

SISTEMA UBIQUITINITZACIÓ

Cristina Romera

Marta Sallés

Marina Selga

Sergio Trillo

SISTEMA UBIQUITINITZACIÓ

- Paper important en la **degradació de proteïnes** de vida curta:
 - Regulació cicle cel·lular
 - Modulació rc. superfície i canals iònics
 - Processament i presentació d'antigens
 - Activació factors de transcripció
 - Reparació DNA
 - Mort cel·lular programada

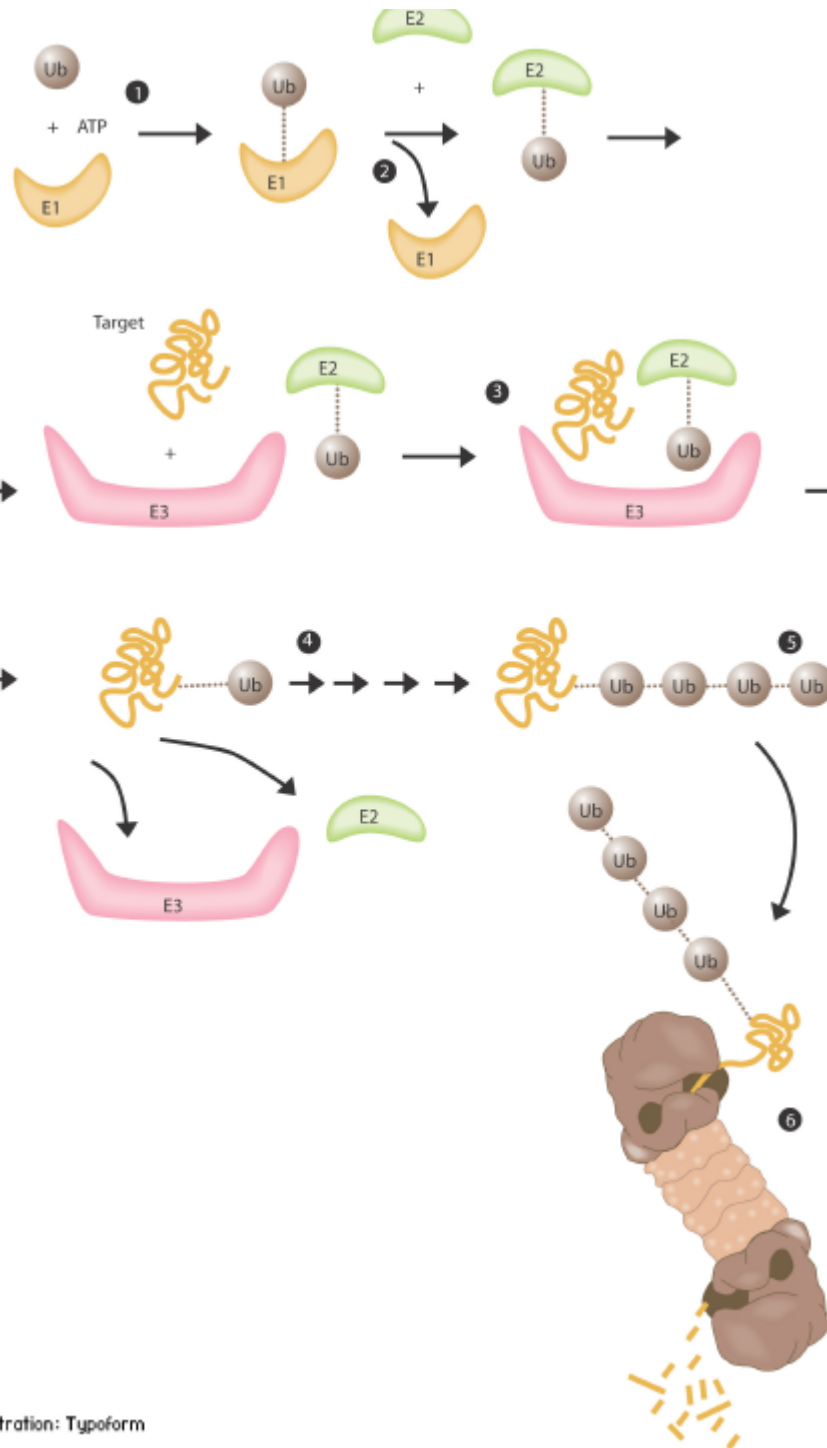
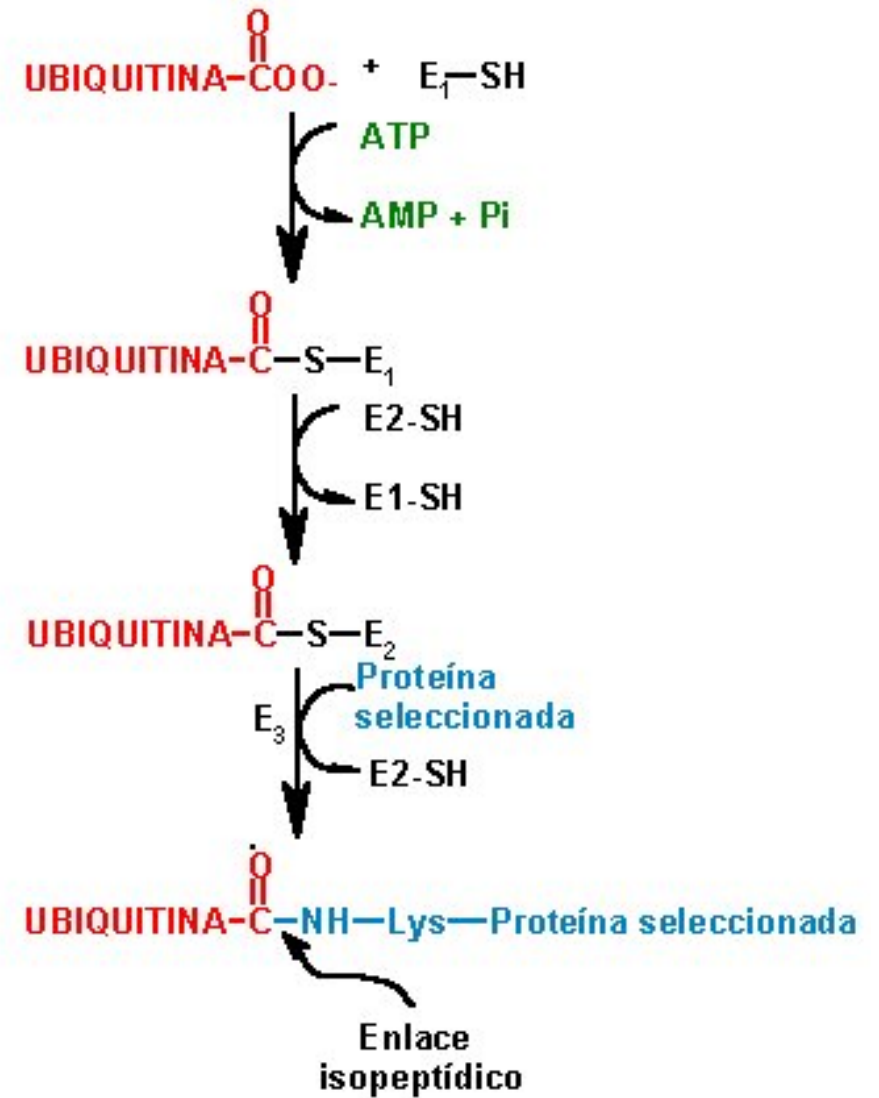


Illustration: Typeform



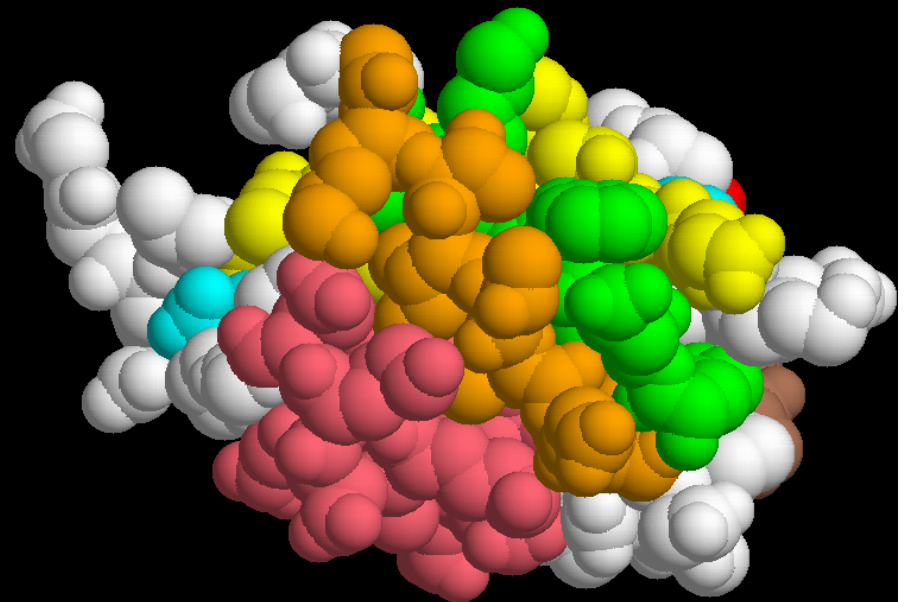
RECONeixEMENT DE SUBSTRATS

Mecanismes:

- **Regla N-terminal:** Vida mitja proteïnes en funció del residu a.a en posició N-terminal.
- **Seqüències PEST:** seqüències curtes d'uns 8 aa que escurcen vida mitja de les proteïnes.
- **Senyals emmascarades:** millor control. Ex: fosforilació
- **Destruction box:** 9 aa RAALGNISN

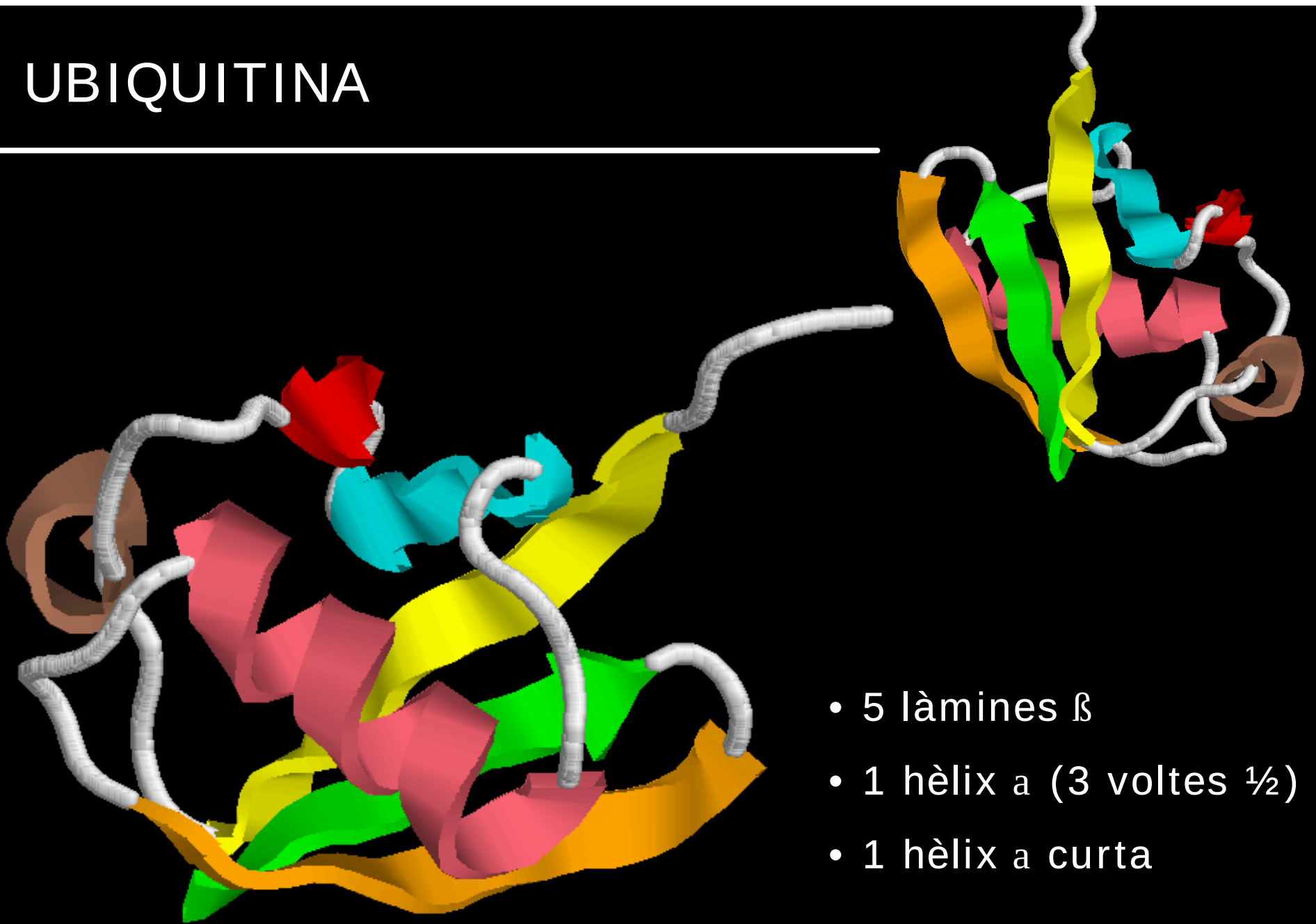
UBIQUITINA *

- Proteïna de 76 aa i 8.6 kDa
- Classe: $\alpha + \beta$
- Plegament: β Grasp (ubiquitin-like)
- Superfamília: ubiquitin-like
- Família: ubiquitin-related



* del llatí *ubique*: a tot arreu

UBIQUITINA



- 5 làmines β
- 1 hèlix α (3 voltes $\frac{1}{2}$)
- 1 hèlix α curta

ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIA

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```
1ubi(H.sapiens)    MQIFVKLTGTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
1otr(S.cerevisiae)MQIFVKLTGTITLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
                  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
```

```
1ubi              IQKESTLHLVLRRLGG
1otr              IQKESTLHLVLRRLGG
                  *****
```

ALINEAMENT ESTRUCTURAL

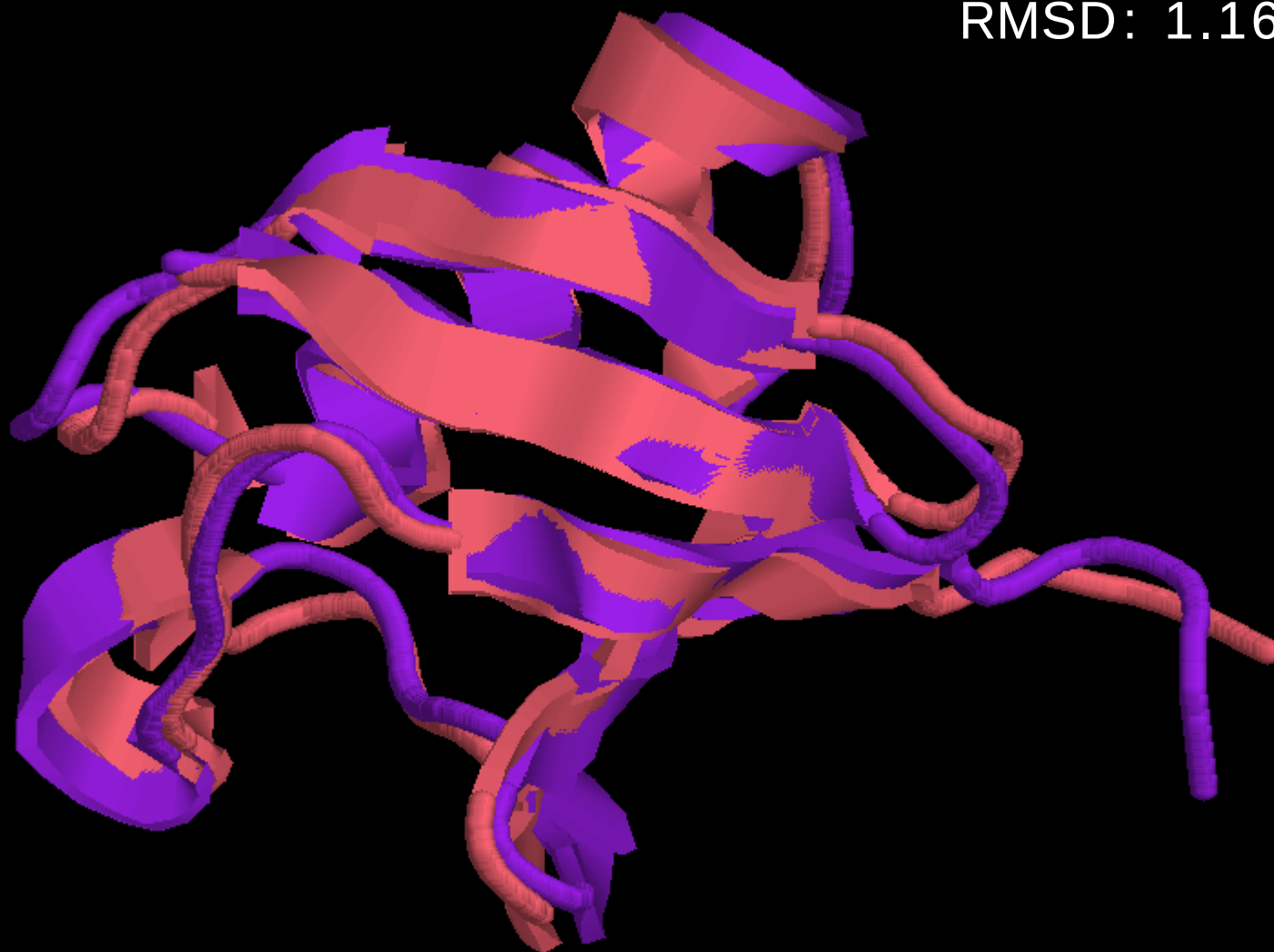
CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```
1ubi              MQIFVKLTGTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
1otr              MQIFVKLTGTITLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
```

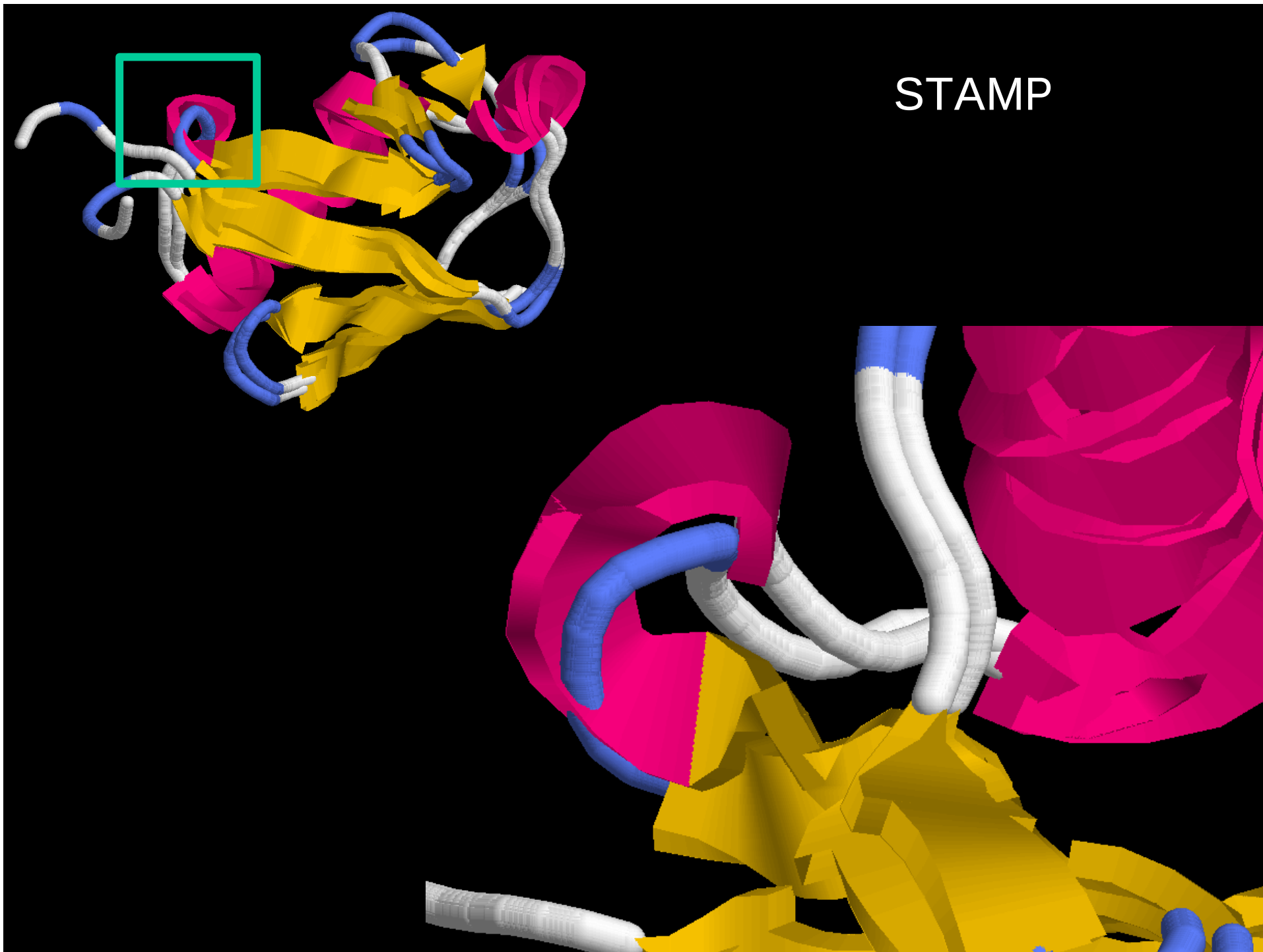
```
1ubi              IQKESTLHLVLRRLGG--
1otr              IQKESTLHLVLR--LRGG
```

