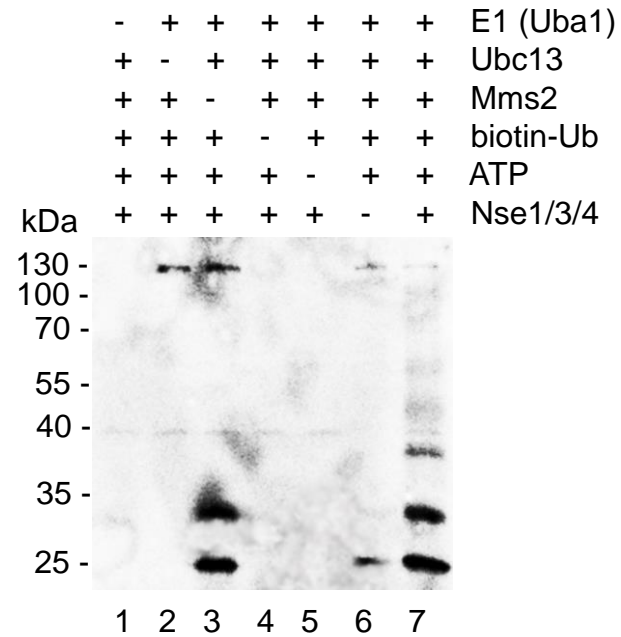
Ubikvitín - konjugačný systém



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

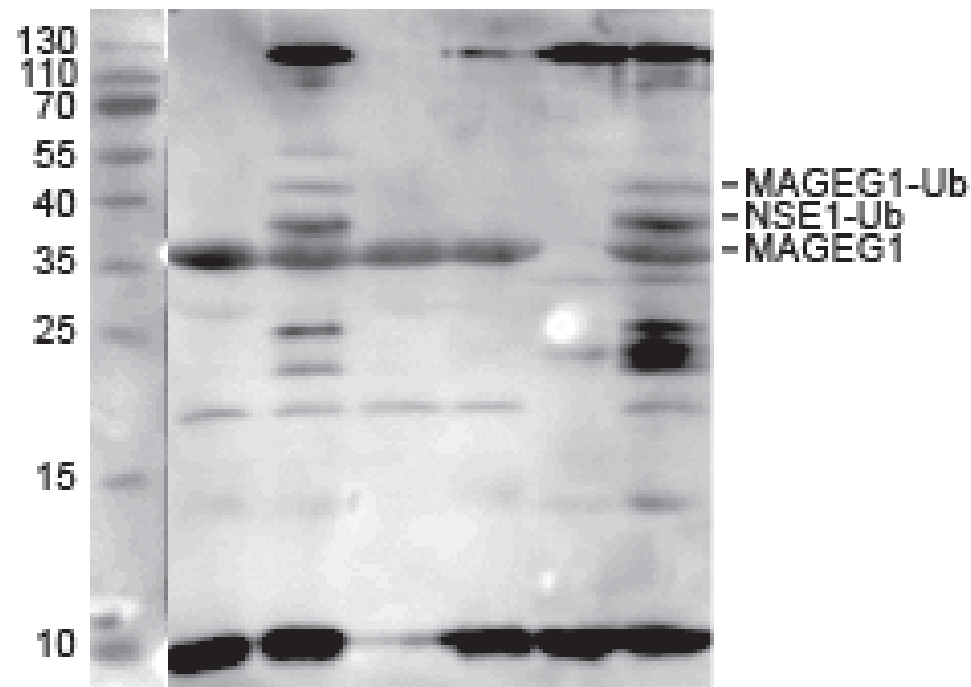
Ľudia: E1 – 2 ks; E2 – 35 ks; E3 > 600 ks

Príklad analýzy ubivitinácie in vitro



Úloha - nájdi problém ubikvitinácie NSE1/MAGEG1

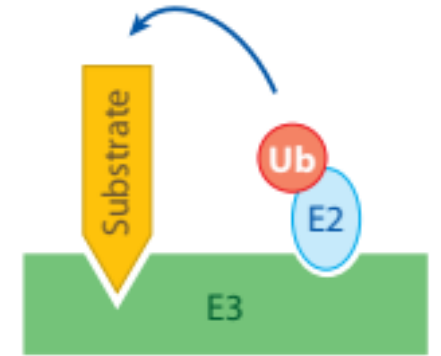
	-	+	+	+	+	+	E1 (110 kDa)
	+	-	+	+	+	+	E2 (Ubc13 -17kDa / Mms2 -21kDa)
	+	+	-	+	+	+	Ub(-biotinylated -8.5 kDa)
	+	+	+	-	+	+	ATP
HMW	+	+	+	+	-	+	NSE1 (30kDa) / MAGEG1 (36kDa)



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

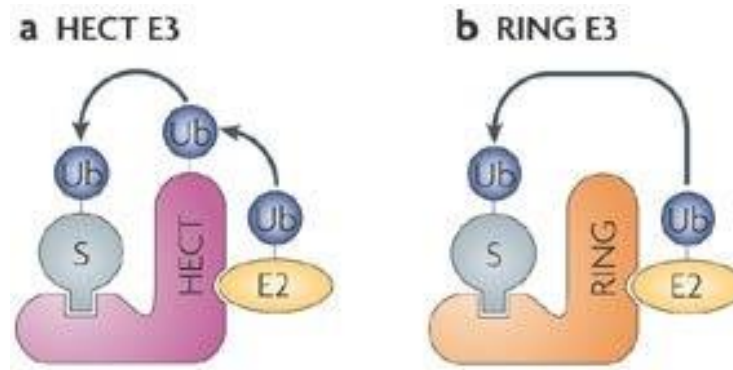


Deshaies & Joazeiro, 2009

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



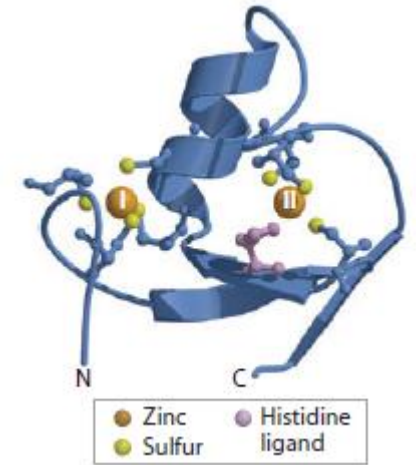
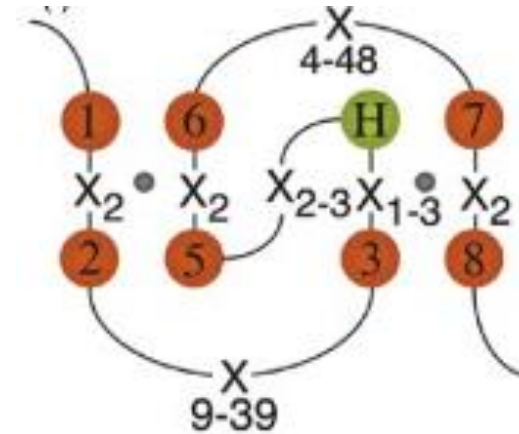
Rotin & Kumar, 2009

Rozdiel v prenose ubikvitínu na substrát:

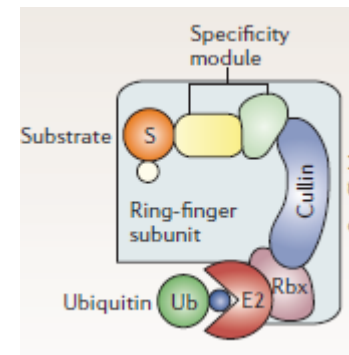
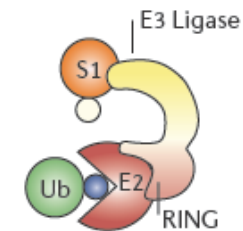
- HECT – obsahujú konzervovaný katalytický cysteín, ktorý funguje ako akceptor ubikvitínu z E2. Ubikvitín je následne prenesený na špecifický lyzín substrátu
- RING – ubikvitín je prenesený z E2 priamo na substrát

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



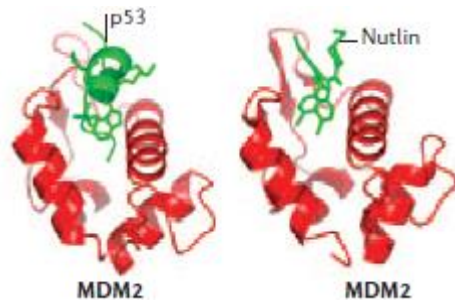
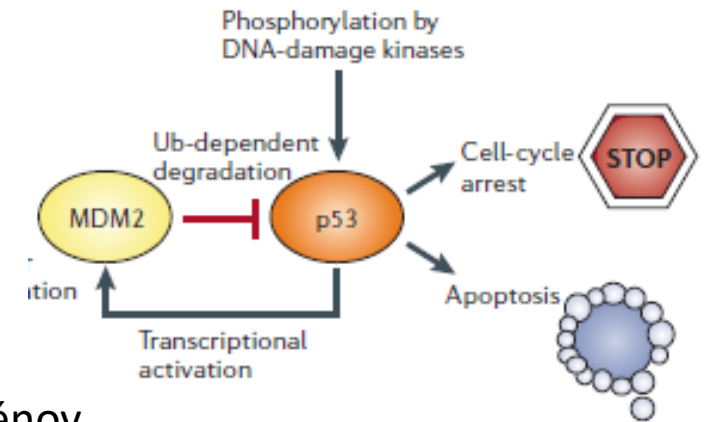
Deshaies & Joazeiro, 2009



Nalepa et al., 2006

Príklad jednoduchej RING E3 ligázy – MDM2

- **p53** – transkripčný faktor, senzor poškodenia DNA - '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

