



Doctoral Thesis

Structural and biophysical characterization of ubiquitin-binding domains in complex with ubiquitin

Author(s):

Burschowsky, Daniel

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006218231> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Doctoral Thesis ETH No. 19017

**Structural and Biophysical
Characterization of Ubiquitin-Binding
Domains in Complex with Ubiquitin**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

DANIEL BURSCHOWSKY

Dipl. Natw. ETH
born September 20th, 1979
citizen of Altsch, Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Gerhard Wider, examiner
Prof. Matthias Peter, co-examiner
Prof. Roland Riek, co-examiner

2010

Summary

In prokaryotic and eukaryotic cells a plethora of different processes is occurring and all of those have to be closely and often codependently regulated. In eukaryotes the ubiquitin system is an important regulation machinery that plays a role in many biological pathways, including protein degradation, DNA damage response and repair, endocytosis, apoptosis signaling and more. The ubiquitination of proteins is a post-translational modification (PTM) that is accomplished by forming a covalent isopeptide bond between a lysine side chain of the target protein and the C-terminus of a ubiquitin moiety. Target proteins can be monoubiquitinated, multi(mono)ubiquitinated or polyubiquitinated by ubiquitin chains that are linked via one of the seven lysines on ubiquitin via a three-step enzymatic cascade. Ubiquitin-binding domains (UBDs) provide specificity to the intricate ubiquitin system, which is also involved in translesion synthesis (TLS). TLS is a mechanism for replicating DNA over damaged regions during S-phase of the cell cycle by means of specialized TLS polymerases, which all contain C-terminal UBDs. Upon stalling of replicative forks at sites of DNA damage, the UBDs of the TLS polymerases interact with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to regulate the interchange between processive DNA polymerases and TLS polymerases. In this context the ubiquitin-binding motifs (UBMs) of TLS polymerases of higher eukaryotes, Rev1 and polymerase iota (*Pol ι*), were found to bind ubiquitin in an uncharacteristic and Ile44-independent manner compared to other UBDs.

We report a biophysical analysis and the solution structures of the two conserved UBM domains located in the C-terminal tail of murine *Pol ι* in complex with ubiquitin. The structures of the UBM-ubiquitin complexes were calculated using sets of NMR spectra for both individual proteins and intermolecular distance constraints. The 35 amino acid domains contain a small hydrophobic core and fold into a helix-turn-helix motif, which belongs to a novel domain fold. Similar to other UBDs, UBM domains bind to ubiquitin on the hydrophobic surface delineated by Leu8, Ile44 and Val70; the interface is, however, slightly shifted away from Ile44 towards the C-terminus. In

addition, Polz UBMs also use electrostatic interactions with Arg42 on ubiquitin to stabilize binding, which are presumably highly conserved. NMR and fluorescence spectroscopy measurements revealed that UBMs bind monoubiquitin and Lys63-linked ubiquitin chains, but not Lys48-linked chains. Moreover, several ubiquitin mutants containing alterations at or near the binding surface were investigated for their binding properties. Importantly, these biophysical data are supported by functional studies, where yeast cells expressing ubiquitin mutants with an impaired ability to bind UBM are viable, but sensitive to DNA damaging conditions that specifically require UBM-mediated TLS for repair.

There are other PTMs related to ubiquitination that make use of ubiquitin-like modifiers, which show a ubiquitin-like fold despite low sequence homology. An example is NEDD8, whose covalent attachment to target proteins is also mediated by three-step enzymatic cascades. NEDD8 itself is crucial for the correct functioning of ubiquitination cascades involving RING-type E3 ligases. In *S. cerevisiae* it is attached to the cullin subunit of RING-type E3 ligases, dependent on the conserved protein Dcn1. Dcn1 possesses an N-terminal UBD, of the family of ubiquitin-associated domains (UBA), which also facilitates dimerization of Dcn1. Apparently neither dimerization, nor an interaction with ubiquitin is necessary for the *in vivo* function of Dcn1, but its UBA may play a more subtle, but non-crucial role.

We report the solution structures of the UBA domain of *S. cerevisiae* Dcn1 free and bound to ubiquitin, which are in good agreement with the full-length crystal structure of Dcn1. We also analyzed the binding affinity and dynamics by means of NMR experiments. Additionally, molecular docking was performed using the program HADDOCK to model structures of the UBA-ubiquitin complex. UBA binds ubiquitin on the classical hydrophobic patch and possibly electrostatically interacts with the charged side chain of Lys48, which could prohibit binding of Lys48-linked ubiquitin chains.