STAMP

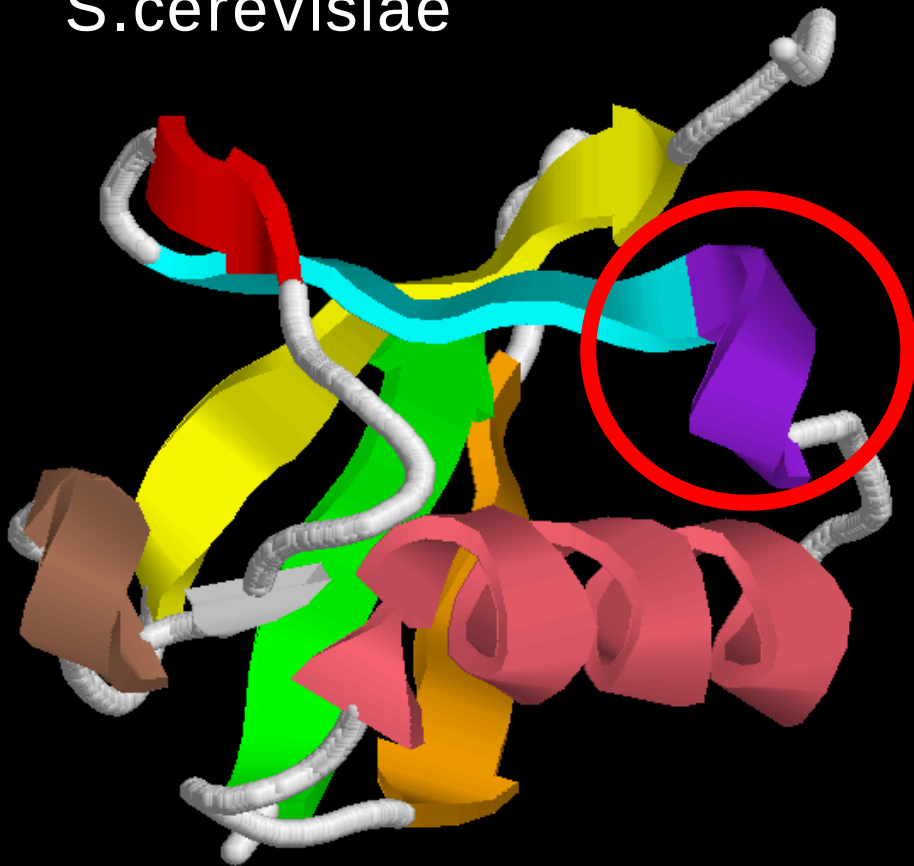
RMSD: 1.16



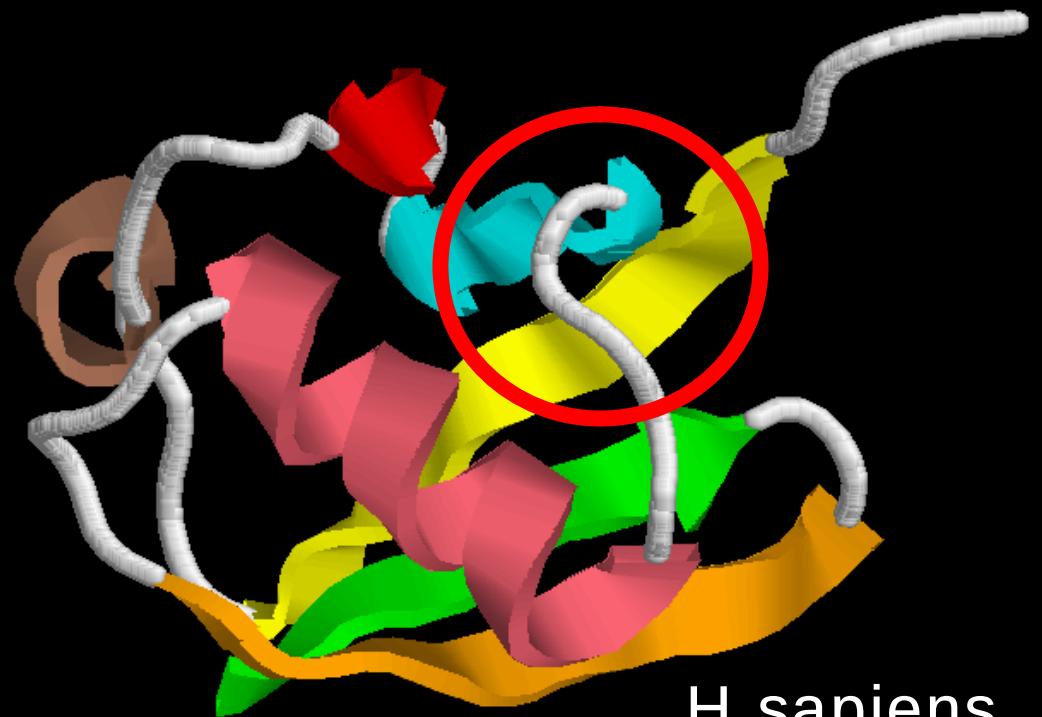
STAMP

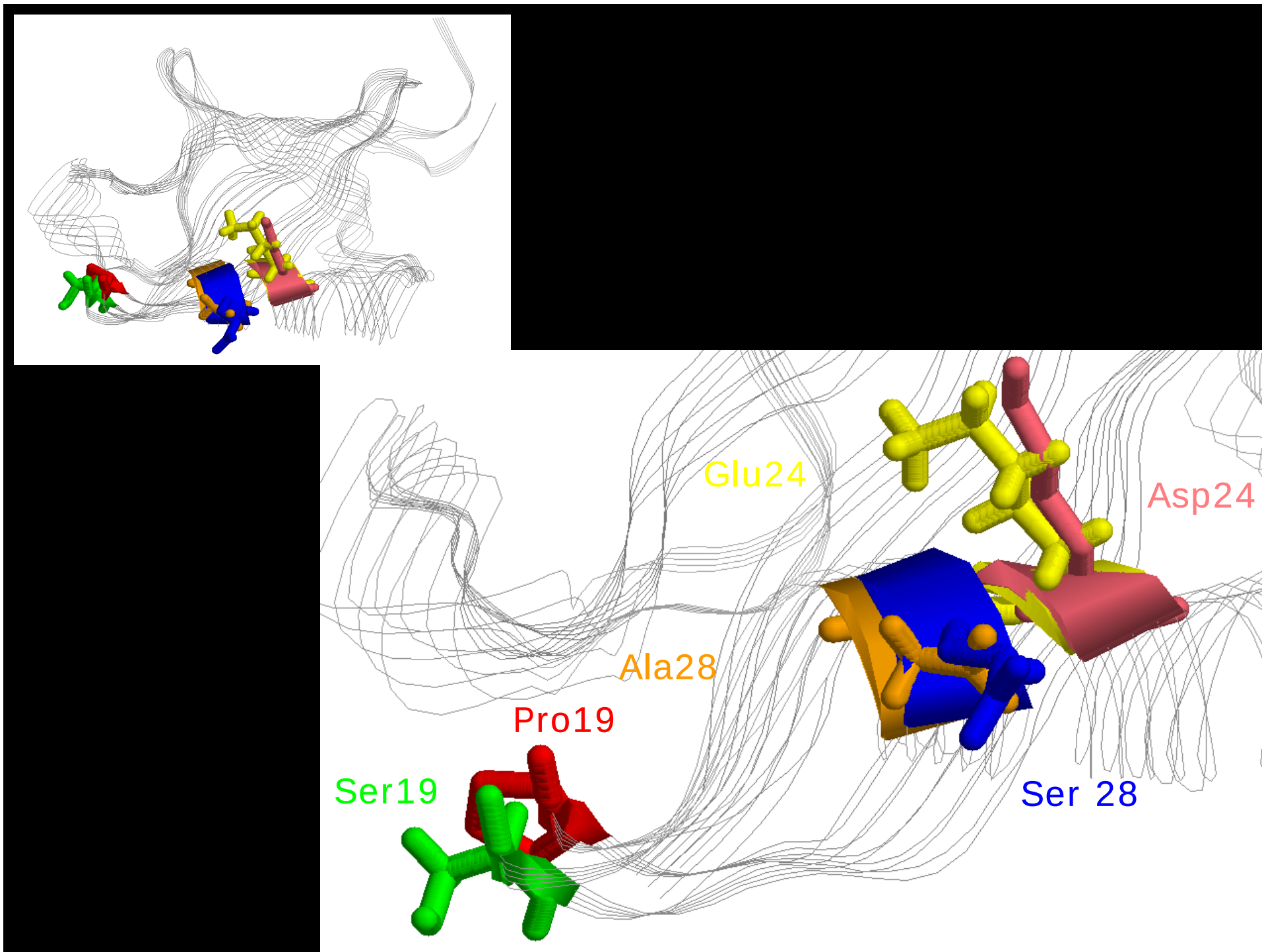


S.cerevisiae

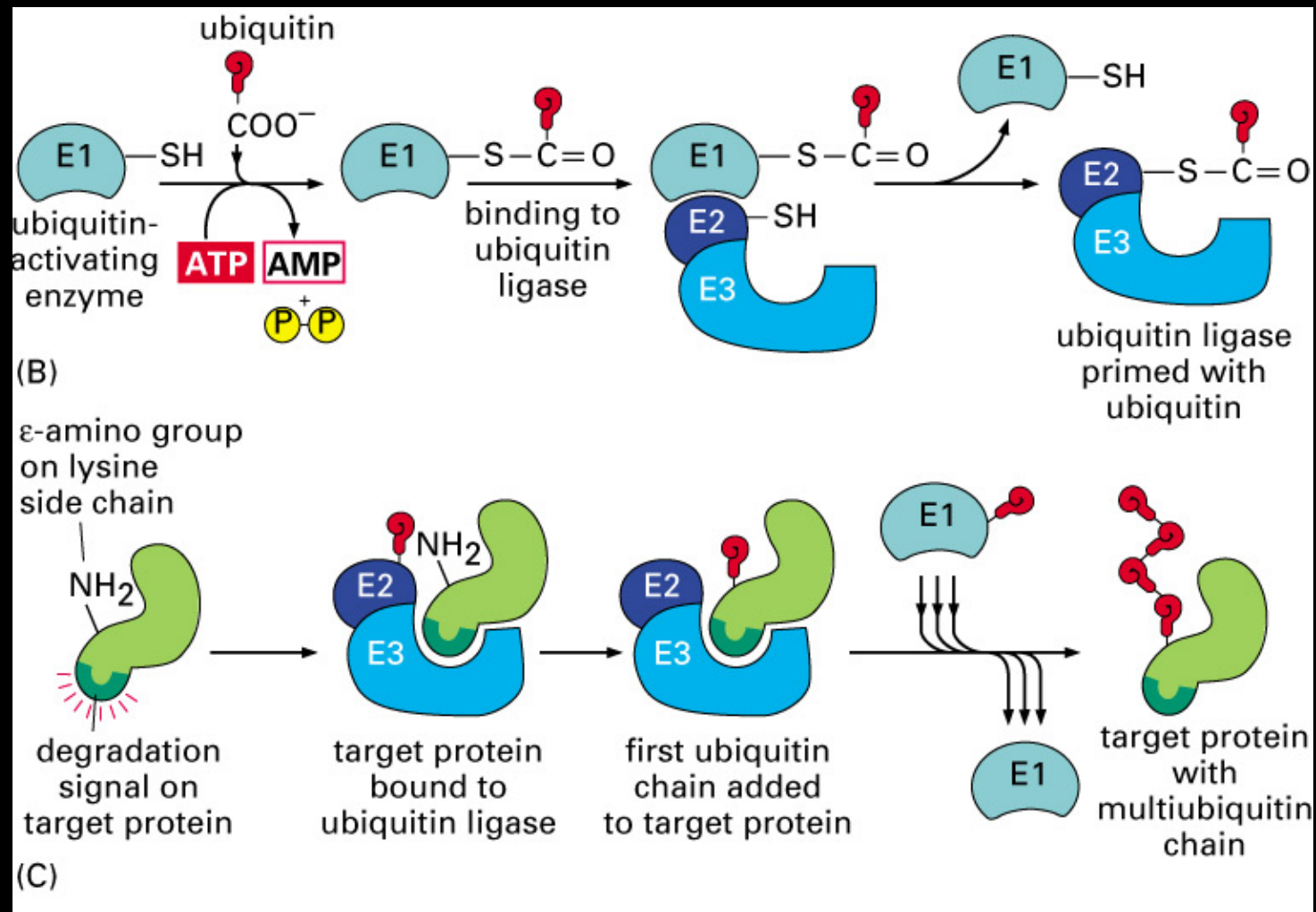


H.sapiens

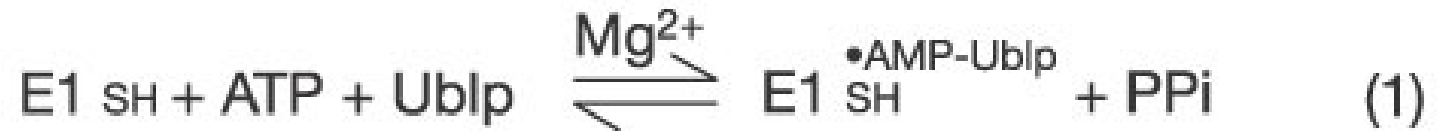




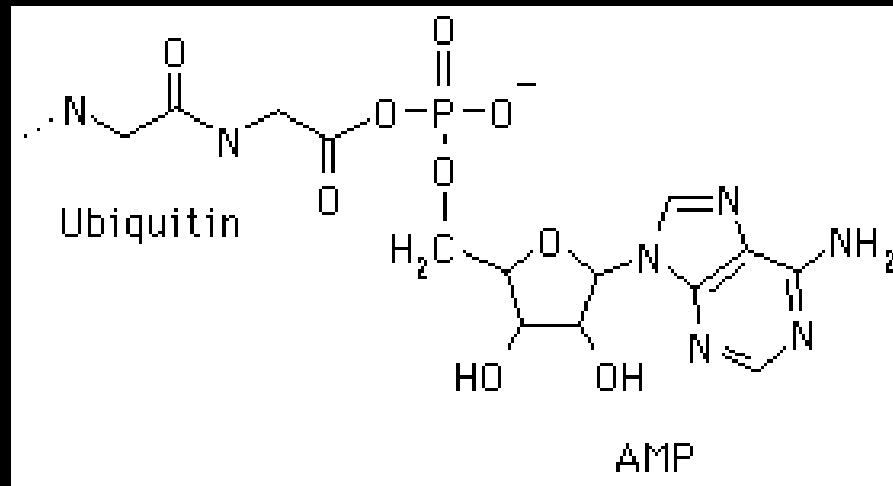
Enzim Activador d'ubiquitina E1



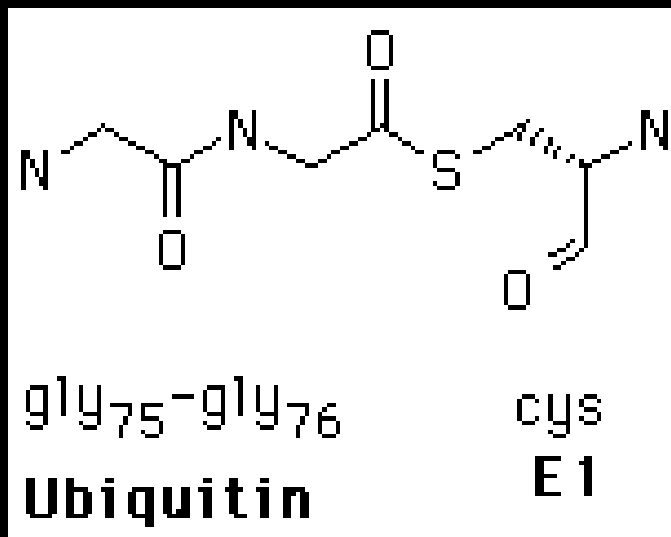
Enzim Activador d'ubiquitina E1



- complexes no covalents
- complexes covalents



Adenilat
d'ubiquitina



Enllaç tioèster

Family: Ubiquitin activating enzymes (UBA)

Llinatge:

Classe: α / β

Plegament: enzims activadors de proteïnes ubiquitin.like

Supefamília: enzims activadors de proteïnes ubiquitin.like

Família:; Enzims activadors d'ubiquitina (UBA)

Dominis Proteics:

1. UBA3 [89764]
a subunit of the heterodimeric E1 enzyme for NEDD8; contains an all-alpha insert subdomain of the FF-like fold (residues 210-288) and an extra C-terminal alpha+beta subdomain (partly disordered)
 1. [Human \(*Homo sapiens*\)](#) [89765] (3)
2. Amyloid beta precursor protein-binding protein 1, APPBP1 [89766]
a subunit of the heterodimeric E1 enzyme for NEDD8; contains a large insertion (residues 170-487) that can be divided into 3 units similar to the UBA3 insertion
 1. [Human \(*Homo sapiens*\)](#) [89767] (3)

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

361

UBA1_HUMAN	KISFKSLVASLAEPDFVVTDFAKFSRPAQLHIGFQALHQFCAQHGRPPRPRNEEDAAEL
UBA1_MOUSE	KISFKSLPASLVEPDFVMTDFAKYSRPAQLHIGFQALHQFCALHNQPPRPRNEEDATEL
UBA1_RABIT	KISFKSLASLAEPDFVMTDFAKFSRPAQLHIGFQALHKFCAQHSRPPRPRNEEDAAEL
UBA1_YEAST	KISFKSLKQQLSNPEFVFSDFAKFDRAAQLHLGFQALHQFAVRHNGELPRTMNDEDANEL ***** * *.** .****. * ****.*****.*. * ** *.*** *
UBA1_HUMAN	VALAQAVNARALPAVQQ-NMLDEDLIRKLAYVAAGDLAPINAFIGGLAAQEVMMKACSGKF
UBA1_MOUSE	VGLAQAVNARSPPSVKQ-NSLDEDLIRKLAYVAAGDLAPINAFIGGLAAQEVMMKACSGKF
UBA1_RABIT	VTLARAVNSKASSAVQQ-DSLDEDLIRNLAFVAAGDLAPINAFIGGLAAQEVMMKACSGKF
UBA1_YEAST	IKLVTDLSPVQQPEVLGEGVDVNEDLIKELSYQARGDIPGVVAFFGGGLVAQEVLMKACSGKF . * ****. *.. * **, . ** *** ****.*****
UBA1_HUMAN	MPIMQWLYFDALECLPQDKEV-LTEDKCLQRQRYDGQVAVFGSDLQEKLGKQKYFLVGA
UBA1_MOUSE	MPIMQWLYFDALECLPEDKEA-LTEEKCLPRQRYDGQVAVFGSDFQEKLSKQKYFLVGA
UBA1_RABIT	MPIMQWLYFDALECLPEDKES-LTEDKCLPRQRYDGQVAVFGSDLQEKLGKQKYFLVGA
UBA1_YEAST	TPLKQFMYPDSLESPLDPKNFPRNEKTTQPVNSRYDNQIAVFGLDFQKKIANSKVFLVGS *. * .***.***. * . * . . ****.*.***** * * *. * ****.
UBA1_HUMAN	GAIGCELLKNFAMIGLGCGEIIVTDMDTIEKSNLNRQFLFRPWDVTKLKSDTAAAAAV
UBA1_MOUSE	GAIGCELLKNFAMIGLGCGEIIVTDMDTIEKSNLNRQFLFRPWDVTKLKSDTAAAAAV
UBA1_RABIT	GAIGCELLKNFAMIGLGCGEIIVTDMDTIEKSNLNRQFLFRPWDVTKLKSDTAAAAAV
UBA1_YEAST	GAIGCEMLKNWALLGLGSGSDGYIVVTDNDSIEKSNLNRQFLFRPKDVGNKSEVAAEAV *****.*** *.**.*. * * ..*** *.***** ***** ** * **, ** **
UBA1_HUMAN	LLESGLTGKGNVQVIVPFLTESYSSSQDPPEKSIPICTLKNFPNAIHTLQWARDEFEG
UBA1_MOUSE	LLESGLTGKGNVQVIVPFLTESYSSSQDPPEKSIPICTLKNFPNAIHTLQWARDEFEG
UBA1_RABIT	LLESGLTGKGNVQVIVPFLTESYSSSQDPPEKSIPICTLKNFPNAIHTLQWARDEFEG
UBA1_YEAST	LLESGLTGKGTQVIIPRLTESYSSSRDPPEKSIPLCTLSRFPNKIDHTIAWAKSLFQG *****.***** ** * *****.*****.*** ** * **, ** *

Patrons
específics d'E1
(ProSite)

KACSGKFxP

P[LIVM]CT[LIVM]
[KRH]xFP

Domini d'unió a ATP

GxGxxG

FUGUE v2.s.07

Profile	Hit	PLEN	RAWS	RVN	ZSCORE	ZORI	AL
hs1y8qb	510	-228	710	44.57	47.58	02	CERTAIN Alignment
hs1z7la	255	-444	480	40.44	43.32	02	CERTAIN Alignment
hs1r4mb	418	-292	572	31.13	34.08	02	CERTAIN Alignment
hs1jw9b	240	-537	359	25.77	28.41	02	CERTAIN Alignment
hs1ngva	529	-461	437	24.46	27.51	02	CERTAIN Alignment

- sumo e1 activating enzyme **sae1-sae2**-mg-atp complex
- crystal structure of fragment of **mouse ubiquitin-activating enzyme**
- **appbp1-uba3-nedd8**, an e1-ubiquitin-like protein complex
- structure of the native **moeb-moad** protein complex
- insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the e1 for ned

FUGUE

Alineament estructural:

Query: UBA1

APPBP1-UBA3-NEDD8

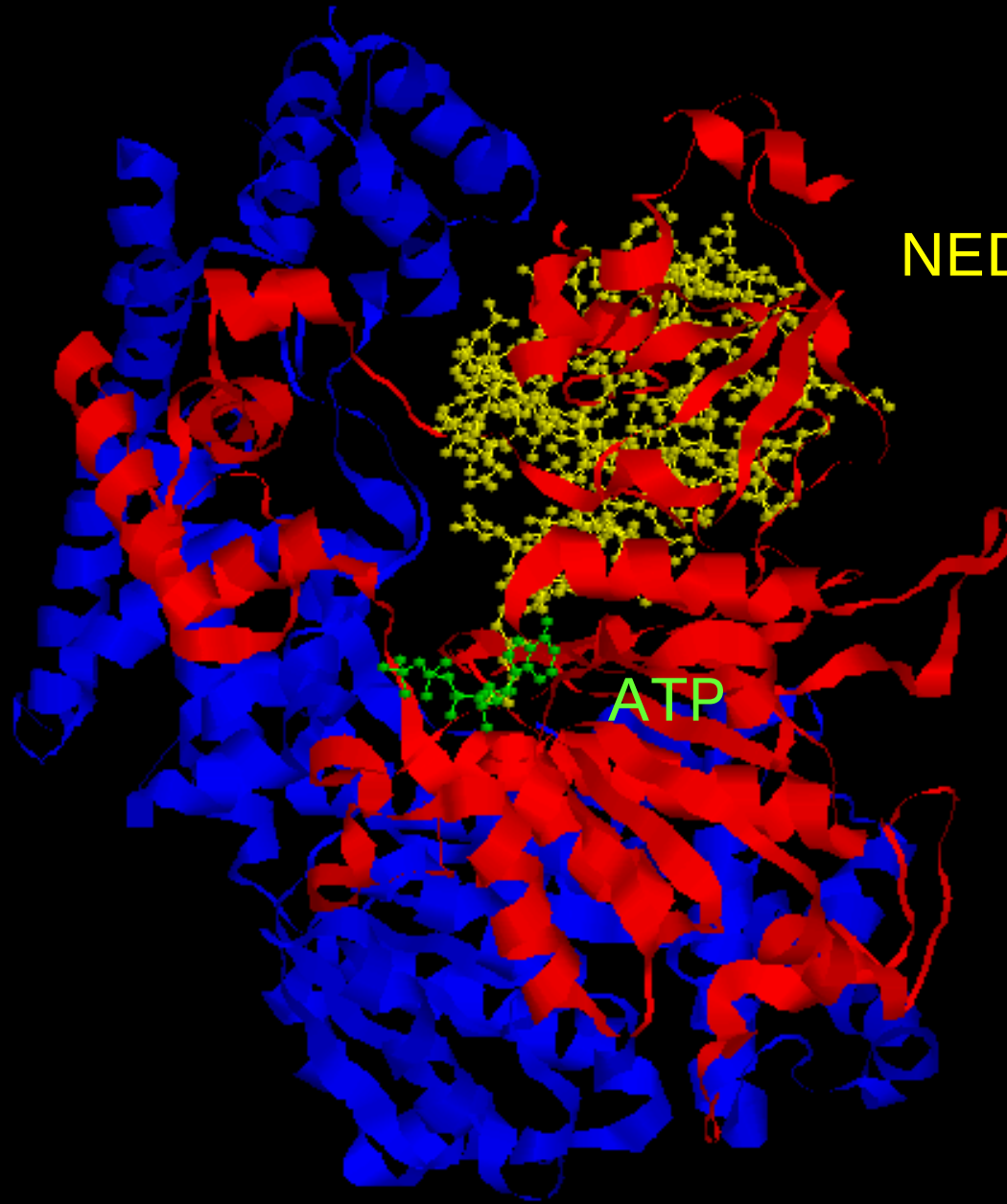
hs1r4mb	(12)	410	420	430	440	450
QUERY UBA1				dwegrw <hb>hvkkfLersgpf</hb>		
				IGGLAAQEVMAKACSGKFMPIQWLYFDALECLPQDKEVLTEDEKCLQRQNR		
				aaaaaaaa		
hs1r4mb	(31)	460	470	480	490	500
QUERY UBA1		thpdFepste slqfLLdt ck VLVI gAgGL GCeLLknLA lsGF-----rg I				
		YDGOVAVFGSDLQEKLGKQKYFLVGAGAIGCELLKNFAMIGLCGCGEGGEI				
		aaaaaaaa	bbbb	aaaaaaaaaa		b
hs1r4mb	(76)	510	520	530	540	550
QUERY UBA1		hVId mdtId vsnl nrQfLFr pkD igr pkAeVAAefL ndrvpnCnV vphfn				
		IVTDMDTIEKSNLNRQFLFRPWDVTKLKSDTAAAVRQMNPHIRVTSHQN				
		bbb	333	333	aaaaaaaaaaaa	bbb
hs1r4mb	(126)	560	570	580	590	600
QUERY UBA1		kIqdf ----- ndtfYr qF hII VC Gldsi arr wINgMLis LLnyedg vld				
		RVGPDTERIYDDDDFFQNLGDGVANALDNVDARMYMDRRCV-----				
		333	aaaaa	bbbb	aaaaaaaaaaaaaa	bbb bbb
hs1r4mb	(171)	610	620	630	640	650
QUERY UBA1		pss ivp LIDG tegf kgnAR VIIPGmtAÇIeÇ tLe lyppgvnfp matIas				
		-YYRKPLLESGTLGKGNVQVVIPTLTSYSSSQD--PPEKSIPICTLKN				
		333	bbbbbbb	bbbbbbb	333	aaaaa
hs1r4mb	(221)	660	670	680	690	700
QUERY UBA1		mPr lpeHCIEy Vrml qUpke gPfgvgvpl dgd pe HIq wIf qkSle RAsq				
		FPNAIEHTLQWARDEFEGFLFKQPAENVNQYLTDPKFVERTLRLAGTQPLE				
		aaaaaaaaaa	aaaa		aaaaaaaaaaaaaaaaaa	
hs1r4mb	(271)	710	720	730	740	750
QUERY UBA1		ynirg VtYr l Tqgv Vkriipavas TNavIAavCAt EV fki atsAyipl--				
		V-LEAVQRLVLQRPQTWADCVTWACHHWHTQYSNNIRQLLHNFPPDQLT				
		aaaaaaaaaa		aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa		
hs1r4mb	(319)	760	770	780	790	800
QUERY UBA1		nnylvfn dvdg lytyt feaerkenÇpaÇ sglpn igf sp saklqev ldyl				
		SSGAPFWSGPKRCPHPLTFDVNNPLHLDYVMAAANLFAQTYGLTGSQDRA				
		bbbb	bbbb	bb		aaaa
hs1r4mb	(369)	810	820	830	840	850
QUERY UBA1		tn saslgmk sPa itatnrtlylgsv tsie ertrkel glvd gqeav adv tt				
		AVATFLQSVQVPEFTPKSGVKIHVSDQELQSANASVDDSRLEELKATLPS				
		aa	bb	aaaaaa	aaaa	bb
hs1r4mb	(907)	860	870	880	890	900
QUERY UBA1		pqtvlfkl hft				
		PDKLPGFKMYPIDFEKDDDSNFHMDFIVAASNLRANEDIPSADRHKSCL				
		bb				