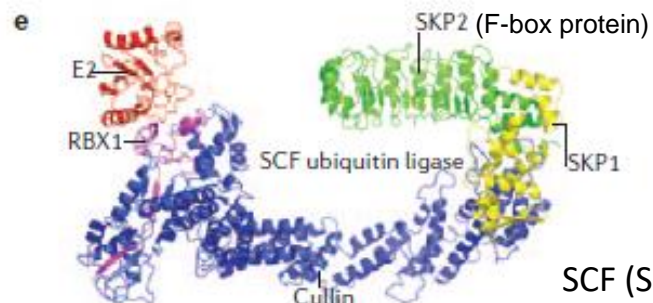
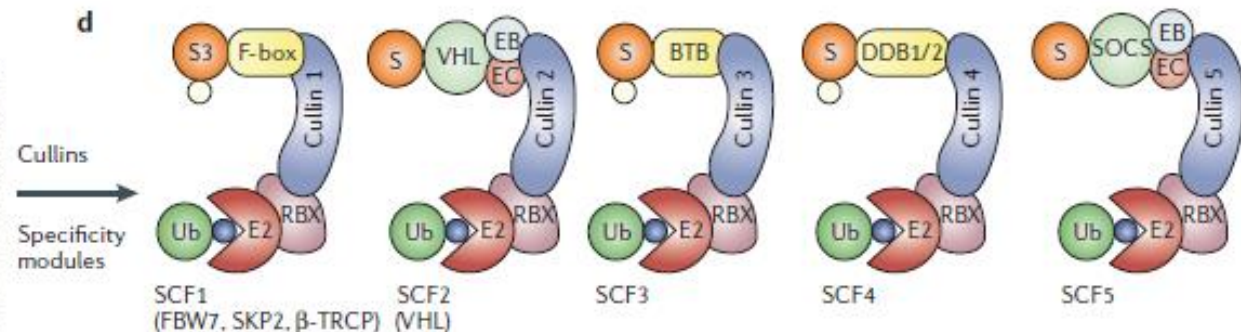
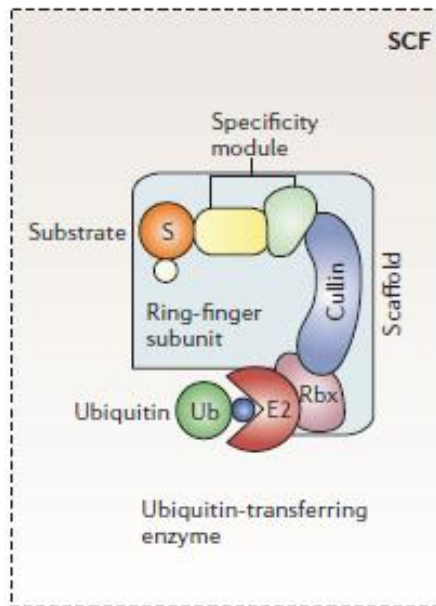


Cullin-RING E3 ligázy

- multi-podjednotkové ligázy zostavené na Cullin-ovom lešení
- u ľudí 7 Cullinov - každý súčasťou 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



SCF (SKP1-Cullin-F-box) ligázy

Petorski et al., 2005

Nalepa et al., 2006

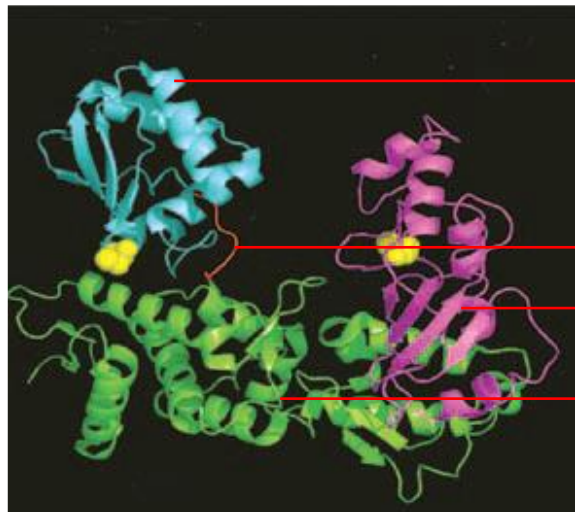
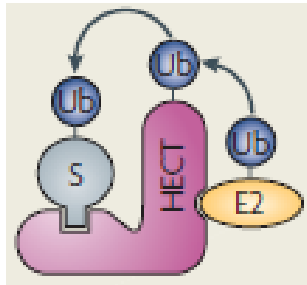
U-box E3 ligázy

- U-box motív je štruktúrne podobný RING doméne a viaže E2 enzýmy
- U-box neviaže ióny kovu, priestorovú konformáciu určujú intramolekulárne vodíkové väzby
- STUB1 (CHIP) – 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)

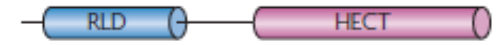
ohybová doména

E2 (Ubc7)

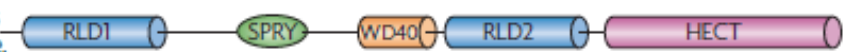
Ubc väzobná HECT doména

HERC family (six members)

Small HERCs



Large HERCs
(for example, HERC1)

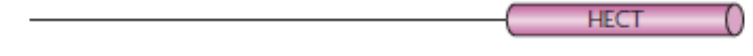


Nedd4 family
(nine members)

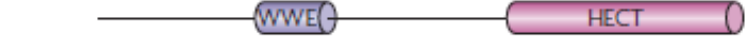


Other HECTs

E6AP, HECTD2 and KIAA0614



TRIP12



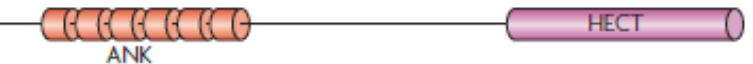
G2E3



EDD



HACE1 and HECTD1



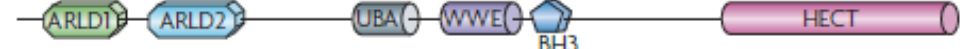
UBE3B and UBE3C



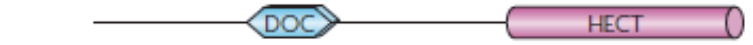
KIAA0317



HUWE1



HECTD3



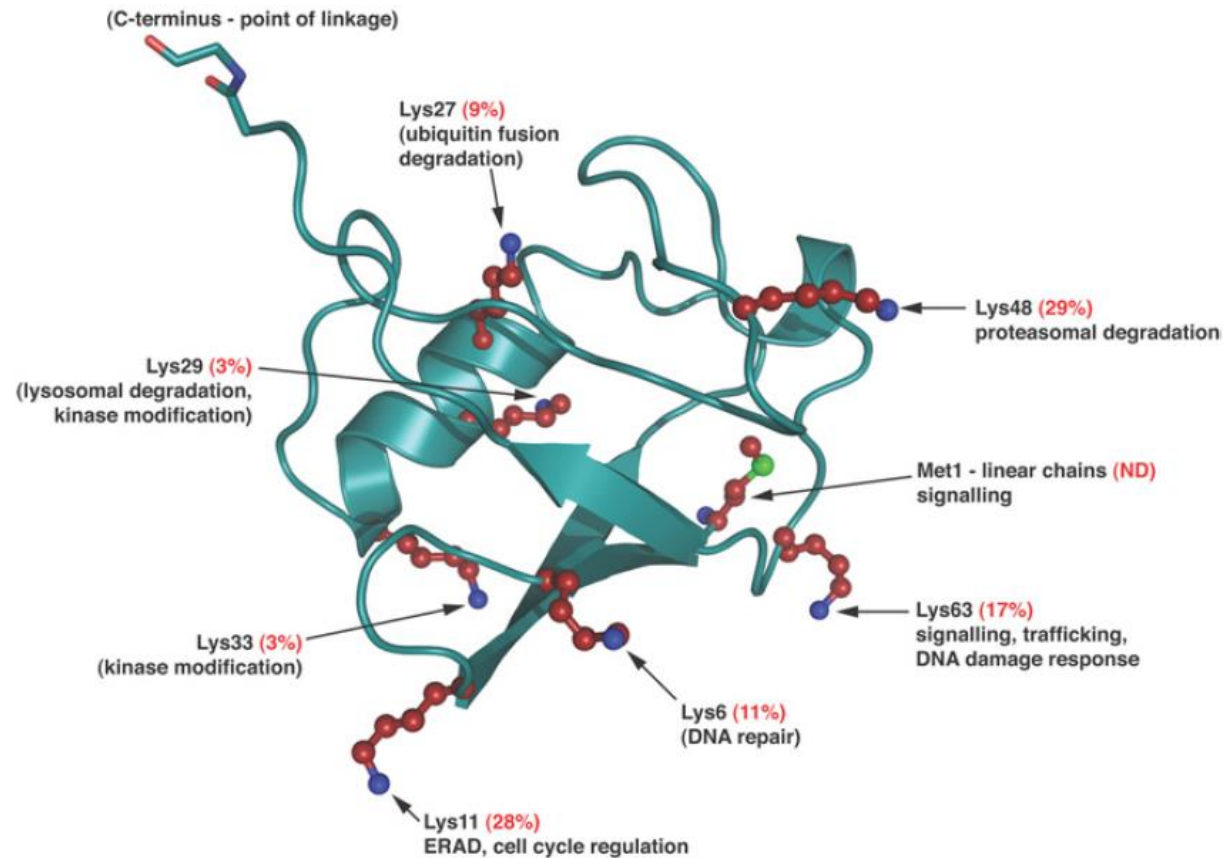
Príklad HECT E3 ligázy

- **E6-AP (UBE3A) 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 potom ubikvitinuje p53, čo vedie k jeho degradácii a napomáha vzniku rakoviny
 - Angelmanov syndróm
 - spôsobený mutáciou pri aktívnom mieste E6-AP
 - mentálna retardácia, záchvaty smiechu

