

Received: 26.06.2017
Accepted: 24.01.2018
Published: 07.06.2018

Ubikwitynacja, kontrola jakości i degradacji białek błonowych – szansa na terapie?

Ubiquitination, quality control and degradation of membrane proteins – chance for therapies?

Donata Wawrzycka, Katarzyna Mizio

Zakład Genetyki i Fiziologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Utrzymanie integralności błony komórkowej zależy od rozmieszczenia i funkcjonalności występujących w niej białek. Dlatego prawidłowe działanie systemów kontroli jakości jest podstawą przeżycia organizmów. Zachowanie homeostazy proteomu w zmieniających się warunkach środowiskowych jest możliwe dzięki usuwaniu zbędnych białek, przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji innych. Zablockowane w błonie białka mogą wchodzić w niepożądane interakcje z innymi cząsteczkami, tworzyć agregaty i nabierać toksycznego charakteru. W komórkach eukariotycznych zidentyfikowano kilka mechanizmów rozpoznawania nieprawidłowości konformacyjnych w obrębie błony komórkowej – zależny od chaperonów system wykrywający źle sfałdowane domeny cytoplazmatyczne oraz zawarty w strukturze samego białka system LID, opierający się na ekspozycji degronu po przyjęciu odpowiedniej konformacji. U drożdży opisano również sieć zależności adaptorów ART i ligazy Rsp5, współpracujących w degradacji transporterów błonowych. Rsp5 jest E3 ligazą ubikwityny należącą do rodziny Nedd4, jedyną dotychczas zidentyfikowaną drożdżową ligazą ubikwitynującą białka błonowe. Ubikwitynacja przez Rsp5 jest sygnałem do internalizacji białek w procesie endocytozy; następnie są rozpoznawane przez system ESCRT, wprowadzane do MVB i degradowane przez proteazy wakuolarnie. Rsp5 preferuje budowanie łańcuchów poli-Ub przez K63, a na błonowe substraty naprowadzana może być przez tzw. białka adaptorowe. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście białek pełniących funkcje adaptorów dla Rsp5, większość z nich należy do rodziny α -arestyn. Wykazano, że zaburzenia ubikwitynacji białek błonowych mogą prowadzić do nowotworzenia, rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, chorób układu krążenia i nadciśnienia. Wciąż jednak brak odpowiednich środków, które można by zastosować w terapii. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są jednym z najlepszych modeli do badań mechanizmów ubikwitynacji i degradacji białek błonowych.

Słowa kluczowe:

białka błony komórkowej • degradacja • drożdże *S. cerevisiae* • ubikwitynacja

Summary

Plasma membrane integrity maintenance is crucial for cell survival. Plasma membrane proteins are under tight regulation and under certain conditions are actively removed from the membrane allowing cells to adapt to changing environment. Proteins blocked in the cell membrane may interact with other molecules and form toxic aggregates. Ubiquitin is one of

*Praca powstała dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus nr 2015/19/B/NZ1/00327 i Europejskiego Programu Współpracy Naukowo-Technicznej COST (COST - European Cooperation in Science and Technology) program Action *Proteostasis* BM1307.

the most important modifiers targeting proteins for degradation and/or regulating protein functions. Several quality control mechanisms have been identified in eukaryotic cells: chaperone-dependent system that recognizes and ubiquitinates misfolded or redundant membrane proteins; protein-intrinsic LID-degron system, based on recognition of degron and ARTs-Rsp5 network that controls quality of membrane transporters. Rsp5, a Nedd4-family E3 ubiquitin ligase, is crucial for plasma membrane proteins ubiquitination. Rsp5-dependent ubiquitin action acts as a sorting signal for internalization of a membrane protein via endocytosis, recognition by the ESCRT system and vacuolar degradation. Rsp5 builds poliUb-chains on K63 and recognizes substrates through various adaptor proteins. Most of the identified Rsp5 adaptors belongs to the α -arrestin family. Plasma membrane protein ubiquitination and degradation disorders may cause neurodegenerative and cardiovascular diseases. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the best models for studying trafficking pathways of membrane proteins and ubiquitination systems.

Keywords: ubiquitylation • *S. cerevisiae* yeast • protein degradation • plasma membrane protein turnover

GICID 01.3001.0012.0823
DOI: 10.5604/01.3001.0012.0823
Word count: –
Tables: 1
Figures: 4
References: 136

Adres autorki: dr Donata Wawrzycka, Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski; ul. Kanonia 6/8, 51-328 Wrocław; e-mail: donata.wawrzycka@uwr.edu.pl

Wykaz skrótów: **ARTs** – system adaptorów ligazy Rsp5 (arrestin-related traffic king adaptors); **CHIP** – ligaza ubikwityny (C-terminus of Hsc70-interacting protein); **DUBs** – deubikwitynazy (deubiquitinating enzymes); **ER** – retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum); **ESCRT** – endosomalny kompleks sortujący (endosomal sorting complexes required for transport); **HSPs** – białka szoku cieplnego (heat shock proteins); **ILVs** – pęcherzyki światła endosomu (intraluminal vesicles); **LID** – domena interakcji z pętlami cytoplazmatycznymi (loop interaction domain); **MVBs** – ciała wielopęcherzykowe (multivesicular bodies); **PM** – błona komórkowa (plasma membrane); **QC** – kontrola jakości (quality control); **TGN** – sieć transaparatu Golgiego (trans-Golgi network); **Ub** – ubikwityna (ubiquitin); **UBDs** – domeny wiążące ubikwitynę (ubiquitin binding domains); **UIM** – motywy interakcji z ubikwityną (ubiquitin-interaction motif).

WSTĘP

Utrzymywanie integralności błony komórkowej (PM, plasma membrane) jest podstawą życia komórki. Membrana cytoplazmatyczna tworzy platformę kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym. Zakotwiczone w błonie receptory sygnałowe, akwaporyny, transportery substancji odżywczych i inne białka są niezbędne do przeżycia, wzrostu i zachowania homeostazy. Zachowanie prawidłowej struktury błony zależy od rozmieszczenia i funkcjonalności białek w niej występujących, stąd sprawnie działające systemy kontroli jakości i degradacji białek leżą u podstaw przeżycia, szczególnie organizmów jednokomórkowych. Zmieniające się warunki środowiska i dostępność czynników odżywczych wymuszają dostosowanie przez komórkę białek z obrębu błony komórkowej, stanowiących do 20% proteomu [2].

Białka niewykorzystywane, zbędne lub już wykorzystane są wyprowadzane z błony i degradowane (turnover) przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji innych białek, które w danych warunkach są niezbędne. Zachowanie homeostazy proteomu komórki (proteostasis) wymaga regulacji na poziomie transkrypcji, translacji i degradacji. Prawidłowy balans między wytwarzaniem białka, a jego degradacją zależy od fałdowania, potranslacyjnych modyfikacji, oligomeryzacji, prawidłowego sortowania i aktywności mechanizmów degradacyjnych. Z zaburzeniami funkcjonowania białek błonowych powiązано wiele chorób.

Białka uszkodzone i źle sfałdowane mogą wchodzić w niepożądane interakcje z innymi cząsteczkami, tworzyć w komórkach agregaty i nabierać toksycznego charakteru. Szybkie rozpoznanie i pozbycie się tego typu

zagrożeń jest szczególnie ważne w przypadku błony cytoplazmatycznej, gdzie nawet kilka wadliwych białek transmembranowych może zaburzyć homeostazę lipidowo-białkową doprowadzając do destabilizacji i śmierci komórki [13]. Funkcjonalne białka również podlegają nieustannemu cyklowi syntezy i proteolizy – wyjątkiem są m.in. krystaliny soczewki oka, które nigdy nie ulegają wymianie ani degradacji [79]. W zależności od funkcji, fazy cyklu komórkowego i panujących warunków środowiskowych, białka charakteryzują się różnym czasem półtrwania. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* waha się od 4 minut do 48 godzin (podczas gdy cykl komórkowy trwa około 90 min) [16].

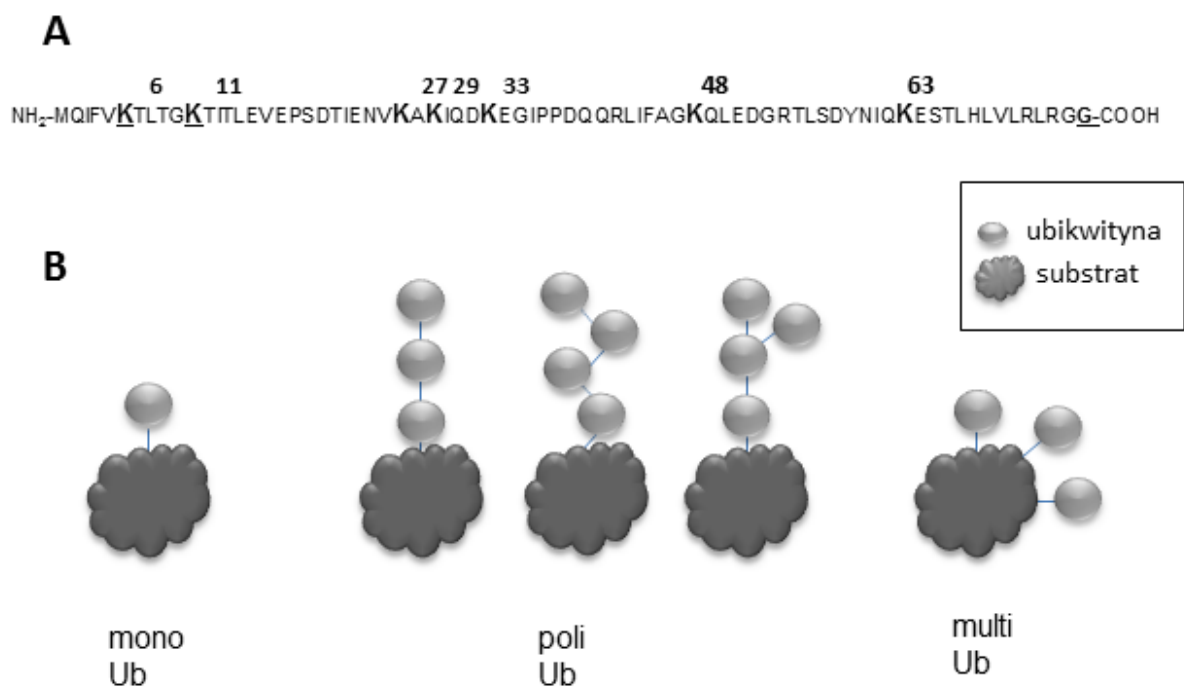
W komórkach eukariotycznych są dwie główne ścieżki degradacji białek – zależna od ubikwityny degradacja w proteasomie oraz proteoliza wakuolarna/lizosomalna. Uszkodzone i niepotrzebne białka cytozolowe, po rozpoznaniu, są kierowane na drogę degradacji proteasomalnej, choć w warunkach stresu głodowego mogą wybiórczo ulegać autofagii i następnie proteolizie wakuolarniej [12]. W proteasomie są hydrolizowane również białka zewnętrznej błony mitochondrialnej [27,87] oraz retrotranslokowane z retikulum endoplazmatycznego (ER) [41,49]. Otoczone podwójną błoną mitochondria, jako jedyne organella, wykształciły własny system proteolityczny – macierz mitochondrialna oraz błona wewnętrzna nie mają dostępu do cytoplazmatycznego systemu degradacji, stąd zawierają własne ATP-zależne

