

# Výskum ubikvitinácie proteínov v onkológii

## Protein Ubiquitination Research in Oncology

Faktor J., Pjehová M., Hernychová L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Súhrn

**Východiská:** Ubikvitinácia je dôležitá posttranslačná modifikácia proteínov, ktorá reguluje mnoho signalizačných dráh u eukaryot. Aberantná ubikvitinácia je molekulárnou príčinou niektorých onkologických, neurodegeneratívnych, imunitných a kardiovaskulárných ochorení. Rozvoj hmotnostne spektrometrických metód ponúka možnosť kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy ubikvitinácie proteínov v biologickom materiáli onkologických pacientov. Výskum ubikvitinácie môže objasniť molekulárnu príčinu zmeny hladiny niektorých proteínov, ktoré vystupujú ako onkogény alebo tumor supresory. **Cieľ:** Cieľom článku je priblížiť čitateľovi zmysel a dôležitosť ubikvitinácie v niektorých molekulárnych procesoch prebiehajúcich v ľudskom tele. Predovšetkým je dôraz kladený na popis zapojenia ubikvitinácie do malígnych procesov. Na literárnu rešerš nadväzujeme priblížením procesu hmotnostne spektrometrickej identifikácie ubikvitinácií prostredníctvom diglycylových zbytkov v sekvencii proteínu CHIP. Predstavujeme identifikáciu ubikvitinácie proteínov metódami tandemovej hmotnostnej spektrometrie, proces validácie tandemových hmotnostných spektier a popis časovej závislosti ubikvitinácie proteínu CHIP. **Záver:** Literárna rešerš oboznamuje čitateľa so známymi aberantnými mechanizmami ubikvitinácie u malígnych ochorení. Úspešne vytvorená hmotnostne spektrometrická metóda môže slúžiť na identifikáciu pozícií ubikvitinácie v sekvenciách proteínov obsiahnutých v lyzátoch nádorového tkaniva.

### Klíčové slová

ubikvitin – hmotnostná spektrometria – neoplazmy – proteín – proteomika

### Summary

**Background:** Ubiquitination is a vital posttranslational protein modification involved in the regulation of many eukaryotic signalling pathways. Aberrant ubiquitin signalling is known to be a molecular causality of certain cancer, neurodegenerative, immune system or cardiovascular diseases. The recent development of mass spectrometry methods enables qualitative and quantitative ubiquitination analysis in biological material from cancer patients. Research of ubiquitination may clarify the molecular cause of aberrant changes in the protein level of tumour suppressors or oncogenes. **Purpose:** We aim to explain the meaning and importance of ubiquitination in certain molecular processes taking place in the human body. We hereby emphasise the connection between ubiquitination and malignant processes. A literature search is followed by introducing our mass spectrometry platform intended for ubiquitin identification via diglycyl remnants in the CHIP protein sequence. The aim is to introduce tandem mass spectrometry identification of ubiquitin modification, ubiquitination tandem mass spectra validation and the time-dependent manner of CHIP ubiquitination to the reader. **Conclusion:** A literature search familiarises the reader with known mechanisms of aberrant ubiquitination in malignant diseases. A successfully optimised mass spectrometry platform could serve as a potent tool for determining ubiquitin position in proteins that are a part of real tumour samples.

### Key words

ubiquitin – mass spectrometry – neoplasms – proteins – proteomics

Práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413 and MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jakub Faktor, Ph.D.  
Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: jakub.faktor@mou.cz

Obdržané/Submitted: 14. 6. 2019

Prijaté/Accepted: 27. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193556

## Úvod

Ubikvitín je krátky polypeptid (8,6 kDa) vyskytujúci sa takmer u všetkých eukaryotických organizmov [1]. Väzba ubikvitínu na proteín prebieha procesom ubikvitinácie, ktorá bola objavená už začiatkom 80. rokov minulého storočia [2]. Popis súvislostí medzi ubikvitináciou a proteostázou bol základom pre ďalšie objavy, ktoré v roku 2004 vyústili v udeľenie Nobelovej ceny Aaronovi Ciechanoverovi, Avramovi Hershkovi a Irwinovi Rosemu za objasnenie mechanizmu degradácie proteínov ubikvitináciou [3].

Ubikvitinácia je charakteristická pripojením C-konca ubikvitínu kovalentnou izopeptidickou väzbou k  $\epsilon$ -amino skupine cieľového lyzínového zbytku v sekvencii proteínu [4]. Jedná sa o sofistický viacstupňový ATP-dependný proces katalyzovaný tromi skupinami enzýmov, E1, E2 a E3 ligázami. V prvom kroku dochádza k tvorbe thio-esterovej väzby medzi ubikvitínom a enzýmom E1 (ubiquitin activating enzyme). Tvorba komplexu E1-ubikvitín umožňuje tvorbu thio-esterovej väzby medzi enzýmom E2 (ubiquitin conjugating enzyme) a ubikvitínom. Následne je potrebná E3 ubikvitín ligáza, ktorá zaručí väzbu ubikvitínu na špecifické miesta v sekvencii modifikovaného proteínu [5]. Špecifita ubikvitinácie môže byť modulovaná posttranslačnými modifikáciami E2, E3 ubikvitín ligáz. Význam ubikvitinácie závisí tiež na posttranslačných modifikáciách samotného ubikvitínu a na umiestnení modifikácie v sekvencii proteínu [6,7], existuje teda akýsi „ubikvitínový kód“ [8].

Cieľom nášho výskumu je popis ubikvitínového kódu proteínu CHIP. Vzhľadom k prítomnosti množstva potencionálnych ubikvitináčnych miest v sekvencii CHIP možno predpokladať autoubikvitináciu v rôznych doménach proteínu v závislosti na stave organizmu. Analýza ubikvitinácie proteínu CHIP za rôznych podmienok pomôže odhaliť preferenčné miesta ubikvitinácie v sekvencii, ktoré môžu súvisieť aj s aktivitou niektorých proteínov zapojených v onkogénnych signalizačných dráhach. K výskumu ubikvitinácie sme vytvorili metódu tandemovej hmotnostnej spektrometrie (liquid chromatography tandem-mass

spectrometry – LC-MS/MS) na identifikáciu diglycylových (GlyGly) zbytkov ubikvitínu na lyzínach a jej funkčnosť sme overili sledovaním autoubikvitinácie E3 ubikvitín ligázy CHIP za rôznych podmienok. Skúmali sme aj efekt prídavku ATP do reakčnej zmesi a časový priebeh ubikvitinácie proteínu CHIP.