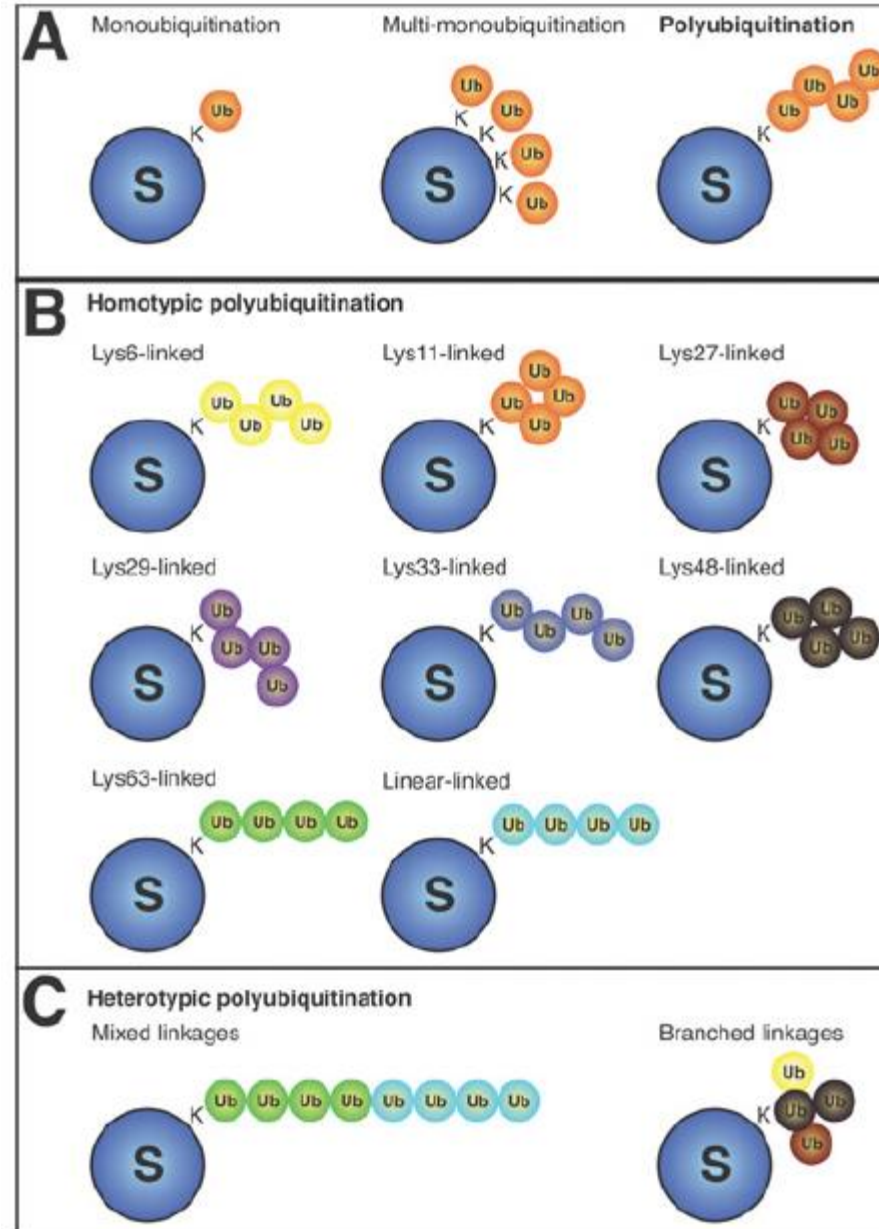


Monoubikvitinácia / polyubikvitinácia

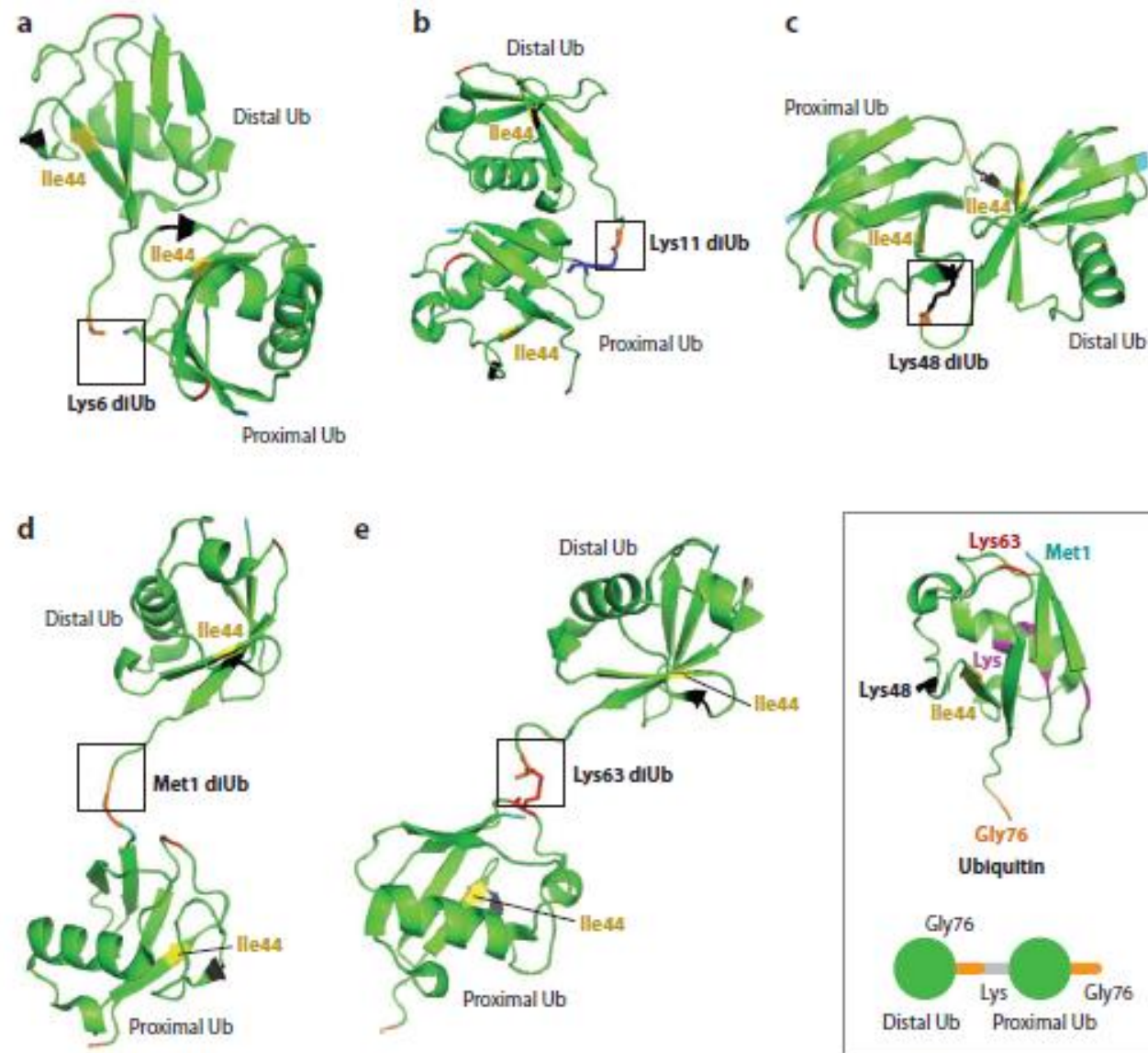
- Polyubikvitinácia – samotný ubikvitín je substrátom ubikvitinácie
- Ubikvitín má 7 lyzínov ktoré môžu byť modifikované + N-koniec



Druhy ubikvitinácií



Rôzne ub reťazce majú odlišnú topológiu

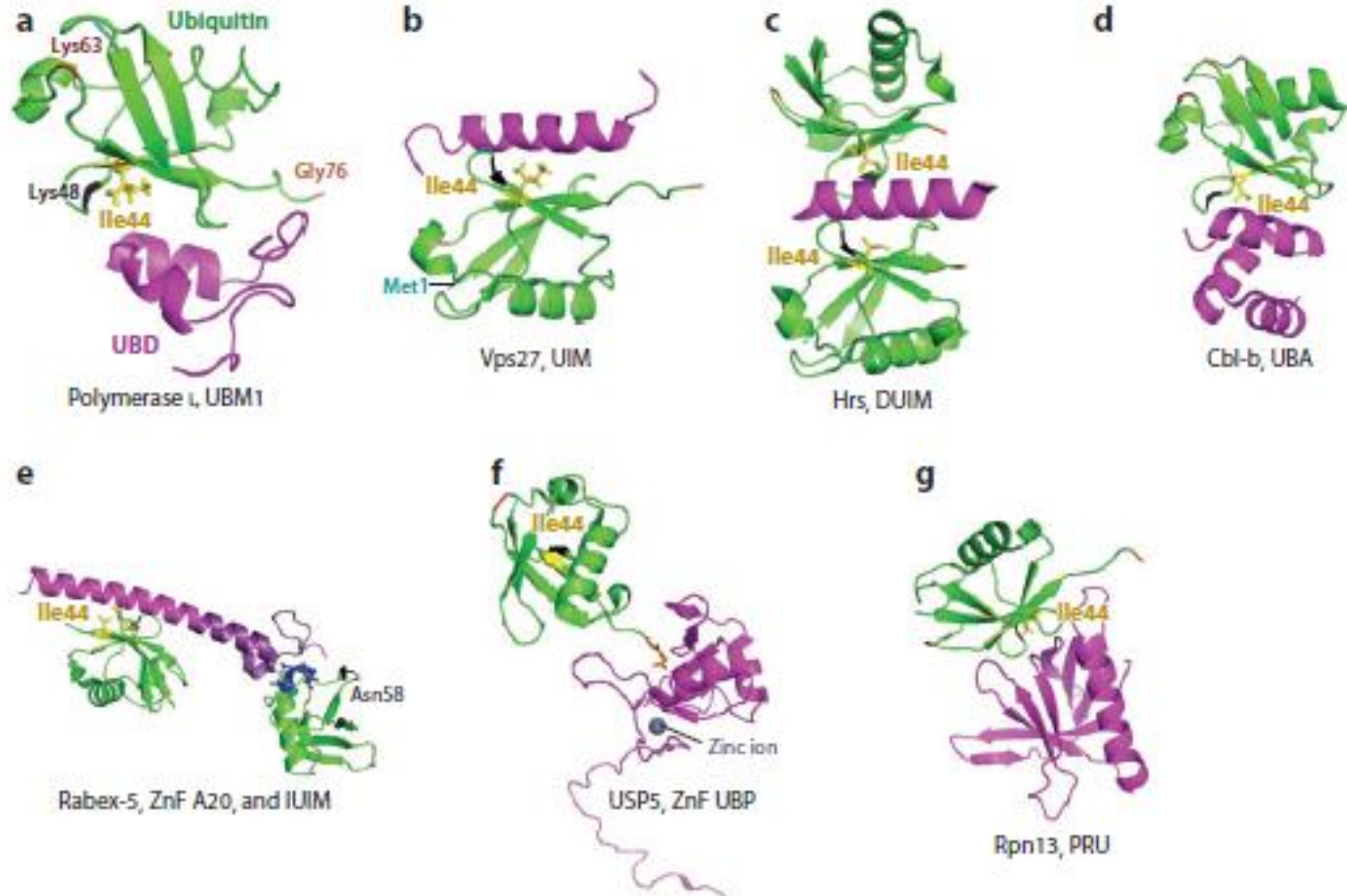


Dopad pripojenia ubikvitínu



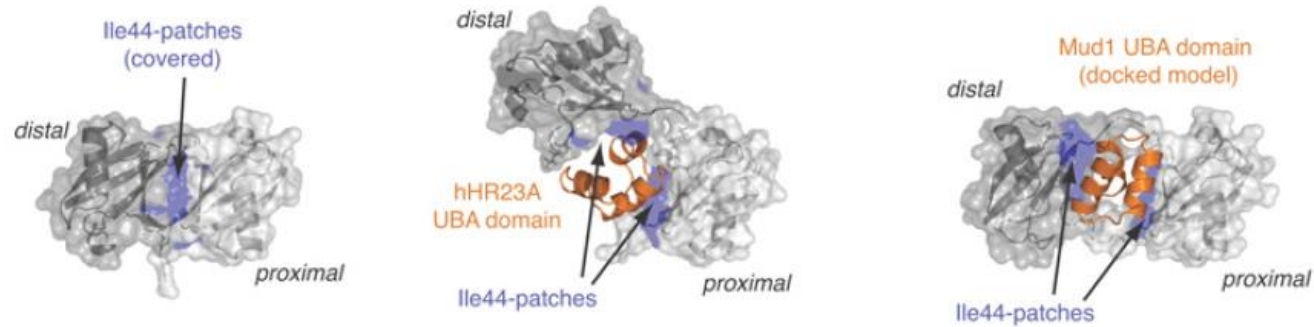
- stimulácia proteín-proteínových interakcií, tvorba komplexov
- Interakčný partner (ubikvitínový receptor) obsahuje nekovalentné väzobné miesto špecifické pre ubikvitín (**ubiquitin binding domain, UBD**)
- Asi 20 rôznych typov UBD s rôznymi štruktúrami a veľkosťou
- Väčšina UBD sa viaže s hydrofóbnou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