proteazy i oligopeptydazy [63]. Zupełnie inaczej są usuwane białka błony komórkowej, które podlegają kilkunetapowemu transportowi do wakuoli (lizosomu w komórkach zwierzęcych), gdzie wraz z fragmentami błony są degradowane przez nieswoiste proteazy i lipazy [71].

Biorąc pod uwagę różnorodność białek błonowych (np. transportery, receptory, kanały) zaburzenia procesu ich regulacji poprzez ubikwitynację doprowadzają do zmian w sieci odpowiedzi wewnątrzkomórkowej (down stream signaling pathways), a to wpływa na fizjologię komórki [31]. Zaburzenia ubikwitynacji białek błonowych mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na rozwój wielu chorób np. nowotworzenie, choroby serca, neurodegeneracyjne czy metaboliczne [31].

UBIKWITYNACJA BIAŁEK

Ubikwitynacja jest sposobem znakowania białek przeznaczonych do degradacji, endocytozy, naprawy i innych procesów komórkowych. Polega na kowalencyjnym przyłączeniu zbudowanej z 76 aminokwasów ubikwityny (Ub) do substratu, którym może być również inna cząsteczka ubikwityny. Tworzy się w ten sposób wiązanie izopeptydowe między resztą lizynową substratu, a C-końcówką glicyną ubikwityny [47]. W cząsteczce ubikwityny zidentyfikowano 6 reszt lizynowych: K6, K11, K29, K33, K48 i K63 (ryc.1), z których każda może utwo-



Ryc. 1. Typy ubikwitynacji; A - sekwencja aminokwasowa ubikwityny z zaznaczonymi lizynami (K), poprzez które może dochodzić do tworzenia układów poliubikwitynowych, B - przyłączenie cząsteczki ubikwityny do substratu może doprowadzić do monoubikwitynacji, multiubikwitynacji lub poliubikwitynacji

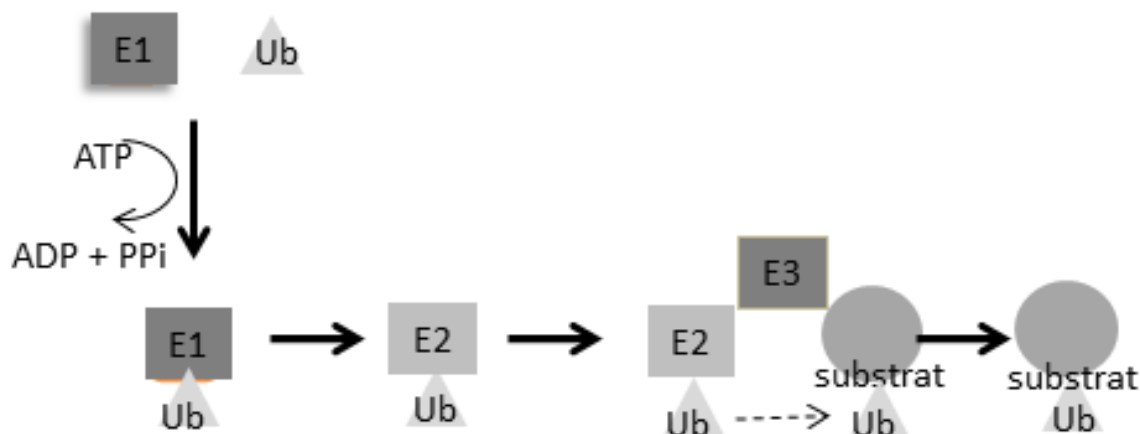
rzyć wiązanie izopeptydowe z następną cząsteczką ubikwityny. W wyniku poliubikwitynacji powstaje łańcuch ubikwityn, który w zależności od tego, przez którą resztę lizynową ubikwityny jest zbudowany, nadaje białku różne przeznaczenie. Łańcuchy dołączone do lizyny K48 kierują substrat na ścieżkę degradacji proteasomalnej [118], a odchodzące od lizyny K63 są sygnałem związanym z wieloma procesami komórkowymi, m.in. naprawą DNA [111] i odpowiedzią na stres środowiskowy [10], ale co najważniejsze w obrocie białek błony komórkowej – są sygnałem sortowania do ciał wielopęcherzykowych (MVBs, multivesicular bodies) [67].

Substrat może ulegać monoubikwitynacji, multiubikwitynacji (pojedyncze cząsteczki ubikwityny są przyłączane do różnych reszt lizynowych substratu) lub być poliubikwitynowany na wielu resztach lizynowych (ryc. 1), np. permeaza Gap1 u drożdży *S. cerevisiae* ma dwa takie miejsca – K9 i K16 [110]. Badania mutantów lizynowych Gap1 i receptora α -faktora wykazały, że już pojedyncza ubikwitynacja wystarcza do internalizacji białka błonowego [112,117], choć poliubikwitynacja przez UbK63 jest niezbędna do skierowania na ścieżkę MVB i degradacji wakuolarniej [67].

Proces ubikwitynacji przebiega w trzech etapach. W pierwszym dochodzi do aktywacji ubikwityny i przeniesieniu jej na resztę cysteinową enzymu aktywującego E1, powstaje wiązanie tioestrowe. Następnie ubikwityna zostaje przeniesiona na resztę cysteinową enzymu koniugującego E2. W ostatnim etapie ligaza ubikwityny, tzw. enzym E3, katalizuje powstanie wiązania izopeptydowego między C-końcową glicyną ubikwityny a grupą aminową reszty lizynowej substratu białkowego [47] (ryc. 2). U drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano 4 geny kodujące ubikwitynę: *UBI1*, *UBI2*, *UBI3*, *UBI4* (tabela 1). Większość organizmów eukariotycznych ma tylko jeden

enzym aktywujący E1 [95], a wiele E2 i E3. Na przykład u *S. cerevisiae* występuje jeden enzym E1 (Uba1), jednaście E2 (tabela 1) i 60-100 enzymów uczestniczących w ligacji [30]. Różnorodność ligaz E3 wynika z ich swoistości substratowej – są odpowiedzialne za rozpoznawanie substratu (również w kompleksach z E2), które odbywa się w różnych warunkach i umiejscowieniu. Ligazy ubikwityny funkcjonujące jako regulatory cyklu komórkowego rozpoznają inne substraty niż ligazy kierujące uszkodzone białka do degradacji. Natomiast w obrębie samych substratów, uszkodzenia mogą przyjmować różne formy wymagające innego rodzaju identyfikacji. Rozpoznawanie może mieć charakter bezpośredni lub występować z udziałem mediatorów. Ligaza Rsp5 biorąca m.in. udział w odpowiedzi na szok cieplny, rozpoznaje i ubikwitynuje białka cytoplazmatyczne bezpośrednio lub z udziałem białka opiekuńczego Hsp40 [28], a wchodząc w interakcje z białkami ARTs funkcjonuje jako część systemu jakości (QC, quality control) białek błonowych [136]. Zanim białko zostanie ubikwitynowane, musi zostać rozpoznane jako przeznaczone do degradacji. Pozwalają na to sygnały degradacyjne, tzw. degrony, zawarte w samej strukturze tych białek. Degronami mogą być krótkie sekwencje, np. PEST (region bogaty w prolinę, gutaminian, serynę i treoninę) [101], wolne grupy α -aminowe, motywy z charakterystycznie ufosforylowanymi resztami serynowymi/treoninowymi, a także odsłonięte reszty hydrofobowe [100].