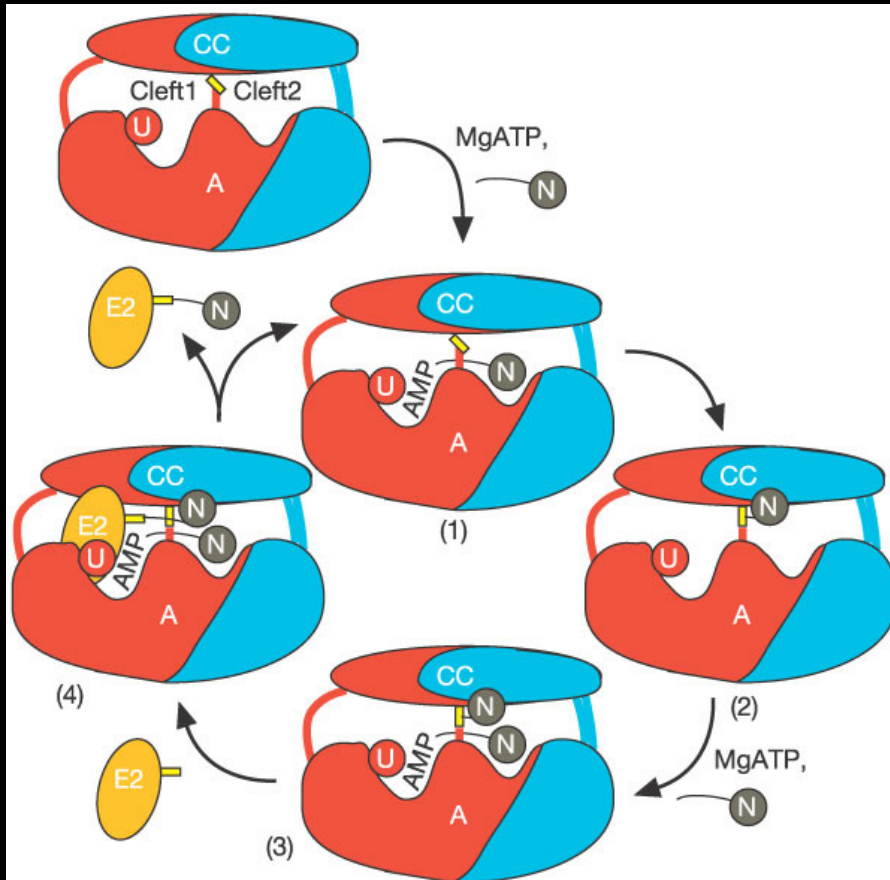
APPBP1

NEDD8

UBA3

ATP



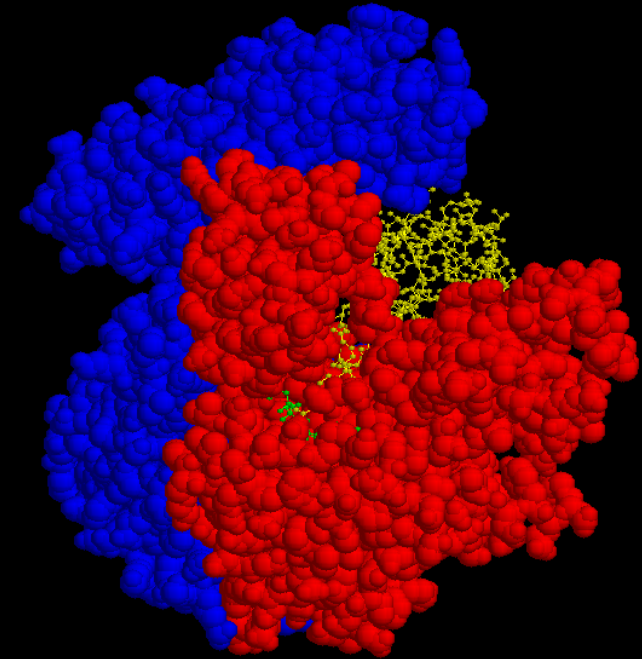


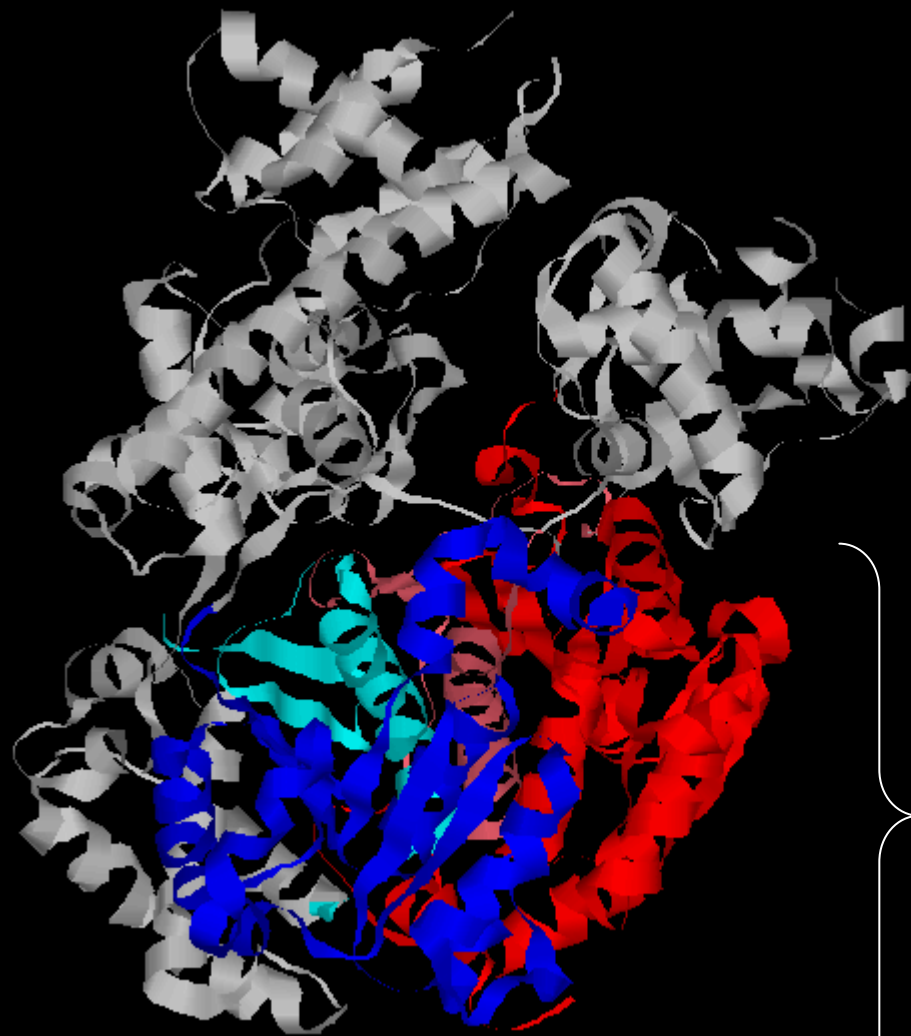
A: donmini d'adenilació

U: domini ubiquitin-like

CC: domini de la cys catalítica

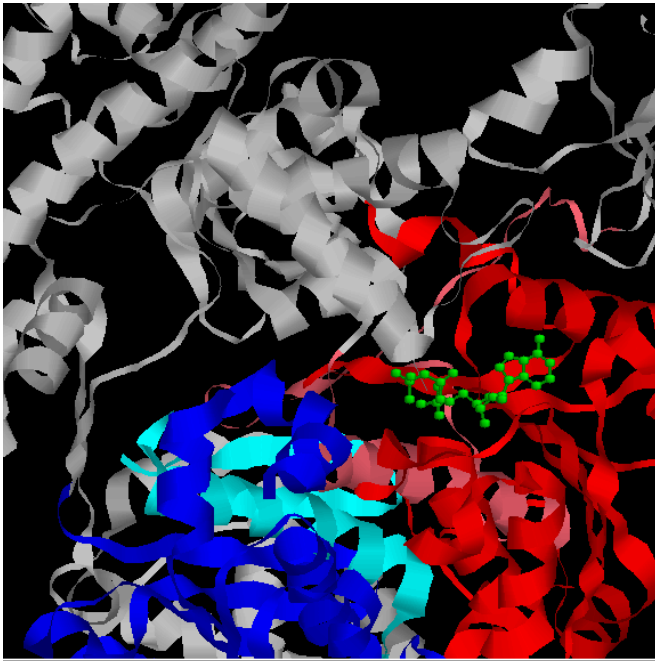
1. Reacció d'adenilació. Unió de l'ATP a la fenedura1 i NEDD8 a la fenedura2
2. Formació d'un enllaç tioèster entre la cys catalítica i NEDD8
3. Una segona molècula de NEDD8 és adenilada
4. Unió d'E2 a la fenedura1, transferència de NEDD8 a E2



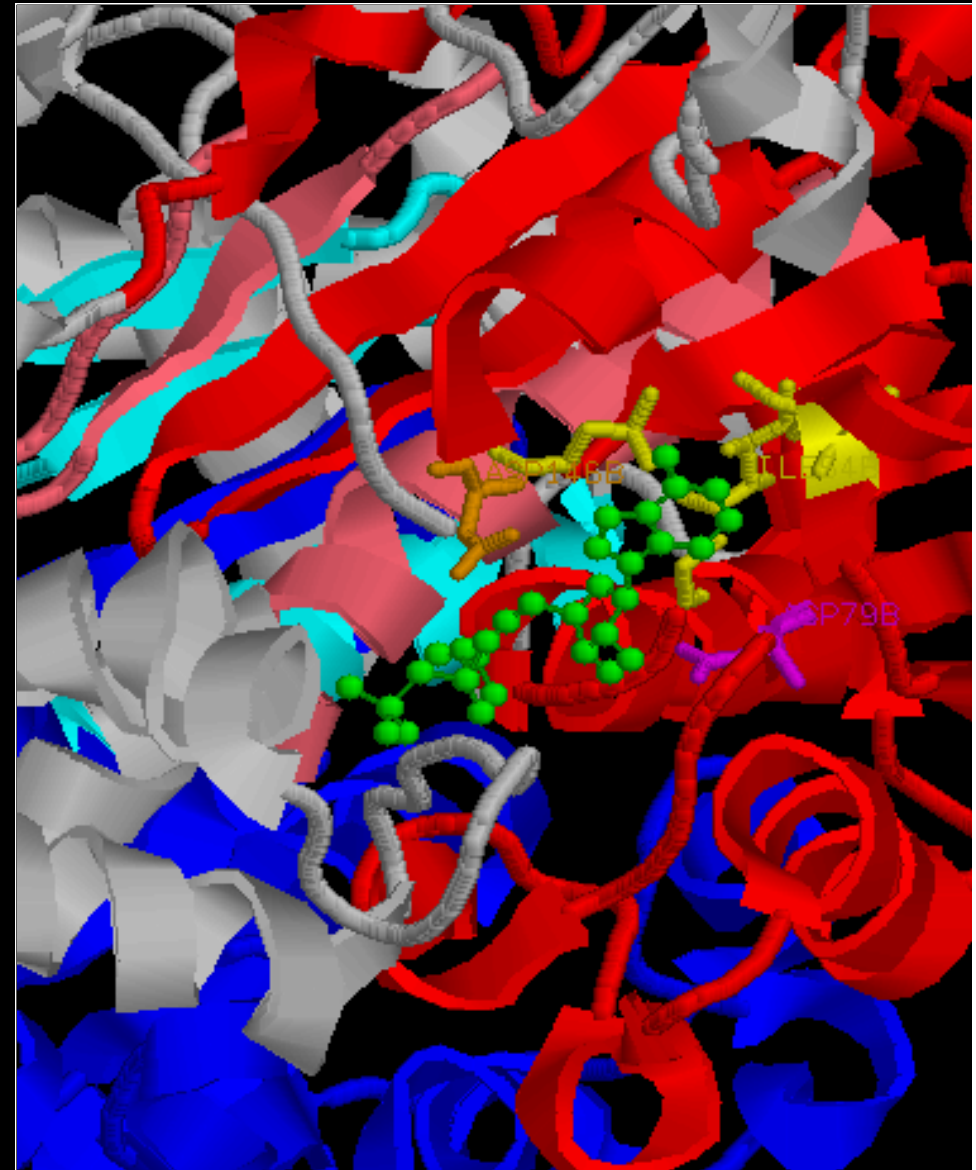


Domini
d'adenilació

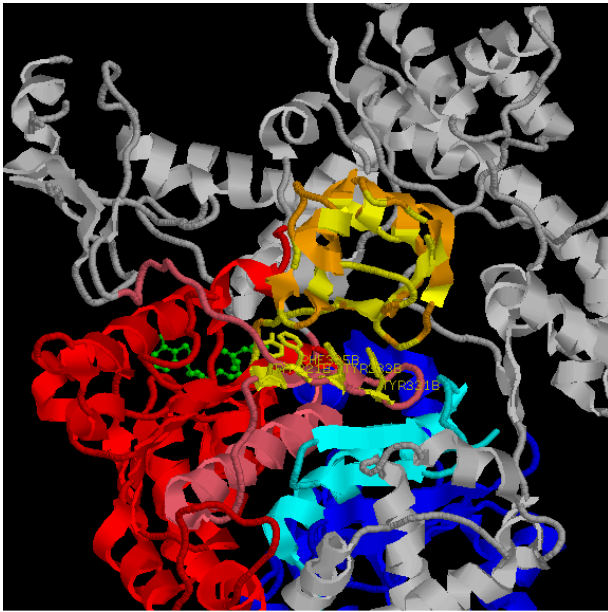
Interacció amb ATP



- UBA3:
 - Leu145, Ile127, Gly55, Ile54 → contacte amb l'adenina
 - Asp79 → contacte anell de ribosa
 - Asp146 → coordina Mg^{+}
- APPBP1
 - Arg15 → contacte amb fofat-? de l'ATP



Interacció amb NEDD8

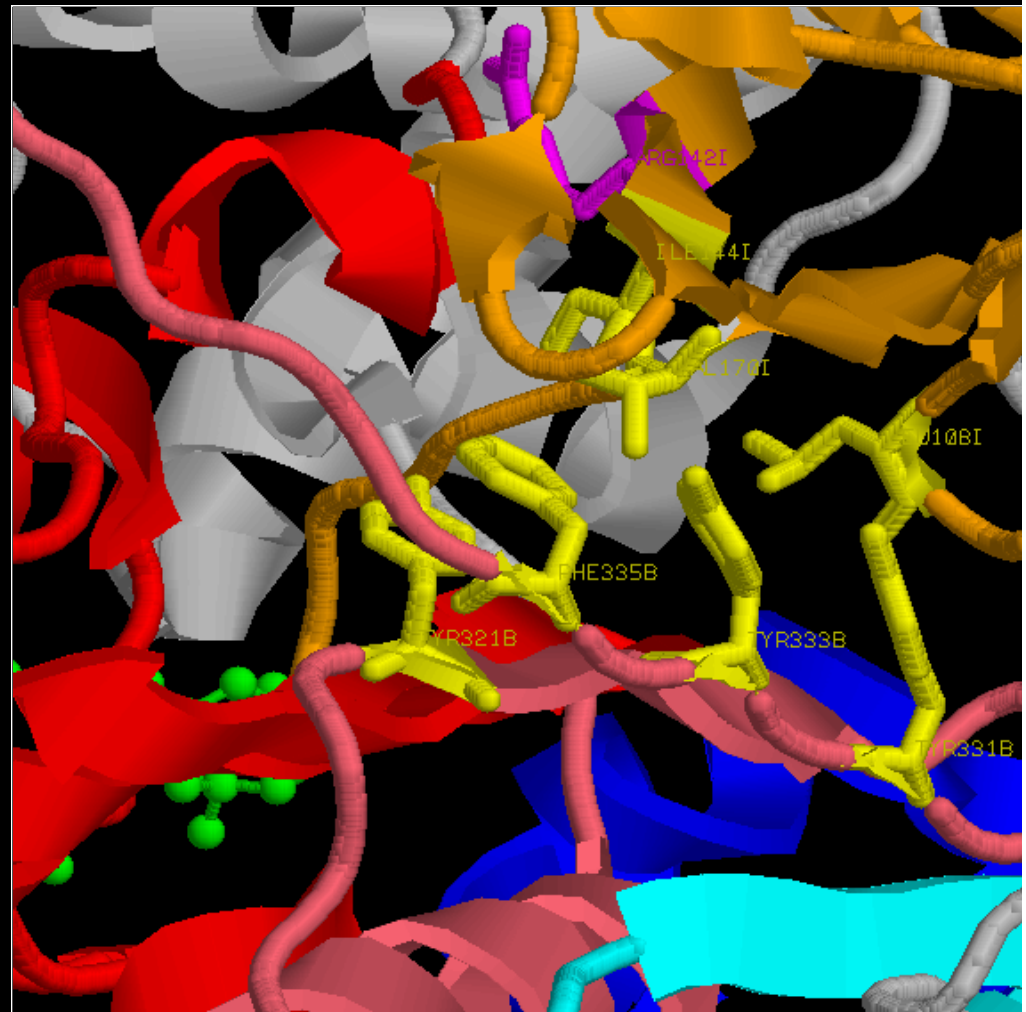


Hydrophobic patch:

- UBA3: Tyr321, Tyr331, Tyr333, Phe335
- NEDD8: Leu8, Ile44, Val70

Pont d'hidrogen:

- UBA3 Tyr321 – Arg42



Alineament seqüència

Alineament estructural

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```

      1           2           3           4           5
1nddA_SEQR  MLIKVKTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPPQQQRLIYSGKQMNDKTAADYK
1ubi__SEQR  MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
* * ***** * .....* . * . * .....***** .....* . * .**

      7
1nddA_SEQR  ILGGSVLHLLALRGG
1ubi__SEQR  IQKESTLHLLRLRGG
* * ***** **

```

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```

      1           2           3           4           5           6
1UBI       MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYN
nedd8      MLIKVKTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPPQQQRLIYSGKQMNDKTAADYK

      7
1UBI       IQKESTLHLLRLRGG
nedd8      ILGGSVLHLLALR--

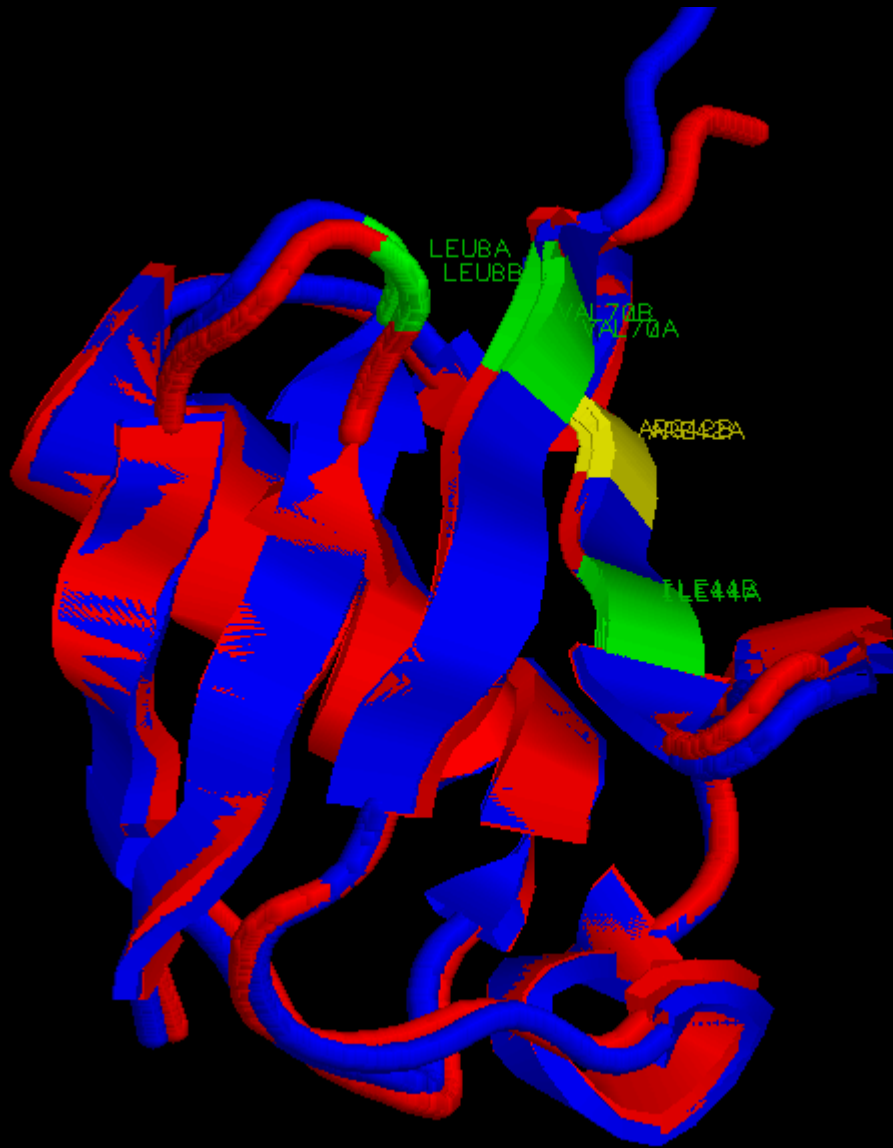
```

- Hydrophobic patch
- Pont d'hidrogen amb Tyr d'UBA3

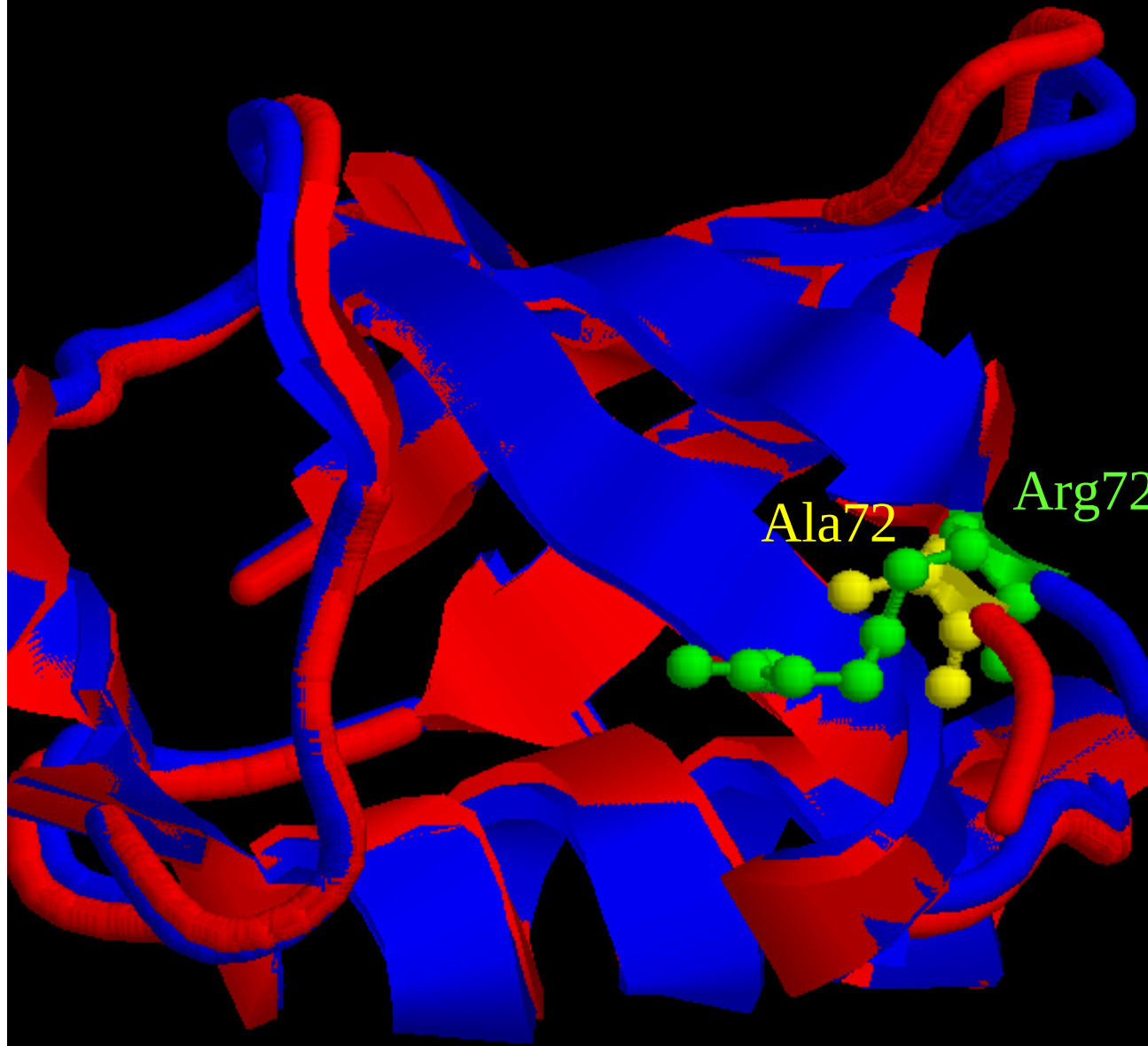
STAMP: NEDD8-Ubiquitina



Conservació del Patch hidrofòbic



- **Leu8, Ile44, Val70:**
 - formen un patch hidrofòbic
 - interacció amb path hidrofòbic de l'E1 corresponent
 - Conservades
- **Arg42:**
 - important per la formació de l'ubiquitina-adenilat
 - Forma un pont d'hidrogen amb Tyr d'E1
 - Conservat



Residu 72:

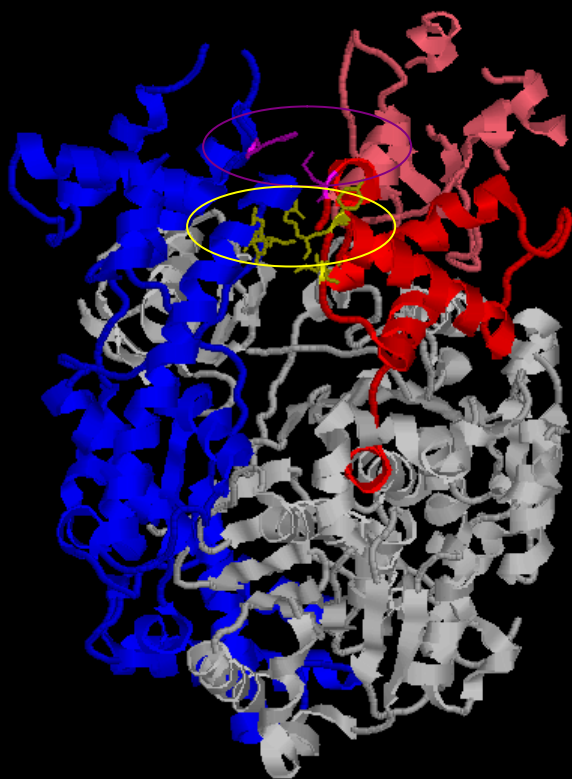
Determinant
d'especificitat

- Arg en UBI.
- Ala en NEDD8 → interacció amb residus hidrofòbics: Leu206 i Tyr207 de UBA3.
- En els membre de la família SUMO és Glu o Gln.