UBD – väzba s ubikvit nom

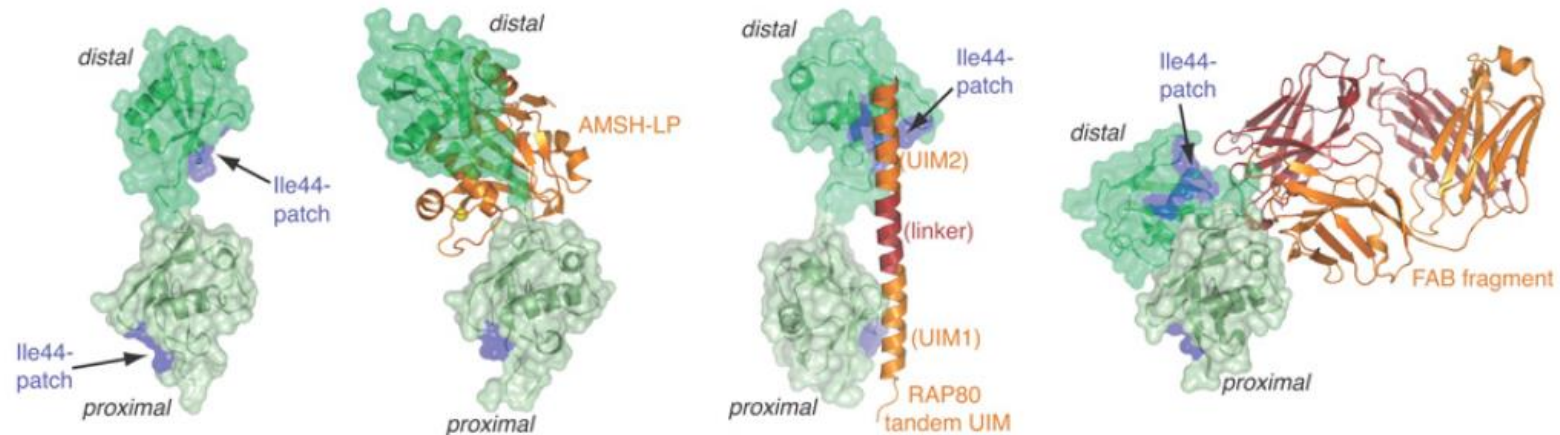


UBD - odlišenie rôznych typov ub reťazcov

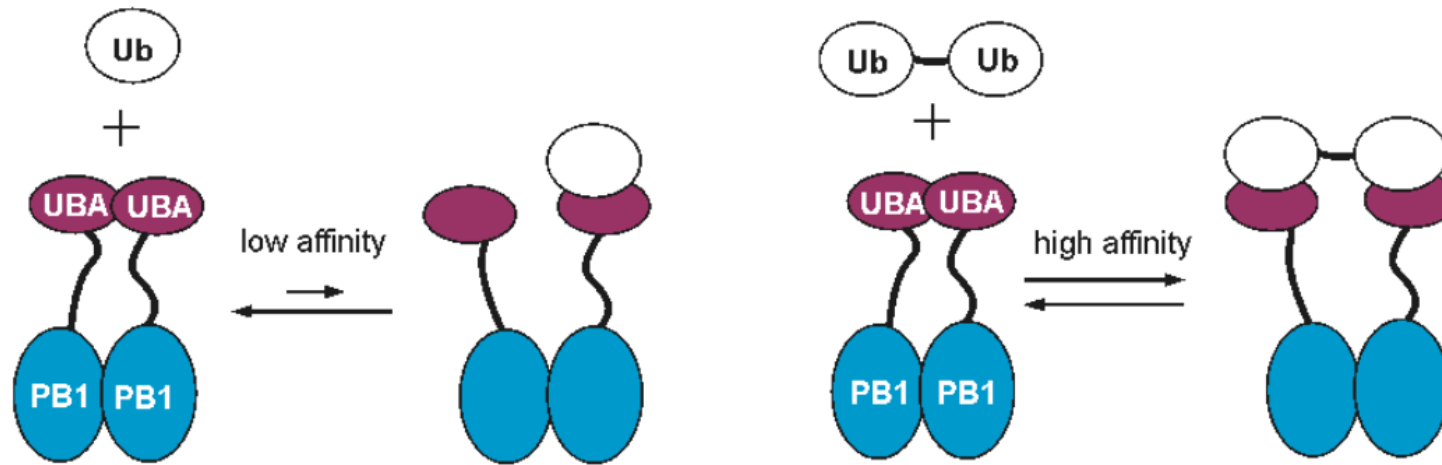
A Lys48 diubiquitin complex



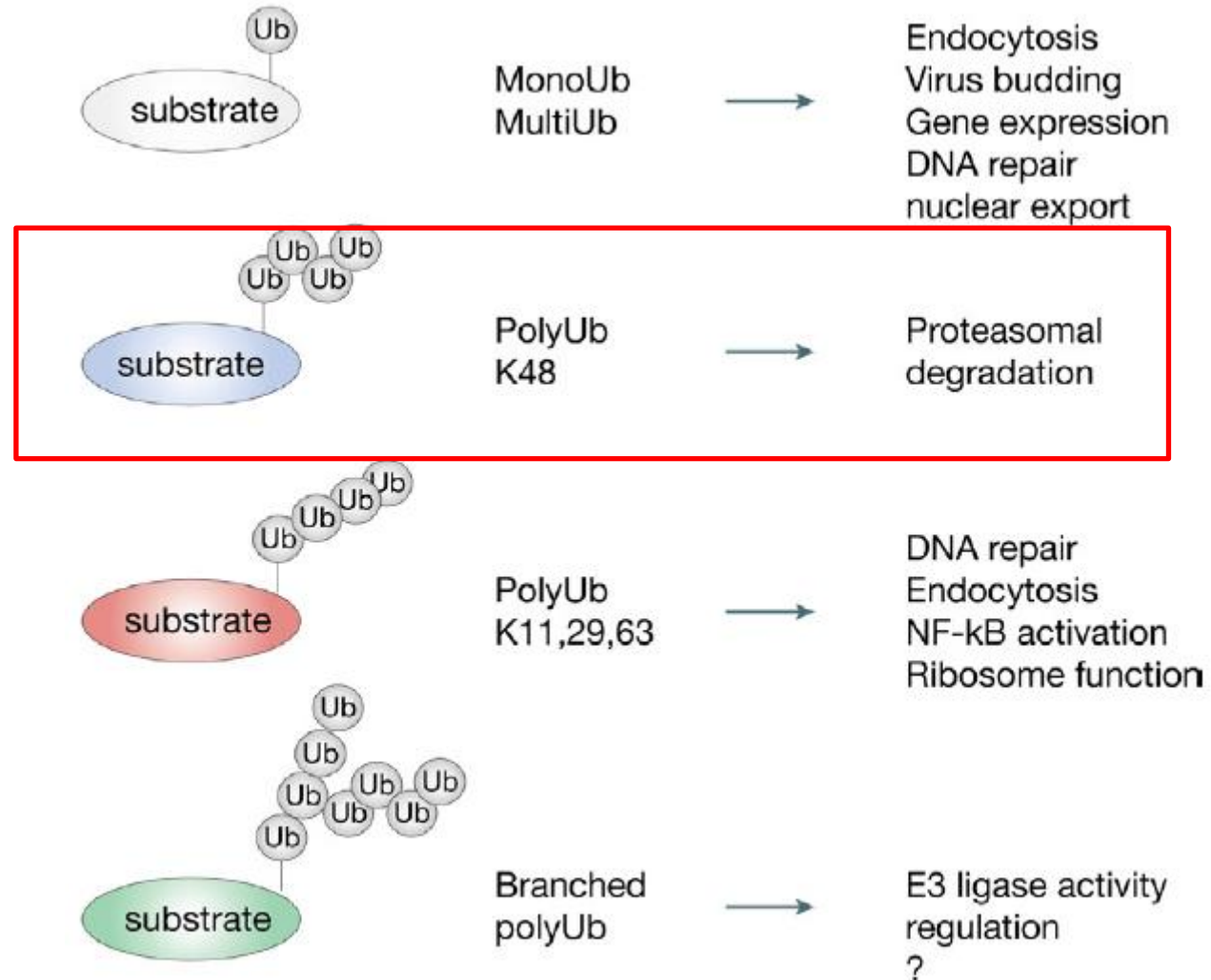
B Lys63 diubiquitin complexes



Viacnásobné slabé interakcie významne zvyšujú afinitu

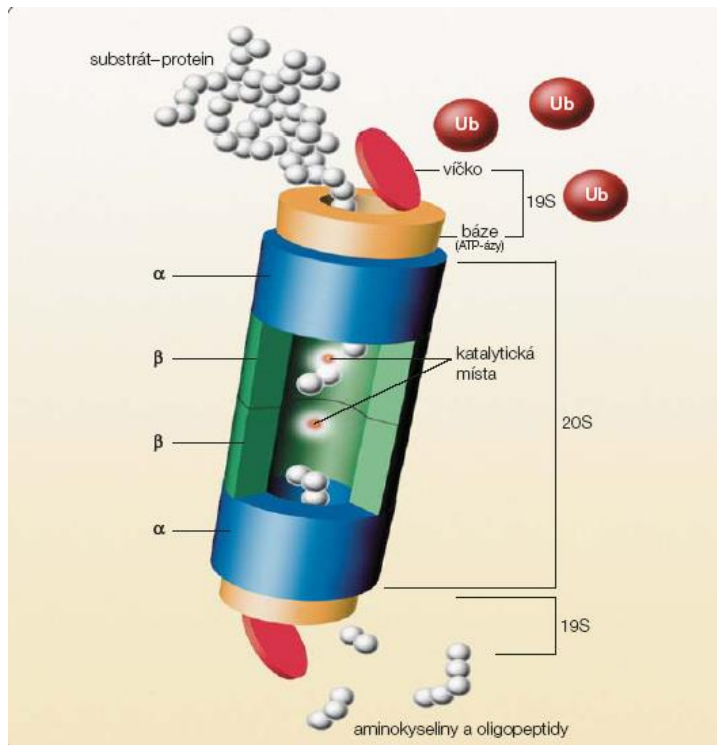


Funkcie ubikvitinácie



Cytozolická degradácia proteínov v proteazómoch

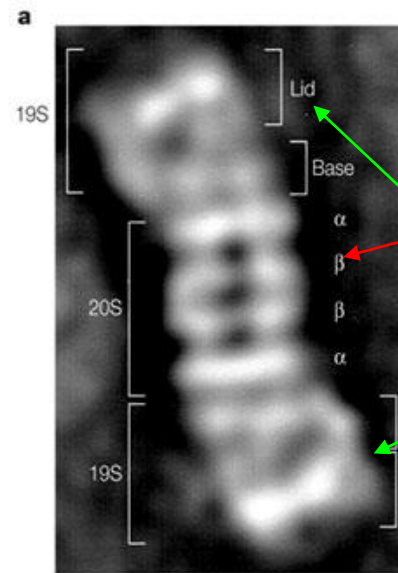
- Konjugácia ubikvitínu - hlavná nelyzozomálna proteolytická dráha
- Po selektívnom označení proteínu konjugáciou ubikvitínového reťazca K48 (na rozoznanie treba 4 a viac ubikvitínov v reťazci) dochádza k jeho degradácii v proteazóme
- odstránenie abnormálnych proteínov, riadi dĺžku života dôležitých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