Mechanizm rozpoznawania uszkodzonych białek błonowych (i cytoplazmatycznych) jest słabo poznany, choć zidentyfikowano różne elementy systemu QC zaangażowane w ten proces. W rozfałdowanych domenach cytoplazmatycznych, ogólnym degronem wydają się eksponowane reszty hydrofobowe, gdzie rekrutacja chaperonów nie wymaga odsłonięcia konkretnej sekwencji. Bardziej swoistych sygnałów degra-



Ryc. 2. Schemat procesu ubikwitynacji; E1 - enzym aktywujący, E2 - enzym koniugujący, E3 - ligaza ubikwityny, Ub - cząsteczka ubikwityny

Tabela 1. Składniki systemu ubikwitinacji u *Saccharomyces cerevisiae*

Geny kodujące ubikwitynę	
UBI1 (YIL148W)	Koduje białko ubikwityna-L40A (składnik podjednostki 60S rybosomu) [93]
UBI2 (YKR094C)	Koduje białko ubikwityna-L40B (składnik podjednostki 60S rybosomu) [93]
UBI3 (YLR167W)	Koduje białko ubikwityna-S31 (składnik rybosomu) [93]
UBI4 (YLL039C)	Koduje prekursorową formę pentameru poliubikwityny (5 kopii genu ubikwityny powtórzone bez przerw w układzie „head-to-tail”)
Białka E1	Charakterystyka
Uba1	Enzym aktywujący ubikwitynę; łączy się z terminalną glicyną ubikwityny poprzez wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe; aktywacja wymaga ATP; białko niezbędne do życia komórki [81]
Białka koniugujące/ E2/ UBC	Charakterystyka
Ubc1	Związane z biogenezą wakuoli, ERAD, kontrolą jakości białek jądrowych, degradacją proteasomalną [109]
Ubc2/Rad6	Związane z procesami naprawy DNA, regulacją histonu H2B, N-end rule degradacją białek [56]
Ubc3/Cdc34	Regulacja cyklu komórkowego; niezbędne do życia komórki
Ubc4	Kontrola jakości białek poza jądrem, związane z odpowiedzią na stres [108]
Ubc5	Podobne do Ubc4, ekspresja głównie w fazie stacjonarnej [108]
Ubc6/Doa2	Zlokalizowany na błonie ER; związany z ERAD; związany z degradacją proteasomalną [35]
Ubc7	Związany z ERAD [35]
Ubc8	Reguluje glukoneogenezę [98]
Ubc10	Zlokalizowany w peroksysomach, niezbędny do biogenezy peroksysomów [25]
Ubc11	[122]
Ubc12	E2 dla Rub1 (ubiquitin-like protein) [73]
Ubc13	Związany z naprawą DNA; tworzy heterodimer z Mms2 [19]
Deubikwitynazy	Charakterystyka
Ubp1	Zlokalizowane w ER i cytoplazmie [120]
Ubp2	Homeostaza K63 w stresie osmotycznym; deubikwitinacja Rsp5; związane z sortowaniem białek błonowych [14,64]; związany z ubikwitinacją PCNA i replikacją DNA [3], związany z regulacją ART [50]
Ubp3	Zlokalizowany w cytoplazmie; tworzy kompleks z Bre5; związany z regulacją transportu między ER i Golgi; związany z odpowiedzią na stres replikacyjny [14,119]
Doa4/Ubp4	Deubikwitinacja białek z pęcherzyków MVB; związany z degradacją białek błonowych; niezbędny do recyklingu Ub [94,103]; związany z odpowiedzią komórki na rtcę [53]
Ubp5	Zlokalizowany w miejscu pączkowania [130]
Ubp6	Związany z degradacją proteasomalną; związany z recyklingiem Ub [39]; związany z odpowiedzią komórki na rtcę [53]
Ubp7	Zlokalizowany w cytoplazmie; powiązany z naprawą DNA przez rekombinację [18]; związany z endocytozą [125]
Ubp8	Deubikwitynuje histon H2B [80]
Ubp9	Związany z transportem białek błonowych; wchodzi w interakcje z Duf1 [15]
Ubp10	Zlokalizowany w jądrze; reguluje PCNA [33]
Ubp11	[4]
Ubp12	Zlokalizowany w jądrze i cytoplazmie [4]
Ubp13	Związany z odpowiedzią komórki na rtcę [53]
Ubp14	Związany z degradacją Fbp1 [102], związany z odpowiedzią komórki na rtcę [53]
Ubp15	Wpływa na progresję cyklu komórkowego w fazie G1/S [92]; związany z odpowiedzią komórki na rtcę [53]; związany z ubikwitinacją PCNA i replikacją DNA [3]; związany z regulacją ART [50]
Ubp 16	Mitochondrialne [62]; związany z ubikwitinacją PCNA i replikacją DNA [3]
Otu1	Wchodzi w interakcje z Cdc48 [104]; związany z regulacją odpowiedzi na stres replikacyjny [119]
Otu2	Związany z rybosomami; związany z regulacją odpowiedzi na stres replikacyjny [119]
Rpn11	Metalopeptydaza związana z deubikwitinacją i degradacją białek w proteasomie [123]

dacyjnych można się dopatrywać w sekwencjach rozpoznawanych przez ligazy E3, np. Rsp5 ma domeny WW, mogące wiązać się do białek z motywem PY [136], być może w ten sposób bezpośrednio rozpoznaje uszkodzone białka.

Proces ubikwitynacji jest odwracalny. Częsteczki ubikwityny ulegają recyklingowi po rozcięciu wiązania izopeptydowego między resztą lizynową substratu a glicynową ubikwityny. Za uwolnienie ubikwityny są odpowiedzialne swoiste izopeptydazy nazywane deubikwitynazami (DUBs, deubiquitinating enzymes) [4]. U drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano dotychczas kilkanaście deubikwitynaz (tabela 1). Aktywność DUB jest potrzebna nie tylko do uwalniania ubikwityny ze znakowanego substratu, lecz również do uzyskania nowych cząsteczek przez obrabianie produktów genów Ubi1-Ubi4, kodujących fuzyjne białka połączonej ubikwityny i rybosomalnych białek L40 i S31 [29]. Rola deubikwitynaz w regulacji procesów komórkowych jest obecnie szeroko badana. Ubikwitynacja białek błony umożliwia ich endocytozę i degradację wakuolarną. Większość białek występujących wewnątrz komórki jest degradowana w proteasomach w cytoplazmie lub jądrze. Szacuje się, że u drożdży przynajmniej 80% proteasomów występuje w jądrze, gdzie za ubikwitynację wadliwych białek (również cytoplazmatycznych) odpowiada ligaza San1 [6,105]. W zupełnie inny sposób są proteolizowane białka błony komórkowej. Zbędne komórce, wykorzystane lub uszkodzone białka, przez endocytozę i sortowanie do ciał wielopęcherzykowych, docierają do wakuoli/lizosomu, gdzie są degradowane z fragmentami błony (ryc. 3). Wcześniej białko musi zostać rozpoznane przez ligazę E3 lub adaptor [89] i ubikwitynowane, co umożliwia internalizację dzięki rekrutacji białek endocytarnych, choć opisana została również endocytoza niezależna od ubikwitynacji [21]. Wiele z białek biorących udział w endocytozie i sortowaniu do endosomów ma domeny wiążące ubikwitynę (UBDs, ubiquitin binding domains). Adaptory Ent1, Ent2 i Ede1 rozpoznają białka znakowane do degradacji i umożliwiają jego interakcje z maszyną endocytarną [40]. Powstaje tzw. wczesny endosom i na tym etapie możliwy jest jeszcze recykling białka, które po deubikwitynacji może zostać skierowane z powrotem do błony komórkowej bezpośrednio lub przez TGN (trans-Golgi network) [51]. W innym wypadku następuje rekrutacja kompleksów ESCRT (endosomal complex required for transport), które odczytują ubikwitynację jako sygnał sortowania do ILVs (intraluminal vesicles), pęcherzyków powstających po wpukleniu się błony do wnętrza endosomu. Późny endosom zawierający wiele ILVs nazwano ciałem wielopęcherzykowym (MVB). Formacja ILVs wymaga aktywności pięciu konserwatywnych ewolucyjnie endosomalnych kompleksów sortujących ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III i ESCRT-IV. U drożdży *S. cerevisiae* w skład kompleksów wchodzi białka: ESCRT-0 (Vps27, Hse1), ESCRT-I (Vps23, Vps28, Vps37, Mvb12), ESCRT-II (Vps36, Vps22, Vps25), ESCRT-III (Vps20, Snf7, Vps24, Vps2, Vps60, Did2) i Vps4-AAA-ATPazy (Vps4, Vta1). Białka kompleksów ESCRT

0/I/II wchodzi w interakcje z ubikwitynowanymi białkami wykorzystując motywy interakcji z ubikwityną (UIM, ubiquitin-interaction motif) [52]. Wiąże się do ubikwityny przez resztę Ile44 i z nią sąsiadujące, uniemożliwiając jednoczesną interakcję wielu ESCRTs z jedną cząsteczką ubikwityny [129]. Tworzenie ILVs rozpoczyna rozpoznanie ubikwitynowanego ładunku (cargo) i przyłączenie się ESCRT-0 do endosomu. Na nakierowanie ESCRT do endosomu wpływa oddziaływanie z lipidami błony komórkowej. Podjednostka Hrs/Vps27 ESCRT-0 zawiera domenę FYVE, która swoiście wiąże trifosforanofosfatydyloinozytolu (PtdIns(3)P) i umożliwia rekrutację kompleksu do błony [99]. Podobnie inne domeny w obrębie ESCRT mają swoistą i nieswoistą zdolność wiązania do różnych lipidów, np. domena GLUE Vsp26 w ESCRT-II wiąże się do PtdIns(3)P i innych fosfatydyloinozytoli [34]. ESCRT-0 jest niezbędny do rekrutacji ESCRT-I i inicjuje szlak powstawania MVB. Wykazano, że również ligaza Rsp5 wchodzi w interakcje z ESCRT-0, wiążąc motyw PY w podjednostce Hse1, być może przykładając się do zmiany losów białka w ostatniej chwili [76]. ESCRT-I z jednej strony kompleksu wiąże się do ESCRT-0, a z drugiej do ESCRT II, jednocześnie ESCRT-I i -II wiążą ładunek, dzięki czemu powstaje region zawierający ubikwitynowane białka i rozpoczyna się inwaginacja błony endosomu [46]. ESCRT-II wiąże podjednostkę Vsp20, co umożliwia złożenie występującego w formie monomerycznej kompleksu ESCRT-III w całość, natomiast ESCRT-III odpowiada za złożenie ILV i oddzielenie go od błony endosomu. Zanim proces zostanie zakończony, podjednostka Snf7 ESCRT-III wiąże białko adaptorowe Bro1, rekrutujące do miejsca formacji pęcherzyka enzym deubikwitynujący Doa4, który umożliwia uwolnienie i recykling ubikwityny związanej z białkami (cargo) przeznaczonymi do degradacji [75]. Gdy zostanie pomyślnie rozdzielony do pęcherzyka wewnątrz MVB, kompleks Vps4-Vta1 o aktywności ATP-azy, rozmontowuje ESCRT-III rozfałdowując jego podjednostki, ale nie degradując ich [131]. Jeśli wszystkie cargo zostaną posortowane, dojrzałe MVB ulega fuzji z wakuolą i uwalnia swoją zawartość do lumen, gdzie poddana jest działaniu peptydaz. Dotychczas scharakteryzowano siedem wakuolarnych proteaz u *S. cerevisiae*: trzy aminopeptydazy (Ape1, Ape3, Dap2), dwie endopeptydazy (Pep4, Prb1) oraz dwie karboksypeptydazy (Prc1, Cps1) [43]. Pozwalają na cięcia substratów, a uzyskane w wyniku proteolizy białek aminokwasy są transportowane pompami błony wakuolarniej do cytoplazmy, gdzie zostają ponownie użyte do syntezy białek [57].