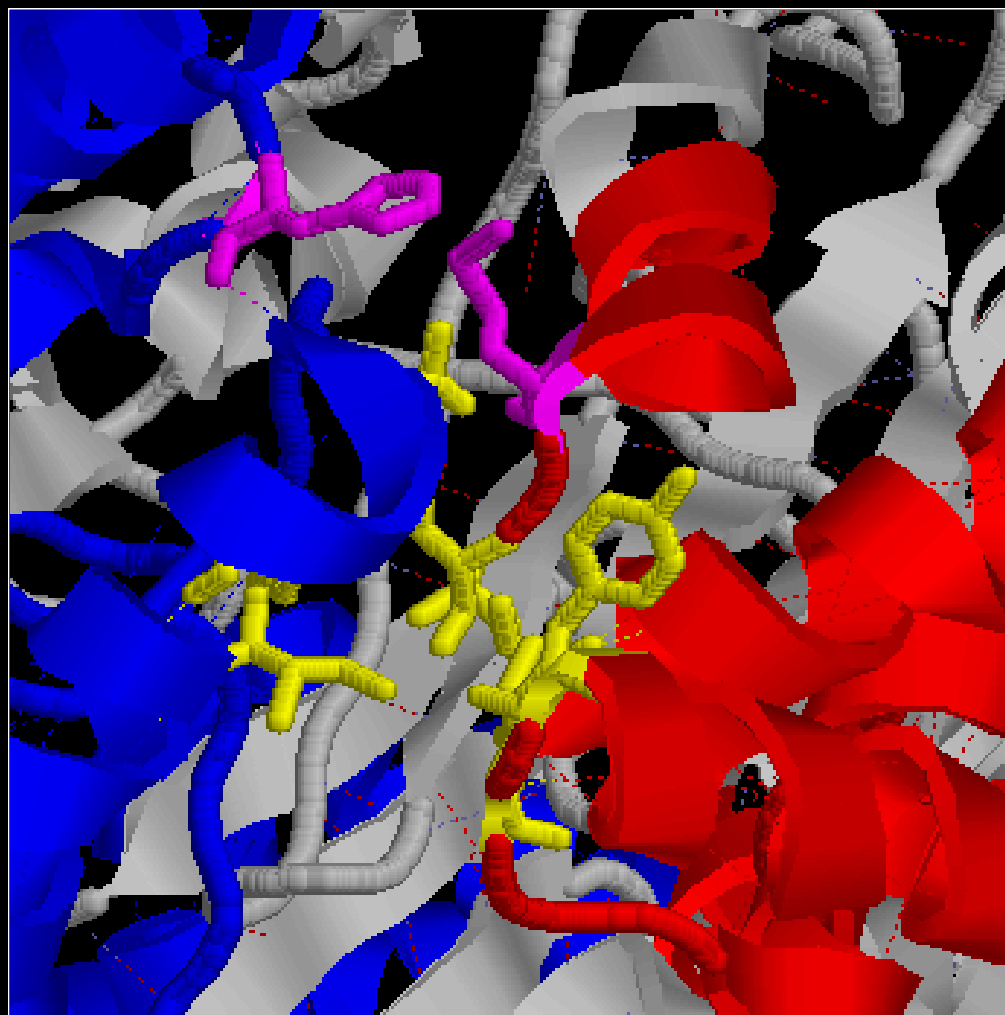
Domini
catalític



2 Clusters hidrofòbics, interacció APPBP1-UBA3



1. APPBP1: Ile340, Tyr339 → UBA3: Arg223, Leu224, Tyr271, Ile273
2. APPBP1: His211 → UBA3: Met221



Ponts d'hydrogen



APPBP1:

Asn344

Ser336

Asp331

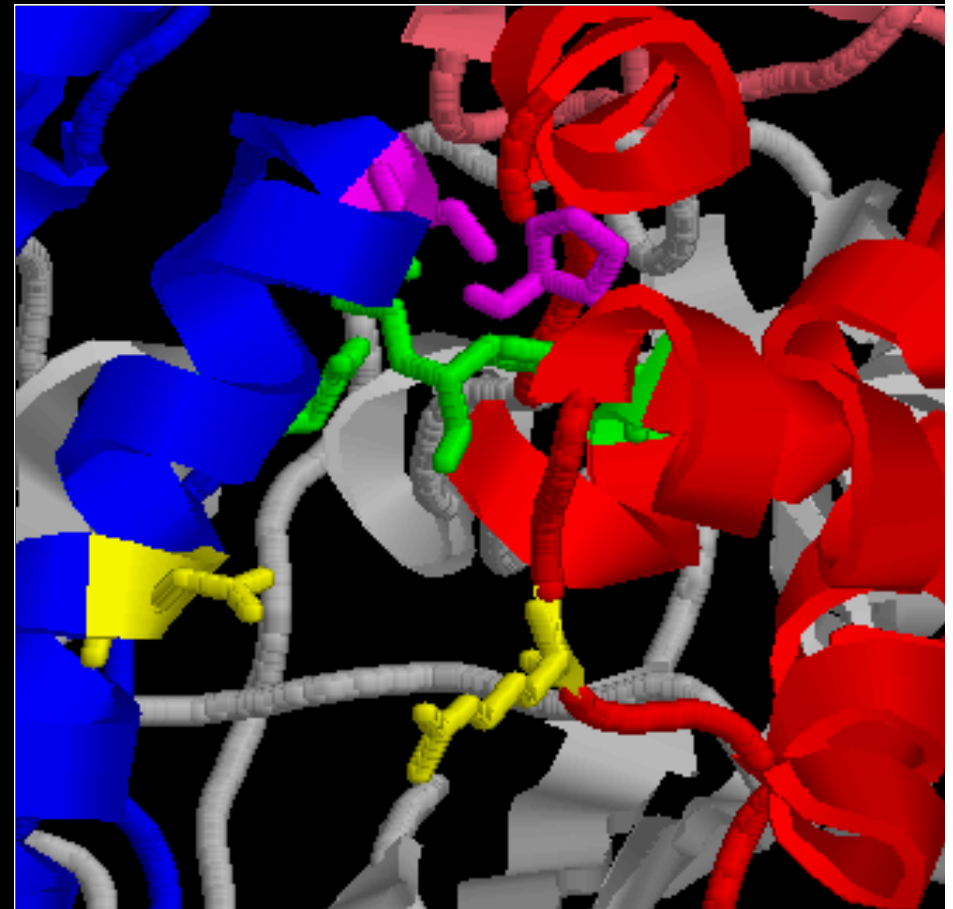
UBA3:

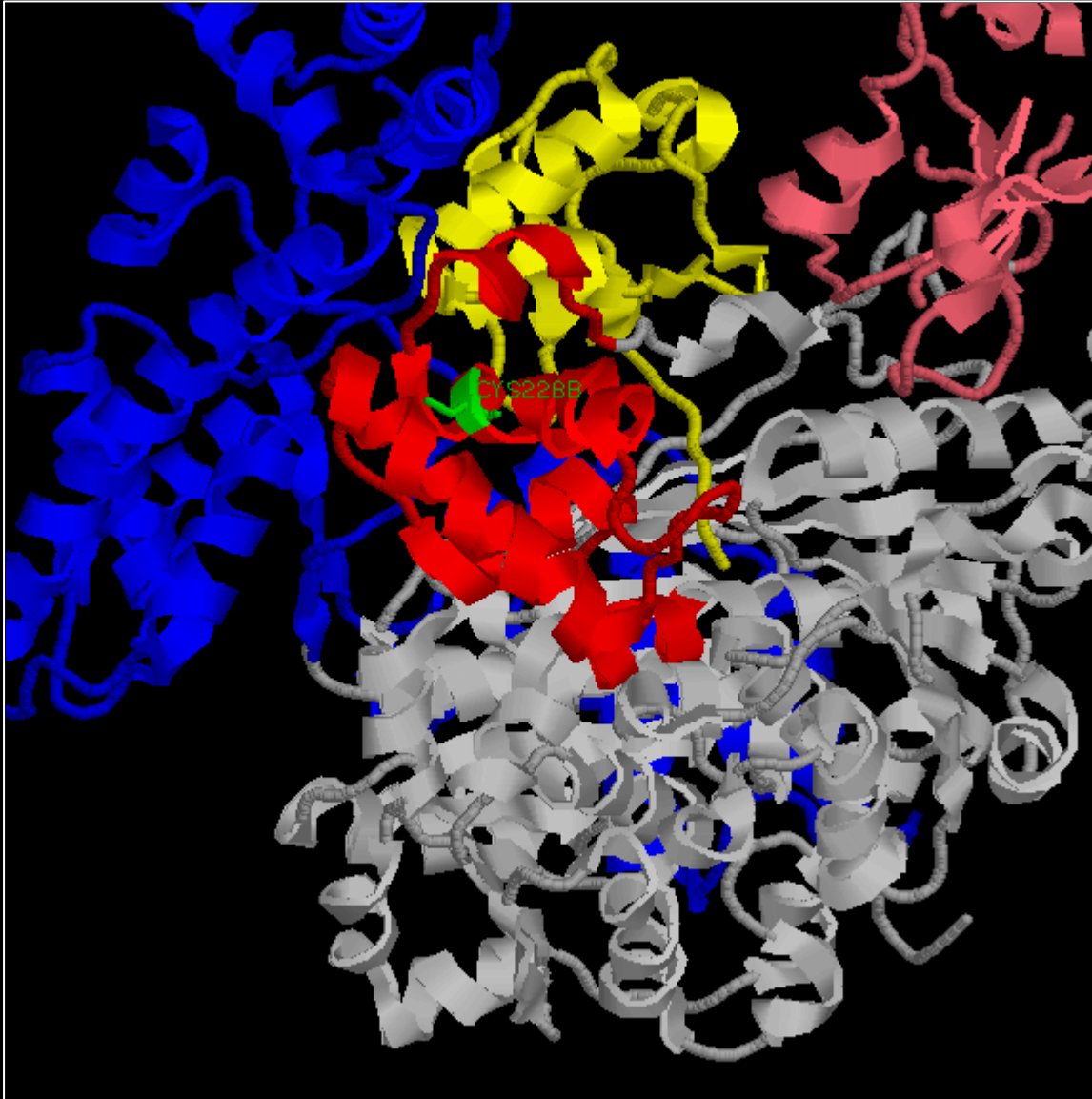
Arg274

Pro222

His227

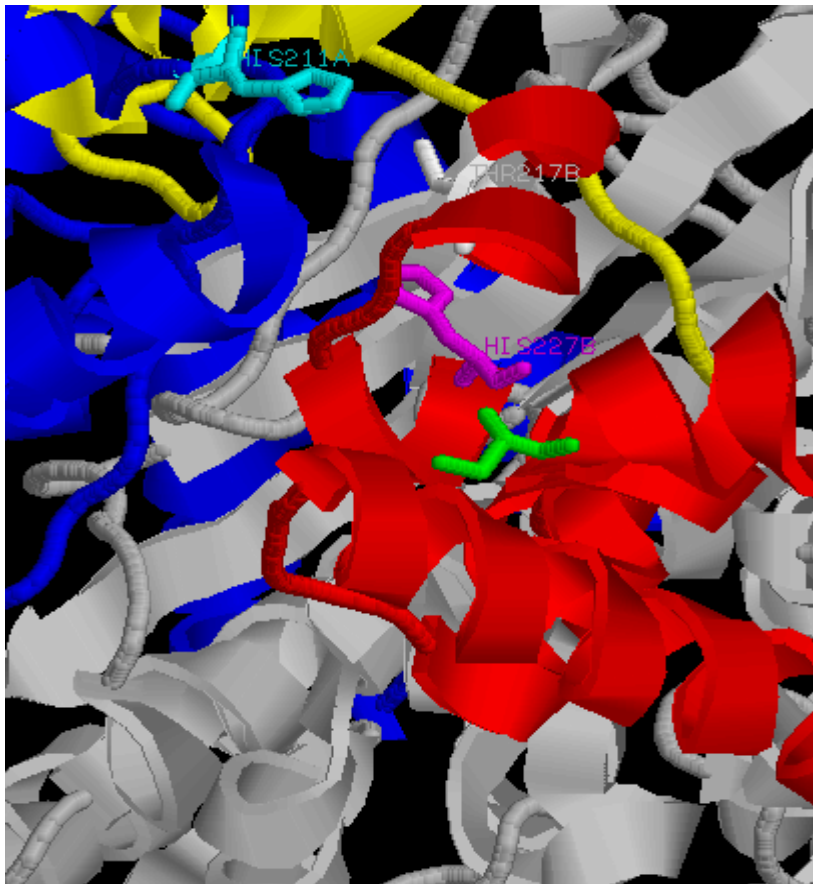
Arg223





Cisteïna catalítica

- Interacció Cys216 amb C-terminal de NEDD8
- Formació d'un enllaç tioèster
- Necessitat d'un canvi conformacional

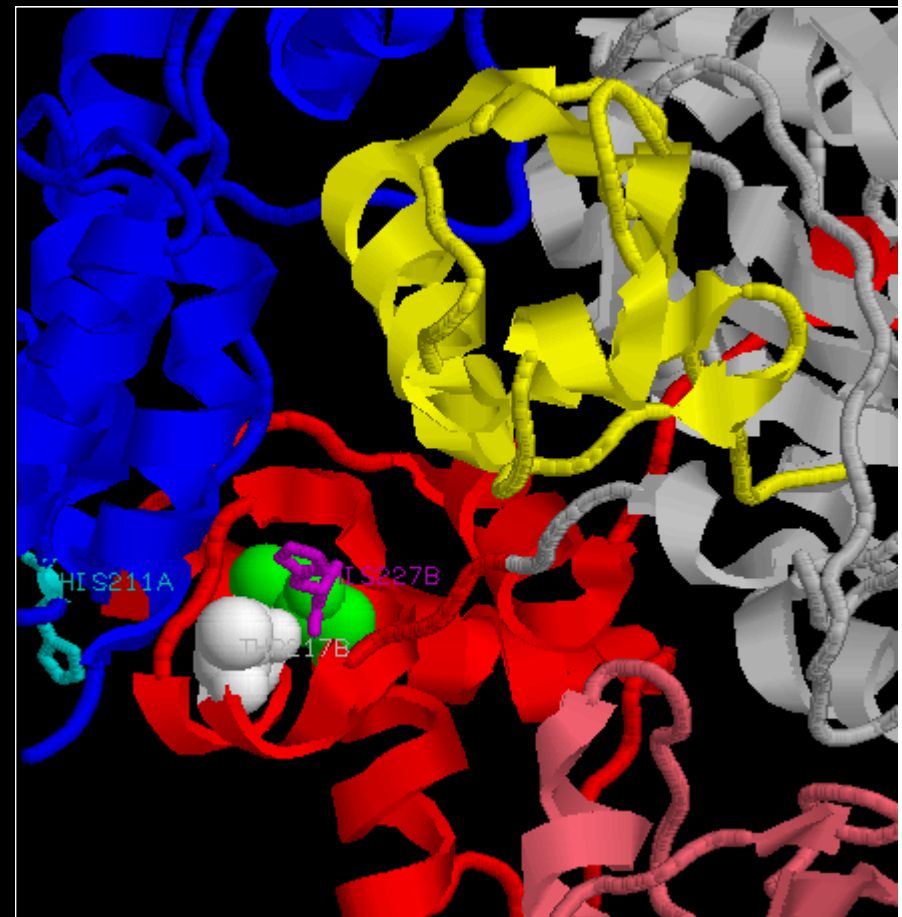


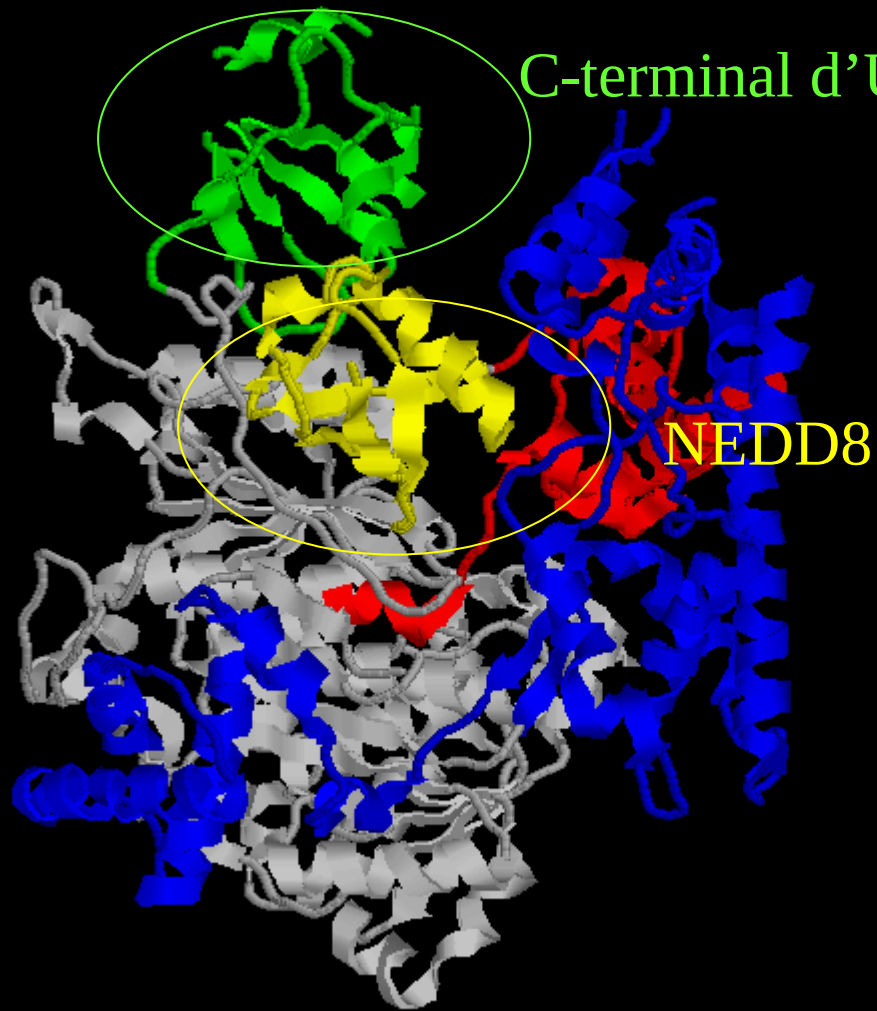
Thr217

- 3,5 Å
- Conservada en diferents enzims E1

Histidines bàsiques

- APPBP1: His211 6,8 Å
- UBA3: His227 9,8 Å
- També participen en la interfase APPBP1-UBA3





Domini ubiquitin-like

- En diverses proteïnes en la via de les ub
- Hipòtesi: involucrat en la unió a E2:
 - Situació propera a la fenadura, que conté el lloc d'unió al nucleòtid. La transferència de l'enllaç tioèster d'E1 a E2 és estimulada per la unió a l'Ublp-adenilat.
 - Es troba en enzims E3 que se sap que uneixen E2.
 - La Ublp Smt3p competeix amb E1 per unir-se a l'E2 Ubc9p.
 - Mutant APPBP1-UBA3 sense el domini c-terminal és defectiu en l'associació amb UBC12 i transferir-li NEDD8

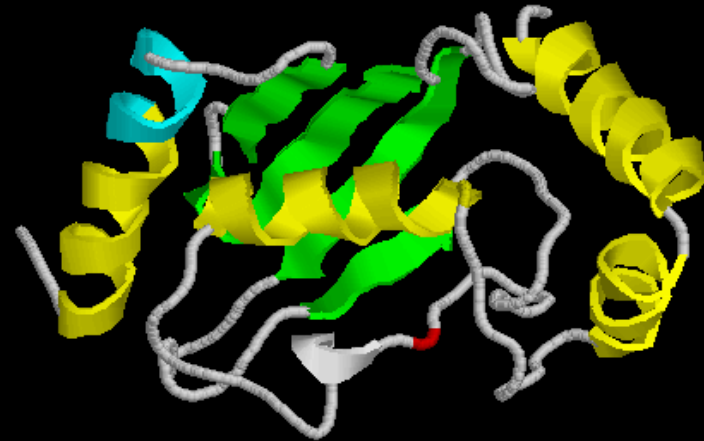
UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME (E2)

Classe → $\alpha + \beta$

Plegament → UBC-like

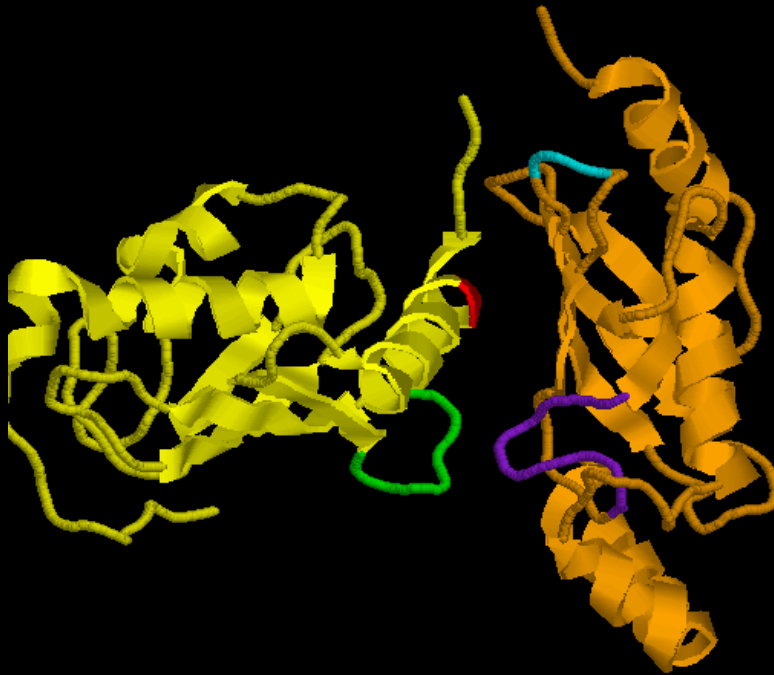
Superfamília → UBC-like

Família → Ubiquitin conjugating enzyme, UBC

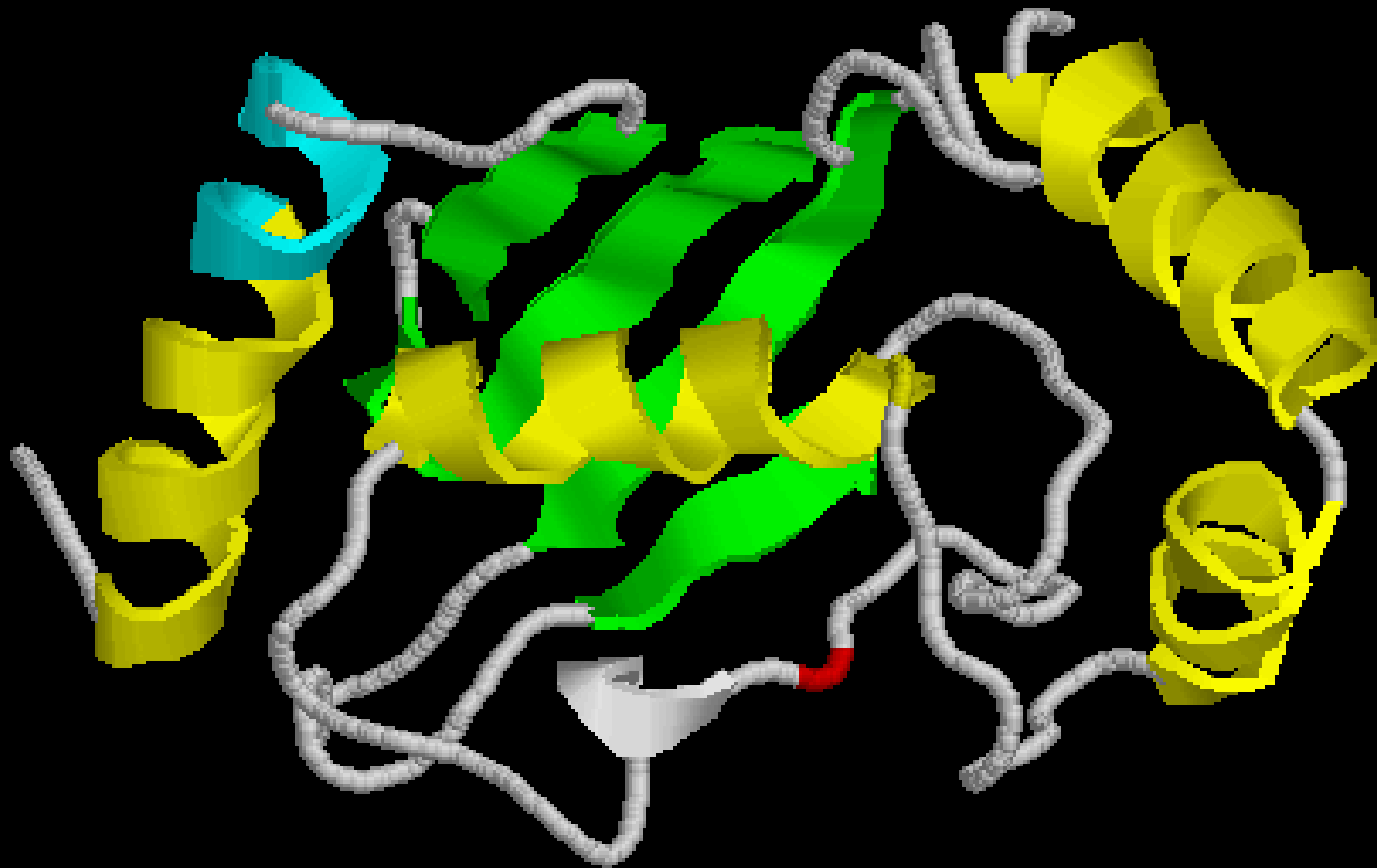


CLASSIFICACIÓ:

- Classe I → domini catalític UBC (150 aa)
- Classe II → UBC + extensions addicionals al C-terminal
- Classe III → UBC + extensions addicionals al N-terminal
- Classe IV → UBC + extensions al N i al C-terminal



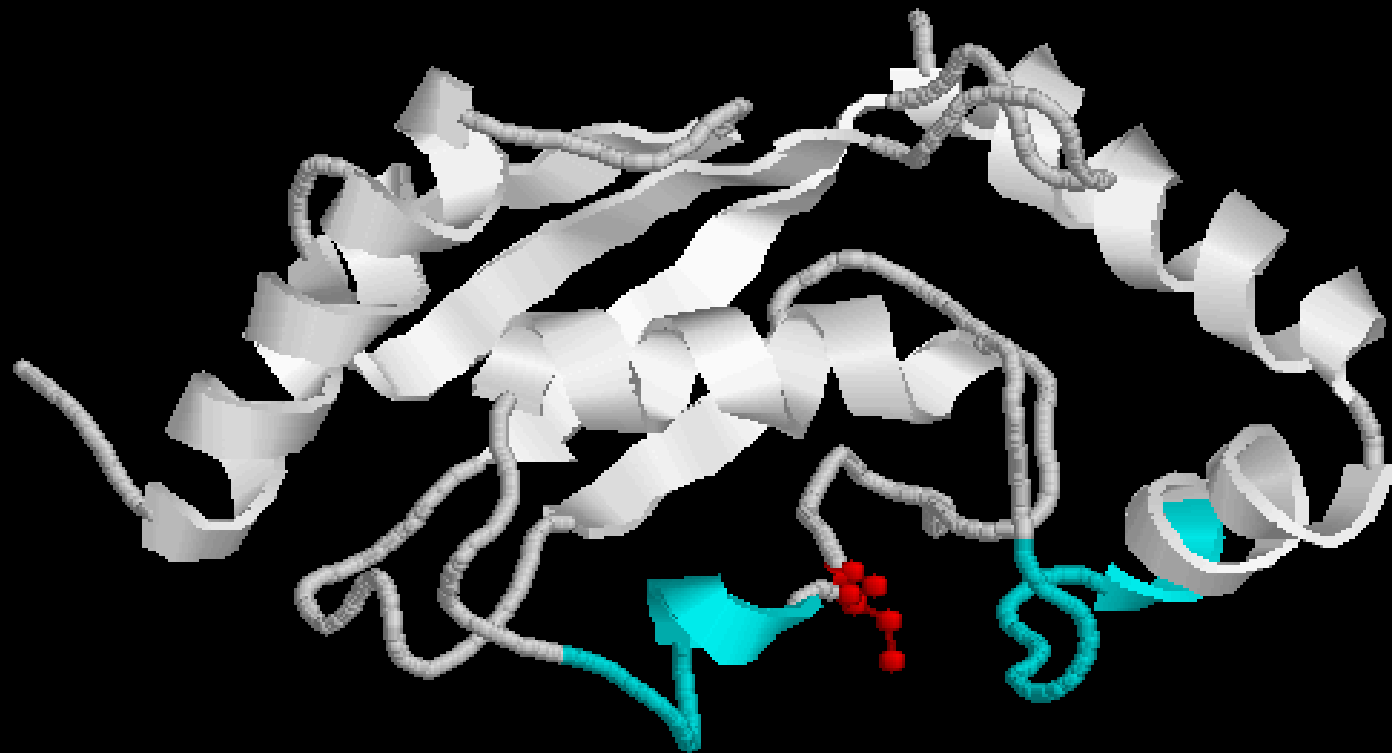
- Monomèrica
- Multimèrica



4 hèlix (3 alfa i 1 alfa+3₁₀)

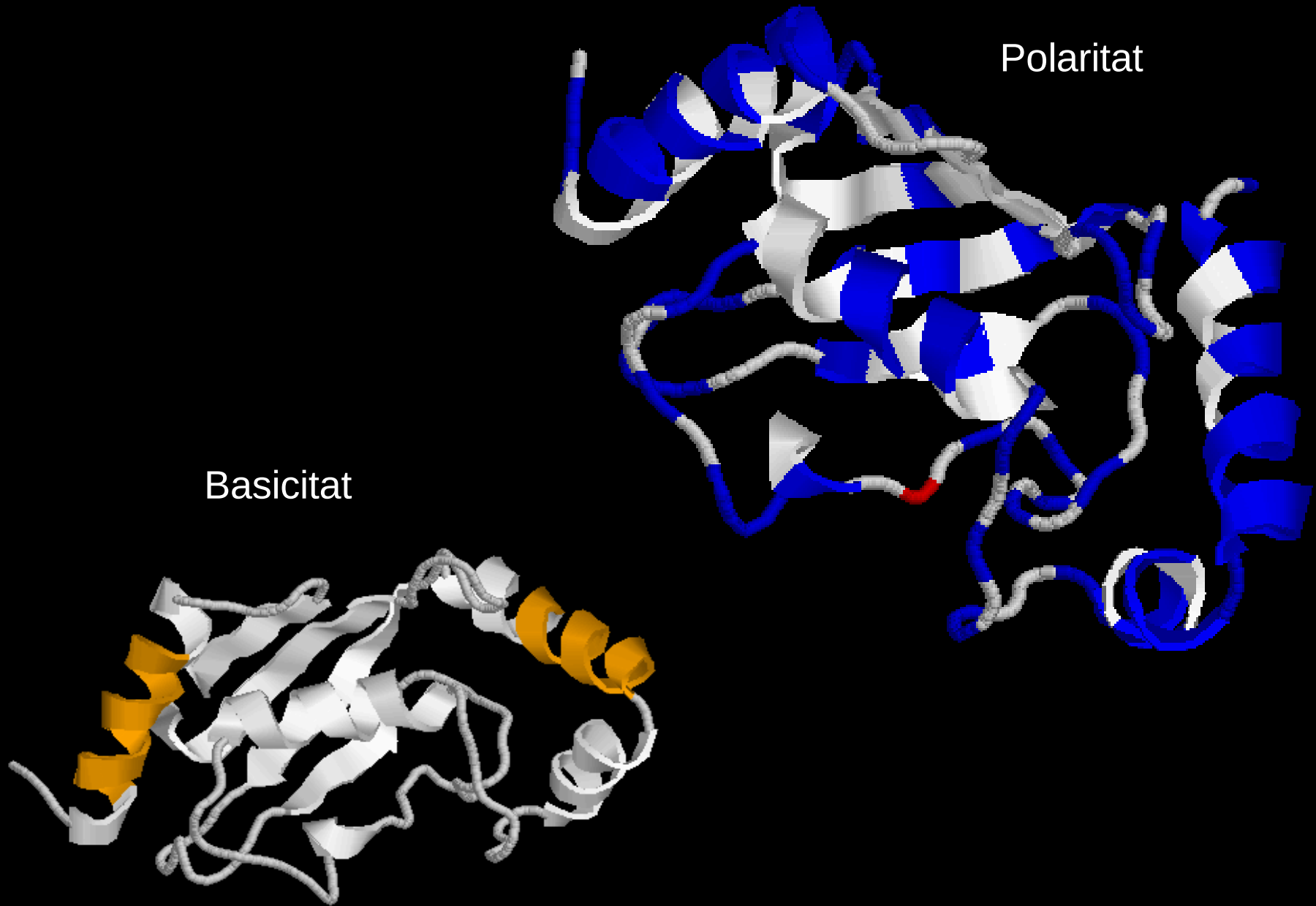
Fulla beta de 4 cadenes antiparal·leles

Centre actiu (cys i bundles)



Polaritat

Basicitat



Regions conservades



CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```

2aak  --MSTPAR-----KRLMRDFKRLQQDPPAGISGAPQ--DN---NIMLWNAVIFGPD DTPW
1ayz   --MSTPAR-----RRLMRDFKRMKEDAPFGVSASPL--PD---NVMWNAMIIGPADTPY
1u9a   LNMSGIAL-----SRLAQERKAWRKDHPPGFVAVPTKNPDGTMNLMNWECAIPGKKGTPW
2e2c   --MTTSKERHSVSKRLQQELRTL LMSGDFGITAFPD--GD---NLFKWVATLDGPKDTVY
1q34   --MTPSR-----RRLMRDFKKLQEDPPAGVSGAPT--ED---NILTWEAIIIFGPQETPF
          * .          ** . . .          *          *          * .          * . . *          *

```

```

2aak  DGGTFKLSLQFSEDYPNKPPTVRFVSRMFHPNIYADGSICLDILQN--QWSPIYDVAAIL
1ayz   EDGTFRLLLEFDEEYPNKPPTHVKF SEMFHPNVYANGEICLDILQN--RWTPTYDVASIL
1u9a   EGGLFKLRMLFKDDYPSSPPKCKFEPPLFHPNVYPSGTVCLSILEEDKDWRPAITIKQIL
2e2c   ESLKYKLTLEFPDYPYKPPVVKF TPCWHPNVDQSGNICLDILKEN--WTASYDVRTIL
1q34   EDGTFKLSLEFTEEYPNKPPTVKFISKMFHPNVYADGSICLDILQN--RWSPTYDVAAIL
          . . . * . * . ** ** * . *          *** .          * ** **          *          **

```

```

2aak  TSIQSLLCDPNPNSPANSEAARMYSESKREYNRRVRDVVEQSWTAD-----
1ayz   TSIQSLFNPNPASPANVEAATLFKDHKSQYVKRVKETVEKSWEDDMDDDDDDDDDDDDDD
1u9a   LGIQELLNEPNIQDPAQAEAYTIYCQNRVEYEKRVRAQAKKFAPS-----
2e2c   LSLQSLLGEPNNASPLNAQAADMWS-NQTEYKKVLHEKYKTAQSDK-----
1q34   TSIQSLLDEPNPNSPANSLAAQLYQENRREYEKRVQQIVEQSWLNFGENEGDAVLKD---
          * *          **          *          *          *          * . . .

```

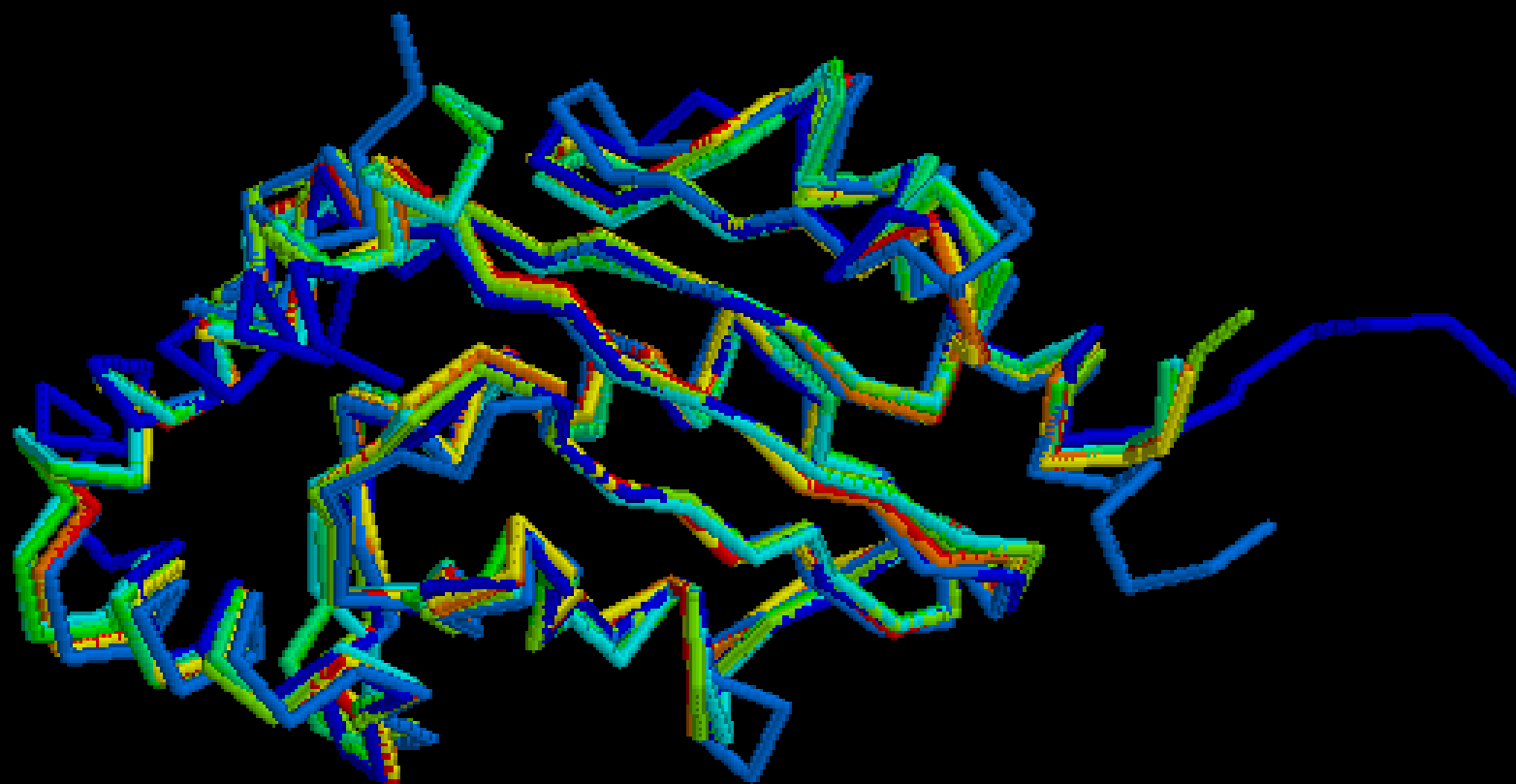
CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

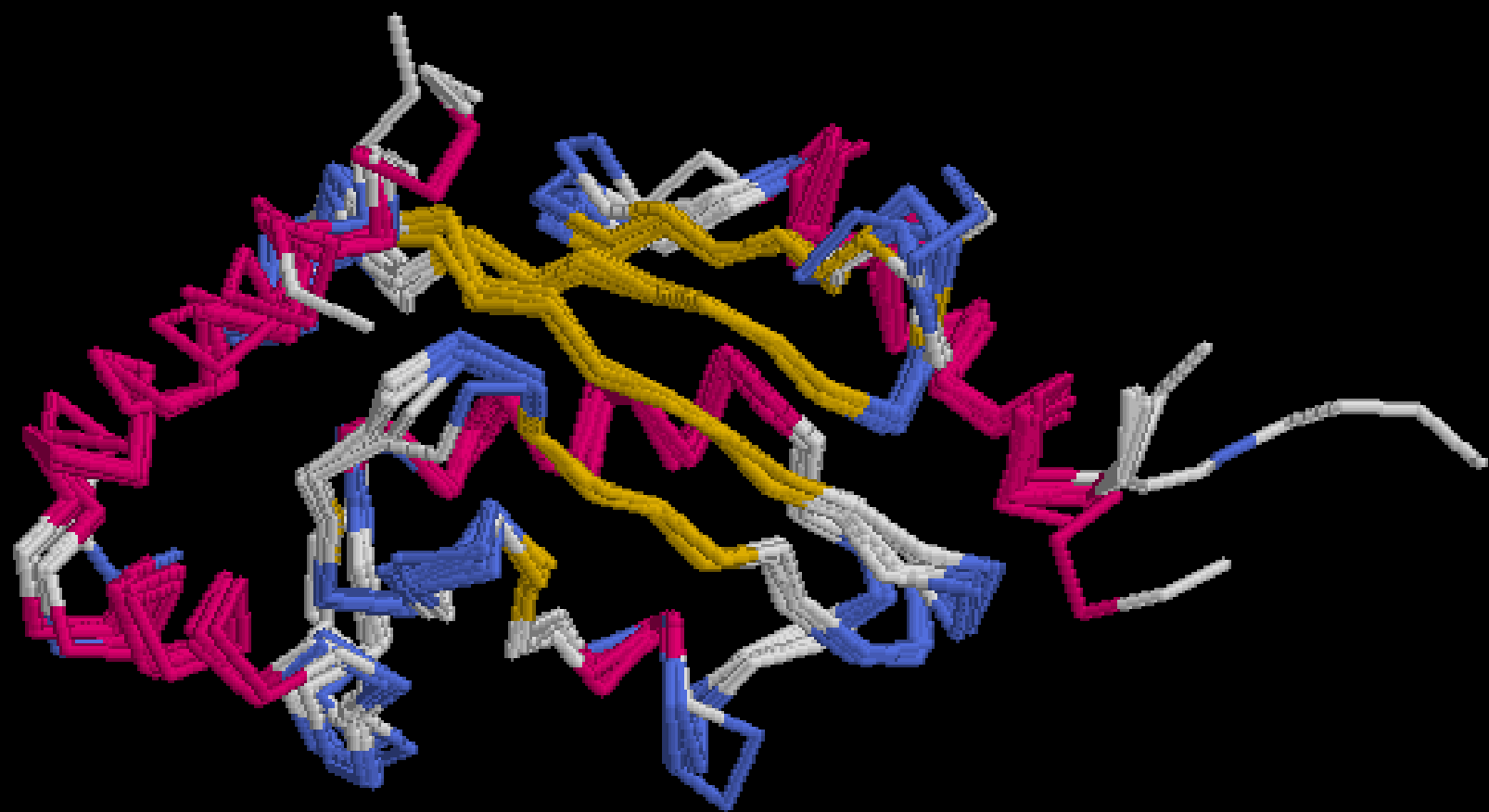
2aak	--M--STPARKRLMRDFKRLQQDPPAGISGAPQ----
1ayz	-----STPARRRLMRDFKRMKEDAPFGVSASPL----P-DNVMWNAMIIGPADTPYED
1u9a	---LNMSGIALSRLAQERKAWRKDHPFGFVAVPTKNPDGTMNLMNWECAIPGKKGTPWEG
2e2c	MTTSKERHSVSKRLQQELRTLMSGDFGITAFP----D-GDNLFKWVATLDGPKDTVYES
1q34	-----TTPSRRRLMRDFKKLQEDPPAGVSGAPT----E-DNILTWEAIIIFGPQETPFED

2aak	GTFKLSLQFSEDYPNKPPTVRFVSRMFHPNIYADGSI CLDIL -Q-NQWSPIYDVAAILTS
1ayz	GTFRLLLEFDEEYPNKPPIVVKFISEMFHPNVYANG EICLDIL -Q-NRWTPTYDVASILTS
1u9a	GLFKLRMLFKDDYPSSPPKCKFEPPLFHPNVYPSGTV CLSILE EDKDWRPAITIKQILLG
2e2c	LKYKLTLEFPSPDYKPPVVKFTTPCWHPNVVDQSGNI CLDI -L-KENWTASYDVRTILLS
1q34	GTFKLSLEFTEEYPNKPPTVKFISKMFHPNVYADGSI CLDIL -Q-NRWSPTYDVAAILTS

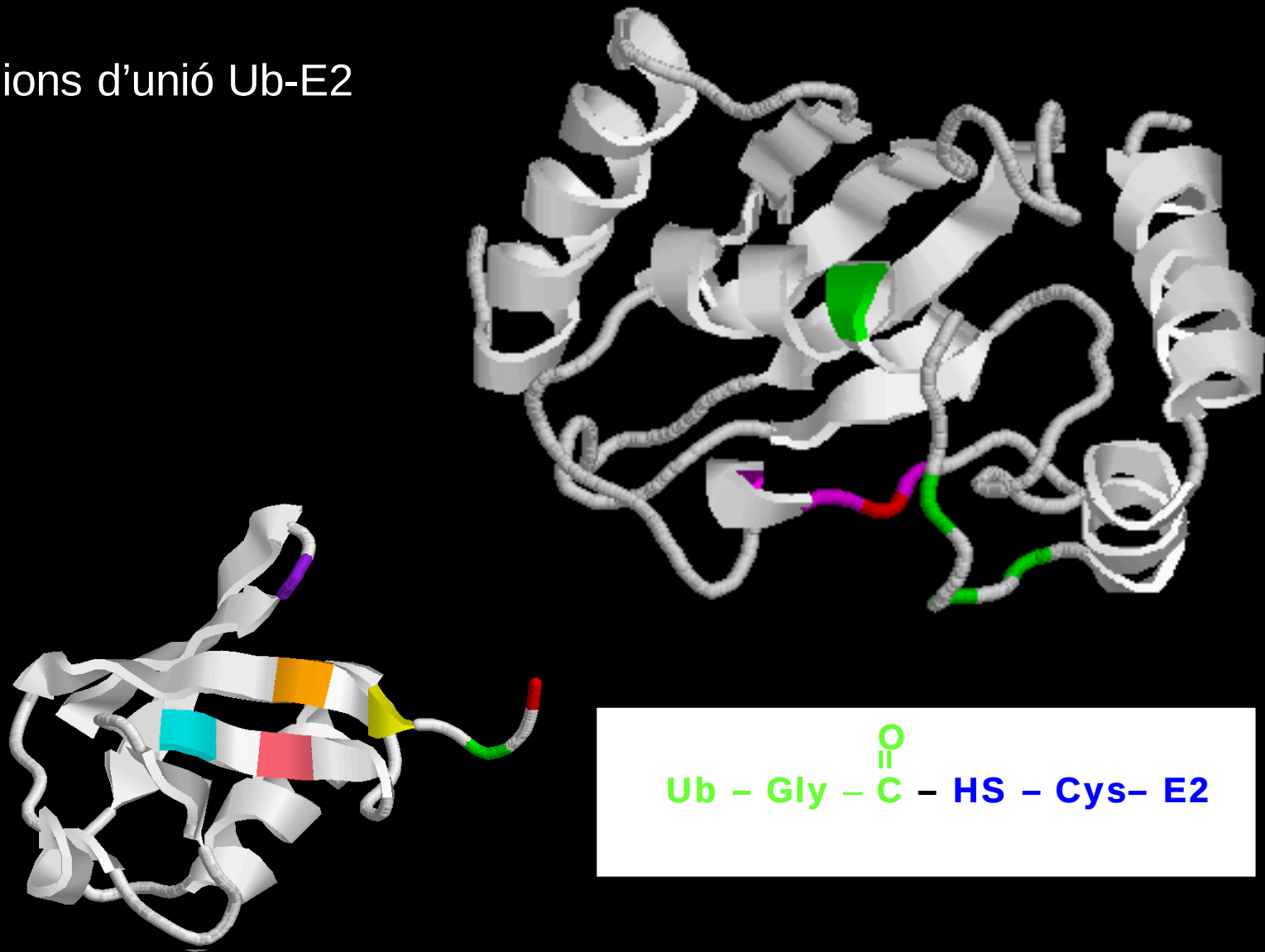
2aak	IQSLLODPNPNSPANSEAARMYSESKREYNRRVRDVVEQSWT----
1ayz	IQSLFNPNPASPANVEAATLFKDHKSQYVKRVKETVEKSWEDDMD
1u9a	IQELLNEPNIQDPAQAEAYTIYCQNRVEYEKRVRAQAKKF--APS-
2e2c	LQSLLGEPNNASPLNAQAADMW-SNQTEYKKVLHEKYKTAQSDK--
1q34	IQSLLEPNPNSPANSLAAQLYQENRREYEKRVQQIVEQSWL----

Aliniament estructural





Regions d'unió Ub-E2



Ubiquitin-Protein Ligases E3

HECT domain – RING finger

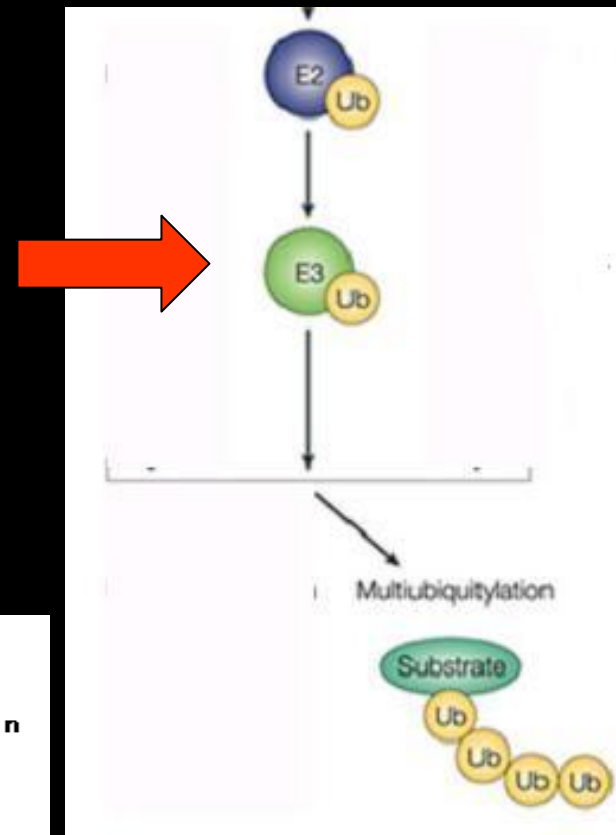
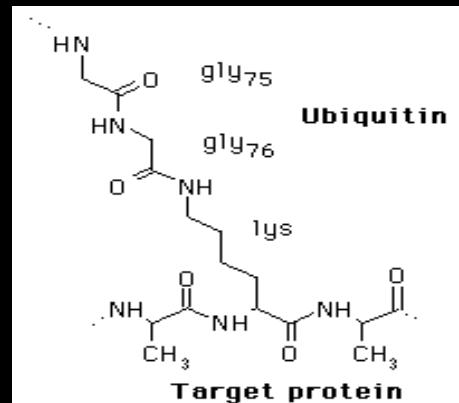
Especificitat de substrat

Especificitat d'unió a E2

Unió ubiquitina des d'E2 a la proteïna target

E2 – Target

E2 – E3 – Target

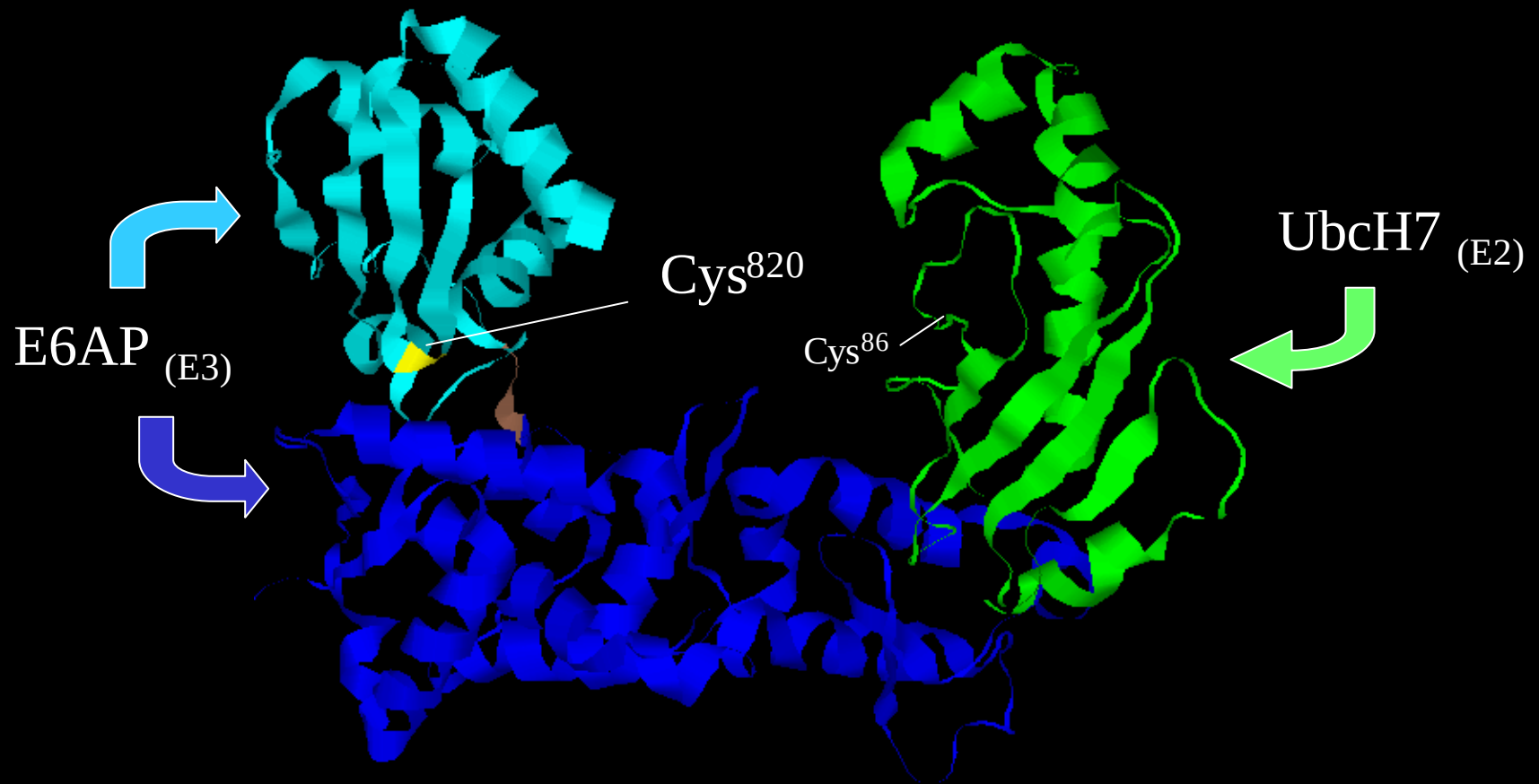


HECT domain (E6AP)

Link (738-740)

NH₂-terminal lobe (495-737) α -helix

COOH-terminal lobe (741-852) α/β



HECT domain (E6AP)

Alineament HMM (hect)

HMMER 2.2g HECT