26S proteazóm

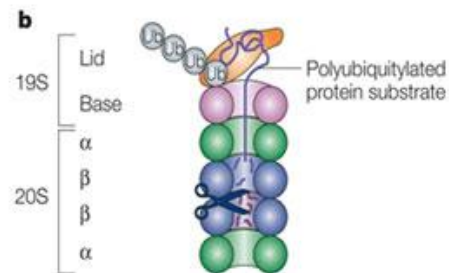
- veľký (2.5 MDa) multipodjednotkový (60) proteázový komplex na degradáciu proteínov

Štruktúra 26S proteazómu



Skladá sa z 2 subkomplexov:

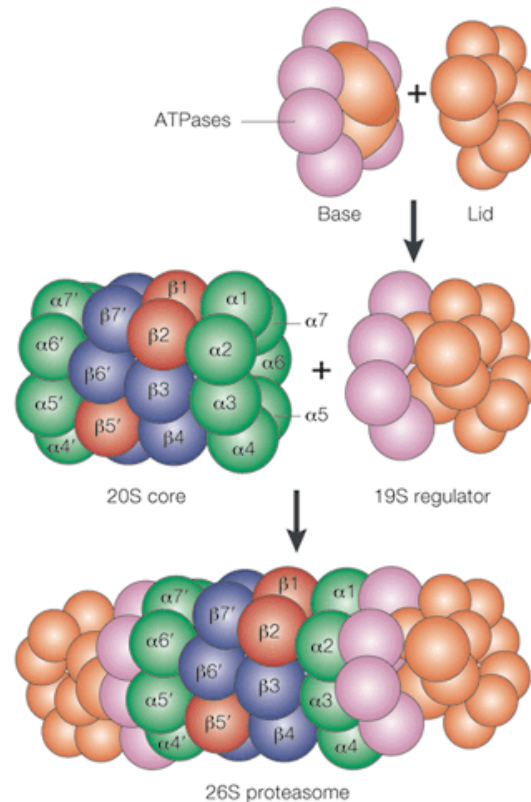
- 20S centrálna časť (core particle) – vykazuje katalytickú aktivitu
- 19S regulačná časť (regulatory particle)



Štruktúra 26S proteazómu

19S regulačná časť

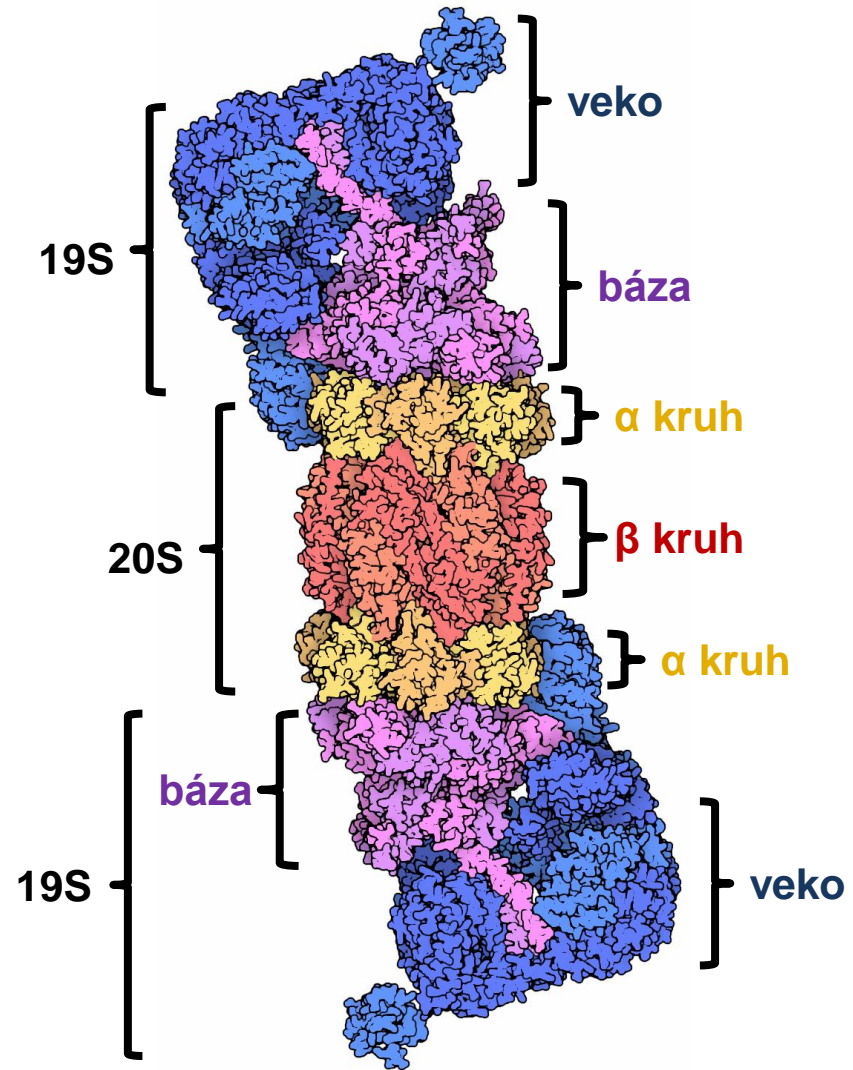
- zložená najmenej z 18 rôznych podjednotiek, ktoré tvoria subkomplexy bázu (base) a veko (lid)
- veko obsahuje podjednotky, ktoré viažu ubikvitinované reťazce a 2 deubikvitinačné enzýmy (izopeptidázy) odstraňujúce ubikvitíny (recyklácia)
- báza obsahuje 6 ATPáz priliehajúcich k vonkajšiemu kruhu 20S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



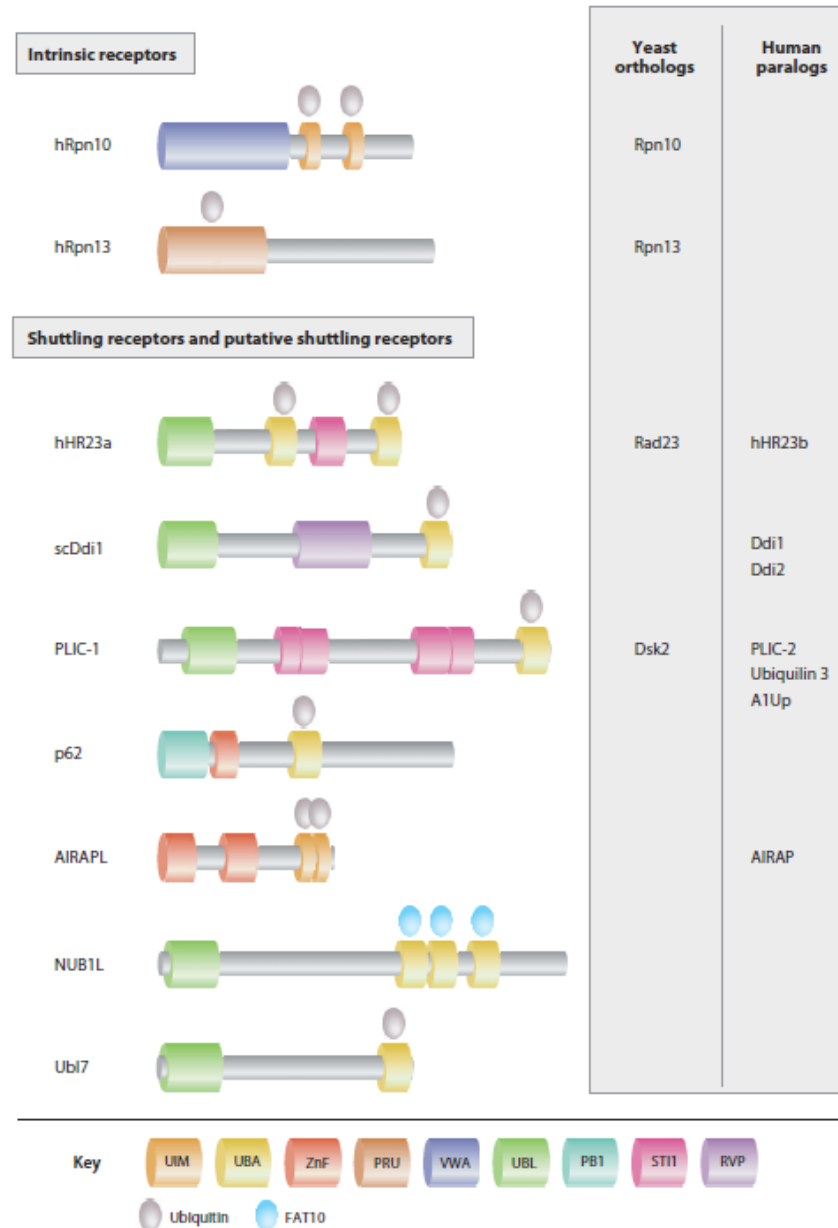
20S centrálna časť

- 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 - α_{1-7} β_{1-7} α_{1-7}
- proteolyticky aktívne miesto je na β podjednotkách (β1, 2, 5)
- α podjednotky obklopujú vstup pre substrát a výstup pre produkt