Zusammenfassung

Eine Unmenge von verschiedenen Prozessen läuft in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ab, und diese müssen alle genau, und oft in gegenseitiger Abhängigkeit, reguliert werden. In Eukaryoten stellt das Ubiquitinsystem eine wichtige Regulationsmaschinerie dar, die in vielen biologischen Stoffwechselwegen eine Rolle spielt, welche Proteinabbau, Antwort auf und Reparatur von DNA Schäden, Endocytose, Apoptoseregulation und andere beinhalten. Die Ubiquitinierung von Proteinen ist eine posttranslatorische Modifikation (PTM), die über das Knüpfen einer kovalenten Isopeptidbindung zwischen einer Lysinseitenkette am Zielprotein und dem C-Terminus einer Ubiquitineinheit erreicht wird. Die Zielproteine können mithilfe einer enzymatischen Kaskade, die drei Schritte beinhaltet, monoubiquitiniert, multi(mono)ubiquitiniert oder mit Ubiquitinketten, die über eines der sieben Lysine von Ubiquitin miteinander verküpft sind, polyubiquitiniert werden. Ubiquitinbindedomänen (UBD) verleihen dem hochkomplexen Ubiquitinsystem, welches auch in der ‘translesion synthesis’ (Synthese über DNA Läsionen, TLS) involviert ist, Spezifität. TLS ist ein Mechanismus, der spezialisierte TLS Polymerasen, welche alle C-terminale UBD enthalten, verwendet, um während der S-Phase des Zellzyklus DNA über beschädigte Regionen hinweg zu synthetisieren. Wenn der Fortschritt einer Replikationsgabel an einer Stelle mit DNA Schäden blockiert wird, interagieren die UBD der TLS Polymerasen mit ubiquitiniertem ‘proliferating cell nuclear antigen’ (Zellkernantigen proliferierender Zellen, PCNA), um den Austausch zwischen prozessiven DNA Polymerasen und TLS Polymerasen zu regulieren. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Ubiquitinbindemotive (UBM) von TLS Polymerasen höherer Eukaryoten, Rev1 und Polymerase *iota* (*Pol ι*), Ubiquitin verglichen mit anderen UBD in einer nicht charakteristischen Art binden, die nicht von Ile44 abhängig ist.

Wir zeigen hier eine biophysikalische Analyse und die Lösungsstrukturen der beiden konservierten UBM Domänen, die sich im C-terminalen Fortsatz von *Pol ι* der Maus befinden, im Komplex mit Ubiquitin. Die Strukturen der gesamten Komplexe wurden mithilfe von je einem Satz von NMR

Spektren beider einzelnen Proteine und intermolekularen Distanzobergrenzen berechnet. Die Domänen, die 35 Aminosäuren gross sind, enthalten je ein kleines, hydrophobes Zentrum und falten sich in ein sogenanntes Helix-Turn-Helix Motiv, das zu einem neuen Typus von Proteinfaltungsstruktur gehört. Ähnlich anderen UBD binden UBM Domänen Ubiquitin an der hydrophoben Oberfläche, die durch Leu8, Ile44 und Val70 begrenzt ist; die Berührungsfläche ist allerdings von Ile44 leicht gegen den C-Terminus hin verschoben. Ausserdem verwenden UBM elektrostatische Interaktionen mit Arg42 auf Ubiquitin, die vermutlich stark konserviert sind, um die Bindung zu stabilisieren. NMR- und Fluoreszenzspektroskopiemessungen zeigen, dass UBM Monoubiquitin und Lys63-verknüpfte Ubiquitinketten binden, jedoch keine Lys48-verknüpfte Ubiquitinketten. Zusätzlich untersuchten wir verschiedene Ubiquitinmutanten, welche Veränderungen auf oder neben der Bindungsoberfläche enthielten, auf ihre Bindungseigenschaften. Diese biophysikalischen Daten werden durch funktionale Studien gestützt, in denen Hefezellen, die Ubiquitinmutanten mit einer eingeschränkten Fähigkeit UBM zu binden exprimierten, zwar überlebensfähig waren, jedoch andererseits empfindlich auf DNA schädigende Bedingungen, die spezifisch durch UBM abhängige TLS repariert werden, reagierten.

Es gibt auch andere, mit Ubiquitinierung verwandte, PTM, die ubiquitinähnliche Modifikatorproteine nutzen. Deren Proteinfaltung ist derjenigen von Ubiquitin sehr ähnlich, obwohl sie nur eine geringe Sequenzhomologie mit Ubiquitin besitzen. Ein Beispiel dafür ist NEDD8, das ebenfalls durch eine enzymatischen Kaskade, die auch drei Schritte beinhaltet, kovalent an Zielproteine geknüpft wird. NEDD8 selbst ist ausserdem für die Funktion von Ubiquitinierungskaskaden notwendig, die über E3 Ligasen vom RING-Typus ablaufen. In *S. cerevisiae* wird NEDD8 in einer vom konservierten Protein Dcn1 abhängigen Weise an Cullin, eine Untereinheit der E3 Ligasen vom RING-Typus, geknüpft. Dcn1 besitzt eine N-terminale UBD aus der Familie der ‘ubiquitin-associated domains’ (Ubiquitinassoziierte Domäne, UBA), welche ausserdem die Dimerisierung von Dcn1 verursacht. Scheinbar ist weder diese Dimerisierung noch die Interaktion mit Ubiquitin notwendig

ZUSAMMENFASSUNG

für die Funktion von Dcn1 *in vivo*, aber UBA könnte immer noch eine subtilere, nicht zwingend notwendige Funktion ausüben.

Wir zeigen hier die Lösungsstrukturen der UBA Domäne von *S. cerevisiae* Dcn1 in freier und an Ubiquitin gebundener Form; die Strukturen sind in guter Übereinstimmung mit der Röntgenkristallstruktur vom gesamten Dcn1. Ausserdem analysierten wir die Bindungsaffinität und dynamische Eigenschaften von UBA mithilfe von NMR Experimenten. Zusätzlich konnten wir Strukturen des Komplexes von UBA-Ubiquitin, unter Zuhilfenahme von molekularem Docken, erstellen, das durch das Programm HADDOCK berechnet wurde. UBA bindet Ubiquitin an dessen klassischer hydrophober Stelle und interagiert möglicherweise über eine elektrostatische Wechselwirkung mit der geladenen Seitenkette von Lys48, was die Interaktion mit Lys48-verknüpften Ubiquitinketten verhindern könnte.