

Chemische Biologie

Die Länge spezifischer Ubiquitin-ketten beeinflusst ihre Erkennung

JOACHIM LUTZ¹, EVA HÖLLMÜLLER^{1,2}, MARTIN SCHEFFNER², ANDREAS MARX¹, FLORIAN STENGEL²¹ FACHBEREICH CHEMIE, KONSTANZ RESEARCH SCHOOL CHEMICAL BIOLOGY, UNIVERSITÄT KONSTANZ² FACHBEREICH BIOLOGIE, KONSTANZ RESEARCH SCHOOL CHEMICAL BIOLOGY, UNIVERSITÄT KONSTANZ

The attachment of differently linked ubiquitin (Ub) chains of varying length to proteins is a prevalent posttranslational modification in eukaryotic cells. We established an affinity enrichment approach for the identification of linkage- and length-selective ubiquitin binding proteins and could show that in addition to the linkage, the length of a Ub chain is an important determinant for Ub chain recognition.

DOI: 10.1007/s12268-020-1421-3
© Die Autoren 2020

Die kovalente Anheftung von Ubiquitin (Ub) an Substratproteine (Ubiquitylierung) ist eine der komplexesten und vielfältigsten posttranslationalen Modifikationen in Eukaryoten [1]. Viele zelluläre Prozesse wie Proteinabbau, Zellteilung und Signaltransduktion werden durch Ubiquitylierung reguliert. Dementsprechend sind viele verschiedene Krankheiten wie Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen eng mit Störungen beim Prozess der Ubiquitylierung verbunden [2].

Die Ubiquitylierung wird durch drei Klassen von Enzymen katalysiert [1]:

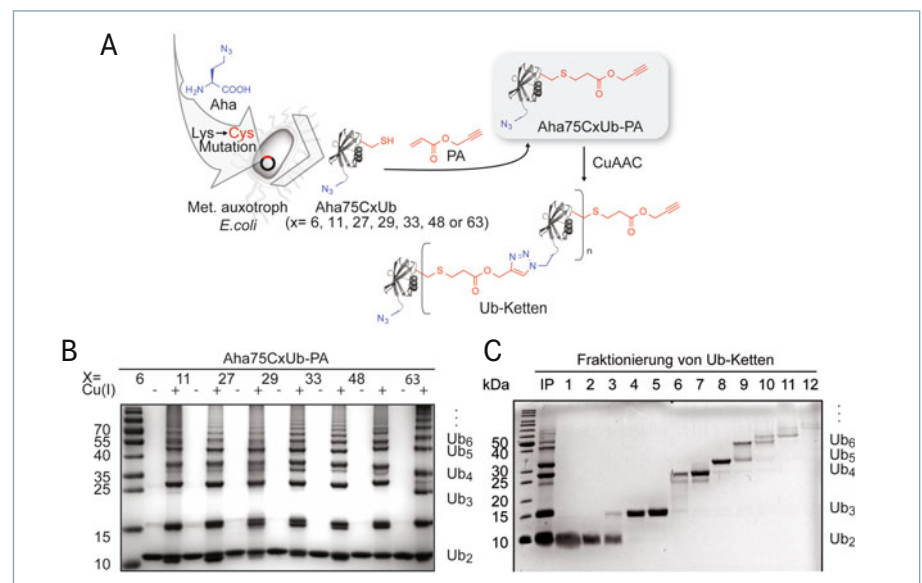
- E1: Ub-aktivierende Enzyme,
- E2: Ub-konjugierende Enzyme und
- E3: Ub-Ligasen.