Architektúra 26S proteazómu

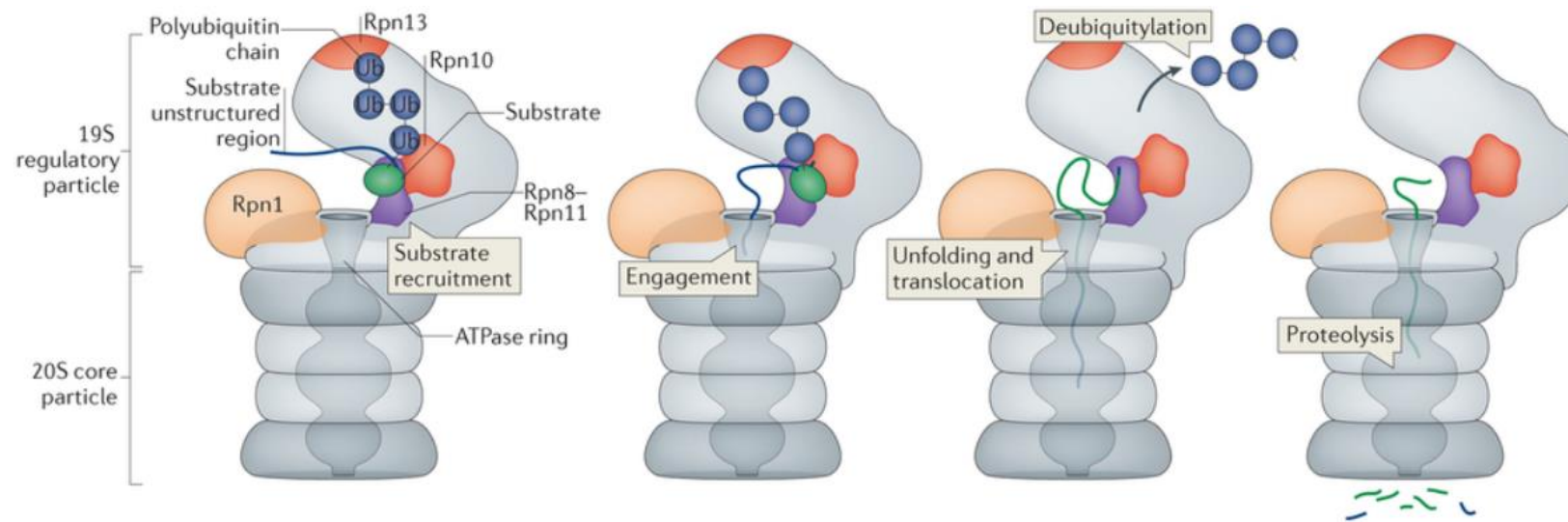


Ubikvitínové receptory proteazómu



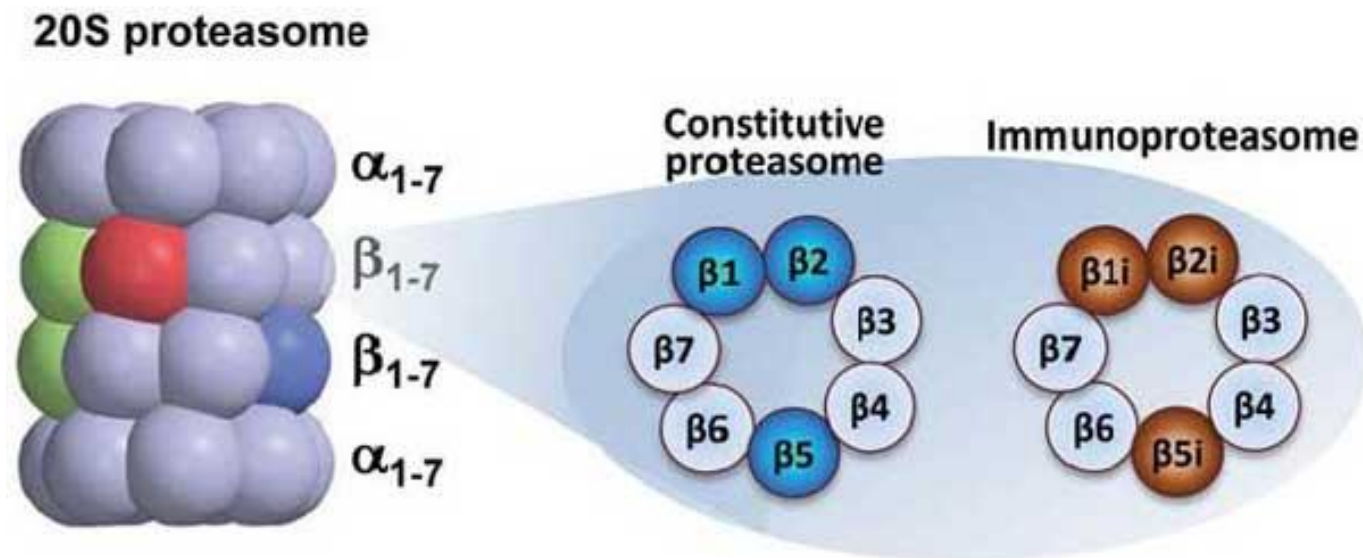
Priebeh degradácie

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

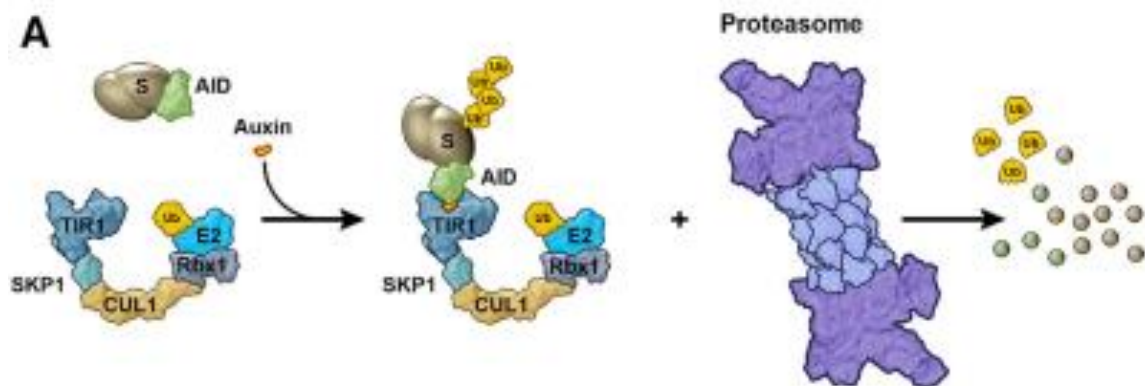


Imunoproteazóm - 20S

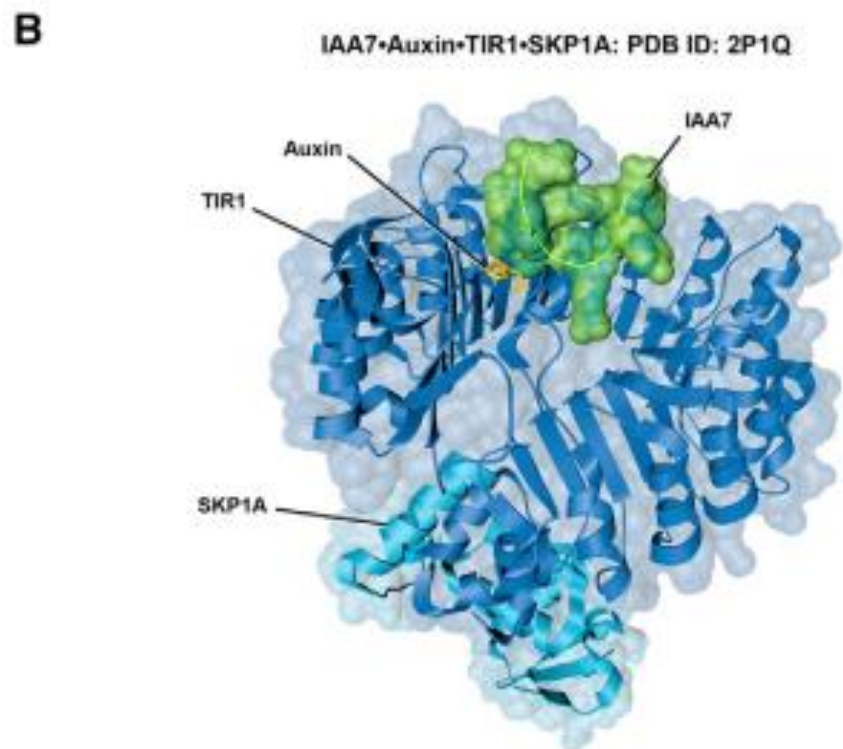
- špeciálny typ proteazómu
- exprimuje sa v bunkách pri zápalovej odpovedi (expresia spustená interferónom) a v antigén-prezentujúcich bunkách imunitného systému
- Je hybridom pozostávajúcim zo štandardných proteazómových podjednotiek a 3 katalytických β -podjednotiek špecifických pre imunoproteazóm
- 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



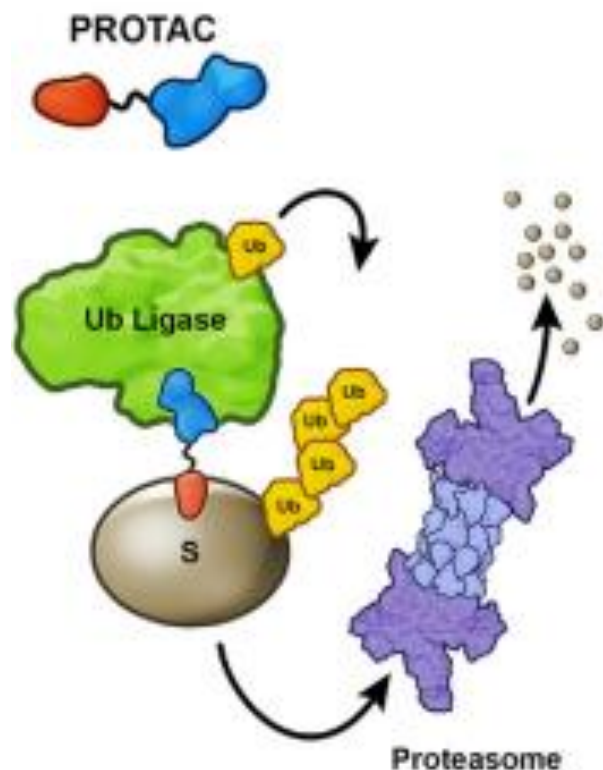
Využitie ubikvitín - proteazómového systému na cielenú degradáciu proteínov



- AID = auxínom indukovateľný 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 cielenú degradáciu proteínov



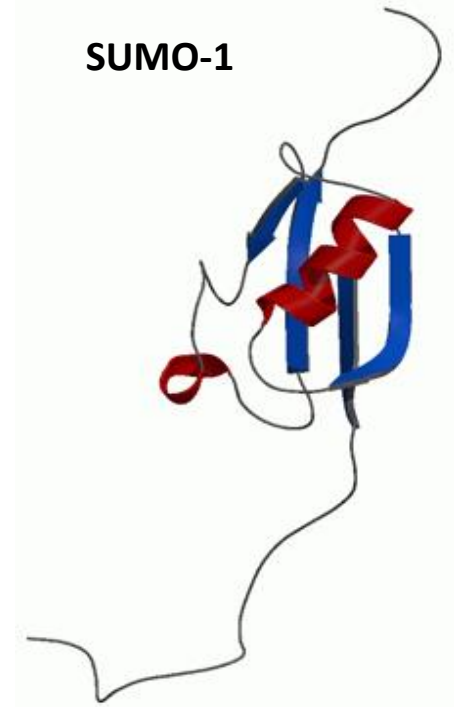
- PROTAC = PROteolysis Targeting Chimeric molecule
- chimerická molekula zároveň interaguje s cieľovým proteínom a s ubikvitín ligázou
- blízkosť ligázy vedie k ubikvitinácii a degradácii cieľového proteínu