KONTROLA JAKOŚCI BIAŁEK BŁONY CYTOPLAZMATYCZNEJ

System kontroli jakości (quality control system) pozwala na rozpoznanie, oznakowanie i wysłanie wadliwych białek do degradacji. W cytoplazmie opiera się głównie na rekrutacji białek szoku cieplnego (HSPs, heat shock proteins), rodziny białek opiekuńczych (chaperony), których głównym zadaniem jest rozpoznawanie i wiązanie się do odsłoniętych reszt hydrofobowych białek, dzięki czemu promują prawidłowe fałdowanie i zapobiegają

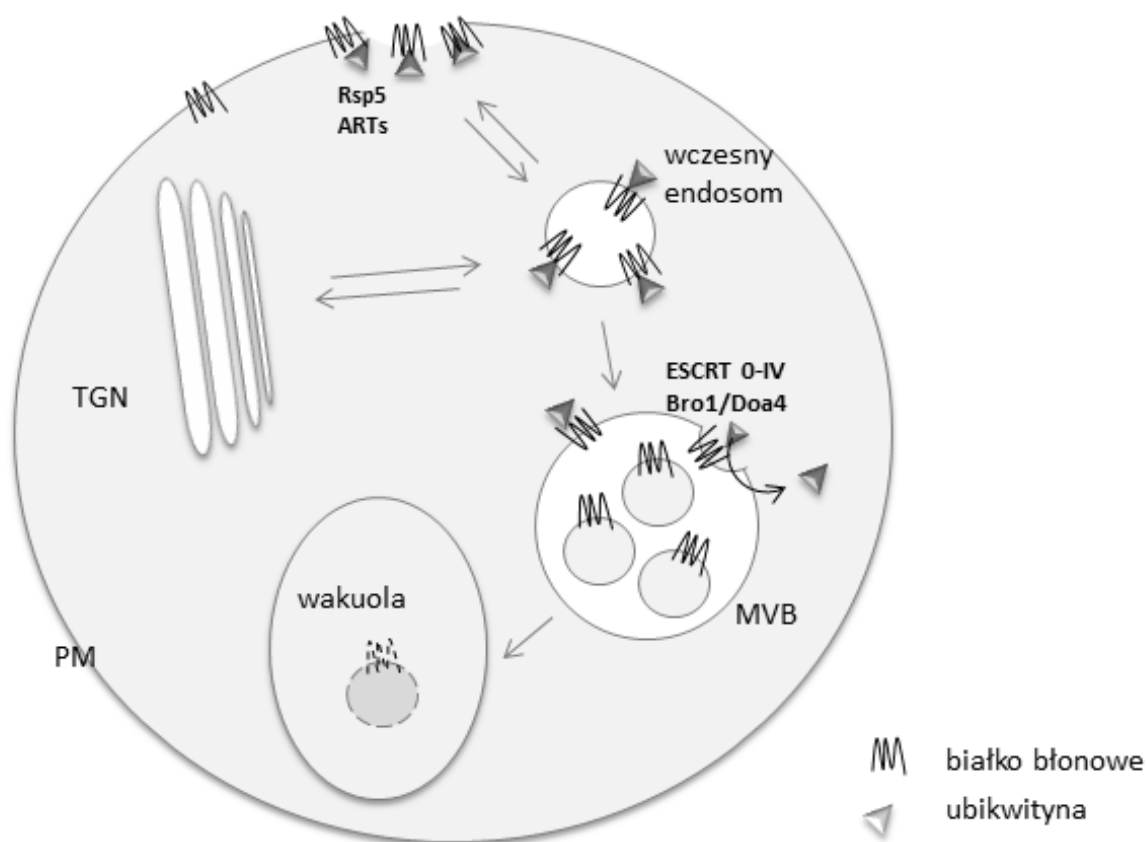
toksycznym skutkom agregacji [20]. Chaperony asystują w ponownym fałdowaniu uszkodzonych białek, ale też zapobiegają przedwczesnym zaburzeniom konformacyjnym już w podczas syntezy i umożliwiają przyjęcie prawidłowej konformacji po niej [61]. Wiązanie nie wymaga najczęściej odsłonięcia swoistej sekwencji, gdyż istotne jest szybkie rozpoznanie i eliminacja każdego nieprawidłowego strukturalnie białka. Jeśli po rozpoznaniu nie uda się przywrócić białka do poprawnej konformacji, kierowane jest na drogę degradacji [20].

Badania mutantów ssaczych [36,128] i drożdżowych [37,55,66,72] wykazały, że białka PM z uszkodzonymi konformacyjnymi zostają wycofane z błony i są degradowane w lizosomach/wakuolach. Po raz pierwszy proces ten opisano dla receptora α -faktora w komórkach *S. cerevisiae* [55]. W badaniach wykorzystano wrażliwe na temperaturę mutanty *ste2-3*, w komórkach których w temperaturze restrykcyjnej (34°C) receptory po syntezie kierowane były bezpośrednio do degradacji w wakuoli, z pominięciem PM. W temperaturze permissywnej (24°C) prawidłowo lokalizowały się w błonie, jednak po podwyższeniu temperatury do 34°C były kierowane do proteolizy wakuolarnej [55]. Wykazano w ten sposób, że źle sfałdowane białka PM podlegają kontroli jakości nie tylko w ER, ale również w samej błonie cytoplazmatycznej.

Nie wiadomo jeszcze, w jaki sposób różne defekty pozwalają na rozpoznanie konkretnego substratu przez system kontroli jakości. Badania drożdżowego mutantu H⁺-ATPazy błonowej Pma1 ze zmianami w jednej z domen cytoplazmatycznych (A165G i V197I) wskazały obecność takich systemów na poziomie błony komórkowej i potwierdziły wakuolarne przeznaczenie wadliwych form Pma1 [37,84]. U wrażliwego na temperaturę mutantu *pma1-10* w warunkach restrykcyjnych (37°C) nowo zsyntezowane i pomyślnie dostarczone do błony cytoplazmatycznej kopie Pma1-10 były od razu degradowane w wakuoli [37], podczas kiedy okres półrozpadu natywnej formy białka wynosi około 11 godzin [17].

ZALEŻNY OD CHAPERONÓW SYSTEM KONTROLI JAKOŚCI BIAŁEK BŁONOWYCH

W badaniach komórek ssaczych [8,9,91] zauważono, że w kontrolę jakości białek błony komórkowej są zaangażowane te same elementy, które biorą udział w kontroli białek cytoplazmatycznych. Pierwszą identyfikację chaperonów biorących udział w PM QC umożliwiła konstrukcja chimery CD4 z temperaturowo wrażliwym wariantem domeny faga λ , który ulega rozfałdowaniu w podwyższonej temperaturze [9]. Rozwijanie zlokalizowanego w błonie cytoplazmatycznej chimerycznego białka CD4t1- λ c



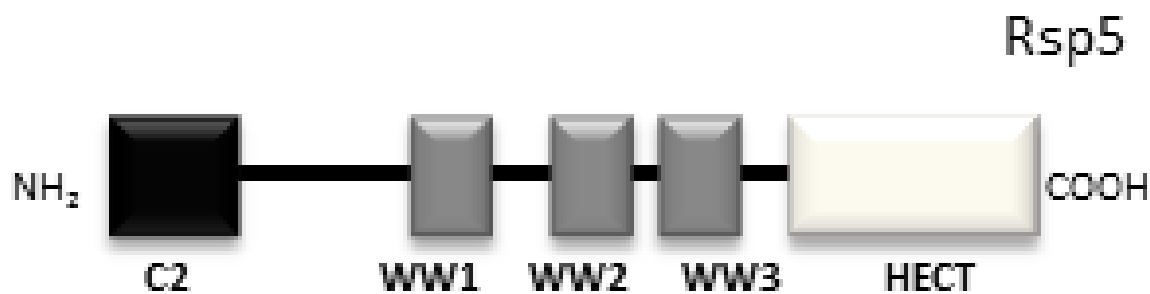
Ryc. 3. Zbędne białka błonowe są ubikwitynowane, a następnie przez endocytozę i sortowanie do ciał wielopęcherzykowych docierają do wakuoli/lizosomu, gdzie są degradowane z fragmentami błony