```

UE3A_HUMAN      ----FRDLGDSHPVLYQSLKDLLLEYEGN----VEDDMMITFQISQTDLF
UE3A_MOUSE     ----FRDLGDSHPVLYQSLKDLLLEYEGS----VEDDMMITFQISQTDLF
NED4_HUMAN     ----LHDMESVDSEYYNSLRWILENDPT-----ELDLRFII.DEELF
NED4_MOUSE     ----LHDMESVDSEYYSSLRWILENDPT-----ELDLRFII.DEELF
PUB1_SCHPO     ----LQDMESMDAEYRSLVWILDNDIT-----GVLDLTFSV.EDNCF
RSP5_YEAST     ----LQMEGVDAEYVNSLNWMLENSID-----GVLDLTFS.A.DDERF
#=GC RF        xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

UE3A_HUMAN      GNPMMY-----DLKENGDKIPITNENRKEFVNLYSDYILNKSVEKQFK
UE3A_MOUSE      GNPMMY-----DLKENGDKIPITNENRKEFVISYSDYILNKSVEKQFK
NED4_HUMAN      GQTHQH-----ELKNGGSEIVVTNKNKKEYIYLVIQWRFVNRIQKQMA
NED4_MOUSE      GQTHQH-----ELKTGGSEIVVTNKNKKEYIYLVIQWRFVNRIQKQMA
PUB1_SCHPO      GEVVTI-----DLKPNGRNIEVTEENKREYVDLVTVWRIQKRIEEQFN
RSP5_YEAST      GEVVTV-----DLKPDGRNIEVTDGNKKEYVELYTVQWRIVDRVQEQFK
#=GC RF         xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

UE3A_HUMAN      AFRRGFHMTNESP LKYLFRPEE IELLICGS---RNLD FQALEETTEYDG
UE3A_MOUSE      AFRRGFHMTNESP LKYLFRPEE IELLICGS---RNLD FQALEETTEYDG
NED4_HUMAN      AFKEGFFELIPQ-DLIKIFDENELELLMCGL---GDVDVNDWREHTKYKN
NED4_MOUSE      AFKEGFFELIPQ-DLIKIFDENELELLMCGL---GDVDVNDWREHTKYKN
PUB1_SCHPO      AFHEGFSELIPQ-ELINVDERELELLIGGI---SEIDMEDWKKHTDYR-
RSP5_YEAST      AFMDGFNELIPE-DLVTVFDERELELLIGGI---AEIDIEDWKKHTDYR-
#=GC RF        xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

UE3A_HUMAN      ----GYTRDSVLIREFWEIVHSFTDEQKRLFLQFTTGTDRAPVGG----
UE3A_MOUSE      ----GYTRESVVIREFWEIVHSFTDEQKRLFLQFTTGTDRAPVGG----
NED4_HUMAN      ----GYSANHQVIQWFWKAVLMMDSSEKIRLLQFVTGTSRVPMMNGFAELY
NED4_MOUSE      ----GYSMNHQVIHWFWKAVWMMDSSEKIRLLQFVTGTSRVPMMNGFAELY
PUB1_SCHPO      ----SYSENDQIIKWFWELMDEWSNEKKSRLQFTTGTSRIPVNGFKDLQ
RSP5_YEAST      ----GYQESDEVIQWFWKCSEWDNEQARLLQFTTGTSRIPVNGFKDLQ
#=GC RF         xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

UE3A_HUMAN      --LGKCLKMIIAKNGPDTERLPTSHTCFNVLLLEPSSSEKELKERLLKAIT
UE3A_MOUSE      --LGKCLKMIIAKNGPDTERLPTSHTCFNVLLLEPSSSEKELNVRLKAIT
NED4_HUMAN      GSNQPQSFTVEQWG-TPEKLRRAHTCFNRLDLPPEESFEELWDKLQMAIE
NED4_MOUSE      GSNQPQSFTVEQWG-TPDKLRRAHTCFNRLDLPPEESFDELWDKLQMAIE
PUB1_SCHPO      GSDGPRKFTIEKAG-EPNKLKKAHTCFNRLDLPPEVTSKKDLDHKLSIAVE
RSP5_YEAST      GSDGPRRFTIEKAG-EVQQKPKSHTCFNRVDLPQVVDYDSMKQKLTLAVE
#=GC RF         xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

- Llocs d'unió a E2 conservats
- Llocs d'unió a E2 no conservats
- Centre actiu

HECT domain (E6AP) Alineament per seqüències

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```

E6AP_HUMAN      LYQSLKDLLEYEGNVEDDMMITFQISQIDLFGNPMMYDLKENGDKIPITNENRKEFVNLYS
E6AP_MOUSE      LYQSLKDLLEYEGSVEDDMMITFQISQIDLFGNPMMYDLKENGDKIPITNENRKEFVISYS
NED4_HUMAN      YYNSLRWILE--NDPT-ELDLRFIIDE-ELFGQTHQHELKNGGSEIVVTNKNKKEYIYLVI
NED4_MOUSE      YYNSLRWILE--NDPT-ELDLRFIIDE-ELFGQTHQHELKTGGSEIVVTNKNKKEYIYLVI
PUB1_SCHPO      YYRSLVWILD--NDITGVLDLTFSVED-NCFGEVVTIDLKPNGRNIEVTEENKREYVDLVT
RSP5_YEAST      VYNSLNUMLE--NSIDGVLDLTFSADD-ERFGEVVTVDLKPGRNIEVTDGNKKEYVELYT
      *  **  . * .      . . *      **      . **  *  *  *  *  *  *  *

```

```

E6AP_HUMAN      DYILNKSVEKQFKAFRRGFHMTNESPLKYLFRPEEIELLICGSRNLDFQALEETTEYDGG
E6AP_MOUSE      DYILNKSVEKQFKAFRRGFHMTNESPLKYLFRPEEIELLICGSRNLDFQALEETTEYDGG
NED4_HUMAN      QWRNVNRIQKQMAAFKEGFFELIPQD-LIKIFDENELELLMCGLDVDVDVNDWREHTKYKNG
NED4_MOUSE      QWRNVNRIQKQMAAFKEGFFELIPQD-LIKIFDENELELLMCGLDVDVDVNDWREHTKYKNG
PUB1_SCHPO      VWRIQKRIEEQFNAFHEGFSSELIPQE-LINVFDERELELLIGGISEIDMEDWKKHTDYR-S
RSP5_YEAST      QWRIVDRVQEQFKAFMDGFNELIPED-LVTVFDERELELLIGGIAEIDIEDWKKHTDYR-G
      . .  *  **  **  . .  *  . *  * . ** . *  . *

```

```

E6AP_HUMAN      YTRDSVLIREFWEIVHSFTDEQKRLFLQFTTGTDRAVPVGGGLGKLK-----MIIAKNGP
E6AP_MOUSE      YTRESVVIREFWEIVHSFTDEQKRLFLFTTGTDRAVPVGGGLGKLK-----MIIAKNGP
NED4_HUMAN      YSANHQVIQWFVKAVLMMDSSEKRIRLLQFVTGTSRVPMMNGFAELYGSNGPQSFTVEQWG
NED4_MOUSE      YSMNHQVIHWFVKAVVMMDSSEKRIRLLQFVTGTSRVPMMNGFAELYGSNGPQSFTVEQWG
PUB1_SCHPO      YSENDQIIKWFWELMDEWSNEKKSRLQFTTGTSRIPVNGFKDLQGS DGPRKFTIEKAG
RSP5_YEAST      YQESDEVIQWFVKCVSEWDNEQARLLQFTTGTSRIPVNGFKDLQGS DGPRRFTIEKAG
      *      . * .  **  .      * . .  *  *  ***  *  * . *  *

```

```

E6AP_HUMAN      DTERLFTSHTCFNVLLLEFSSKEKLKERLLKAITYAKGFGML-
E6AP_MOUSE      DTERLFTSHTCFNVLLLEFSSKEKLNVRLLKAITYAKGFGML-
NED4_HUMAN      TPEKLEHRAHTCFNRLLDLPESFEELWDKLQMAIENTQGFDGVD
NED4_MOUSE      TPDKLEHRAHTCFNRLLDLPESFDELWDKLQMAIENTQGFDGVD
PUB1_SCHPO      EPNKLEHKAHTCFNRLLDLPNTSKKDLDHKLSIAVEETIGFGQE-
RSP5_YEAST      EVQQLEKSHTCFNRVDLQVVDYDSMKQKLTLAVEETIGFGQE-
      . **  . *****  .  **  *      . . *  * .  . **

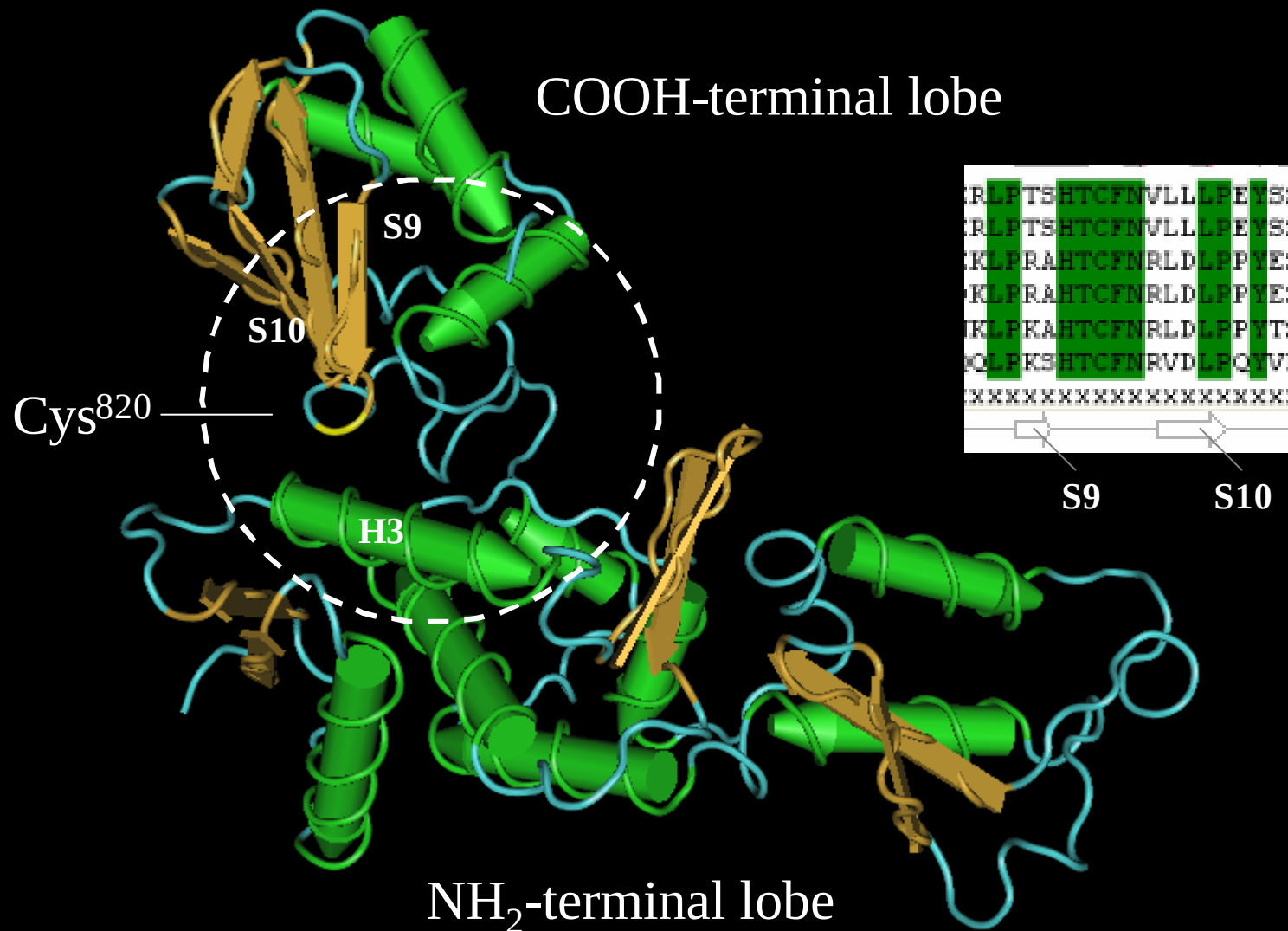
```

■ Llocs d'unió a E2 conservats

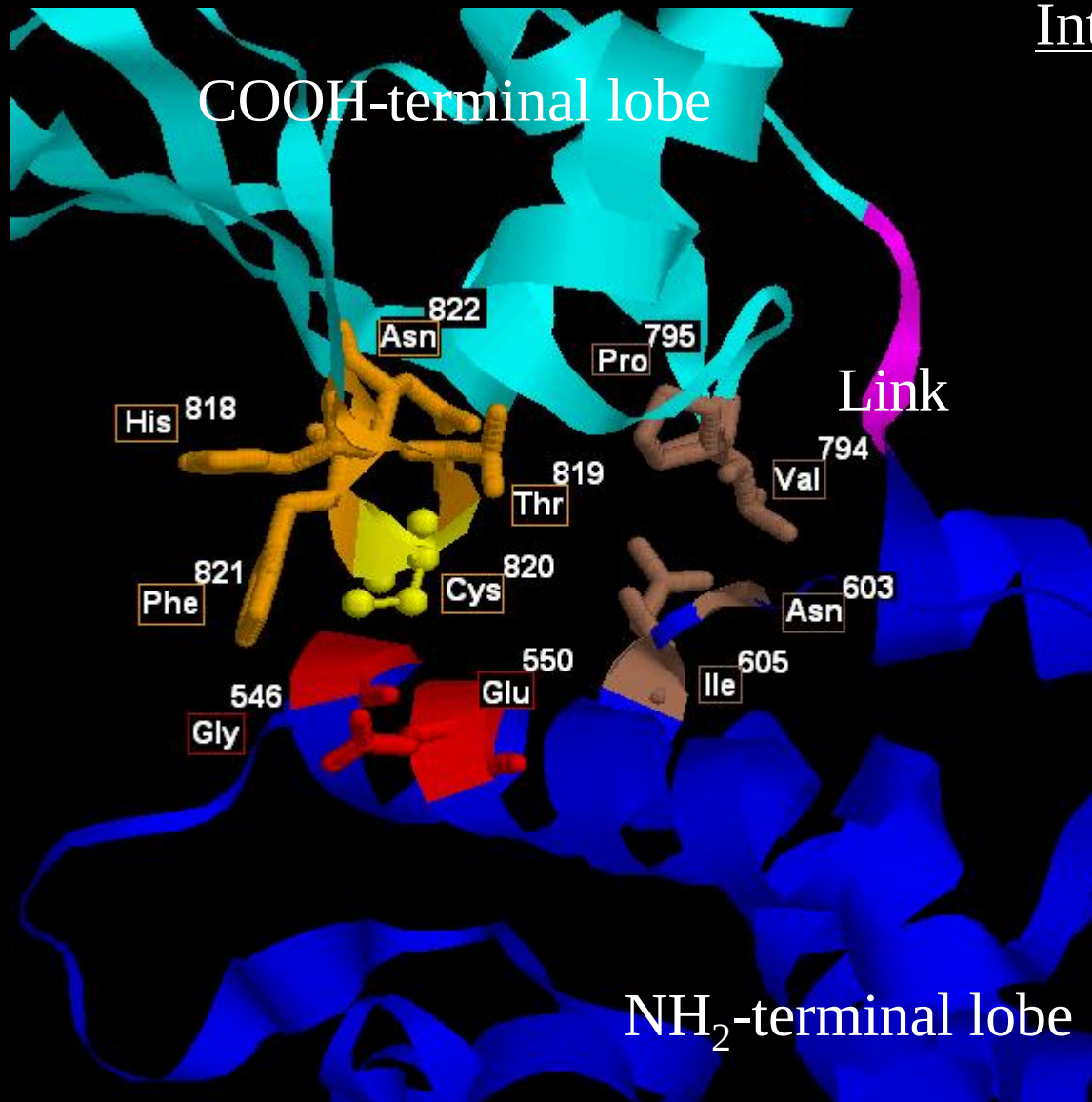
■ Llocs d'unió a E2 no conservats

■ Centre actiu

HECT domain (E6AP) Estructura centre actiu



HECT domain (E6AP) Estructura centre actiu



Interaccions

Ponts d'hidrògen

Thr 819 — Gln 553

Asn 822 — Lys 549

Van der Waals

Phe 821 — Gly 546

— Glu 550

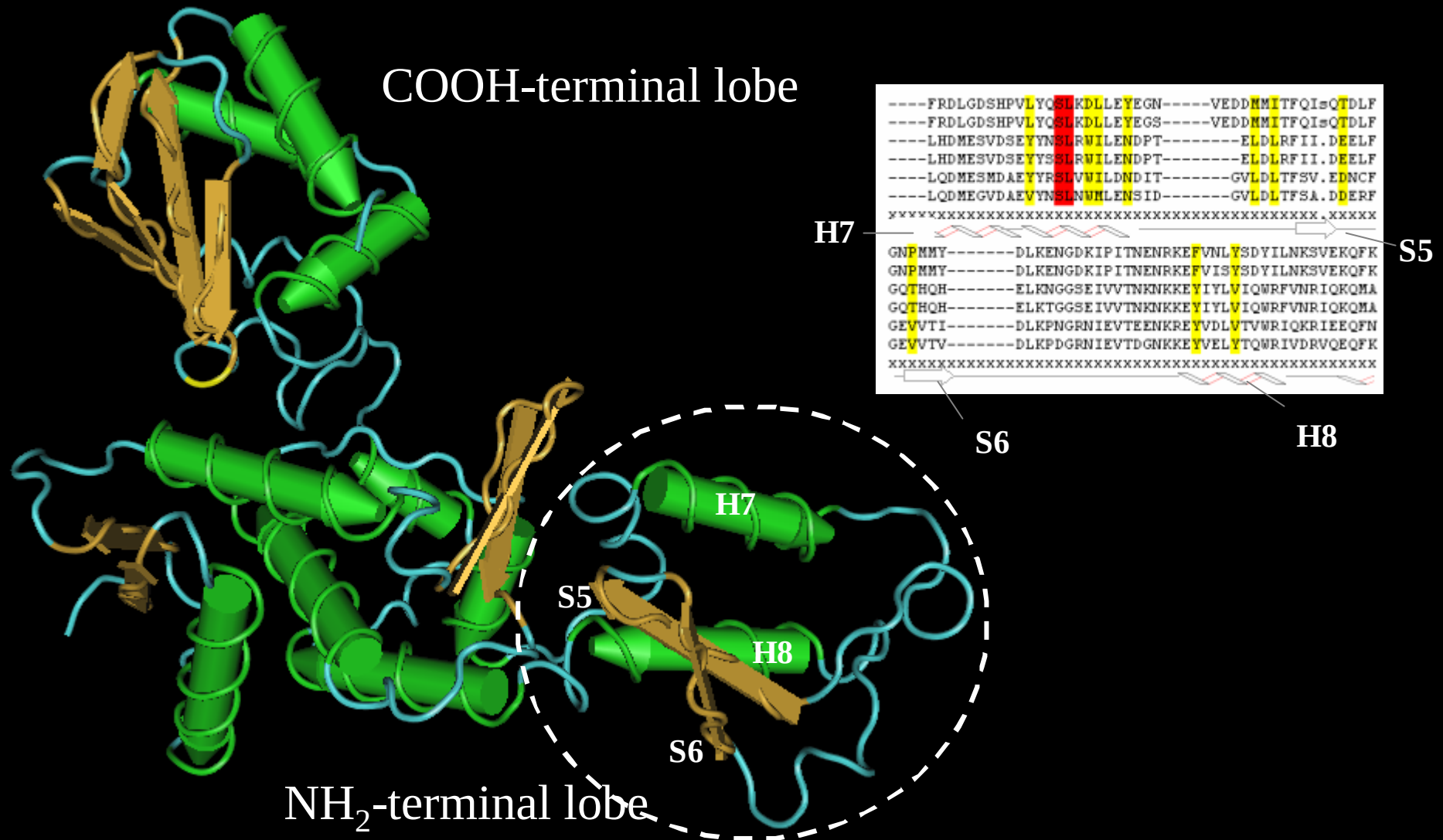
Cys 820 — His 818

Val 794 — Asn 603

Pro 795 — Ile 605

HECT domain (E6AP)

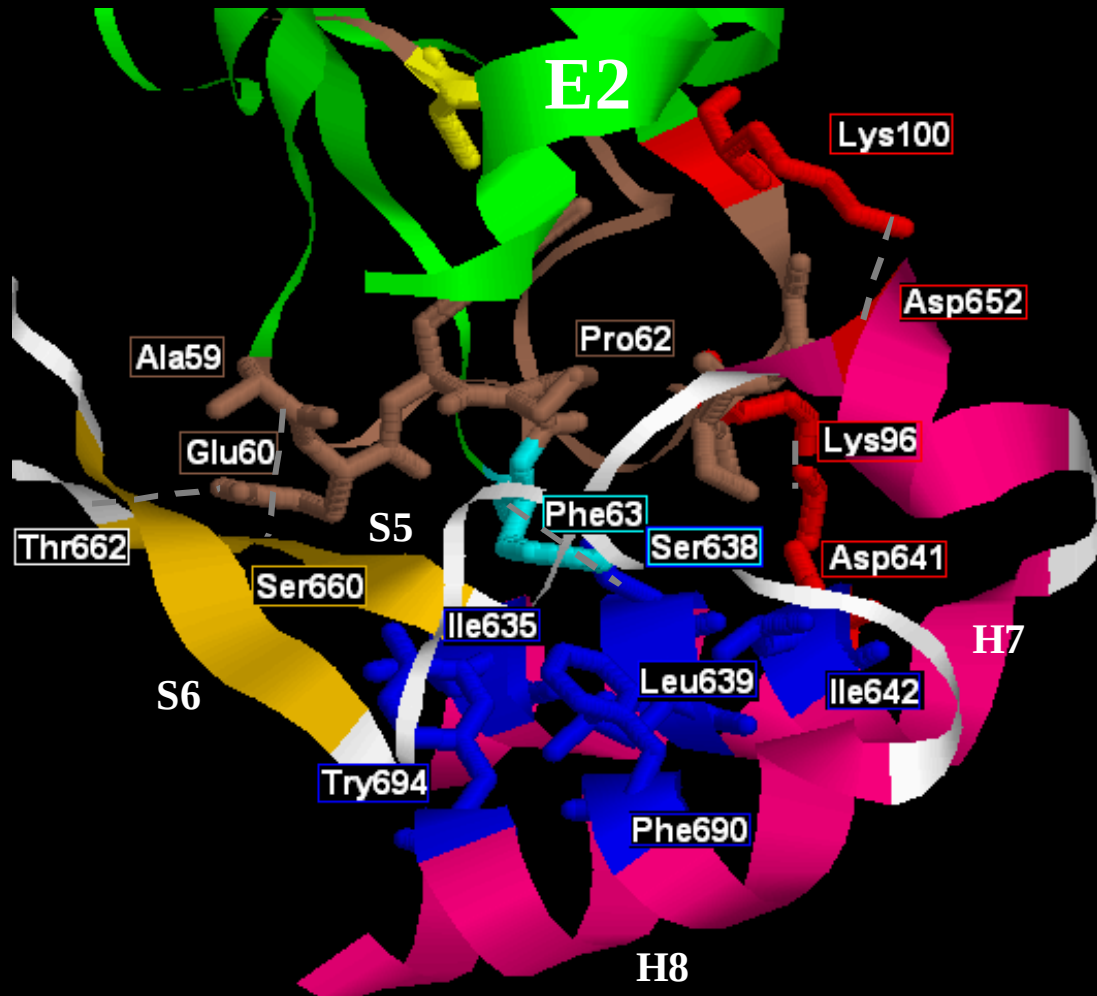
Unió a E2 (UbcH7)



HECT domain (E6AP)

Unió a E2 (UbcH7)

Interaccions



Ponts d'hidrogen

Phe63 _(cad)	—	Ser638
Lys96	—	Asp641
Lys100	—	Asp652 _(cad)
Ala59 _(cad)	—	Ser660
Glu60	—	Thr662

Van der Waals

Phe63	—	Ile635	Ile642
Pro97	—	Phe690	Leu639
Ala98	—	Try694	

RING domain

Consens:

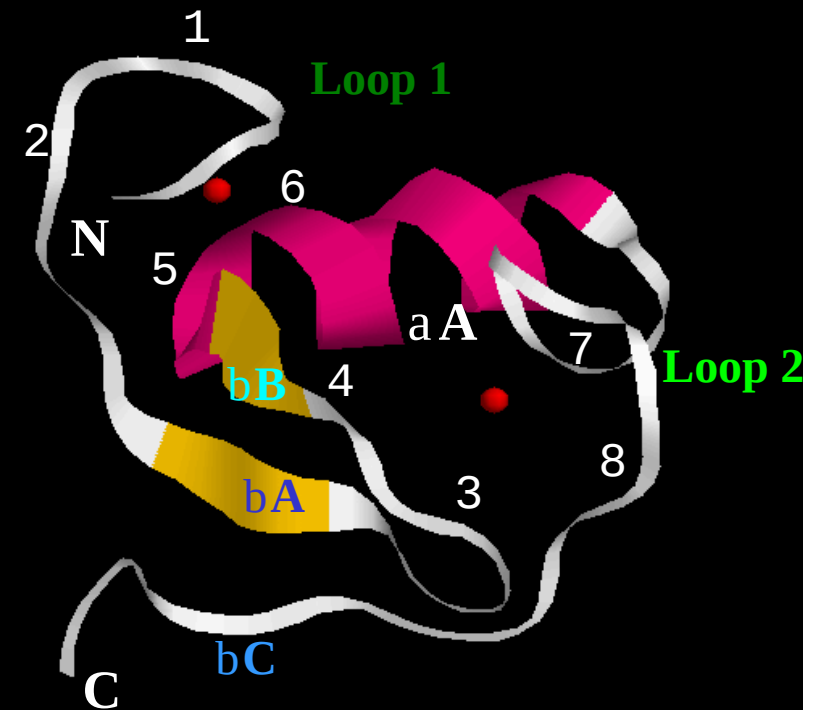
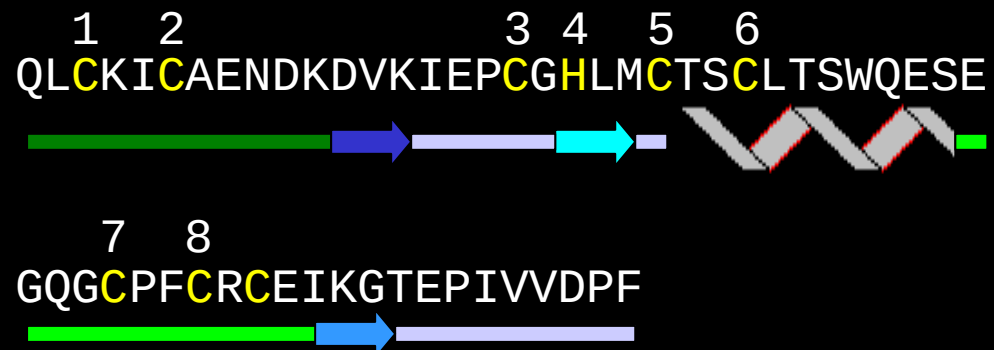
His posició 4

Cys posició 1-3, 6-8

RING-H2 His posició 5

RING-HC Cys posició 5

Residus hidrofòbics (Trp)



Ring domain (c-Cbl)

RING domain

Conservació

CLUSTAL W(1.60) Alineament per seqüència