Letztere sind maßgeblich an der Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe von Ubiquitin und der ε-Amino-Gruppe eines Lysinrests des Substratproteins beteiligt [3]. Über die Anheftung einzelner Ub-Moleküle (Mono-Ubiquitylierung) hinaus kann Ub selbst ebenfalls als Substrat dienen, was zur Bildung von Ub-Ketten (Polyubiquitylierung) führt. Je nachdem welcher der sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) – bzw. der N-terminalen Methioninreste – für die Verknüpfung benutzt wird, werden unterschiedliche Kettentypen gebildet. Somit können Proteine theoretisch mit einer beinahe unendlichen Vielzahl

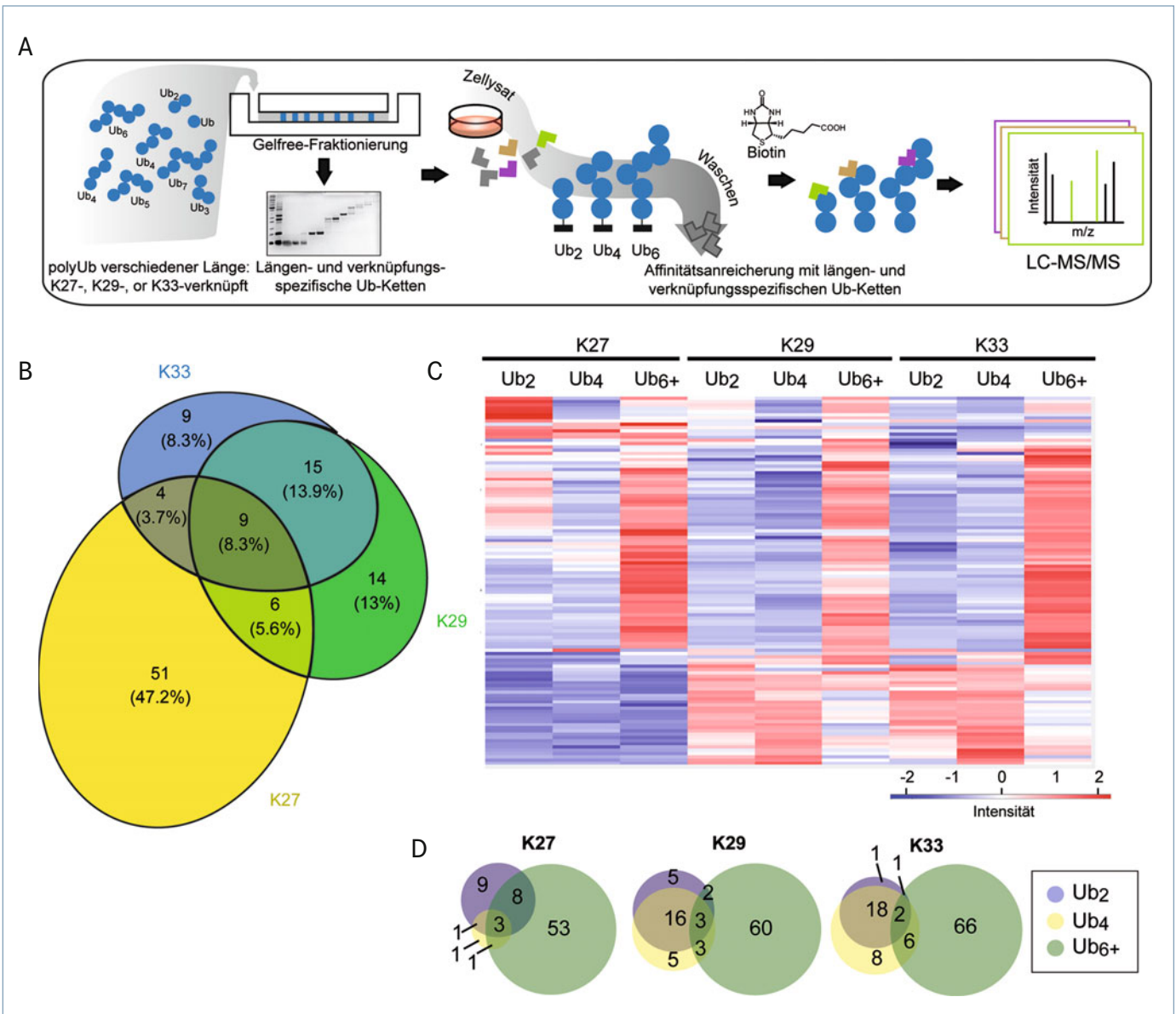
unterschiedlicher Ub-Ketten modifiziert werden. Des Weiteren wird zwischen homogenen und heterogenen Ketten unterschieden. Homogene Ub-Ketten bestehen aus Ub-Mole-