wywoływało rekrutację białek opiekuńczych Hsp40/Hsp70/Hsp90 oraz kompleksów E2- E3 (w tym CHIP); nie działa się tak w dzikiej wersji domeny λ . Podobna kontrola jakości obejmowała zmutowane formy receptorów wazopresyny V2 i dopaminy D2.2 [9]. Główną rolę chaperonów wykazano również w należącym do rodziny ABC transporterów receptorze CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), kanału chlorkowego, którego mutacje są przyczyną mukowiscydozy [59]. Rekrutacja Hsp70 i Hsp90 okazała się niezbędna do ubikwitynacji przez ligazę CHIP (C-terminus of Hsc70-interacting protein) i eliminacji niefunkcjonalnego wariantu $\Delta F508$ -CFTR z błony cytoplazmatycznej [91]. Białka chaperonów Hsp i ligaza ubikwityny CHIP nie wchodzi w interakcje z natywnymi formami CFTR, uczestniczą natomiast w cytoplazmatycznej kontroli jakości rozpoznając i kierując do degradacji wadliwe postaci białka błony komórkowej [8,22,82,91]. Wykazano w ten sposób, że ligaza CHIP jest głównym elementem łączącym chaperony z systemem kontroli jakości [82]. N-końcowa część białka CHIP zawiera domenę TPR (tetratricopeptide repeat), która umożliwia wiązanie do sekwencji EEVD chaperonów Hsp70 i Hsp90, a po stronie C-końca znajduje się domena U-box, która jest odpowiedzialna za interakcje CHIP z koniugującymi ubikwitynę enzymami E2 [135]. Wydaje się więc, że również w przypadku błony komórkowej białko eksponujące reszty hydrofobowe do cytoplazmy jest wiązane przez Hsp70/Hsp90. Jeśli nie powiedzie się powtórne fałdowanie do kompleksu przyłącza się przez TPR ligaza CHIP, która rekrutuje E2 i ubikwitynuje białko, kierując je tym samym do degradacji. Różnica tkwi w preferencji CHIP do poliubikwitynacji – w przypadku białek błony cytoplazmatycznej głównie tworzy łańcuchy poli-Ub łączone przez K63 [8,9], co jest sygnałem sortowania do MVB i degradacji lizosomalnej, a w przypadku białek cytozolowych łańcuchy ubikwityny są tworzone przez K48 [131], a to kieruje substrat do proteasomu. Podobnego systemu QC angażującego chaperony nie udało się zidentyfikować w komórkach drożdżowych. W badaniach wyizolowano temperaturowrażliwe mutanty Ura3 i podobnie jak CD4t1- Δc w komórkach ssaczych [9], wykorzystano zmu-

towaną domenę faga λ [70]. Mimo rozwiniętych domen cytoplazmatycznych badane białka (po opuszczeniu ER i ulokowaniu w błonie komórkowej) nie zostawały rozpoznane i nie ulegały degradacji. Obserwacja jest zaskakująca o tyle, że uszkodzone rejony hydrofobowe potencjalnie były narażone na działanie cytoplazmatycznego systemu QC. Choć drożdże nie mają homologa białka CHIP, podobne funkcje pełnią dwie ligazy ubikwityny - Ubr1 i San1, współpracując z chaperonami w obrębie cytoplazmy i jądra [44]. Być może więc w komórkach drożdżowych występuje odrębny system kontroli jakości białek błony komórkowej, niezależny od rekrutacji białek opiekuńczych. Wykazano, że za ubikwitynację większości białek PM u drożdży *S. cerevisiae* odpowiada ligaza Rsp5, która nie oddziałuje z białkami chaperonowymi [24].

Ligaza ubikwityny Rsp5 i sieć Rsp5-adaptor

Rsp5 jest E3 ligazą ubikwityny należącą do rodziny Nedd4, jedyną dotychczas zidentyfikowaną drożdżową ligazą ubikwitynującą białka błonowe. W strukturze Rsp5 wyróżnić można N-końcową domenę C2, która wykazuje interakcję z wieloma białkami i fosfolipidami [86], a także z C-końcową domeną katalityczną HECT, umożliwiającą przekazywanie ubikwityny z enzymu koniugującego E2 na substrat (ryc. 4) [54]. Interakcje z substratami zapewnia obecność trzech 40-aminokwasowych domen WW, zawierających dwie konserwatywne reszty tryptofanowe [134], które mogą się wiązać do białek zawierających bogaty w proliny motyw PPxY (PY), np. mediatorów ART [136] i substratów (ENAc) [23]. Ubikwitynacja białek błonowych przez Rsp5 jest sygnałem do ich internalizacji w procesie endocytozy [22], jednak Rsp5 (podobnie jak jej ssaczy homolog Nedd4) pełni również rolę w czasie szoku cieplnego, znakując białka cytozolowe do degradacji proteosomalnej [28]. Gdy substrat ulega rozfałdowaniu, może wyeksponować powszechny wśród białek motyw PPxY, który jest rozpoznawany przez domeny WW. Ligaza ubikwityny Rsp5 preferuje budowanie łańcuchów poli-Ub przez K63 [60].



Ryc. 4. Struktura ligazy ubikwityny Rsp5. W białku Rsp5 wyznaczono obecność domen WW (interakcja z substratem lub adaptorem), C2 (interakcja z fosfolipidami) i HECT (domena katalityczna)

W przypadku białek Fur4, Gap1 obserwowano zależną od Rsp5 ubikwitynację i internalizację mimo braku w sekwencji tych białek motywu PPXY [69]. Wykazano, że Rsp5 może być naprowadzana na błonowe substraty przez tzw. białka adaptorowe. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście białek pełniących funkcje adaptorów Rsp5. Większość z nich należy do rodziny α -arestyn [97], określa się je jako adaptory ART (arrestin-related trafficking adaptors). Do grupy adaptorów Rsp5 zakwalifikowano również drożdżowe białka Bul1, Bul2, Bsd2 [45,48,133], Ear1, Ssh4 [68], Tre1 i Tre2 [115] (tabela 2). Białka te pośredniczą w rozpoznawaniu i ubikwitynacji białek błonowych [136], sprawują więc ważną rolę w remodelingu błony komórkowej [88,89]. Degradacja wielu białek PM jest odpowiedzią adaptacyjną na różne zmiany środowiskowe, np. stres głodowy [57]. Taka regulacja ma na celu przystosowanie komórki do nowych warunków i mogą w niej uczestniczyć swoiste adaptory ART [77], ich funkcja nie ogranicza się więc do kontrolowania jakości białek. Dotąd do rodziny ART zakwalifikowano dziesięć białek (Art1-10) wykazujących podobieństwa w funkcji i budowie domenowej [74,88,89] (tabela 2). Wykazano również, że większość z nich (włączając Bul1,2 [83,90], Art1-Art8, Art10 [74,88]) ma motyw PPXY, który umożliwia wiązanie do ligazy Rsp5 przez domeny WW (wyjątkiem jest Art9 niemające motywu PPXY) [74].

Szok cieplny i inne czynniki proteotoksyczne (np. etanol, DTT, diamid) indukują wzmoczoną endocytozę i degradację białek błonowych, co wiąże się z eliminacją uszkodzeń w obrębie błony komórkowej [136]. Komórki ekspresjonujące zmutowane w obrębie domen WW białko *rsp5-ww2* i *rsp5-ww3* wykazywały znac-

nie zwiększoną wrażliwość na temperaturę i nie mogły rosnąć w temperaturze 38°C, natomiast utrata interakcji Rsp5-ART powodowała akumulację rozfałdowanych białek w PM, co za tym idzie utratę integralności błony i śmierć komórki [136]. Wskazuje to na ważną rolę domen WW Rsp5 wchodzących w interakcje z białkami adaptorów, i że to właśnie mediatory są odpowiedzialne za rozpoznawanie uszkodzonych, zbędnych lub wykorzystanych białek błonowych, które następnie są ubikwitynowane przez Rsp5 [28].

Dotychczasowe badania wskazują na specyfikę substratową mediatorów ART. Białka ART regulują endocytozę i degradację różnych transporterów błonowych, choć ich funkcje mogą się na siebie nakładać. Zaobserwowano również, że dany substrat może być rozpoznawany przez różne ART w zależności od warunków. Przykładowo Art4 w prawidłowych warunkach (obecność glukozy) pośredniczy w regulacji Hxt6, ale w warunkach stresowych internalizacja tego transportera wymaga aktywności Art8 [88,136]. Art1 przy współpracy z Art2 pośredniczy w endocytozie i degradacji Tat2 i Fur4, samo odpowiedzialne jest za regulację endocytozy m.in. permeaz metioniny Mup1, argininy Can1 i lizyny Lyp1 [74,88,136]. Art1 uczestniczy w degradacji wielu błędnie fałdowanych białek błony komórkowej w warunkach stresu cieplnego [24].