```
1fbv  LCKICAE-NDKD-VKIEPCGHLMTSCLTSWQESEGQGCPCRCCEIKG-TEPIVVDPF
1bor  -CQAEAK-CPKL----LPCLHTLCSGCLASGMQ----CPICQAPWPLGADTPAL---
1chc  -CLEDPN-NYSM---ALPCLHAFCYVCITRWIRQ-NPTCPLCKVPVESVHTIESDSE
1g25  -CKTTKYRNPSLKLMMVNCGHTLCECVDLLFVRGAGNCPECGTPLRKSFRVQLFED
1jm7  -CSRCTN-ILREPVCCLGGCEHIFCSNCVSDCIGT---GCPVCYTPAWIQDLKINRQLD
1rmd  -CQICEHILADP--VETSCKHLFCRICILRCLKVMGSGYCPSCRYPCFPTDLESPVKSF
1e4u  -CMEPLE-IDDINFFPCTCGYQICRFCWHRIRTDENGLCPACRKPYPE--DPAVYKPL
```

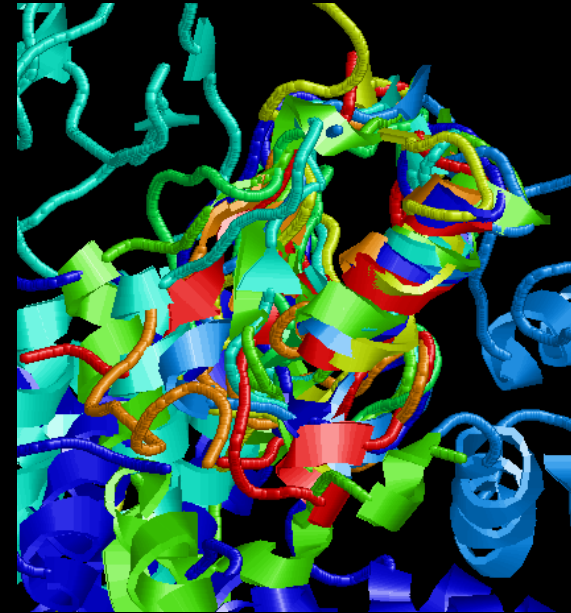
HMMER 2.2g RING

```
P1;1fbv  1CKIC-----AEN---DKDVKIEPCGHLMTSCL-TS---WQESEGQG---CPCrcceikgtepivvdpf
P1;1bor  rCQQC-----QAE---AKCPKLLPCLHTL..CSGCL-E-----ASGMQ-CPICqapwplgadtpal
P1;1chc  rCPIC-----LEDP---SNYSMALPCLHAF..CYVCITRWIR-----QNPT--CPLckvpvesvhtiesds
P1;1g25  v-----CGHTL..CESVDLLFV-----RGAGN-CPECgtplrksnfrvqlfe
P1;1jm7  eCPIC-----LEL---IKEPVSTKCDHIF..CKFCMLKLLN----QKKGPSQ-CPLcknditkrsfqestrif
P1;1rmd  sCQIC-----EHI---LADPVETSCKHLF..CRICI--LRCLKVMG----SY-CPScrypcfptdlespvks
P1;1e4u  eCPLC-----MEPL-EIDDINFFPCTCGYqICRFCW-HRIR----TDENGL--CPACrkpydpavypkpls
#=GC RF  .xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
```

CLUSTAL W(1.60) Alineament per estructura