## „Ubikvitínový kód“ – modulácia významu ubikvitinácie

K posttranslačnej modifikácii jedinou molekulou ubikvitínu dochádza zriedka, cieľové proteíny sú väčšinou polyubikvitinované. Ubikvitín môže byť ďalej ubikvitinovaný na siedmych zbytkoch lyzínu a topológia polyubikvitinácie môže vytvárať komplexné vzorce s rôznym významom. Aktivita polyubikvitinácie je závislá na ich štruktúre a na množstve ubikvitínov [9]. Najfrekvencovanejšia je ubikvitinácia na Lys48 predurčujúca proteín k degradácii v proteazóme procesmi proteolýzy. Bolo dokázané, že najmenej štyri molekuly ubikvitínu musia byť pripojené k lyzínovému zbytku, aby bol rozpoznávaný 26S proteazómom [10]. Polyubikvitinácia na Lys63 aktivuje neproteolytické procesy súvisiace s internalizáciou membránových proteínov, odozvou imunitného systému, moduláciou aktivity kináz a fosfatáz zapojených aj v procesoch karcinogenézy [11,12]. Významný je popis polyubikvitinácie Met1, ktorý spája (lineárnu) polyubikvitináciu s aktiváciou dráhy NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), ktorá rovnako zohráva dôležitú úlohu v karcinogenéze [13,14].

## Ubikvitinácia v súvislosti s karcinogézou

Ubikvitinácia je úzko spätá s onkologickými ochoreniami, kde zohráva duálnu rolu. Deregulácia E2 a E3 ubikvitín ligáz všeobecne významným spôsobom prispieva k aberantnej ubikvitinácii, čo v mnohých prípadoch vedie k iniciácii a k progresii malígnych ochorení [15]. Medzi E2 ubikvitín ligázy so známou úlohou v kontrole procesov progresie bunecného cyklu patrí UBE2N/UBE2V1 enzým, ktorý katalyzuje polyubikvitináciu na Lys63. Aberantná polyubikvitinácia na Lys63 spúšťa aberantnú signalizáciu NF- $\kappa$ B, ktorá u ma-

márneho karcinómu môže viesť k hyperaktivácii zápalu v makroprostredí nádoru [16,17].

E2 ubikvitín ligáza E2-EPF UCP zodpovedá za degradáciu E3 ubikvitín ligázy VHL (von Hippel-Lindau), ktorá destabilizuje transkripčné faktory zapojené v angiogenéze a metastázovaní – vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), matrixové metaloproteinázy (MMP) a hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) [18,19]. Ďalším dobre popísaným príkladom je zapojenie E3 ubikvitín ligázy GP78 do metastázovania sarkómov. Knock-down GP78 vedie k zníženej ubikvitinácii a akumulácii nádorového supresoru KAI1, ktorý navodzuje apoptózu rakovinových buniek a regresiu sarkómov [20]. Inhibícia expresie, príp. inhibícia aktivity GP78 u metastatických sarkómov, by mohla viesť k inhibícii metastázovania sarkómov do pľúc.

E3 ubikvitín ligáza HUWE1 reguluje bunecnú adhéziu cez proteín TIAM1, ktorý sprostredkováva prepojenia medzi bunkami. Overexpresia HUWE1 spôsobuje aberantnú ubikvitináciu a degradáciu proteínu TIAM1, čo zvyšuje invazivitu a metastatický potenciál buniek [21].

## Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)

Proteín CHIP spája chaperónový systém s ubikvitín-proteazómovým systémom. Skladá sa z troch tetratricopeptidových domén s chaperónovou funkciou, coiled-coil domény a z U-box domény s E3 ubikvitín ligázovou aktivitou (obr. 1). U-box interaguje s UbcH4/UbcH5 proteínmi s E2 ligázovou aktivitou, tým je umožnená ubikvitinácia nesprávne zložených proteínov [22].

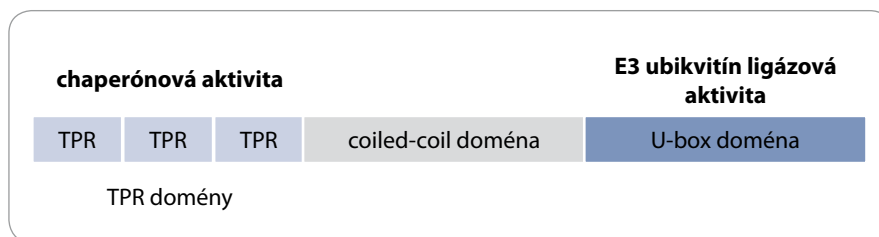
CHIP je zapojený do procesov charakteristických abnormálnou produkciou proteínov, ktoré môžu byť súčasťou onkogénnych signalizačných dráh. CHIP má duálnu rolu a môže vystupovať ako tumor supresor alebo ako onkogén. Tumor supresorová funkcia proteínu CHIP bola objavená u mnohých nádorov, kde ubikvitinácia onkogénov ako napr. *c-myc*, *SRC-3*, *HIF-1 $\alpha$* , *ERBB2*, *EGFR*, a *NF- $\kappa$ B* vedie k ich down-regulácii [23–28]. *In vivo* a *in vitro* štúdiami karcinómu pankreasu bolo dokázané, že zvýšenie hladiny proteínu CHIP

vedie k inhibícii metastázovania a rastu nádoru, zatiaľ čo knock-down proteínu CHIP spôsobuje metastatický zvrät. Ďalej bolo dokázané, že CHIP ubikvitináciou znižuje hladinu *EGFR*, čím inhibuje aberantné dráhy zapojené v malígnych procesoch [27]. U neskorých štádií kolorektálneho karcinómu je promótor proteínu CHIP hypermetetylovaný, čo prispieva k jeho významnej downregulácii a zvýšenej aktivite NF- $\kappa$ B signalizácie [28]. Ďalej CHIP v úlohe tumor supresoru môže inhibovať IL8 indukovanú angiogénu prostredníctvom ubikvitinácie NF- $\kappa$ B/p65 [29].