W temperaturze 38°C Art1 są transportowane do błony komórkowej i choć nie pośredniczą w indukowanej szokiem cieplnym degradacji wakuolarniej większości badanych białek błonowych, delecja $\Delta art1$ wykazywała podobną wrażliwość do mutantów *rsp5-ww2* i *rsp5-ww3*

Tabela 2. Adaptory dla ligazy ubikwityny Rsp5

Adaptory	Charakterystyka
Art1/Ldb19	Zlokalizowany w błonie komórkowej; regulacja endocytozy [75]
Art2/Ecm21	Zlokalizowany w błonie komórkowej; regulacja endocytozy [89]
Art3/Aly2	Reguluje endocytozę białek błonowych, reguluje sortowanie Gap1 w odpowiedzi na czynniki odżywcze [43]
Art4/Rod1	Zlokalizowany w błonie komórkowej; regulacja endocytozy [7]
Art5	Związany z endocytozą białek błonowych [75]
Art6/Aly1	Regulacja endocytozy; sortowanie białek w odpowiedzi na czynniki odżywcze [43]
Art7/Rog3	Regulacja endocytozy [89]
Art8/Csr2	Regulacja endocytozy; reguluje użycie niefermentowalnych źródeł węgla [89]
Art9/Rim8	Niezbędny do wzrostu w warunkach anaerobowych; związany z odpowiedzią na zmiany pH [89]
Art10	Zlokalizowany w cytoplazmie; nadekspresja powoduje oporność na arsenin [117]
Bul1	Regulacja sortowania permeaz aminokwasów z błony do wakuoli [46, 134]
Bul2	Funkcjonalny homolog Bul1 [134]
Bsd2	Reguluje transport metali przez błonę; reguluje wakuolarną degradację Smf1 [49]
Ear1	Reguluje segregowanie białek błonowych do MVB [69]
Ssh4	Reguluje segregowanie białek błonowych do MVB [69]
Tre1	Zlokalizowany w błonie komórkowej; wchodzi w interakcje z Bsd2; reguluje wakuolarną degradację Smf1 [116]
Tre2	Zlokalizowany w błonie komórkowej; wchodzi w interakcje z Bsd2; reguluje wakuolarną degradację Smf1 [116]

[136]. Sieć Rsp5-ART jest więc niezbędna do ochrony komórki przed toksycznymi skutkami akumulacji białek błony komórkowej i jest głównym składnikiem systemu kontroli jakości (QC) błony komórkowej. Różnorodność oddziaływań ART z wieloma substratami wyjaśnia w jaki sposób oddziaływanie ART-Rsp5 nadaje ligazie Rsp5 swoistość substratową. Wciąż nie wyjaśniono jednak w jaki sposób poszczególne substraty błonowe są rozpoznawane przez białka adaptorów. Adaptory Bsd2, Ear1, Tre1, Art1, Art2, Art3, Art6, Art8 same ulegają zależności od Rsp5 ubikwitynacji. Nie ustalono, czy w tym przypadku ubikwitynacja potrzebna jest do regulacji aktywności tych adaptorów; wykazano jednak, że ta modyfikacja wpływa na prawidłową ich lokalizację [65].

SYSTEM LID - DEGRON W ROZPOZNAWANIU SUBSTRATU PRZEZ RSP5-ADAPTOR

Podstawowym i najgroźniejszym problemem narastającym przy akumulacji uszkodzonych lub zbędnych białek PM, jest tworzenie się porów w komórce. Rozfałdowane białka zawierające wiele domen transmembranowych mogą tworzyć pory powodujące utratę integralności błony komórkowej, co prowadzi do śmierci komórki. Wykazano, że omówione wcześniej chaperonowe systemy mogą rozpoznawać długie rozfałdowane regiony ekspozowane do cytoplazmy [9,91], ale nie wiadomo w jaki sposób miałyby kontrolować jakość transmembranowych (lub zewnątrzkomórkowych) domen, które nie zostały do niej wycofane. W drożdżowym systemie Rsp5-ARTs regulacją niektórych transporterów błonowych w warunkach prawidłowych (np. obecności substratu) i stresowych zajmują się te same adaptory – np. Art2 reguluje degradację transportera uracylowego Fur4 w obecności uracylu, ale także po ekspozycji na cykloheksymid (choć inne ARTs mogą komplementować brak jego aktywności) [89]. Dalsze badania Fur4 doprowadziły do odkrycia tzw. systemu LID-degron.

Fur4 zawiera 12 domen transmembranowych i jest transporterem wtórnym. Operuje wykorzystując mechanizm naprzemiennego dostępu (AAM, alternating acces mechanism) - przyłączenie substratu powoduje niewielkie zmiany konformacyjne, ale podczas translokacji dochodzi do przesuwania się rejonów transbłonowych względem siebie [32]. W tym przypadku uracyl jest wiązany po stronie zewnątrzkomórkowej, zamykany w transporterze i następnie uwalniany do cytoplazmy tak, by nie doprowadzić do otwarcia transportera po obu stronach błony. Wysokie stężenie uracylu indukuje szybkie zmniejszenie ilości białka Fur4 w błonie i degradację wakuolarną [106], do czego jest potrzebna (katalizowana przez Rsp5) ubikwitynacja dwóch reszt lizynowych po stronie N-końca, sąsiadujących z sekwencją PEST [78]. Te same reszty podlegają ubikwitynacji również w warunkach stresowych (np. obecność cykloheksymidu; reakcja również katalizowana przez Rsp5) i w obu przypadkach w indukcji endocytozy Fur4 mogą brać udział te same ARTs. Wytlumaczeniem tego, w jaki sposób system ART-Rsp5 rozpoznaje zarówno natywne, jak i rozfałdowane postaci białka Fur4, wydaje się system LID-degron [58].

LID (loop interaction domain) jest domeną zbudowaną z 20 reszt aminokwasowych poprzedzających pierwszą domenę transmembranową transportera Fur4. Na podstawie analizy strukturalnej homologicznego transportera wtórnego u *Microbacterium liquefaciens* - Mhp1 [127] - zbudowano model, w którym LID tworząc wiązania wodorowe wchodzi w interakcje z wszystkimi pętlami cytoplazmatycznymi Fur4, w chwili kiedy z transporterem nie jest związany substrat. Wychwycenie cząsteczki uracylu powoduje zmiany konformacyjne w regionach transmembranowych, indukując zerwanie wiązań między LID a pętlami. Dzięki temu odsłonięty zostaje degron, ligaza Rsp5 uzyskuje dostęp do reszt lizynowych i możliwa staje się ich ubikwitynacja [58]. Działanie mechanizmu LID-degron tłumaczy również degradację indukowaną uszkodzeniami; szok cieplny i inne czynniki proteotoksyczne mogą zaburzać strukturę transporterów PM, przez co utracone zostają interakcje LID z pętlami. Taki model można przypisać nie tylko transporterom, ale właściwie każdemu białku błonowemu, które przechodzi funkcjonalne zmiany konformacyjne i degradowane jest przy dużej aktywności (koncentracji substratu) [13]. Rsp5 może bezpośrednio rozpoznawać sygnał do degradacji – jak wykazano może wiązać białka cytoplazmatyczne w czasie szoku cieplnego, bez udziału mediatorów [28]. Choć Fur4 nie zawiera motywu PY nie można wykluczyć, że wchodzi w innego rodzaju interakcje z Rsp5. Rekrutacja Rsp5 po odsłonięciu degronu prawdopodobnie odbywa się za pośrednictwem białek ART lub innych, związanych z błoną mediatorów [13].

Najnowsze badania wskazują, że zależna od Rsp5 degradacja permeazy metioniny Mup1 jest regulowana przez interakcje białka Mup1 z arrestyną Art1. Rozpoznawany przez Art1 degron znajduje się na N-końcowej cytoplazmatycznej części białka Mup1, tuż przy lizynie K27 i K28, ulegającej Rsp5-zależnej ubikwitynacji. Region rozpoznawany przez Art1 obejmuje grupę kwaśnych aminokwasów (D43, Q49, L54), których zmiana na pozytywnie naładowaną argininę blokuje internalizację Mup1 [38]. Podobny system regulacji zaobserwowano w przypadku zależnej od Art1 degradacji i endocytozy permeazy argininy Can1, gdzie degron zidentyfikowano w obrębie grupy kwaśnych aminokwasów na N-końcu białka [38].

UBIKWITYNACJA W TERAPII

Odkrycie ubikwityny i wyjaśnienie procesu ubikwitynacji było ważnym procesem w biologii molekularnej (Nagroda Nobla, 2004). Szybko zaobserwowano, że jakiegokolwiek zaburzenia procesów ubikwitynacji prowadzą do zaburzeń w homeostazie proteasomu komórkowego i w konsekwencji wielu chorób. Ubikwitynacja wpływa na regulowanie czasu obecności danego białka w błonie, bezpośrednio reguluje aktywność takich białek jak kanały jonowe, transportery aminokwasów czy receptory. Zaburzenia regulacji wpływają na aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych i mają różny wpływ na fizjologię komórki. Obecnie wskazano

wiele patologii związanych z zaburzeniami ubikwitynacji białek błonowych doprowadzających do nowotworzenia, rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i układu krążenia, nadciśnienia czy mukowiscydozy [31]. Upośledzenie aktywności ligazy ubikwityny FBW7 w komórkach ludzkich powoduje nadaktywność onkogenów: cykliny E, Myc, Jun i Notch. Mutacja ligazy ubikwityny c-Clb powoduje inhibicję ubikwitynacji białka FLT3, doprowadzając do transformacji nowotworowej i białaczki [126]. Zablockowanie w wyniku mutacji ubikwitynacji nabłonkowego kanału sodowego ENaC, który odgrywa główną rolę w regulacji stężenia sodu, powoduje nadaktywność tego białka, co jest głównym czynnikiem rozwoju nadciśnienia tętniczego i zespołu Liddle'a [113,114]. Mutacja kinazy PINK1 blokująca jego ubikwitynację doprowadza do zablockowania mitofagii i rozwoju wczesnej postaci choroby Parkinsona [96]. Wykazano, że ubikwitynacja odgrywa główną rolę w regulacji APP i α -amyloidu, białek odpowiedzialnych za rozwój choroby Alzheimera. Ligaza ubikwityny Nedd4 jest związana z regulacją transportera błonowego ABCB1, który eksportuje α -amyloid z komórek śródbłonka [1].