```
1fbv  LCKICA----E-N--D--KDVKIEPCGH-LMTSCLTSWQE-SEGQGCPCRC-C--EI-K-GTE--P--IVV-----DPF
1bor  RCQQCQ-----A-E--A-KCPKLLPCLH-TLCS---GC-----LEA-SGMQCP-IC-QA-PWP-LGAD-TPAL-----
1chc  RCPICLED---P---S-N-YSMALPCLHAFCYVCITRWI-RQ-N-PTCPLCKVP-V--E-S-VV---H--T-I--E-----S
1g25  GCPRCKTTKYRNPS-L-K-LM-VNVCGHTL-CECVDLLFVR-GAGNCPECGTPLRK-S-N-FR---V--QLF--E-----D
1jm7  RCSRCT-----NI-LR-EPVCLGGCEH-IFCSNCVSDC----IGTGCPVCYT-P--AWIQDLK--I-NRQLDSMIQLCSKLRNLLHDNELSD---
1rmd  SCQICE---H--I-L-A-DP-VETSCKHL-FCRICILRCLKVM-GSYCPSCRYPCFPT-D-LES--PVKSFLNILNSL--MVKCPAQDCNEEVSL
1e4u  ECPLCME---P--LEIDDINFFPCTCGYQ-ICRFCWHRIRTDENGLC---PACRK-P-Y-P-ED---P--AVY--K-----P
```

RING domain



Conservació del domini
RING finger

RING domain (c-Cbl)

~46kDa (47-447)

Dominis TKB i RING + linker

TKB

Four-helix bundle

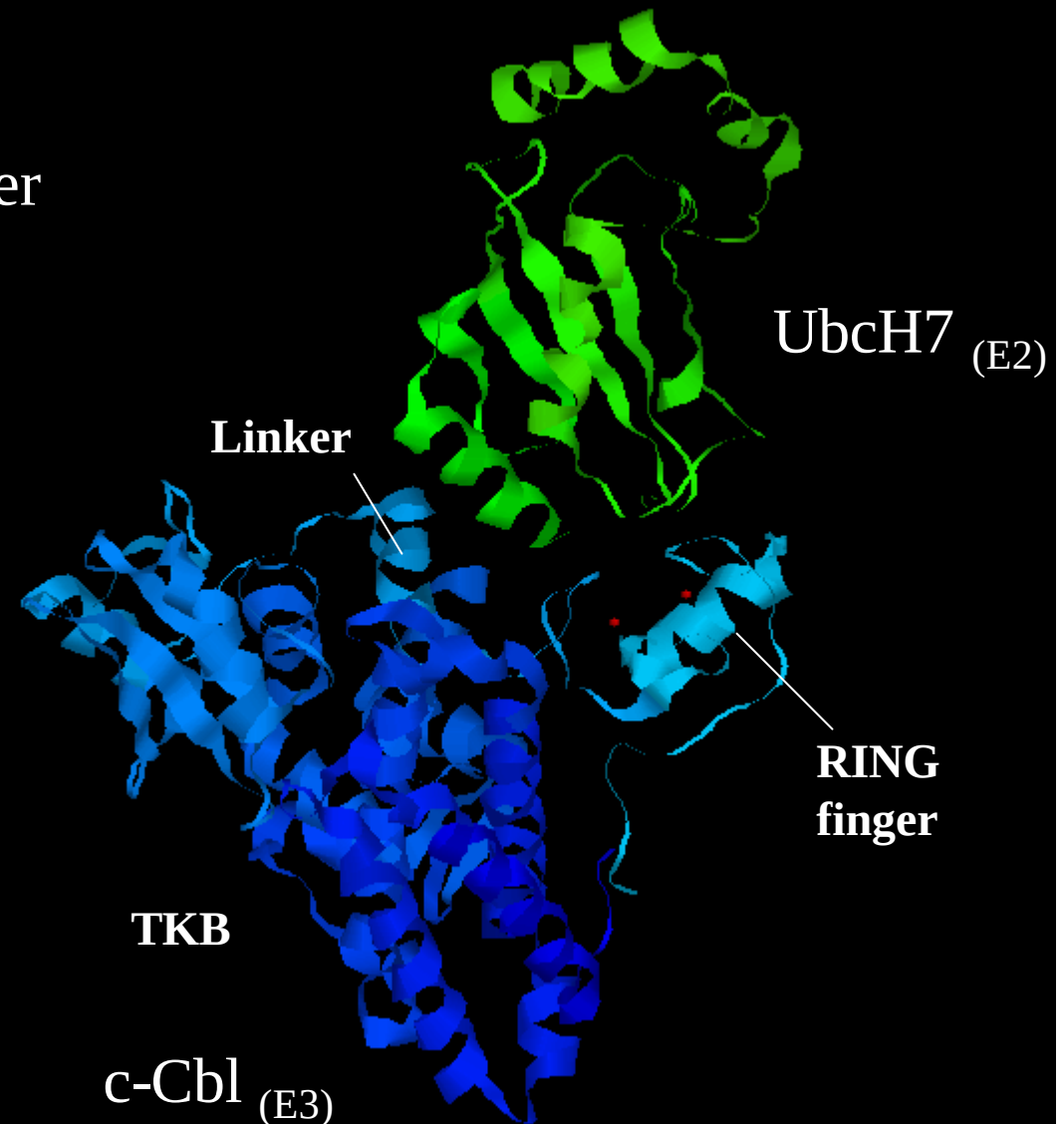
2 EF hand domains

SH2-like

Linker

Loop

α -helix



RING domain (c-Cbl)

Unió a TKB

Interaccions

Ponts d'hidrògen

Asp432 — Lys58
 \ Lys127

Lys389 — Glu135
 \ Phe378_(cad)

Van der Waals

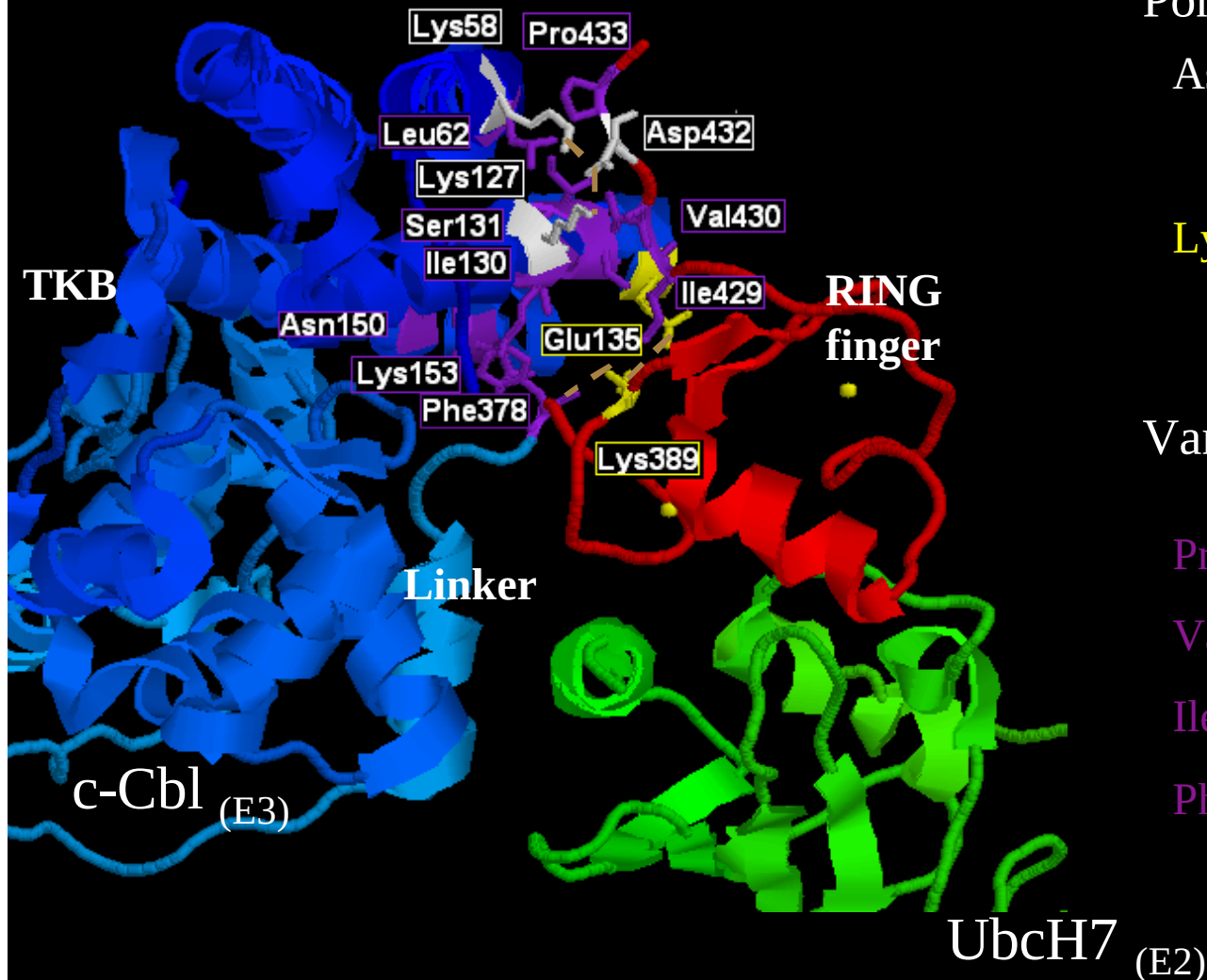
Pro433 — Leu62

Val430 — Ile130

Ile429 — Ser131

Phe378 — Asn150

Lys153



RING domain (c-Cbl)

Unió E2_(UbcH7) - RING - Linker - TKB

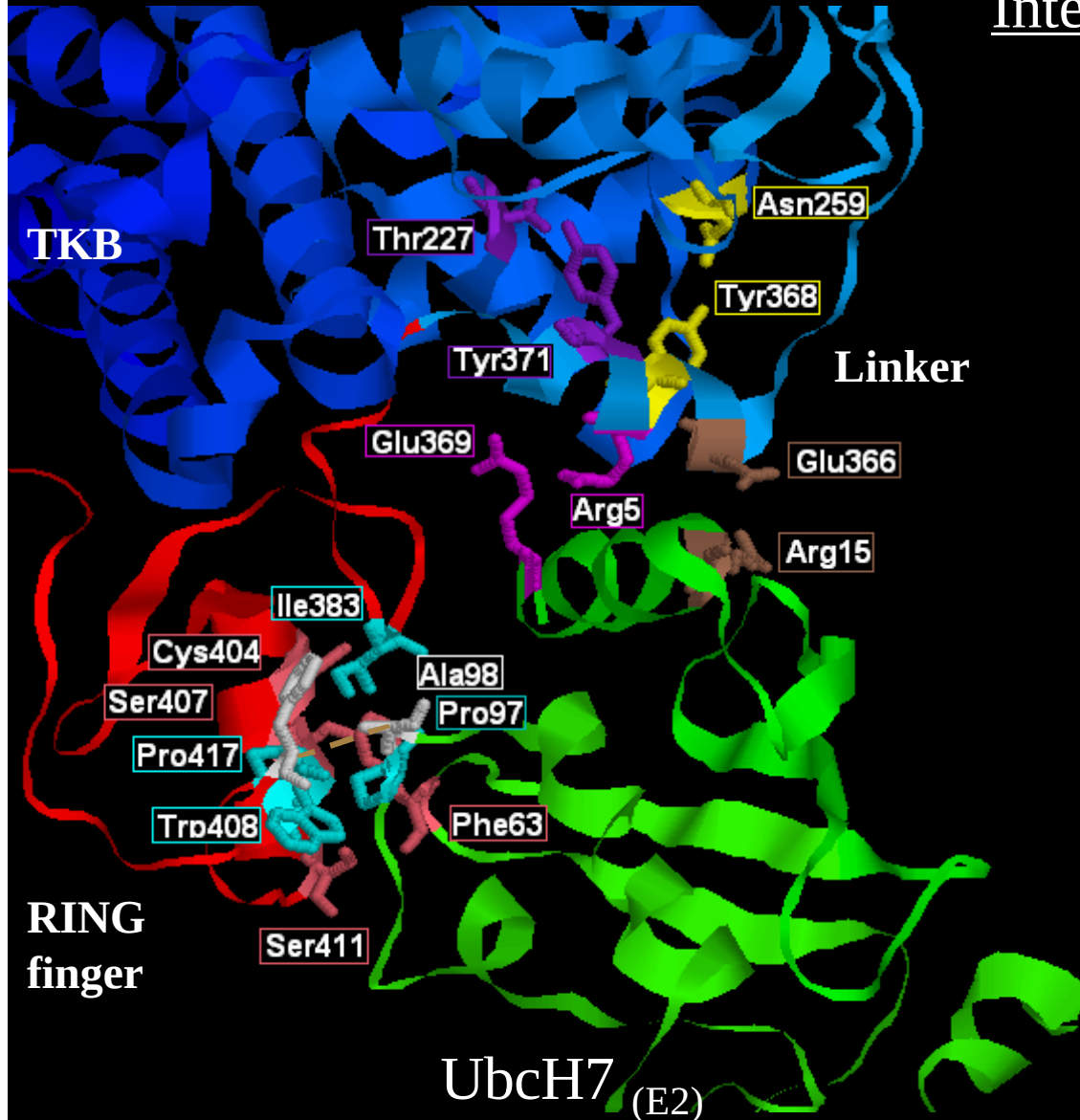
Interaccions E2 - RING

Ponts d'hidrògen

Ala98_(cad) — Pro417_(cad)

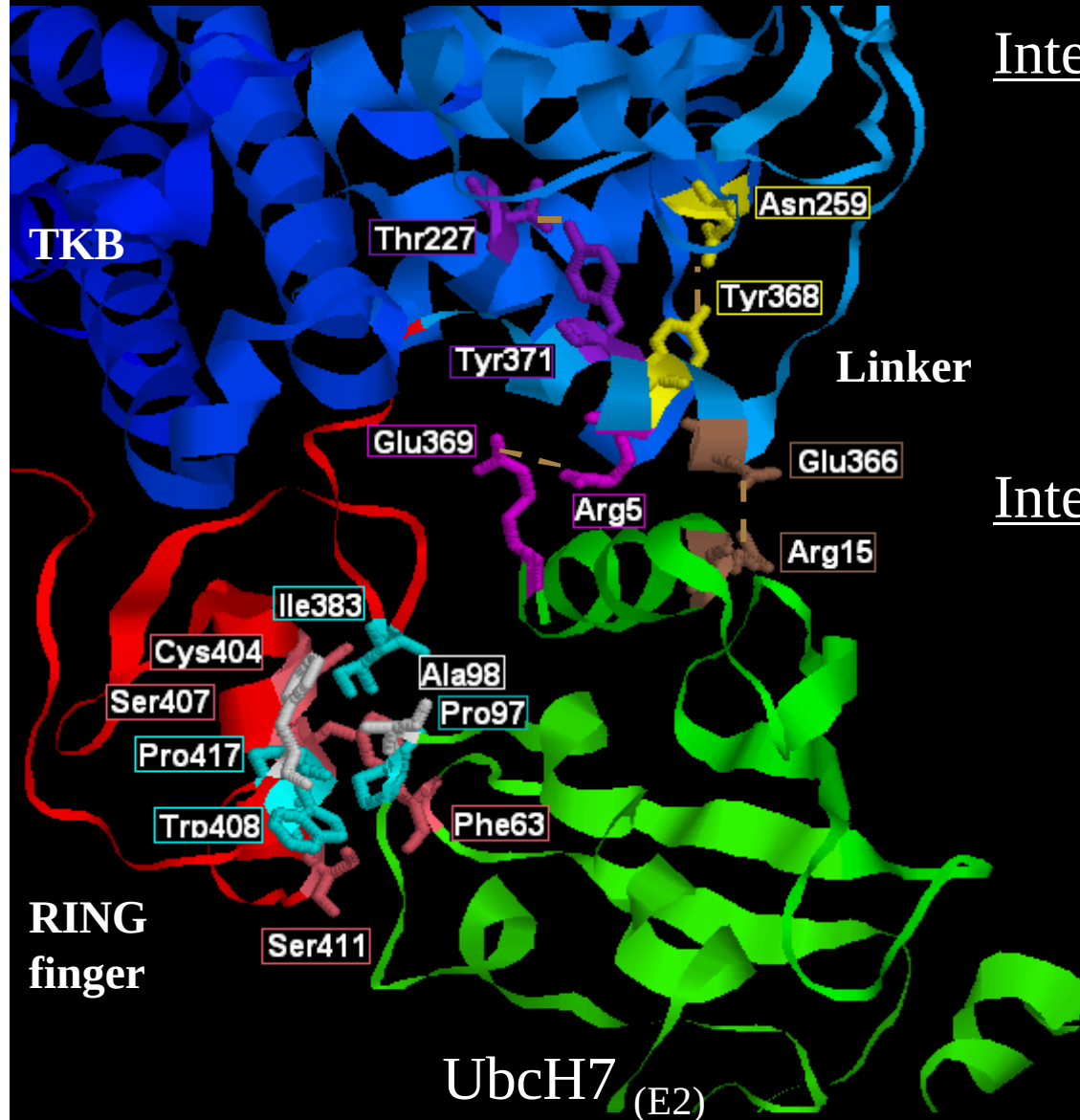
Van der Waals

Pro97	Ile383
	Trp408
	Pro417
Ala98	Phe418
Phe63	Ile383
	Cys404
	Ser407
	Trp408
	Ser411



RING domain (c-Cbl)

Unió E2_(UbCH7) - RING - Linker - TKB



Interaccions E2 - Linker

Ponts d'hidrògen

Arg5 — Glu369

Arg15 — Glu366

Interaccions Linker - TKB

Ponts d'hidrògen

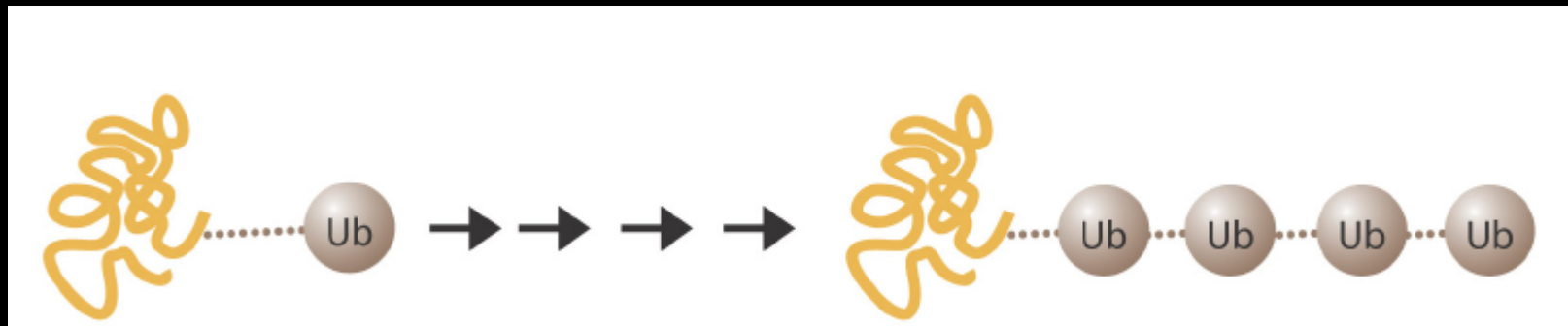
Tyr371 — Thr227

Tyr368 — Asn259

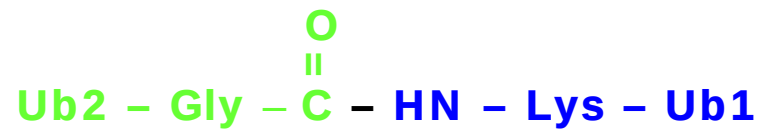
POLIUBIQUITINITZACIÓ

- Unió múltiples molècules d'ubiquitina mitjançant la repetició del procés d'ubiquitinització.

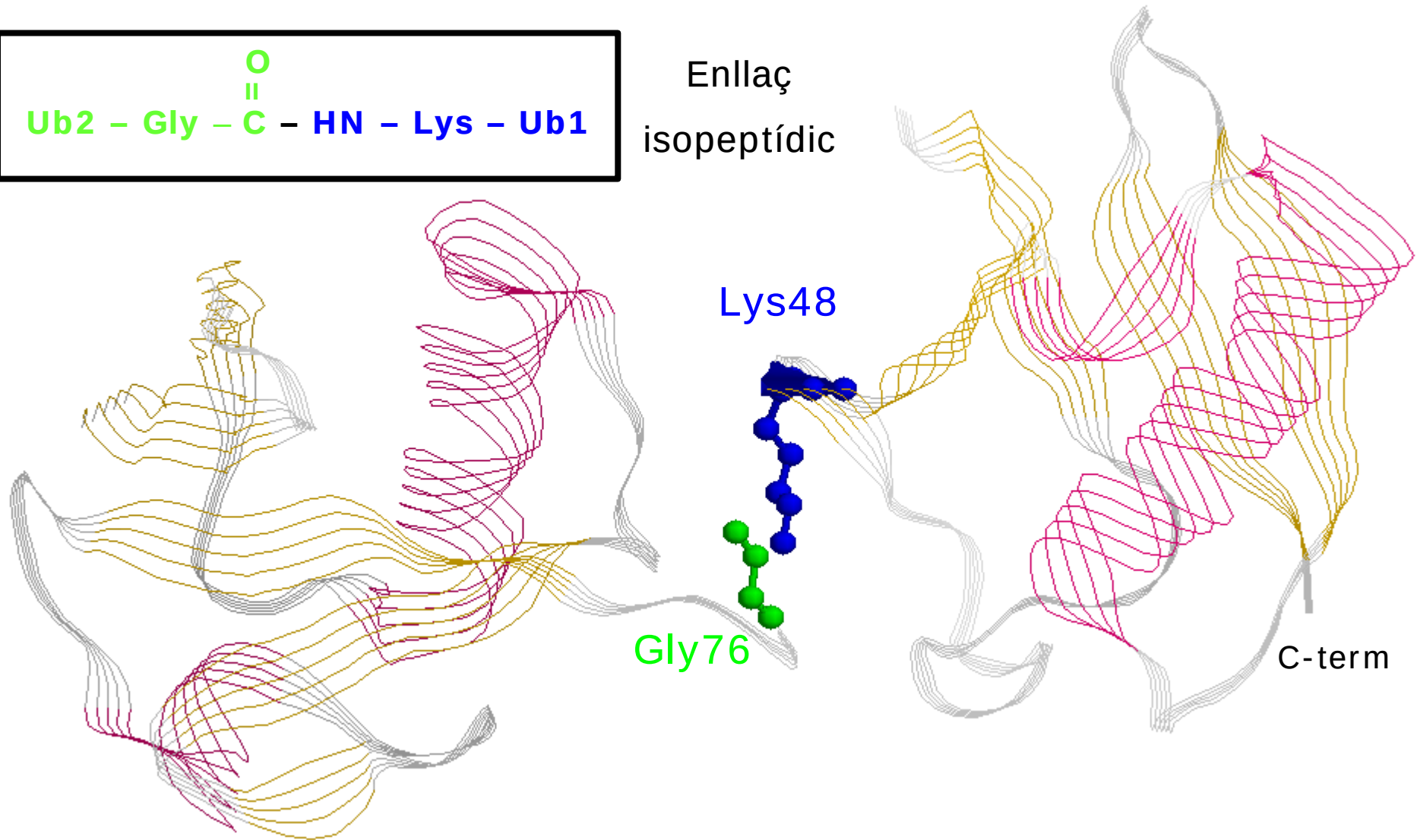
(com més ubiquitines conjugades més probabilitat de degradació per part del proteasoma)



DIUBIQUITINA

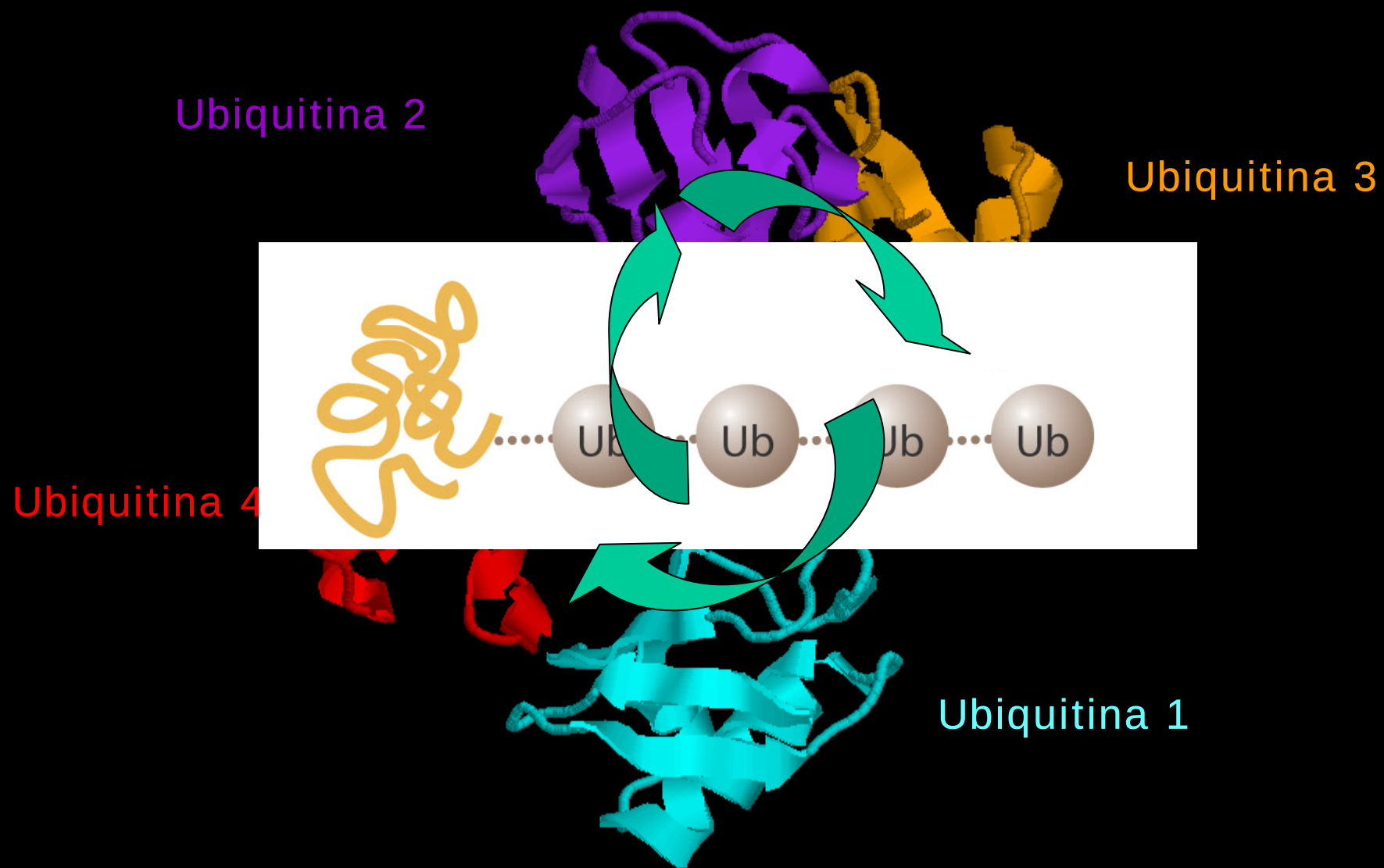


Enllaç
isopeptídic

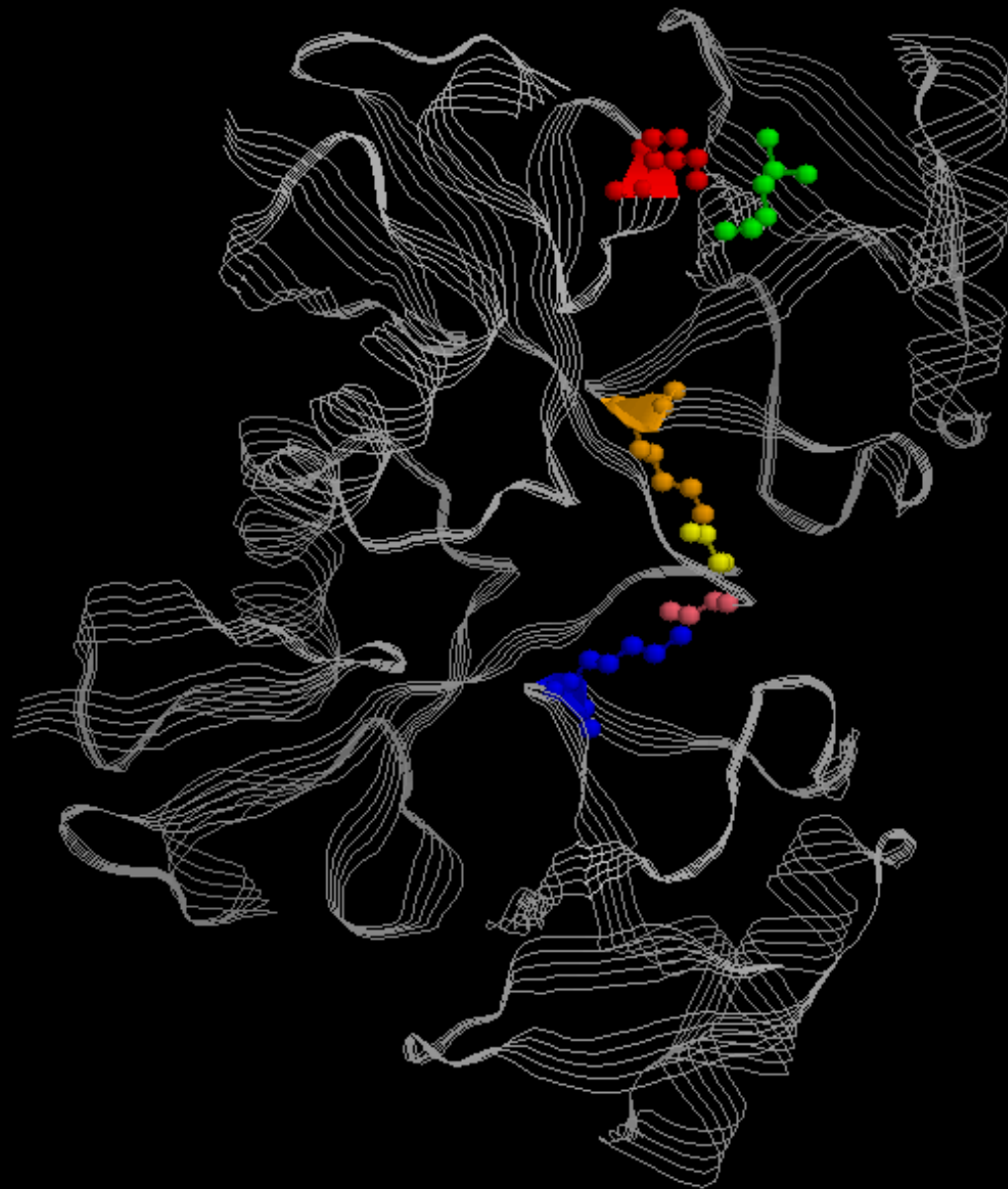


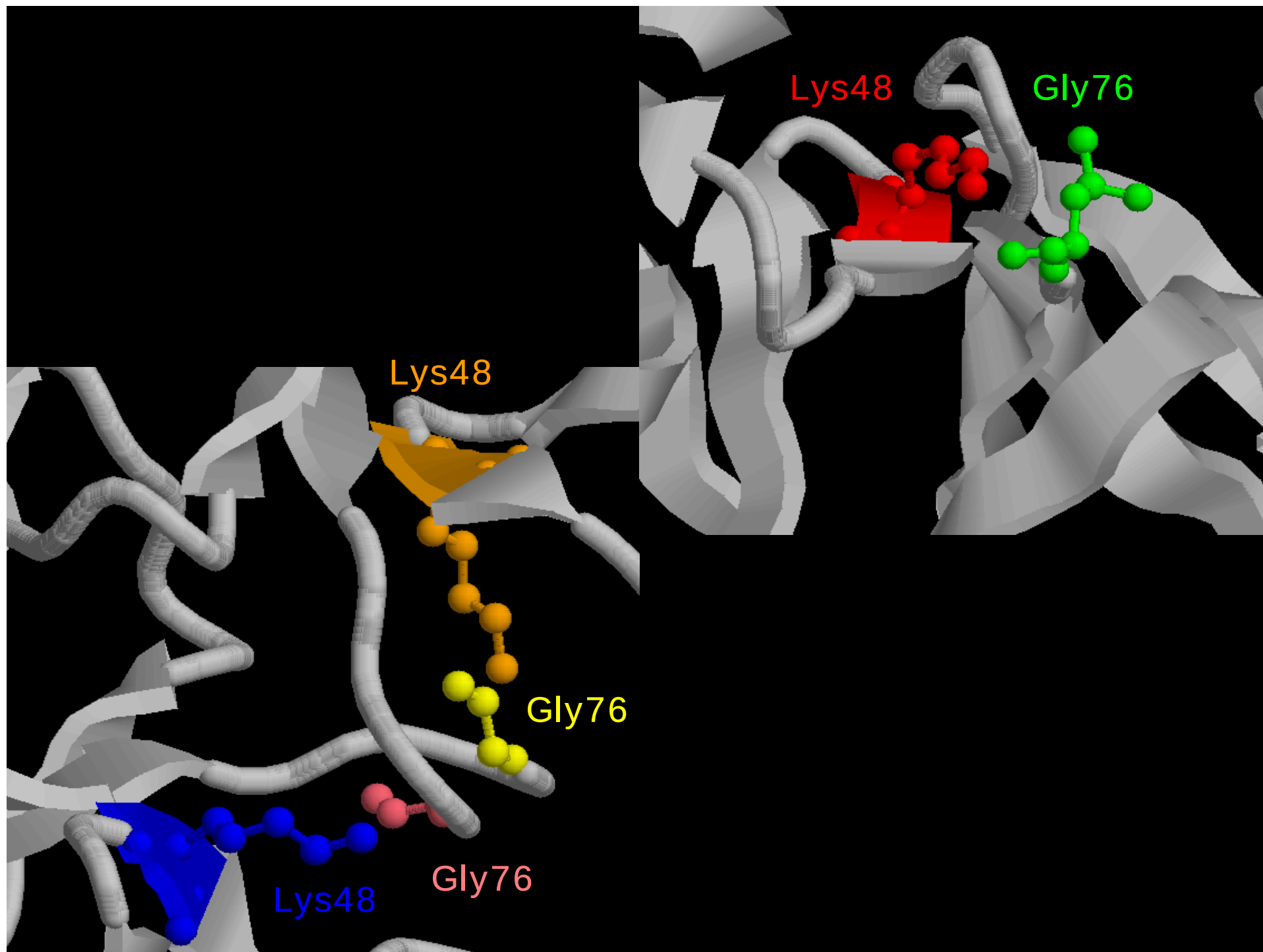
TETRAUBIQUITINA

PDBtoRotate



TETRAUBIQUITINA

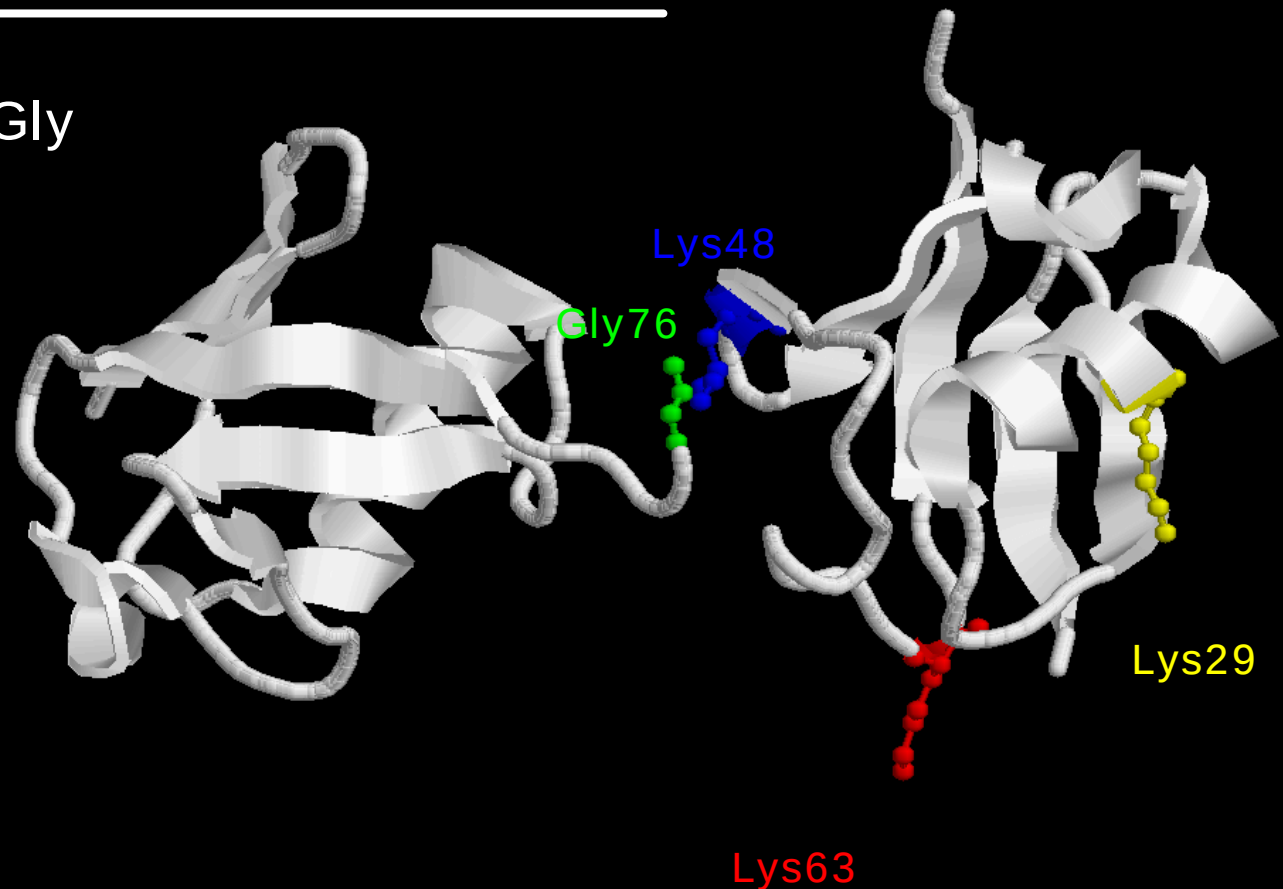




DIUBIQUITINA

Possibles Lys unió a Gly

- **Lys48**: targeting
- **Lys29**: targeting
- **Lys63**: reparació
DNA, resposta
stress, herència
DNA mitocondrial



Preguntes PEM

1. Quin és l'enllaç que es forma entre dues ubiquitines:
 - a) enllaç peptídic
 - b) enllaç isopeptídic**
 - c) enllaç tioéster
 - d) enllaç de tipus no covalent
 - e) cap de les anteriors es correcta

2. Quin dels enzims de la cascada enzimàtica és ATP-depenent
 - a) E1**
 - b) E2
 - c) E3
 - d) Tots són ATP-depenents
 - e) Cap és ATP-depenent

3. Sobre l'enzim activador d'ubiquitina és fals
 - a) Catalitza l'activació de l'ubiquitina mitjançant gast d'ATP
 - b) El contacte inicial ubiquitina-enzim s'estableix per contactes hidrofòbics i ponts d'hidrogen
 - c) S'uneix amb l'ubiquitina mitjançant un enllaç tioèster
 - d) L'enllaç amb l'ubiquitina es produeix mitjançant un residu de cys de l'enzim
 - e) L'enzim s'enllaça amb la part n-terminal de l'ubiquitina**

4. Senyala la resposta correcta

- a) L'enzim activador d'ubiquitina humana no ha estat cristal·litzat.**
- b) Per tal d'estudiar la seva estructura podem utilitzar altres enzims basant-nos en la seva alta homologia de seqüència.
- c) a i b són correctes.
- d) L'estructura de l'enzim activador d'ubiquitina ha estat resolta per RMN
- e) Totes les anteriors són correctes.

5. Sobre l'estructura d'E1:

- a) Pertany a la família $\alpha + \beta$
- b) Consta de dues fenadures on interaccionaran ATP i ubiquitina**
- c) L'estabilització de la unió entre cadenes té lloc per ponts disulfur.
- d) La presencia d'un domini ubiquitin-like impedeix la unió a ubiquitina en estat inactiu.
- e) Totes són falses

6. El domini conservat de E2, que dona nom a la família és:

- a) E2 domain
- b) UBC domain**
- c) UEVS domain
- d) Conjugating domain
- e) Hect domain

7. E2 té capacitat per a unir-se a:

- a) E1
- b) E3
- c) Ubiquitines

d) Totes són correctes

8. Quins dels següents dominis son característics d'E3?

- a) RING domain
- b) Hect domain

c) Les dues anteriors són correctes

d) UBC domain

d) Totes són correctes

9. Quin metall forma part del RING domain?

- a) Magnesi
- b) Ferro
- c) Calci

d) Zinc

e) Totes són correctes

10. Quins aa. són importants al RING domain?

a) Histidina

b) aa. hidrofòbics

c) Les dues anteriors són correctes

d) Cisteina

e) Totes són correctes

Bibliografia

- Arthur L. Haas, Jessie V.B. Warms, Avram Hershko, Irwin A. Rose. *Ubiquitin-activating Enzyme, mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 257, No. 5, Issue of March 10, pp 2543-2548, 1982.
- Helen Walden, Michael S. Podgorski, Brenda A. Schulman. *Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8*. Nature, Vol 422, 20 March 2003.
- William J. Cook *Three-dimensional Structure of a Ubiquitin Conjugating Enzyme (E2)* The journal of Biological Chemistry. Vol 267, No 21, Issue of July 25 , 1992.
- Avram Hershko and Aaron Ciechanover. *The Ubiquitin System* Annu. Rev. Biochem 1998.
- Jian Zhang, Meng Qin, Wei Wang. *Multiple Folding Mechanisms of Protein Ubiquitin*. Proteins 59:565-579, 2005
- Moraes TF, Edwards RA, McKenna S, Pastushok L, Xiao W, Glover JN, Ellison MJ. *Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13*. Nature, August 2001 Vol. 8 No. 8 pp 669-673

- Shengyun Fang, Kevin L. Lorick, Jane P. Jensen, Allan M. Weissman. *RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer*. Seminars in Cancer Biology, 13 5–14, 2003
- Ning Zheng, Ping Wang, Philip D. Jeffrey, and Nikola P. Pavletich. *Structure of a c-Cbl–UbcH7 Complex: RING Domain Function in Ubiquitin-Protein Ligases*. Cell, Vol. 102, 533–539, August 18, 2000
- Lan Huang, Elspeth Kinnucan, Guangli Wang, Sylvie Beaudenon, Peter M. Howley, Jon M. Huibregtse, Nikola P. Pavletich. *Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade*. Science Vol 286 12 november 1999