Na druhej strane viaceré publikácie popisujú zapojenie proteínu CHIP v degradácii tumor supresorových proteínov. CHIP teda možno považovať aj za onkogén. Tumor supresorový proteín FOXO indukovaný proteínom TNF $\alpha$  podlieha degradácii ubikvitináciou sprostredkovanou proteínom CHIP [30]. CHIP je zapojený aj do regulácie tumor supresorov spojených s apoptózou, medzi ktoré patrí hlavne p53, AIF a IRF-1 [31–33]. Úloha proteínu CHIP v onkogénnej signalizácii je komplikovaná a závisí na mnohých aspektoch. CHIP má vplyv na rôzne substráty, ale ich preferencia nie je dostatočne popísaná. Analýza ubikvitinácie proteínu CHIP za rôznych podmienok môže objasniť mechanizmy jeho účinku vplyvajúce na stabilitu proteínov zapojených v onkogénnych signalizačných dráhach.

### Analýza ubikvitinácie hmotnostnou spektrometriou

V súčasnej dobe nachádzajú vo výskume ubikvitinácie veľmi dobré uplatnenie metódy hmotnostnej spektrometrie a imunochemické metódy, ktoré možno spolu kombinovať [34,35]. Hmotnostne spektrometrická analýza vychádza z predpokladu, že trypsin počas proteomickej prípravy vzorky neštiepi proteínovú sekvenciu v pozícii lyzínu modifikovaného ubikvitínom. V peptidovom digeste teda získavame tryptické peptidy s vynechaným štiepnym miestom za lyzíni nesúcimi GlyGly pochádzajúcim z ubikvitínu. Metódou LC-MS/MS možno určiť pozíciu ubikvitinácie v reťazci peptidu/proteínu a z výsledku možno predpokladať aj jej biologickú úlohu [36].



**Obr. 1. Funkčné domény proteínu CHIP. Proteín CHIP sa skladá z troch TPR domén, z coiled-coil domény a z U-box domény. TPR domény majú chaperónovú funkciu a U-box doména má E3 ubikvitín ligázovú aktivitu. Proteín CHIP spája E3 ubikvitín ligázovú aktivitu s chaperónovou aktivitou.**

TPR – tetratricopeptidová doména

Identifikácia ubikvitinovaných peptidov/proteínov je však pomerne komplikovaná kvôli ich nízkemu zastúpeniu vo vzorke. Dôvodom je rýchla degradácia ubikvitinovaných proteínov a nízka stechiometria modifikácie. Robustná platforma na LC-MS/MS identifikáciu endogénnej ubikvitinácie by mala obsahovať techniku špecificky obohacujúcu vzorku o peptidy nesúce GlyGly zbytok po proteolytickej digescii. Úspešnosť identifikácie ubikvitinačných miest sa všeobecne zlepšila po komercializácii protilátok špecifických proti GlyGly zbytkom na lyzínoch. Imunochemickým obohatením vzorky o GlyGly modifikované peptidy možno izolovať a identifikovať ubikvitinačné miesta v biologických vzorkách ako napr. bunecný lyzát alebo tkanivový lyzát [37,38]. Alternatívne možno použiť protilátku špecifickú proti intaktnému ubikvitínu alebo ubikvitín značený afinitnými značkami ako napr. hemagglutínin (HA), polyhistidín (His<sub>n</sub>) alebo glutathion S transferáza (GST) [39–42]. Týmto spôsobmi možno obohatiť vzorku o ubikvitinované proteíny ešte pred zahájením proteolytického štiepenia [39].

K dokonalejšiemu popisu úlohy ubikvitinácie môže prispieť aj rozvoj hmotnostne spektrometrických metód umožňujúcich kvantifikáciu proteínov. Dá sa predpokladať, že kvantitatívne metódy hmotnostnej spektrometrie môžu určiť kvantitu ubikvitinovaného proteínu/peptidu, čo by umožnilo dynamicky sledovať vývoj zmeny modifikácie v čase, príp. medzi dvoma stavmi (tumor vs. zdravá kontrola). Týmto spôsobom možno dynamicky popísať molekulárnu príčinu onkologického ochorenia, príp.

stratifikovať onkologických pacientov na základe molekulárnej príčiny ochorenia.

### Materiály a metódy

#### Ubikvitinačná reakcia

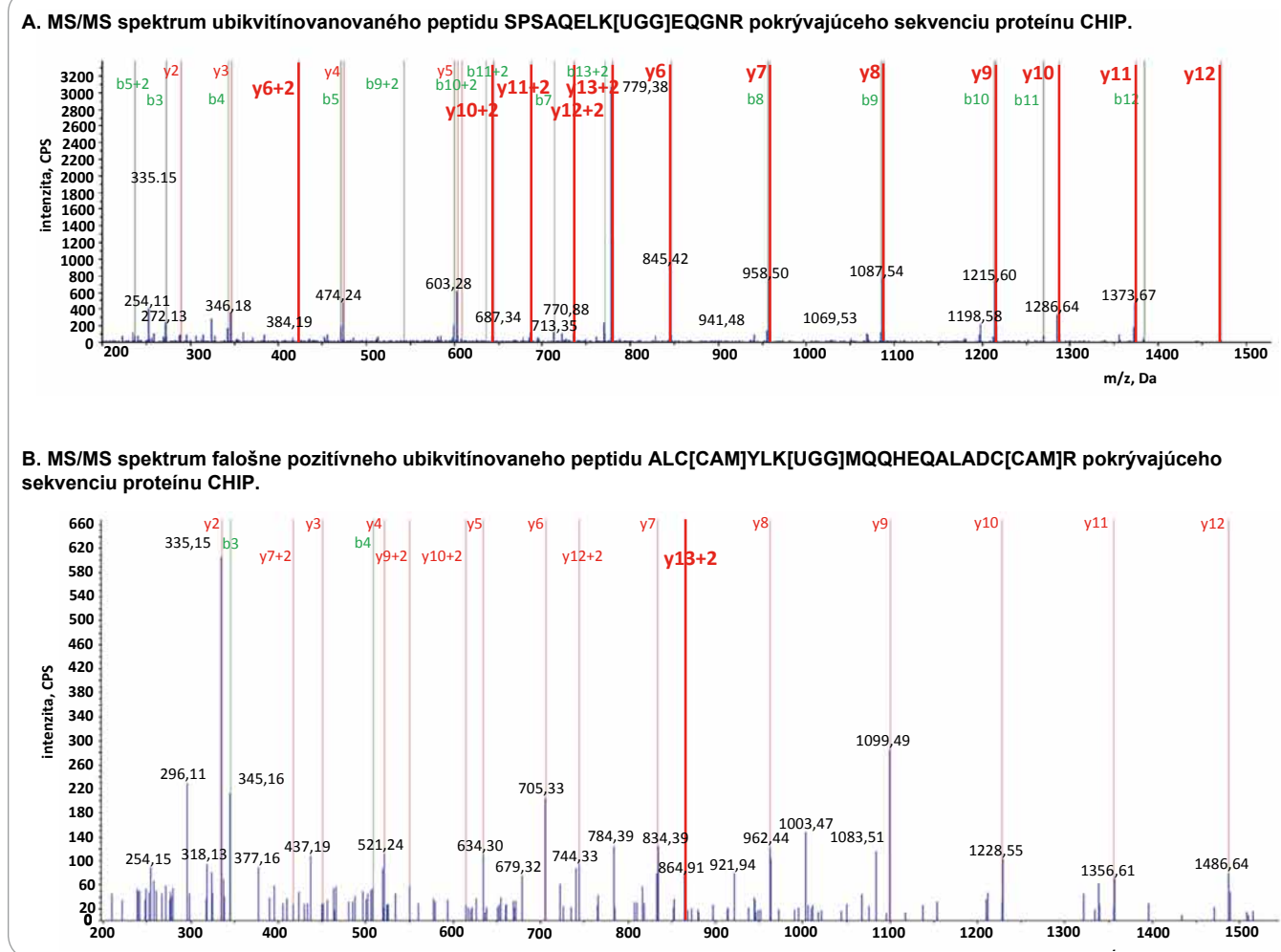
Ubikvitinačná reakcia *in vitro* bola uskutočnená v roztoku zloženom z 27 mM Hepes (pH 8,0), 6,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,543 mM DTT, 3,26 mM ATP (kontrolné vzorky boli pripravené bez ATP), 100 nM Ube1 (E1), 1  $\mu$ M UbcH5 $\alpha$  (E2), 3,2  $\mu$ g CHIP s His-tagom a 2  $\mu$ g ubikvitínu. Reakcia bola uskutočnená v intervaloch 5, 20 a 40 min, potom bola zastavená.