System ubikwitynacji jest obecnie wykorzystywany do walki z chorobami. Dotychczas zastosowane terapeutyki mające na celu inhibicję ubikwitynacji celują w zablockowanie proteasomu. Brak jednak środków swoiście działających na ubikwitynację i degradację białek błonowych. Badania wykazały, że zmutowana postać błonowego kanału chlorkowego CFTR(Δ F508) nie podlega sortowaniu do błony komórkowej, ale ulega szybkiej degradacji w systemie ERAD, co doprowadza do rozwoju mukowiscydozy. Zaobserwowano, że usunięcie ligaz ubikwityny RNF5 i RNF185 blokuje degradację CFTR(Δ F508) i pozwala na ponowne prawidłowe wprowadzanie CFTR do błony, bez wpływu na inne substraty ERAD [26,121]. Ukierunkowane blokowanie ligaz ubikwityny mogłoby stworzyć szansę na leczenie np. chorych z mukowiscydozą, dlatego tak ważne jest ustalenie mechanizmów regulujących ubikwitynację i degradację białek błonowych. Większość informacji o tym systemie czerpie się z badań prowadzonych na modelowym organizmie, drożdżach *S. cerevisiae*.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akkaya B.G., Zolnerciks J.K., Ritchie T.K., Bauer B., Hartz A.M., Sullivan J.A., Linton K.J.: The multidrug resistance pump ABCB1 is a substrate for the ubiquitin ligase NEDD4-1. *Mol. Membr. Biol.*, 2015; 32: 39-45
- [2] Almén M.S., Nordström K.J., Fredriksson R., Schiöth H.B.: Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol.*, 2009; 7: 50
- [3] Álvarez V., Viñas L., Gallego-Sánchez A., Andrés S., Sacristán M.P., Bueno A.: Orderly progression through S-phase requires dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 25513
- [4] Amerik A.Y., Hochstrasser M.: Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1695: 189-207
- [5] Amerik A.Y., Li S.J., Hochstrasser M.: Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.*, 2000; 381: 981-992
- [6] Amm I., Sommer T., Wolf D.H.: Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1843: 182-196
- [7] Andoh T., Hirata Y., Kikuchi A.: PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Lett.*, 2002; 525: 131-134
- [8] Apaja P.M., Foo B., Okiyoneda T., Valinsky W.C., Barriere H., Atanasiu R., Ficker E., Lukacs G.L., Shrier A.: Ubiquitination-dependent quality control of hERG K⁺ channel with acquired and inherited conformational defect at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, 2013; 24: 3787-3804
- [9] Apaja P.M., Xu H., Lukacs G.L.: Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, 2010; 191: 553-570
- [10] Arnason T., Ellison M.J.: Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol. Cell Biol.*, 1994; 14: 7876-7883
- [11] Aubry L., Klein G.: True arrestins and arrestin-fold proteins: a structure-based appraisal. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2013; 118: 21-56
- [12] Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y.: Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.*, 1994; 124: 903-913
- [13] Babst M.: Quality control at the plasma membrane: one mechanism does not fit all. *J. Cell Biol.*, 2014; 205: 11-20
- [14] Baker R.T., Tobias J.W., Varshavsky A.: Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 23364-23375
- [15] Beckley J.R., Chen J.S., Yang Y., Peng J., Gould K.L.: A degenerate cohort of yeast membrane trafficking DUBs mediates cell polarity and survival. *Mol. Cell. Proteomics*, 2015; 14: 3132-3141
- [16] Belle A., Tanay A., Bitincka L., Shamir R., O'Shea E.K.: Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 13004-13009
- [17] Benito B., Moreno E., Lagunas R.: Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1063: 265-268
- [18] Böhm S., Szakal B., Herken B.W., Sullivan M.R., Mihalevic M.J., Kabbinar F.F., Branzei D., Clark N.L., Bernstein K.A.: The budding yeast ubiquitin protease Ubp7 is a novel component involved in S phase progression. *J. Biol. Chem.*, 2016; 291: 4442-4452
- [19] Brusky J., Zhu Y., Xiao W.: *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 2000; 37: 168-174
- [20] Chen B., Retzlaff M., Roos T., Frydman J.: Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011; 3: a004374
- [21] Chen L., Davis N.G.: Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic*, 2002; 3: 110-123
- [22] d'Azzo A., Bongiovanni A., Nastasi T.: E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic*, 2005; 6: 429-441

- [23] Dunn R., Hicke L.: Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 2001; 12: 421-35
- [24] Dupré S., Urban-Grimal D., Haguenaer-Tsapis R.: Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1695: 89-111
- [25] Eckert J.H., Johnsson N.: Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 3623-3634
- [26] El Khouri E., Le Pavec G., Toledano M.B., Delaunay-Moisan A.: RNF185 is a novel E3 ligase of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) that targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 31177-31191
- [27] Escobar-Henriques M., Langer T.: Mitochondrial shaping cuts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1763: 422-429
- [28] Fang N.N., Chan G.T., Zhu M., Comyn S.A., Persaud A., Deshaies R.J., Rotin D., Gsponer J., Mayor T.: Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress. *Nat. Cell Biol.*, 2014; 16: 1227-1237
- [29] Finley D., Bartel B., Varshavsky A.: The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 1989; 338: 394-401
- [30] Finley D., Ulrich H.D., Sommer T., Kaiser P.: The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2012; 192: 319-360
- [31] Foot N., Henshall T., Kumar S.: Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol. Rev.*, 2017; 97: 253-281
- [32] Forrest L.R., Krämer R., Ziegler C.: The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1807: 167-188
- [33] Gallego-Sánchez A., Andrés S., Conde F., San-Segundo P.A., Bueno A.: Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.*, 2012; 8: e1002826
- [34] Gill D.J., Teo H., Sun J., Perisic O., Veprintsev D.B., Emr S.D., Williams R.L.: Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.*, 2007; 26: 600-612
- [35] Gilon T., Chomsky O., Kulka R.G.: Degradation signals recognized by the Ubc6p-Ubc7p ubiquitin-conjugating enzyme pair. *Mol. Cell Biol.*, 2000; 20: 7214-7219
- [36] Glozman R., Okiyoneda T., Mulvihill C.M., Rini J.M., Barriere H., Lukacs G.L.: N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.*, 2009; 184: 847-862
- [37] Gong X., Chang A.: A mutant plasma membrane ATPase, Pma1-10, is defective in stability at the yeast cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9104-9109
- [38] Guiney E.L., Klecker T., Emr S.D.: Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol. Biol. Cell*, 2016; 27: 4043-4054
- [39] Guterman A., Glickman M.H.: Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1729-1738
- [40] Haglund K., Dikic I.: The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.*, 2012; 125: 265-275
- [41] Hampton R.Y.: ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002; 14: 476-482
- [42] Hatakeyama R., Kamiya M., Takahara T., Maeda T.: Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol. Cell Biol.*, 2010; 30: 5598-5607
- [43] Hecht K.A., O'Donnell A.F., Brodsky J.L.: The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell. Logist.*, 2014; 4: e28023
- [44] Heck J.W., Cheung S.K., Hampton R.Y.: Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 1106-1111
- [45] Helliwell S.B., Losko S., Kaiser C.A.: Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.*, 2001; 153: 649-662
- [46] Henne W.M., Buchkovich N.J., Emr S.D.: The ESCRT pathway. *Dev. Cell*, 2011; 21: 77-91
- [47] Hershko A., Ciechanover A.: The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 425-479
- [48] Hettema E.H., Valdez-Taubas J., Pelham H.R.: Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.*, 2004; 23: 1279-1288
- [49] Hiller M.M., Finger A., Schweiger M., Wolf D.H.: ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, 1996; 273: 1725-1728
- [50] Ho H.C., MacGurn J.A., Emr S.D.: Deubiquitinating enzymes Ubp2 and Ubp15 regulate endocytosis by limiting ubiquitination and degradation of ARTs. *Mol. Biol. Cell*, 2017; 28: 1271-1283
- [51] Huotari J., Helenius A.: Endosome maturation. *EMBO J.*, 2011; 30: 3481-3500
- [52] Hurley J.H.: ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008; 20: 4-11
- [53] Hwang G.W., Kimura Y., Takahashi T., Lee J.Y., Naganuma A.: Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 2012; 37: 1287-1290
- [54] Ingham R.J., Gish G., Pawson T.: The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, 2004; 23: 1972-1984
- [55] Jenness D.D., Li Y., Tipper C., Spatrick P.: Elimination of defective α -factor pheromone receptors. *Mol. Cell Biol.*, 1997; 17: 6236-6245
- [56] Jentsch S., McGrath J.P., Varshavsky A.: The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, 1987; 329: 131-134
- [57] Jones C.B., Ott E.M., Keener J.M., Curtiss M., Sandrin V., Babst M.: Regulation of membrane protein degradation by starvation-response pathways. *Traffic*, 2012; 13: 468-482
- [58] Keener J.M., Babst M.: Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic*, 2013; 14: 412-427
- [59] Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 1989; 245: 1073-1080
- [60] Kim H.C., Huibregtse J.M.: Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol. Cell Biol.*, 2009; 29: 3307-3318
- [61] Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A., Hayer-Hartl M., Hartl F.U.: Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013; 82: 323-355
- [62] Kinner A., Kölling R.: The yeast deubiquitinating enzyme Ubp16 is anchored to the outer mitochondrial membrane. *FEBS Lett.*, 2003; 549: 135-140
- [63] Koppen M., Langer T.: Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2007; 42: 221-242
- [64] Lam M.H., Urban-Grimal D., Bugnicourt A., Greenblatt J.F., Haguenaer-Tsapis R., Emili A.: Interaction of the deubiquitinating enzyme Ubp2 and the E3 ligase Rsp5 is required for transporter/receptor sorting in the multivesicular body pathway. *PLoS One*, 2009; 4: e4259