külen, die immer durch den gleichen Lysinrest verknüpft sind, während heterogene Ketten über verschiedene Lysinreste verknüpft sind. Unterschiedliche Ketten üben verschiedene Funktionen in der Zelle aus. K48-verknüpfte Ketten sind z. B. das vorwiegende Signal für den proteasomalen Abbau, während K63-verknüpfte Ketten in nicht-proteolytische Funktionen wie DNA-Reparatur und dem NF-κB-Signaltransduktionsweg involviert sind [3].

Für die restlichen fünf homogen verknüpften Ub-Ketten sind nur bedingt Informationen über die jeweilige Funktion verfügbar [4, 5]. K6-verknüpfte Ketten spielen eine wichtige Rolle für DNA-Reparatur sowie Parkin-gesteuerte Mitophagie. K11-verknüpfte Ketten dienen neben K48-verknüpften Ketten als ein wichtiges proteasomales Abbausignal, insbesondere bei der Regulation des Zellzyklus. K27-verknüpfte Ketten hingegen wurden Funktionen bei DNA-Repa-



▲ **Abb. 1:** Synthese homogener Ubiquitin(Ub)-Ketten. **A,** Schema zur Herstellung Triazol-verknüpfter Ub-Ketten, einschließlich des Einbaus von Azidohomoalanin (Aha) in Ub in *Escherichia coli*, bioorthogonaler Modifikation von Ub mittels Propargylacrylat (PA) und Protein-Polymerisierung über CuAAC (*copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*). **B,** Die resultierenden Ketten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Blue-Färbung gefärbt. **C,** SDS-PAGE-Analyse der Trennung der Ub-Polymere über GELFrEE-Fraktionierung (*gel eluted liquid fraction entrapment electrophoresis*): IP Input, 1-12 Elutionsfraktionen mit den jeweiligen Kettenlängen. Nach [11, 12], © John Wiley & Sons, Inc.



▲ Abb. 2: Überblick über den Arbeitsablauf für die AP-MS (*affinity purification-mass spectrometry*)-basierte Identifizierung von Interaktionspartnern von längen- und verknüpfungsspezifischen Ubiquitin(Ub)-Ketten. **A**, Schema für die GELFrEE-Fraktionierung von verknüpfungsspezifischen Ub-Ketten verschiedener Polymerisierungsgrade. Ub₂, Ub₄, Ub₆₊ verknüpft über K27, K29 oder K33 wurden als Affinitätsmatrix für eine Affinitätsanreicherung von UBPs in HEK293T-Zellysate verwendet. Angereicherte Proteine wurden mittels MS-basierter Proteomik identifiziert. **B**, Überblick über die gemeinsamen und selektiven Interaktionspartner, die anhand der drei Kettentypen (K27, K29, K33) identifiziert wurden. **C**, Hierarchische Gruppierung von statistisch signifikanten Interaktionen mit längen- und verknüpfungsspezifischen Ub-Ketten. Die interagierenden Proteine sind in den Reihen gezeigt; Spalten zeigen die Ub-Variante die als Affinitätsmatrix benutzt wurde. **D**, Überblick über längenspezifische Interaktionen. Die Zahlen geben die Anzahl an identifizierten Proteinen an. Nach [11, 12], © John Wiley & Sons, Inc.

ratur, Proteinsekretion und Autophagie zugeordnet. K33-Ketten wurden mit verschiedenen Prozessen wie TCR-Signaltransduktion und post-Golgi-Membrantransport in Verbindung gebracht. Zusammen mit K29-verknüpften Ketten sind K33-verknüpfte Ketten an der Regulation von AMPK (AMP-aktivierter Proteinkinase)-ähnlichen Proteinkinasen beteiligt. Weiterhin dienen K29-verknüpfte Ketten wahrscheinlich als Signal für den Abbau durch das Proteasom.