#### Štiepenie proteínov v roztoku

Proteíny boli 5 min sonifikované, následne bolo pridaných 2,5  $\mu$ l 200 mM dithiothreitolu a zmes bola kultivovaná pri 37 °C počas 1 hod. Alkylácia proteínov bola uskutočnená prídavkom 2,5  $\mu$ l 200 mM jodoacetamidu počas 30 min pri izbovej teplote v temne. Prebytočný jodoacetamid bol odstránený prídavkom 2,5  $\mu$ l 200 mM dithiothreitolu pri 37 °C, 15 min. Digescia proteínov na peptidy prebehla za účasti trypsinu (Promega, USA), ktorý bol pridaný v pomere 1 : 100 (enzým : proteín). Proteolytické štiepenie prebiehalo pri 37 °C cez noc. Vzorky boli odsolené podľa Bouchala et al [43].

#### Parametre LC-MS/MS merania proteínových digestov

LC-MS/MS analýza bola uskutočnená postupom inšpirovaným Faktor et al [44]. V skratke, peptidy boli separované na kvapalinovom chromatografe Eksigent ekspert™ nanoLC 400 (SCIEX, USA), ktorý bol priamo spojený s MS systémom TripleTOF 5600+ (SCIEX,



**Obr. 2. Fragmentačné spektrum peptidu SPSAQLK[UGG]EQGNR (A) a fragmentačné spektrum peptidu ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R (B) so zvýraznenými produktovými iónmi potvrdzujúcimi prítomnosť GlyGly modifikácie na lyzíne. Fragmentačné spektrum A naznačuje, že Lys8 nesie GlyGly zbytok ubikvitínu. V produktových iónoch y6–y12 dochádza k charakteristickému posunu  $m/z$  o +114 Da (GlyGly zbytok). Rovnaký posun  $m/z$  možno sledovať aj v b sérii produktových iónov (b8–b12) indikujúci prítomnosť GlyGly zbytku ubikvitínu. Fragmentačné spektrum B obsahuje len jeden produktový ión potvrdzujúci modifikáciu GlyGly. Ubikvitinácia peptidu ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R nebola potvrdená, keďže jediný charakteristický produktový ión s posunom +114 Da môže pochádzať z iného kofragmentovaného prekurzorového iónu.**

MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria, CPS – counts per second

Canada). Peptidy boli zachytené a odsolené na trap kolóne  $\mu$ -precolumn, 30  $\mu$ m i.d., 5 mm dĺžka, C18 PepMap 100, 5  $\mu$ m veľkosť častíc, 100 Å veľkosť pórov (Thermo Scientific, USA). Následne boli peptidy eluované na analytickú emiterovú kolónu 75  $\mu$ m  $\times$  250 mm PicoFrit® (New Objective, USA) s náplňou ProntoSIL 120-3-C18 AQ, 3  $\mu$ m častice (Bischoff, Nemecko). Mobilná fáza A bola zložená z 0,1 % (v/v) kyseliny mravčej v H<sub>2</sub>O a mobilná fáza B z 0,1 % (v/v) kyseliny mravčej v acetonitrile. Elúcia z analytickej kolóny začínala na 5 % mobilnej fázy B počas 30 min. Percentuálny podiel

mobilnej fázy lineárne stúpal na 40 % B počas 120 min a v nasledujúcich 5 min vzrástol až na 80 % B, na hodnote 80 % B zostal počas 5 min následne podiel mobilnej fázy B lineárne klesal na 5 % počas 2 min. Podiel mobilnej fázy B zostal na hodnote 2 % počas ďalších 28 min.

Hmotnostný spektrometer TripleTOF 5600+ pracoval v dáta dependentnom móde. TOF-MS spektrum (akumulatívny čas 250 ms) bolo zmerané v každom cykle nasledované fragmentáciou 20 najintenzívnejších prekurzorových iónov a ukončené zmeraním spektrier ich produktových iónov. Minimálna

intenzita prekurzorového iónu bola nastavená na hodnotu 50 cps (counts per second) a čas exklúzie na hodnotu 12 s. Akumulatívny čas prekurzorového iónu bol 100 ms.