- [65] Lauwers E., Erpapazoglou Z., Haguenaer-Tsapis R., André B.: The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.*, 2010; 20: 196-204
- [66] Lauwers E., Grossmann G., André B.: Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. *Mol. Biol. Cell*, 2007; 18: 3068-3080
- [67] Lauwers E., Jacob C., André B.: K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J. Cell Biol.*, 2009; 185: 493-502
- [68] Léon S., Erpapazoglou Z., Haguenaer-Tsapis R.: Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell*, 2008; 19: 2379-2388
- [69] Léon S., Haguenaer-Tsapis R.: Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.*, 2009; 315: 1574-1583
- [70] Lewis M.J., Pelham H.R.: Inefficient quality control of thermosensitive proteins on the plasma membrane. *PLoS One*, 2009; 4: e5038
- [71] Li S.C., Kane P.M.: The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1793: 650-663
- [72] Li Y., Kane T., Tipper C., Spatrick P., Jenness D.D.: Yeast mutants affecting possible quality control of plasma membrane proteins. *Mol. Cell Biol.*, 1999; 19: 3588-3599
- [73] Liakopoulos D., Doenges G., Matuschewski K., Jentsch S.: A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J.*, 1998; 17: 2208-2214
- [74] Lin C.H., MacGurn J.A., Chu T., Stefan C.J., Emr S.D.: Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*, 2008; 135: 714-725
- [75] Luhtala N., Odorizzi G.: Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.*, 2004; 166: 717-729
- [76] MacGurn J.A., Hsu P.C., Emr S.D.: Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu. Rev. Biochem.*, 2012; 81: 231-259
- [77] MacGurn J.A., Hsu P.C., Smolka M.B., Emr S.D.: TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell*, 2011; 147: 1104-1117
- [78] Marchal C., Haguenaer-Tsapis R., Urban-Grimal D.: Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 23608-23614
- [79] Masters P.M., Bada J.L., Zigler J.S. Jr: Aspartic acid racemization in heavy molecular weight crystallins and water-insoluble protein from normal human lenses and cataracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 1204-1208
- [80] McCormick M.A., Mason A.G., Guyenet S.J., Dang W., Garza R.M., Ting M.K., Moller R.M., Berger S.L., Kaeberlein M., Pillus L., La Spada A.R., Kennedy B.K.: The SAGA histone deubiquitinase module controls yeast replicative lifespan via Sir2 interaction. *Cell Rep.*, 2014; 8: 477-486
- [81] McGrath J.P., Jentsch S., Varshavsky A.: UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.*, 1991; 10: 227-236
- [82] Meacham G.C., Patterson C., Zhang W., Younger J.M., Cyr D.M.: The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 100-105
- [83] Merhi A., André B.: Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Cell Biol.*, 2012; 32: 4510-4522
- [84] Morsomme P., Slayman C.W., Goffeau A.: Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1469: 133-157
- [85] Murata S., Minami Y., Minami M., Chiba T., Tanaka K.: CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.*, 2001; 2: 1133-1138
- [86] Nalefski E.A., Falke J.J.: The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Prot. Sci.*, 1996; 5: 2375-2390
- [87] Neutzner A., Youle R.J.: Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 18598-18603
- [88] Nikko E., Pelham H.R.: Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic*, 2009; 10: 1856-1867
- [89] Nikko E., Sullivan J.A., Pelham H.R.: Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.*, 2008; 9: 1216-1221
- [90] Novoselova T.V., Zahira K., Rose R.S., Sullivan J.A.: Bul proteins, a nonredundant, antagonistic family of ubiquitin ligase regulatory proteins. *Eukaryot. Cell*, 2012; 11: 463-470
- [91] Okiyoneda T., Barrière H., Bagdány M., Rabeih W.M., Du K., Höhfeld J., Young J.C., Lukacs G.L.: Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, 2010; 329: 805-810
- [92] Ostapenko D., Burton J.L., Solomon M.J.: The Ubp15 deubiquitinase promotes timely entry into S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 2015; 26: 2205-2216
- [93] Ozkaynak E., Finley D., Solomon M.J., Varshavsky A.: The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.*, 1987; 6: 1429-1439
- [94] Papa F.R., Hochstrasser M.: The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature*, 1993; 366: 313-319
- [95] Pickart C.M., Eddins M.J.: Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1695: 55-72
- [96] Pickrell A.M., Youle R.J.: The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 2015; 85: 257-273
- [97] Piper R.C., Dikic I., Lukacs G.L.: Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014; 6: a016808
- [98] Qin S., Nakajima B., Nomura M., Arfin S.M.: Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a new member of the ubiquitin-conjugating protein family. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 15549-15554
- [99] Raiborg C., Bremnes B., Mehlum A., Gillooly D.J., D'Arrigo A., Stang E., Stenmark H.: FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell Sci.*, 2001; 114: 2255-2263
- [100] Ravid T., Hochstrasser M.: Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 679-690
- [101] Rechsteiner M., Rogers S.W.: PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, 1996; 21: 267-271
- [102] Regelmann J., Schüle T., Josupeit F.S., Horak J., Rose M., Entian K.D., Thumm M., Wolf D.H.: Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 1652-1663
- [103] Richter C.M., West M., Odorizzi G.: Doa4 function in ILV budding is restricted through its interaction with the Vps20 subunit of ESCRT-III. *J. Cell Sci.*, 2013; 126: 1881-1890
- [104] Rumpf S., Jentsch S.: Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol. Cell*, 2006; 21: 261-269

- [105] Russel S.J., Steger K.A., Johnston S.A.: Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21943-21952
- [106] Séron K., Blondel M.O., Haguenaer-Tsapis R., Volland C.: Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 1793-1800
- [107] Serrano R., Kielland-Brandt M.C., Fink G.R.: Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 1986; 319: 689-693
- [108] Seufert W., Jentsch S.: Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.*, 1990; 9: 543-550
- [109] Seufert W., McGrath J.P., Jentsch S.: UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. *EMBO J.*, 1990; 9: 4535-4541
- [110] Soetens O., De Craene J.O., Andre B.: Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 43949-43957
- [111] Spence J., Sadis S., Haas A.L., Finley D.: A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell Biol.*, 1995; 15: 1265-1273
- [112] Springael J.I., Galan J.M., Haguenaer-Tsapis R., André B.: NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.*, 1999; 112: 1375-1383
- [113] Staub O., Abriel H., Plant P., Ishikawa T., Kanelis V., Saleki R., Horisberger J.D., Schild L., Rotin D.: Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int.*, 2000; 57: 809-815
- [114] Staub O., Dho S., Henry P., Correa J., Ishikawa T., McGlade J., Rotin D.: WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.*, 1996; 15: 2371-2380
- [115] Stimpson H.E., Lewis M.J., Pelham H.R.: Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J.*, 2006; 25: 662-672
- [116] Takahashi T., Yano T., Zhu J., Hwang G.W., Naganuma A.: Overexpression of FAP7, MIG3, TMA19, or YLR392c confers resistance to arsenite on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35: 945-946
- [117] Terrell J., Shih S., Dunn R., Hicke L.: A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell*, 1998; 1: 193-202
- [118] Thrower J.S., Hoffman L., Rechsteiner M., Pickart C.M.: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.*, 2000; 19: 94-102
- [119] Tkach J.M., Yimit A., Lee A.Y., Riffle M., Costanzo M., Jaschob D., Hendry J.A., Ou J., Moffat J., Boone C., Davis T.N., Nislow C., Brown G.W.: Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.*, 2012; 14: 966-976
- [120] Tobias J.W., Varshavsky A.: Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 12021-12028
- [121] Tomati V., Sondo E., Armirotti A., Caci E., Pesce E., Marini M., Gianotti A., Jeon Y.J., Cilli M., Pistorio A., Mastracci L., Ravazzolo R., Scholte B., Ronai Z., Galiotta L.J., Pedemonte N.: Genetic inhibition of the ubiquitin ligase Rnf5 attenuates phenotypes associated to F508del cystic fibrosis mutation. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 12138
- [122] Townsley F.M., Ruderman J.V.: Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* UBC11 gene. *Yeast*, 1998; 14: 747-757
- [123] Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., Koonin E.V., Deshaies R.J.: Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 2002; 298: 611-615
- [124] Wang N., Chen W., Linsel-Nitschke P., Martinez L.O., Agerholm-Larsen B., Silver D.L., Tall A.R.: A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 99-107
- [125] Weinberg J.S., Drubin D.G.: Regulation of clathrin-mediated endocytosis by dynamic ubiquitination and deubiquitination. *Curr. Biol.*, 2014; 24: 951-959
- [126] Welcker M., Clurman B.E.: FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 83-93
- [127] Weyand S., Shimamura T., Yajima S., Suzuki S., Mirza O., Kru-song K., Carpenter E.P., Rutherford N.G., Hadden J.M., O'Reilly J., Ma P., Saidijam M., Patching S.G., Hope R.J., Norbertczak H.T. i wsp.: Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*, 2008; 322: 709-713
- [128] Wilson M.H., Highfield H.A., Limbird L.E.: The role of a conserved inter-transmembrane domain interface in regulating α_{2a} -adrenergic receptor conformational stability and cell-surface turnover. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 59: 929-938
- [129] Wollert T., Yang D., Ren X., Lee H.H., Im Y.J., Hurley J.H.: The ESCRT machinery at a glance. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 2163-2166
- [130] Xiao W., Fontanie T., Tang M.: UBP5 encodes a putative yeast ubiquitin-specific protease that is related to the human Tre-2 oncogene product. *Yeast*, 1994; 10: 1497-1502
- [131] Xu P., Duong D.M., Seyfried N.T., Cheng D., Xie Y., Robert J., Rush J., Hochstrasser M., Finley D., Peng J.: Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 2009; 137: 133-145
- [132] Yang B., Stjepanovic G., Shen Q., Martin A., Hurley J.H.: Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015; 22: 492-498
- [133] Yashiroda H., Oguchi T., Yasuda Y., Toh E.A., Kikuchi Y.: Bul1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 3255-3263
- [134] Zarrinpar A., Lim W.A.: Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat. Struct. Biol.*, 2000; 7: 611-613
- [135] Zhang M., Windheim M., Roe S.M., Peggie M., Cohen P., Prodromou C., Pearl L.H.: Chaperoned ubiquitylation – crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol. Cell*, 2005; 20: 525-538
- [136] Zhao T., Macgurn J.A., Liu M., Emr S.: The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *eLife*, 2013; 2: e00459

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.