Signaltransduktion durch Ubiquitin

Die Vielfalt der möglichen Ubiquitinmodifikationen erlaubt es daher, für eine große Anzahl unterschiedlicher zellulärer Signale zu codieren (Ub-Code). Allgemein wird angenommen, dass die Topologie der jeweiligen Ubiquitinkette das Schicksal des modifizierten Substratproteins beeinflusst. Dabei spielt vor allem die Position der Verknüpfung innerhalb der Kette und die daraus resultierende räumliche Anordnung und

Konformation der Ub-Moleküle zueinander eine wichtige Rolle [6], da diese von spezifischen Ub-Bindeproteinen (UBP) erkannt wird. Ein generelles Modell, wie UBPs spezifische Charakteristika wie Topologie und Konformation von Ub-Ketten selektiv erkennen, besteht bisher jedoch nicht. Strukturelle Studien mit Komplexen von UBPs und Ub-Ketten deuten jedoch darauf hin, dass die charakteristische Anordnung von Ub-bindenden Domänen (UBD) in den UBPs

zur spezifischen Erkennung von Ub-Ketten maßgeblich beitragen.

Neben der Art der Verknüpfung könnte auch die Kettenlänge ein weiteres, noch weniger verstandenes Charakteristikum für die Erkennung von Ub-Ketten darstellen. Einzelne Beispiele für die potenzielle Bedeutung der Ub-Kettenlänge sind bereits bekannt. So wurde z. B. gezeigt, dass das deubiquitylierende Enzym (DUB) USP5 Ub-Tetramere mit deutlich höherer Affinität bindet als Dimere und dass das DUB UCH-L3 bevorzugt kurze Polymere schneidet [7]. Als weiteres Beispiel dient das proteasomale Transportprotein hRad23A, das präferiert lange K48-verknüpfte Ub-Ketten bindet [8]. Diese Beispiele geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Länge einer Ub-Kette neben dem Verknüpfungstyp ein weiteres wichtiges Element des Ub-Codes darstellt.

Allerdings gab es bis vor kurzem keine Studie, die den Einfluss der Kettenlänge auf die Erkennung von Ub-Ketten generell zum Forschungsgegenstand hatte.

Herstellung definierter Ubiquitinketten

Für Studien von spezifisch verknüpften Ub-Ketten ist vor allem die Herstellung letzterer in ausreichender Menge und Reinheit essenziell. Enzymatische und synthetische Methoden, die Festphasensynthese sowie chemische Prozessierung von Ub-Molekülen beinhalten, wurden entwickelt, um diese Hürden zu überwinden [9]. Beide Ansätze weisen jedoch auch Nachteile auf, wie hoher Arbeitsaufwand, geringe Kettenlänge und Unspezifität der verwendeten Enzyme. Ein weiterer, wesentlicher Nachteil der so generierten „nativen“ Ub-Ketten ist ihre Anfälligkeit für hydrolytische Spaltung durch DUB. Dies führt zu einer deutlichen Beschränkung ihrer Anwendungsmöglichkeiten in Zellextrakten. Um dieser Einschränkung zu begegnen, haben wir einen Ansatz entwickelt, der den Einbau einer einzelnen unnatürlichen Aminosäure in Ub über die *selective pressure incorporation*-Methode (SPI) [10] mit Michael-Addition sowie mit der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC) kombiniert (**Abb. 1**, [11]).