#### Analýza LC-MS/MS dát

Analýza LC-MS/MS dát prebehla v programe ProteinPilot 4.5 (SCIEX, Canada). Parametre prehľadávania boli nastavené nasledovne: proteáza – trypsin, fixné modifikácie – karbamidomethyl na cysteíne, prehľadávanie s dôrazom na identifikáciu ubikvitinácie, prehľadávací databáza – Uniprot+Swissprot



**Obr. 3. Zoznamy produktových iónov reprezentujúcich dva vybrané peptidy z proteínu CHIP nesúce GlyGly zbytok.** Na základe identifikácie prehľadavacím algoritmom ProteinPilot 4.5.0.0. bola obom peptidom pridelená vysoká peptidová konfidencia (pep. konfidencia > 99 %). Zelenou farbou sú vyznačené produktové ióny spoľahlivo identifikované v fragmentačnom spektre tandemovej hmotnostnej spektrometrie. Červenou farbou sú podčiarknuté iba produktové ióny, ktoré potvrdzujú GlyGly zbytok v peptide a zahrňujú charakteristický posun m/z o 114 Da (zbytok GlyGly).

A. Peptid SPSAQLK[UGG]EQGNR s 21 produktovými iónmi potvrdzujúcimi prítomnosť GlyGly zbytku na Lys 8.

Zbytok	b	b +2	y	y +2
S	88.0393	44.5233	1557.7616	779.3844
P	185.0921	93.0497	1470.7295	735.8684
S	272.1241	136.5657	1373.6768	687.3420
A	343.1612	172.0842	1286.6448	643.8260
Q	471.2198	236.1135	1215.6076	608.3075
E	600.2624	300.6348	1087.5491	544.2782
L	713.3464	357.1769	958.5065	479.7569
K[UGG]	955.4843	478.2458	845.4224	423.2148
E	1084.5269	542.7671	603.2845	302.1459
Q	1212.5859	606.7964	474.2419	237.6246
G	1269.6070	635.3071	346.1833	173.5953
N	1383.6499	629.3286	289.1619	145.0846
R	1539.7510	770.3791	175.1190	88.0631

B. Peptid ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R s jedným produktovým iónom potvrdzujúcim prítomnosť GlyGly zbytku na Lys 6. Z tabuľky je zrejmé, že peptidová konfidencia nereflexuje pravdepodobnosť prítomnosti GlyGly zbytku v sekvencii peptidu, a že fragmentačné spektrá modifikovaných peptidov je nutné po identifikácii skontrolovať.

Zbytok	b	b +2	y	y +2
A	72.0444	36.5258	2349.0897	1175.0485
L	185.1285	93.0679	2278.0526	1139.5299
C[CAM]	345.1591	173.0832	2164.9685	1082.9879
Y	508.2224	254.6149	2004.9378	1002.9726
L	621.3065	311.1569	1841.8745	921.4409
K[UGG]	863.4444	432.2258	1728.7904	864.8989
M	994.4849	497.7461	1486.6526	743.8299
Q	1122.5434	561.7754	1355.6121	678.3097
Q	1250.6020	625.8047	1227.5535	614.2804
H	1387.6609	694.3341	1099.4949	550.2511
E	1516.7035	758.8554	962.4360	481.7216
Q	1644.7621	822.8847	833.3934	417.2003
A	1715.7992	858.4032	705.3348	353.1711
L	1828.8833	914.9453	634.2977	317.6525
A	1899.9204	950.4638	521.2137	261.1105
D	2014.9473	1007.9773	450.1765	225.5919
C[CAM]	2174.9780	1087.9926	335.1496	168.0784
R	2331.0791	1166.0432	175.1190	88.0631

(ver. 2) Homo sapiens. Analýza FDR (false discovery rate) prebehla proti obrátenej databáze.

### Výsledky analýzy LC-MS/MS dát

Analýzou LC-MS/MS dát bolo identifikovaných 142 unikátnych peptidov pokrývajúcich sekvenciu proteínu CHIP z 99,7 %. Obr. 2A znázorňuje fragmentačné spektrum jedného z ubikvitinovaných peptidov SPSAQLK[UGG]EQGNR, ktorý sa podarilo identifikovať v reakčnej zmesi proteínu CHIP s ATP po inkubácii ubikvitinácie reakcie počas 20 min. Peptid nesie charakteristické vynechané štiepne miesto za lyzínom modifikovaným ubikvitínom. Na lyzíne je identifikovaný charakteristický GlyGly zbytok na Lys8 vzniknutý tryptickým štiepením ubikvitínu. Tento peptid nie je však jediný z identifikovaných ubikvitinova-

ných peptidov. LC-MS/MS analýza odhalila ubikvitináciu aj na ďalších lyzinoch a dá sa predpokladať, že niektoré identifikácie budú falošne pozitívne (obr. 2B). K filtrácii potenciálne pozitívne falošných priradení GlyGly modifikácie významne prispelo zaradenie validačného kroku do nášho postupu identifikácie ubikvitinácií. Validačný krok spočíva v kontrole fragmentačných spektier modifikovaných peptidov. Pri validácii spektier sa zameriavame na počet produktových iónov so zbytkom GlyGly (+114 Da) na lyzíne. Ukázalo sa, že niektoré peptidy identifikované s vysokou hodnotou peptidovej konfidencie (pep. konfidencia > 99 %) nesúce GlyGly zbytok obsahujú vo fragmentačnom spektre len niekoľko produktových iónov modifikovaných GlyGly zbytkom na lyzíne. Ich prekursorový peptid môže byť izo-

barický s peptidmi s inou sekvenciou. Dobrým príkladom je izobarický peptid, ktorý miesto GlyGly modifikácie má aminokyseliny GlyGly zaradené priamo v peptidovej sekvencii za alebo pred lyzínom. Existencia ubikvitinácie na peptidoch s nízkym počtom produktových iónov potvrdzujúcich GlyGly modifikáciu nemusí byť reálna a ich identifikácia je teda pravdepodobne falošne pozitívna. Ako reprezentatívny príklad uvádzame dva peptidy s rovnakou peptidovou konfidenciou (pep. konfidencia = 99 %) nesúce GlyGly zbytky na lyzíne (obr. 3A, 3B). V obr. 3A a 3B sú u oboch peptidov (SPSAQLK[UGG]EQGNR a ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R) zelenou farbou vyznačené m/z spoľahlivo identifikovaných produktových iónov z MS/MS spektier a zároveň v obr. 2A a 2B sú tieto produktové ióny zvýraznené