SUMO

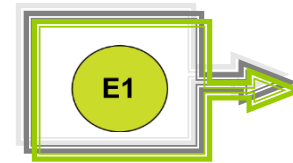
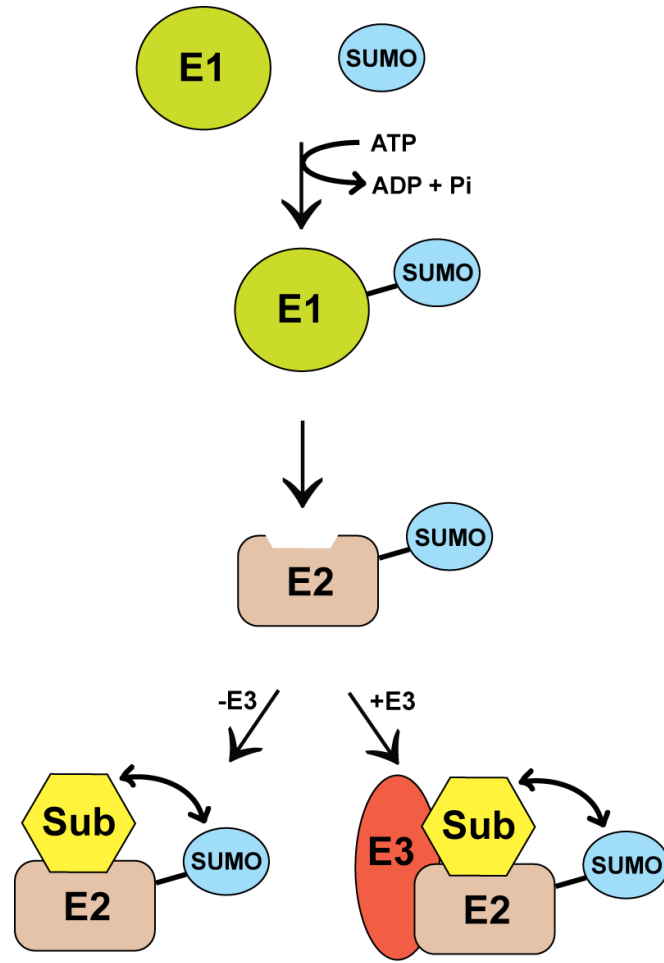
SUMO proteíny

- 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

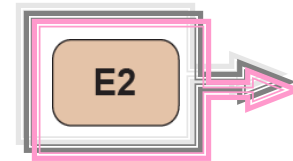
- **Sumoylácia** – kovalentné pripojenie SUMO proteínu k lyzínu cieľového proteínu
 - esenciálna vo väčšine eukaryotov
 - väčšinou vo forme monomérov a nie reťazcov
 - nevedie k proteozomálnej degradácii



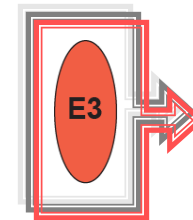
Sumoylácia



Aos1/Uba2 u kvasiniek
Sae1/Sae2 u ľudí

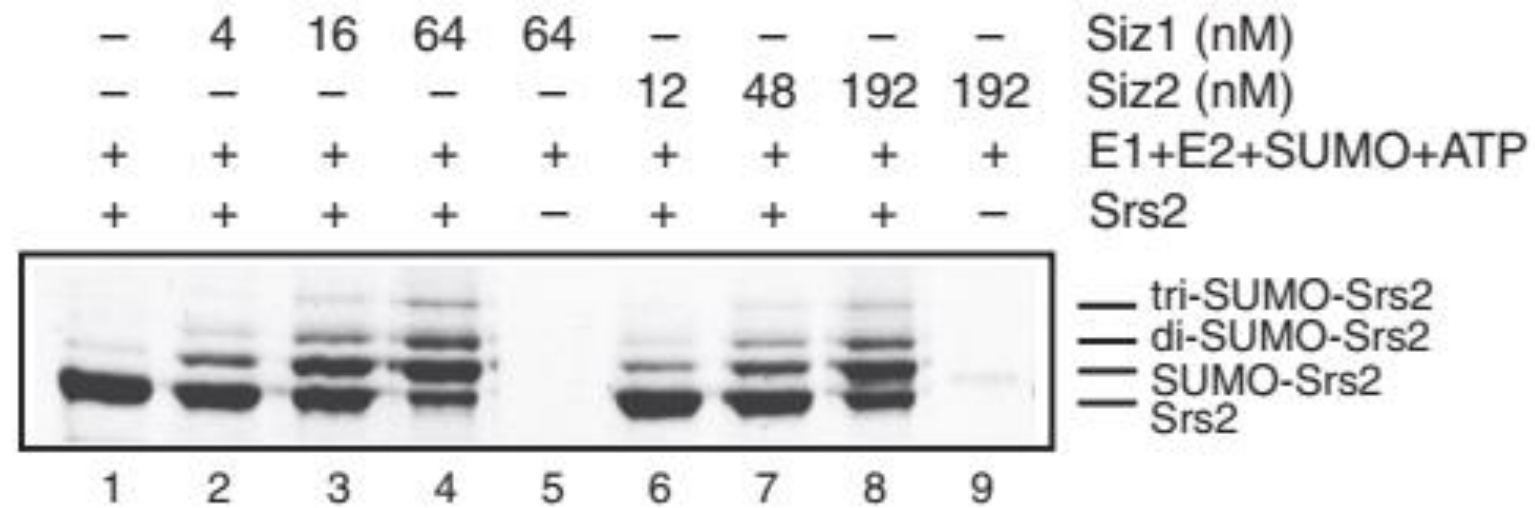


Ubc9



SIZ/PIAS rodina
RanBP2
Pc2
Mms21

Príklad analýzy sumoylácie in vitro



Published online 16 June 2012

Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 16 7831–7843
doi:10.1093/nar/gks484

Dual roles of the SUMO-interacting motif in the regulation of Srs2 sumoylation

Peter Kolesar^{1,2}, Prabha Sarangi^{3,4}, Veronika Altmannova^{1,2,5}, Xiaolan Zhao³ and Lumir Krejci^{1,2,5,*}

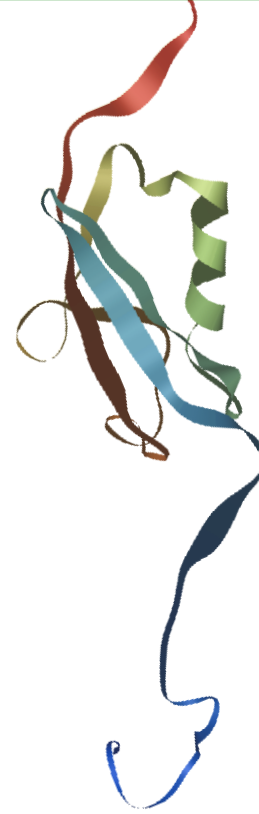
Sumoylácia

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

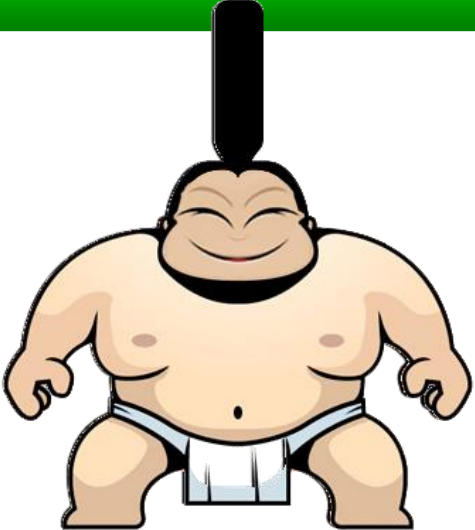


- Dopad sumoylácie: SUMO stimuluje interakcie s proteínmi obsahujúcimi SUMO-interakčný motív (SIM) – 3-4 hydrofóbné a.k. + príľahlé **negatívne nabité zvyšky** (napr. **IVIIEDD**)

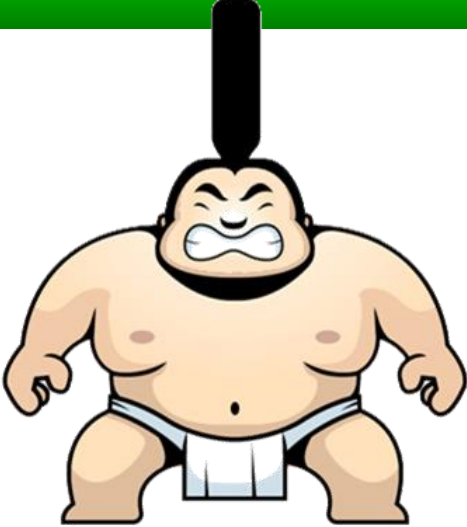
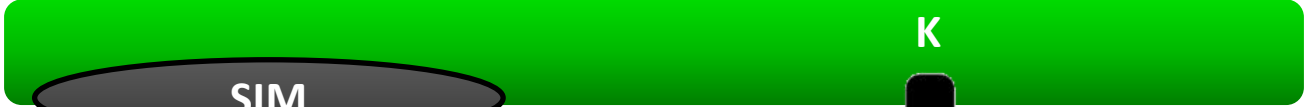
K

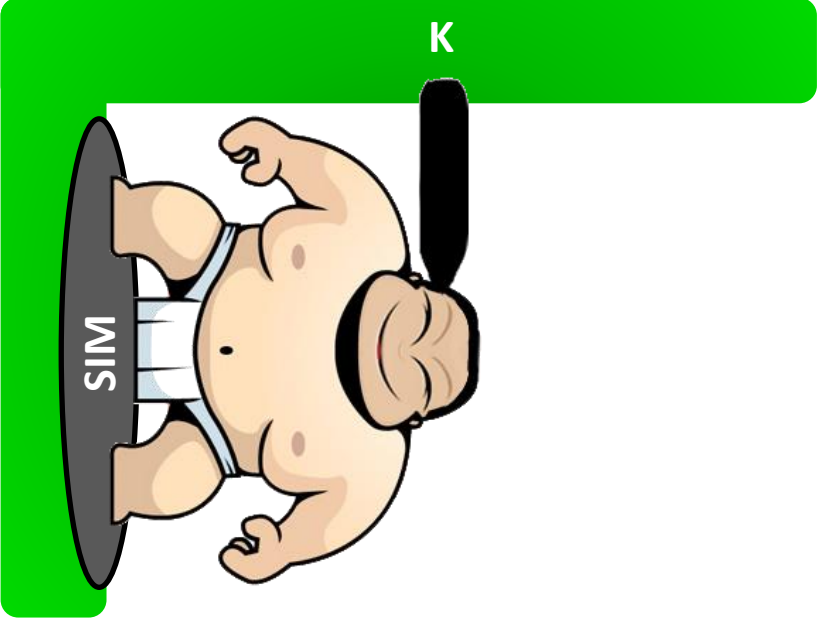


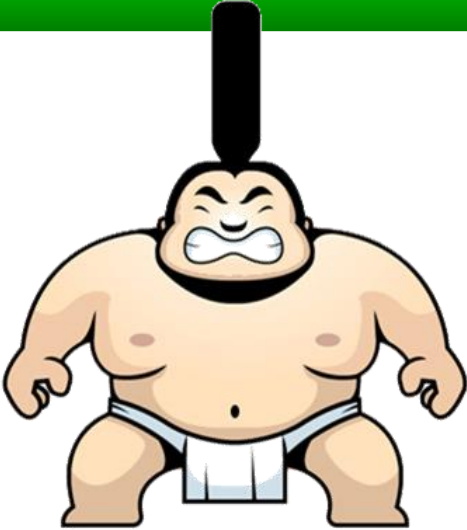
K

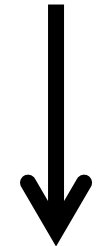
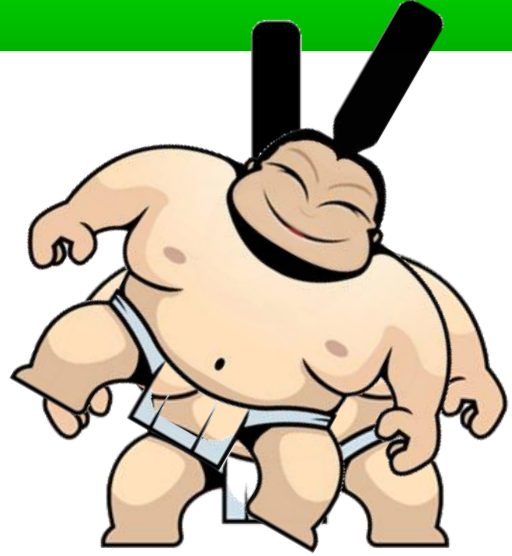