Identifizierung von verknüpfungs- und längenspezifischen UBP

Die mithilfe unseres Ansatzes erzeugten DUB-resistenten Polymere haben wir in HEK293T-Zellysat eingesetzt, um dort mittels eines auf Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie basierenden Ansatzes ketten- und längenspezifische UBP zu identifizieren (**Abb. 2A**). Dazu wurden die jeweiligen Ub-Ketten mit einem Desthiobiotin-Affinitätstag versehen, wodurch sie auf Streptavidin-Agarose immobilisiert werden konnten. Entscheidend hierfür war, dass wir zusätzlich zur Darstellung von Ub-Ketten eines definierten Verknüpfungstyps ein Verfahren für die längenspezifische Trennung der durch CuAAC erzeugten verschiedenen Polymerisierungsgrade, entwickelt haben [12]. Durch gelbasierte Flüssigfraktion-Gelelektrophorese (GELFrEE-Fraktionierung) gelang eine Trennung der Ub-Polymere bis auf Tetramerebene. Längere Ketten wurden als Mischung erhalten (**Abb. 1C**). Durch die anschließende Verwendung der definierten Ub-Ketten als Affinitätsmatrix konnten wir

Hier steht eine Anzeige.



aus HEK293T-Zellysate zahlreiche Proteine anreichern und identifizieren, die spezifisch mit den wenig charakterisierten K27-, K29-, und/oder K33-verknüpften Ketten interagieren (**Abb. 2B**). Des Weiteren zeigen unsere Affinitätsstudien mit längendefinierten Ub-Ketten (Ub₂, Ub₄, Ub₆₊), dass neben dem Verknüpfungstyp auch die Kettenlänge ein wichtiges Element für die spezifische Erkennung von Ub-Ketten darstellt (**Abb. 2C, D**). Besonders auffallend ist, dass eine große Zahl von UBP präferiert mit längeren Ub-Ketten eines Verknüpfungstyps interagiert.

Bisherige Studien zeigen, dass Ub-Ketten eines bestimmten Verknüpfungstyps nicht nur eine einzige Konformation, sondern eher ein für diesen Verknüpfungstyp spezifisches Ensemble von Konformationen annehmen [13]. In diesem Zusammenhang erscheint es wahrscheinlich, dass lange Polymere eine größere Anzahl verschiedener Konformationen annehmen können als z. B. Dimere und dadurch mehr Möglichkeiten für spezifische Interaktionsstellen gegeben sind. Dies würde längeren Ketten erlauben, mehr Orientierungen von spezifischen Interaktionsstellen zur Verfügung zu stellen als kurze Ketten. Unsere Studie liefert somit klare Anhaltspunkte, dass die Kettenlänge einen wichtigen Einfluss auf die Erkennung verschiedener Ub-Ketten durch UBP hat und dadurch auch unmittelbar das Schicksal des entsprechend modifizierten Proteins beeinflusst.

Ausblick

Der hier vorgestellte Ansatz birgt großes Potenzial für die Untersuchung von bisher wenig verstandenen Ub-Modifizierungen. Dazu gehören z. B. heterogene Ub-Ketten, die verschiedene Verknüpfungspunkte aufweisen oder auch verzweigte Ketten. Weiterhin kann der Effekt von Modifizierungen von Ubiquitin selbst, durch z. B. Phosphorylierung, Acetylierung oder SUMOylierung, auf die Erkennung durch UBP untersucht werden. Ebenfalls von großem Interesse ist es, über strukturelle Studien die genauen molekularen Mechanismen aufzuklären, über die die Kettenlänge von spezifischen UBP erkannt wird. Der hier vorgestellte Ansatz stellt somit ein überaus vielfältiges Werkzeug dar, um die biochemischen und zellulären Funktionen der großen Anzahl verschiedenartiger Ubiquitinmodifikationen untersuchen und besser verstehen zu können. ■