**A**

CHIP bez ATP

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPEKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM  
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR  
 WNSIEERRIHQESSELHSYLSRLTAAEFERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD  
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRADIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA  
 FISENGWVEDY

**B**

CHIP + 3,26 mM ATP

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPEKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM  
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR  
 WNSIEERRIHQESSELHSYLSRLTAAEFERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD  
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRADIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA  
 FISENGWVEDY

Obr. 4. Na obrázku je červenou farbou zvýraznená ubikvitinácia lyzínov v sekvencii CHIP-u s prídavkom (1B) a bez prídavku ATP (1A) do ubikvitináčnej reakčnej zmesi. Peptidy s vysokou konfidienciou (pep. konfidencia > 95 %) sú znázornené zelenou farbou, peptidy so stredne vysokou konfidienciou (pep. konfidencia ≤ 95 % a > 50 %) sú znázornené oranžovou farbou, nízko konfidentné peptidy (pep. konfidencia ≤ 50 %) sú znázornené červenou farbou a neidentifikované peptidy sivou farbou písma. CHIP je jednoznačne viac ubikvitinovaný v prítomnosti ATP, zatiaľ čo v neprítomnosti ATP k ubikvitinácii nedochádza.

ATP – adenosíntrifosfát

priamo v MS/MS spektre. Z obr. 2B a 3B vyplýva, že GlyGly zbytok na Lys6 v peptide ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R potvrdzuje len jeden produktový ión (obr. 2B, 3B), zatiaľčo pri peptide SPSAQELK[UGG]EQGNR (obr. 2A, 3A) zaznamenávame až 21 produktových iónov s charakteristickým posunom o 114 Da (GlyGly zbytok) potvrdzujúcim ubikvitináciu na Lys8. Z obr. 2A, 2B a 3A, 3B je zrejme, že pravdepodobnosť správnej identifikácie GlyGly zbytku lyzínu je odlišná u oboch peptidov a nesúvisí s peptidovou konfidienciou. Z tohto dôvodu doporučujeme pri identifikácii ubikvitinácie dôkladne prekontrolovať fragmentačné spektrá peptidov.

Overenie funkčnosti postupu identifikácie ubikvitinácie sme skúmali aj postupom vyplývajúcim z ATP-dependentej podstaty reakcie. Množstvo ubikvitinovaných lyzínov sme sledovali v prítomnosti a v neprítomnosti ATP v reakčnej zmesi. Výsledky LC-MS/MS analýz v oboch podmienkach sú zhrnuté v obr. 4A a 4B. Dáta jasne poukazujú na to, že dochádza k nárastu ubikvitinácie

lyzínov po pridaní ATP do reakčnej zmesi. Pokračovali sme výskumom dynamiky priebehu ubikvitináčnej reakcie v prítomnosti ATP v intervaloch 5, 20 a 40 min od započatia ubikvitináčnej reakcie. Z obr. 5A–C je jasný postupný nárast ubikvitinácie lyzínov s časom.

### Diskusia

Literárna rešerš jasne naznačuje, že ubikvitinácia je sofistikovaným nástrojom regulácie proteostázy a má mnoho významov. Regulácia hladiny proteínu ubikvitináciou má duálny charakter a zohráva úlohu v mnohých nádorových ochoreniach. Zdá sa, že pozornosti neuniká ani možnosť cielenia liečebných postupov na ubikvitín ligázy a deubikvitináčnej enzýmy. V súčasnosti už bolo objavených niekoľko molekúl zasahujúcich do procesu ubikvitinácie s cieľom zastaviť malígne procesy, no ich využitie ešte stále nie je zavedené do klinickej praxe [45]. Ukazuje sa, že E3 ubikvitín ligázy majú najväčší potenciál pre tvorbu cielených terapeutických postupov, nakoľko sa vyznačujú vysokou sub-

strátovou špecifitou. Avšak z hľadiska zapojenia ubikvitinácie a ubikvitín ligáz v onkogenéze je stále mnoho neprebádaných malígných procesov, ktoré unikajú pozornosti výskumníkov a lekárov. Práve zapojenie „-omics“ metód môže ponúknuť bližší náhľad na tieto procesy. Tvorba hmotnostne spektrometrickej metódy na popis ubikvitinácie nám umožnila skúmať ubikvitináciu na špecifických miestach v sekvencii proteínu. Lokalizácia pozície ubikvitinácie v sekvencii proteínu je významná pre porozumenie jej biologickej úlohe [46–48]. Na proteíne CHIP sa nám podarilo identifikovať ubikvitináciu (pozn. GlyGly zbytok) na viacerých lyzínach. Autoubikvitinácia proteínu CHIP identifikovaná na Lys22 bola už v minulosti popísaná v publikácii od Graf et al [49] podobne ako aj ubikvitinácia na Lys30, Lys125, Lys221 a Lys255 v publikáciách od Lumpkin et al a Akimov et al [50,51]. Ubikvitinácia na Lys4, Lys7, Lys41, Lys223 a Lys234 nebola doposiaľ popísaná, treba však podotknúť, že ubikvitináciu v týchto pozíciách sa podarilo

**A**

CHIP + 3,26 mM ATP, 5 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM  
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR  
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD  
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQQLIPNLAMKEVIDA  
 FISENGWVEDY

**B**

CHIP + 3,26 mM ATP, 20 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM  
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR  
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD  
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQQLIPNLAMKEVIDA  
 FISENGWVEDY

**C**

CHIP + 3,26 mM ATP, 45 min

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKM  
 QQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIAKKKR  
 WNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVD  
 EKRRKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKIDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQQLIPNLAMKEVIDA  
 FISENGWVEDY

Obr. 5. Časový priebeh ubikvitinačnej reakcie proteínu CHIP po 5 min (2A), 20 min (2B) a 45 min (2C) s prídavkom ATP do ubikvitinačnej reakčnej zmesi. Z obrázku 2A–C je zjavný nárast ubikvitinácie s postupom času.

ATP – adenosíntrifosfát

identifikovať vo vzorkách pripravených ubikvitinačnou reakciou *in vitro*. Z biologického hľadiska by bolo zaujímavé zistiť, či sa obdobná ubikvitinácia vyskytuje *in vivo*, a určiť jej zmysel.