SIM







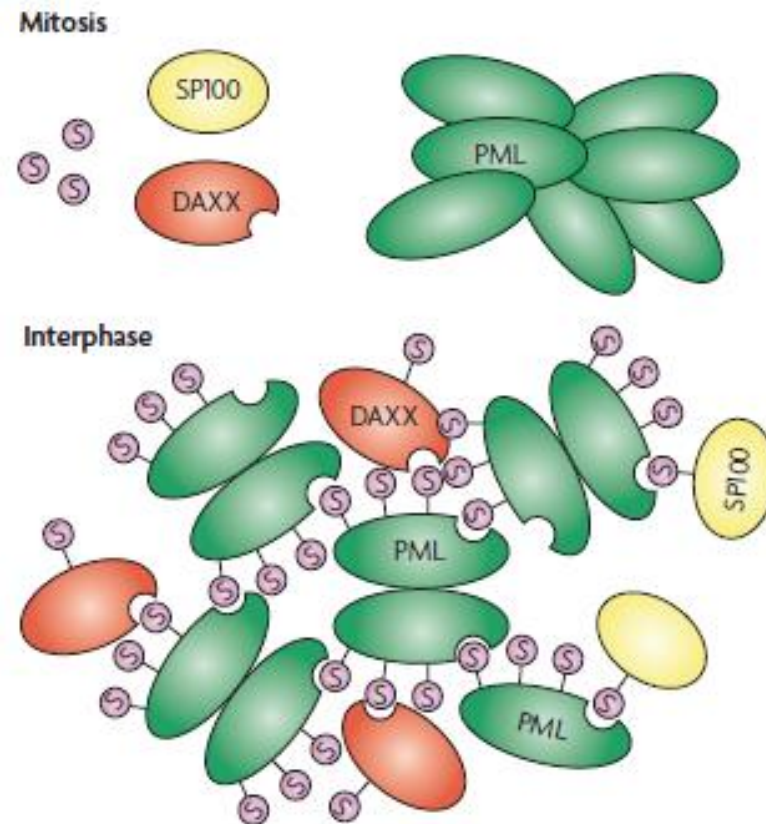


špecifickost' indukovanost'



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

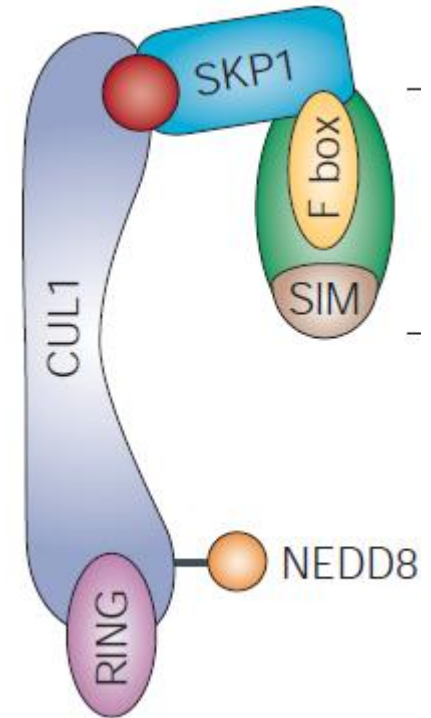
Protein	Function	Role of SUMOylation	Role of ubiquitination	Common lysine? ^a
IKB α	Signal transduction/ Inhibition of NFKB	Stabilizes IKB α by competition with ubiquitin	Promotes proteasome-mediated degradation	yes
NEMO	Signal transduction/ IKK regulation	Promotes nuclear localization	Required for IKK activation	
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	

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

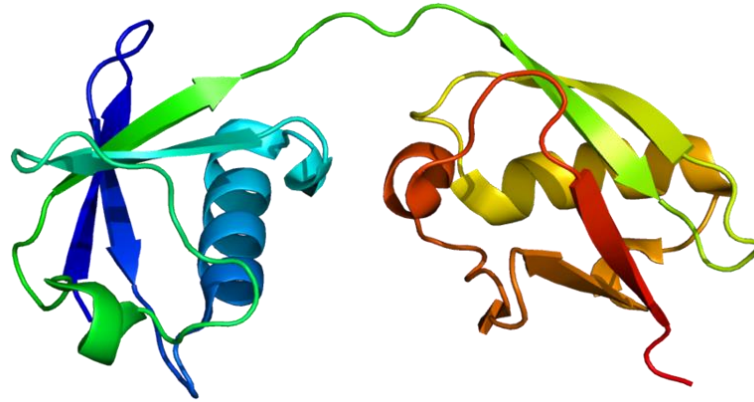
Iné ubikvitóny

NEDD8

- NEDD8 – 9 kDa, 60% sekvenčná identita s ubikvitínom
- Neddylačný cyklus: - štípenie neaktívneho prekursoru
 - 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



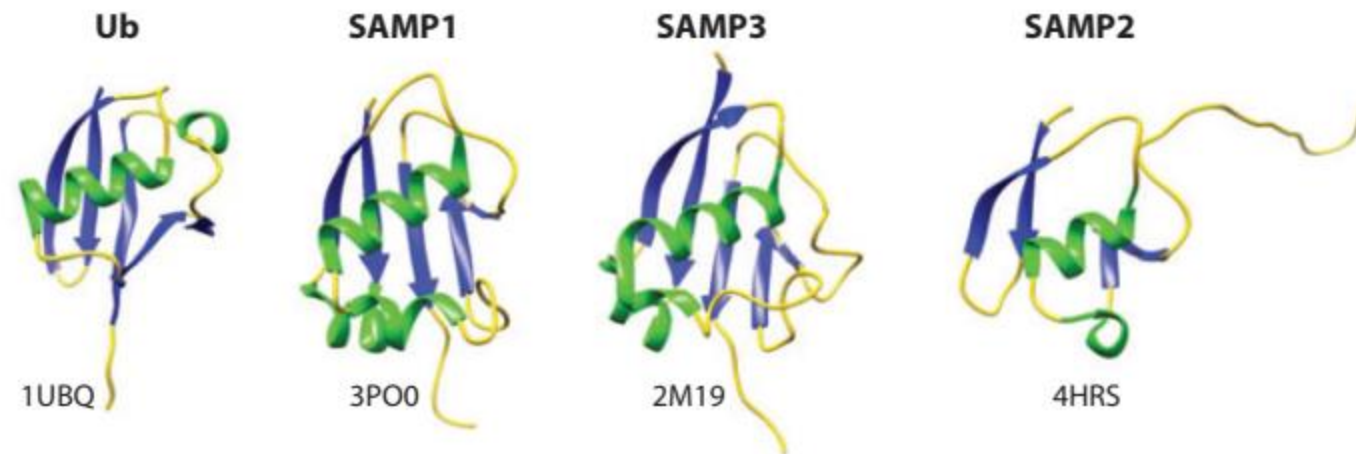
ISG15



- 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

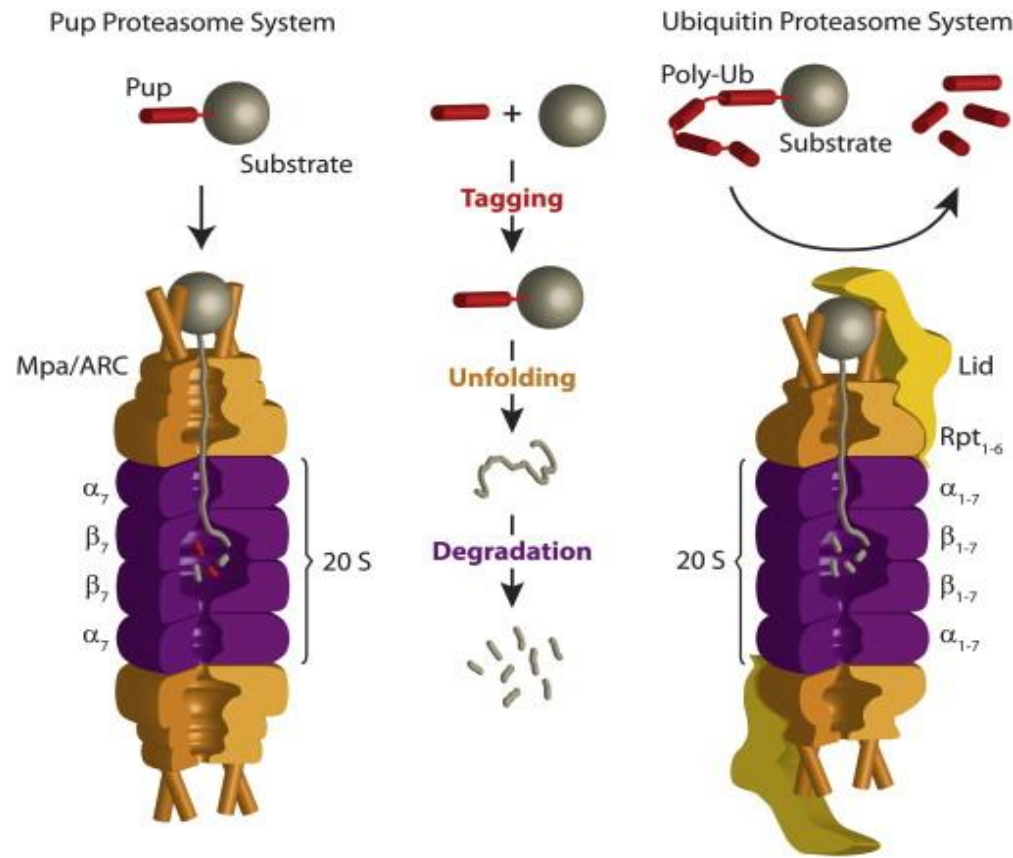
- **SAMPs** (small archaeal modifier proteins) u archaea / **TtuB** u rodu *Thermus*
 - odlišná sekvencia od ubikvitínu, ale spoločný β -grasp fold



- **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 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