Literatur

- [1] Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81:203–229
- [2] Popovic D, Vucic D, Dikic I (2014) Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* 20:1242
- [3] Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin/thioester cascade. *Nature* 373:81–83
- [4] Kulathu Y, Komander D (2012) Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:508–523
- [5] Swatek KN, Komander D (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26:399–422
- [6] Alfano C, Faggiano S, Pastore A (2016) The ball and chain of polyubiquitin structures. *Trends Biochem Sci* 41:371–385
- [7] Fushman D, Wilkinson KD (2011) Structure and recognition of polyubiquitin chains of different lengths and linkage. *F1000 Biol Rep* 3:1–10
- [8] Raasi S, Orlov I, Fleming KG, Pickart CM (2004) Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol* 341:1367–1379
- [9] Spasser L, Brik A (2012) Chemistry and biology of the ubiquitin signal. *Angew Chem Int Ed* 51:6840–6862
- [10] Rosner D, Schneider T, Schneider D et al. (2015) Click chemistry for targeted protein ubiquitylation and ubiquitin chain formation. *Nat Protocols* 10:1594–1611
- [11] Zhao X, Lutz J, Höllmüller E et al. (2017) Identification of proteins interacting with ubiquitin chains. *Angew Chem Int Ed* 56:15764–15768
- [12] Lutz J, Höllmüller E, Scheffner M et al. (2020) The length of a ubiquitin chain is a general determinant for selective recognition by ubiquitin-binding proteins. *Angew Chem Int Ed* 59: 12371–12375
- [13] Castañeda CA, Chaturvedi A, Camara CM et al. (2016) Linkage-specific conformational ensembles of non-canonical polyubiquitin chains. *Phys Chem Chem Phys* 18:5771–5788

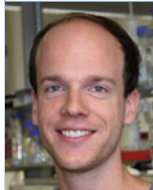
Funding Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Florian Stengel
 Fachbereich Biologie
 Konstanz Research School Chemical Biology
 Universität Konstanz
 Universitätsstraße 10
 D-78457 Konstanz
 florian.stengel@uni-konstanz.de

AUTOREN



Joachim Lutz

2009–2015 Studium der Life Science an der Universität Konstanz; dort bis 2020 Promotion im Bereich Zelluläre Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. A. Marx. Schwerpunkt der Arbeit waren Interaktionsstudien von definierten Ubiquitinketten.



Eva Höllmüller

2010–2015 Studium der Life Science an der Universität Konstanz. Seit 2015 Promotion in den Laboren von Prof. Dr. A. Marx und Prof. Dr. F. Stengel, Universität Konstanz. Schwerpunkt der Arbeit liegt in der chemischen Proteomik mittels Massenspektrometrie.



Martin Scheffner

1982–1989 Studium der Biologie und Promotion an der Universität Konstanz bei Prof. Dr. R. Knippers. 1990–1993 Postdoc am National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA, bei Dr. P. M. Howley. 1993–1999 Gruppenleiter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. 1999–2003 Professor für Biochemie am Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln. Seit 2004 Professor für Biochemie an der Universität Konstanz.



Andreas Marx

1988–1994 Studium der Chemie an den Universitäten Freiburg, Bochum und Sussex, UK. 1994–1997 Promotion an der Universität Basel, Schweiz, bei Prof. Dr. B. Giese. 1998–1999 Postdoc an der Universität Nagoya, Japan, bei Prof. Dr. H. Yamamoto. 1999–2000 Gruppenleiter und Habilitation in Organischer Chemie und Biochemie an der Universität Bonn. Seit 2004 Professor für Organische Chemie/Zelluläre Chemie an der Universität Konstanz.



Florian Stengel

2001–2006 Studium der Biochemie an der FU Berlin mit anschließender Promotion am Institut für Chemie der Universität Cambridge, UK, bei Prof. Dr. C. Robinson. 2011–2015 Postdoktorand an der ETH Zürich, Schweiz, im Labor von Prof. Dr. R. Aebersold. Seit 2015 Emmy-Noether-Gruppenleiter und Assistenzprofessor an der Universität Konstanz.