Definícia pravidiel manuálnej kontroly peptidových LC-MS/MS spektier na potvrdenie prítomnosti GlyGly zbytku bola kľúčová pre overenie správnosti identifikácie ubikvitinovaných peptidov. Peptidová konfidencia priamo súvisí s kvalitou fragmentačného spektra peptidu, avšak ukázalo sa, že prehľadávací algoritmus v tejto hodnote nezohľadňuje pravdepodobnosť správnej identifikácie GlyGly zbytku. V analýzach ubikvitinomu teda môže dochádzať k identifikácii falošne pozitívnych peptidov s vysokou konfidenciou (peptidová konfiden-

cia > 95 %), kde sa LC-MS/MS spektrum GlyGly modifikovaného a nemodifikovaného peptidu líši len v jednom fragmentovom ióne. Dobrým príkladom je identifikovaný peptid ALC[CAM]YLK[UGG]MQQHEQALADC[CAM]R, u ktorého nie je možné s dostatočnou určitosťou potvrdiť prítomnosť GlyGly modifikácie (+114 Da) na lyzíne. Prítomnosť modifikácie potvrdzuje len jeden fragmentový ión obr. 2B a 3B, ktorý môže pochádzať z iného ko-fragmentovaného prekurzorového iónu.

Aplikáciou pravidiel manuálnej kontroly sa nám podarilo rozlíšiť dva peptidy so zdanlivo identickou pravdepodobnosťou prítomnosti GlyGly zbytku v sekvencii. Zavedený postup odporúčame aplikovať na potvrdenie prítomnosti lu-

bovolnej modifikácie peptidov alebo na odfiltrovanie falošne pozitívnych identifikácií modifikovaných peptidov. Nevýhodou je časová náročnosť postupu a teda aplikácia v komplexných peptidových vzorkách (digest tkaniva, modelových bunecných línií) je limitovaná.

Presná znalosť pozície ubikvitinácie nemusí byť dostačujúca pre výskum priebehu biologického procesu. Náhľad na dynamiku čiastočne poskytuje sledovanie vývoja ubikvitinácie v čase. Schopnosť sledovania zmeny počtu ubikvitinácií lyzínov v čase sme úspešne demonštrovali na proteíne CHIP. S predlžujúcim sa časom inkubácie ubikvitinačnej reakcie sa postupne zvyšoval počet ubikvitinovaných lyzínov. Sledovanie ubikvitinácie v čase prispelo k objavu ly-

zínov proteínu CHIP, kde k autoubikvitinácii dochádza prednostne.

Nevýhodou metódy je, že zo získaných dát nie je možné spoľahlivo určiť do akej miery boli ubikvitinované jednotlivé lyzíny za skúmaných podmienok. K dynamickému popisu ubikvitinácie jednotlivých lyzínov sa snažíme v súčasnosti vyvinúť semikvantitatívnu akvizíciu metódu. Vo vývoji semikvantitatívnej metódy sa snažíme aplikovať poznatky z label-free kvantitatívnej proteomiky. Pre presnejší popis dynamiky plánujeme využiť metódu SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical mass spectra), ktorá by teoreticky mala paralelne kvantifikovať všetky detekovateľné GlyGly modifikácie lyzínov počas jedinej LC-MS analýzy.

Dá sa predpokladať, že kvantitatívne metódy hmotnostnej spektrometrie, medzi ktoré patrí aj metóda SWATH, môžu určiť kvantitu ubikvitinovaného proteínu/peptidu, čo by umožnilo presnejšie sledovať zmeny modifikácie, aj medzi viacerými stavmi (napr. tumor vs. zdravá kontrola). Nemenej dôležitý je popis ubikvitinácie za rôznych podmienok, či už *in vitro*, alebo *in vivo*. Týmto spôsobom možno dynamicky popísať a objasniť príčiny zmien v hladinách proteínov, príp. určiť preferenciu substrátov ubikvitín ligáz v závislosti na biologickom stave. Detailnejšia charakterizácia proteostázy môže objasniť molekulárnu príčinu aberantnej signalizácie u niektorých nádorových ochorení.

## Záver

Platforma na MS výskum ubikvitinácií bola vytvorená za zjednodušených podmienok na purifikovaných proteínoch, do budúcnosti sa však počíta s rozšírením na komplexné proteomické vzorky. Práve komplexné tkanivové vzorky obsahujú celkový náhľad na ubikvitinóm pacienta. Výskum ubikvitinácií v časových intervaloch umožňuje popísať lyzíny, u ktorých dochádza k ubikvitinácii prednostne, a lyzíny, u ktorých sa ubikvitinácia nevyskytuje, príp. je len veľmi málo pravdepodobná. Objav unikátnych ubikvitinácií môže napomôcť k objasneniu molekulárnej príčiny niektorých nádorových ochorení, čo by mohlo prispieť aj k zdokonaleniu niektorých súčasných

terapeutických metód v onkológii. Popis ubikvitinácie je len veľmi malým krokom k tvorbe nových postupov špecificky cieľných na molekulárnu príčinu nádorového ochorenia. Efektívne spracovanie získaných informácií bude vyžadovať zapojenie multioborového tímu a rozsiahlu validáciu.

## Literatúra

- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 11–15. doi: 10.1073/pnas.72.1.11.
- Ciechanover A, Elias S, Heller H et al. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257(5): 2537–2542.
- Ciechanover A. The 2008 Lindau Nobel laureate meeting: Aaron Ciechanover, Chemistry 2004. *J Vis Exp* 2009; (29): 1559. doi: 10.3791/1559.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503–533. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.503.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425–479. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Cheng Q, Cross B, Li B et al. Regulation of MDM2 E3 ligase activity by phosphorylation after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2011; 31(24): 4951–4963. doi: 10.1128/MCB.05553-11.
- Herhaus L, Dikic I. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO Rep* 2015; 16(9): 1071–1083. doi: 10.15252/embr.201540891.
- Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 203–229. doi: 10.1146/annurev-biochem-060310-170328.
- Nguyen LK, Dobrzyński M, Fey D et al. Polyubiquitin chain assembly and organization determine the dynamics of protein activation and degradation. *Front Physiol* 2014; 5: 4. doi: 10.3389/fphys.2014.00004.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M et al. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19(1): 94–102. doi: 10.1093/emboj/19.1.94.
- Sehat B, Andersson S, Girmila L et al. Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res* 2008; 68(14): 5669–5677. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6364.
- Yang WL, Zhang X, Lin HK. Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 2010; 29(32): 4493–4503. doi: 10.1038/ncr.2010.190.
- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 2009; 136(6): 1098–1109. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.007.
- Fil BK, Gyrd-Hansen M. Met1-linked ubiquitination in immune signalling. *FEBS J* 2014; 281: 4337–4350. doi: 10.1111/febs.12944.
- Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(8): 737–747. doi: 10.4161/cbt.10.8.13417.
- Gallo LH, Ko J, Donoghue DJ. The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis. *Cell Cycle* 2017; 16(7): 634–648. doi: 10.1080/15384101.2017.1288326.
- Wu Z, Shen S, Zhang Z et al. Ubiquitin-conjugating enzyme complex Uev1A-Ubc13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- $\kappa$ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation. *Breast Cancer Res* 2014; 16(4): 75. doi: 10.1186/bcr3692.
- Jung CR, Hwang KS, Yoo J et al. E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat Med* 2006; 12(7): 809–816. doi: 10.1038/nm1440.
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T et al. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; 19(16): 4298–4309. doi: 10.1093/emboj/19.16.4298.
- Tsai YC, Mendoza A, Mariano JM et al. The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* 2007; 13(12): 1504–1509. doi: 10.1038/nm1686.
- Vaughan L, Tan CT, Chapman A et al. HUWE1 ubiquitylates and degrades the RAC activator TIAM1 promoting cell-cell adhesion disassembly, migration, and invasion. *Cell Rep* 2015; 10(1): 88–102. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.012.
- Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ et al. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 2007; 282(31): 22267–22277. doi: 10.1074/jbc.M700513200.
- Paul I, Ahmed SF, Bhowmik A et al. The ubiquitin ligase CHIP regulates c-Myc stability and transcriptional activity. *Oncogene* 2013; 32(10): 1284–1295. doi: 10.1038/ncr.2012.144.
- Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y et al. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3): 312–319. doi: 10.1038/ncb1839.
- Ferreira JV, F6fo H, Bejarano E et al. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2013; 9(9): 1349–1366. doi: 10.4161/auto.25190.
- Xu W, Marcu M, Yuan X et al. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12847–12852. doi: 10.1073/pnas.202365899.
- Wang T, Yang J, Xu J et al. CHIP is a novel tumor suppressor in pancreatic cancer through targeting EGFR. *Oncotarget* 2014; 5(7): 1969–1986. doi: 10.18632/oncotarget.1890.
- Wang Y, Ren F, Wang Y et al. CHIP/Stub1 functions as a tumor suppressor and represses NF- $\kappa$ B-mediated signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014; 35(5): 983–991. doi: 10.1093/carcin/bgt393.
- Wang S, Wu X, Zhang J et al. CHIP functions as a novel suppressor of tumour angiogenesis with prognostic significance in human gastric cancer. *Gut* 2013; 62(4): 496–508. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301522.
- Li F, Xie P, Fan Y et al. C terminus of Hsc70-interacting protein promotes smooth muscle cell proliferation and survival through ubiquitin-mediated degradation of FoxO1. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 20090–20098. doi: 10.1074/jbc.M109.017046.
- Esser C, Scheffner M, Höfheld J. The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2005; 280(29): 27443–27448. doi: 10.1074/jbc.M501574200.
- Oh KH, Yang SW, Park JM et al. Control of AIF-mediated cell death by antagonistic functions of CHIP ubiquitin E3 ligase and USP2 deubiquitinating enzyme. *Cell Death Differ* 2011; 18(8): 1326–1336. doi: 10.1038/cdd.2011.3.
- Narayan V, Pion E, Landré V et al. Docking-dependent ubiquitination of the interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by the ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 2011; 286(1): 607–619. doi: 10.1074/jbc.M110.153122.
- Udeshi ND, Mertins P, Svinkina T et al. Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry.



- rometry. *Nat Protoc* 2013; 8(10): 1950–1960. doi: 10.1038/nprot.2013.120.
35. van der Wal L, Bezstarosti K, Sap KA et al. Improvement of ubiquitylation site detection by Orbitrap mass spectrometry. *J Proteomics* 2018; 17(2): 49–56. doi: 10.1016/j.jpro.2017.10.014.
36. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol* 2010; 28(8): 868–873. doi: 10.1038/nbt.1654.
37. Udeshi ND, Mani DR, Eisenhaure T et al. Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(5): 148–159. doi: 10.1074/mcp.M111.016857.
38. Udeshi ND, Svinkina T, Mertins P et al. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(3): 825–831. doi: 10.1074/mcp.O112.027094.
39. Vasilescu J, Smith JC, Ethier M et al. Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4(6): 2192–2200. doi: 10.1021/pr050265i.
40. Ogawa Y, Ono T, Wakata Y et al. Histone variant macroH2A1.2 is mono-ubiquitinated at its histone domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(1): 204–209. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.046.
41. Maine GN, Gluck N, Zaidi IW et al. Bimolecular affinity purification (BAP): tandem affinity purification using two protein baits. *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 2009(11): 1–7. doi: 10.1101/pdb.prot5318.
42. Kirkpatrick DS, Weldon SF, Tsapralis G et al. Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. *Proteomics* 2005; 5(8): 2104–2111. doi: 10.1002/pmic.200401089.
43. Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R et al. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res* 2009; 8(1): 362–373. doi: 10.1021/pr800622b.
44. Faktor J, Bouchal P. Building mass spectrometry spectral libraries of human cancer cell lines. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 54–58. doi: 10.14735/amko20164554.
45. Liu J, Shaik S, Dai X et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1855(1): 50–60. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.11.005.
46. Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB et al. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 1995; 34(44): 14535–14546. doi: 10.1021/bi00044a032.
47. Deng L, Wang C, Spencer E et al. Activation of the IκappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103(2): 351–361. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00126-4.
48. Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(2): 119–126. doi: 10.1016/j.ceb.2004.02.005.
49. Graf C, Stankiewicz M, Nikolay R et al. Insights into the conformational dynamics of the E3 ubiquitin ligase CHIP in complex with chaperones and E2 enzymes. *Biochemistry* 2010; 49(10): 2121–2129. doi: 10.1021/bi901829f.
50. Lumpkin RJ, Gu H, Zhu Y et al. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1171–1182. doi: 10.1038/s41467-017-01271-3.
51. Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF et al. Ubi-Site approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25(7): 631–640. doi: 10.1038/s41594-018-0084-y.