

Substrate specificity and regulation of SUMOtargeted ubiquitin ligases in yeast and in humans

Abstract

Post-translational modifications play a crucial role in orchestrating various cellular processes. Sumoylation and ubiquitylation are two such protein modifications. Sumoylation of protein substrates can either affect their subcellular localization or functions. SUMO chain formation on substrate proteins serves as targeting signal recognized by members of a novel class of ubiquitin ligases called SMO-targeted ubiquitin E3 ligases (StUbls) or ubiquitin ligases for sumoylated proteins (ULSs). These StUbls interact with SUMO via their SUMO Interaction motifs (SIMs). A few of such StUbls proteins have been identified thus far. Human Arkadia and budding yeast Uls1 are two such StUbls proteins, which were analysed in the present work.

Although a few StUbls have been characterized, the substrate specificity of SIMs in this novel class of enzymes towards the different SUMO isoforms present in humans has not yet been addressed *in vivo*. In mammals, there are 3 conjugatable SUMO isoforms (SUMO1, -2 and -3), unlike in budding yeast which has only one isoform – SMT3. In order to analyze mammalian StUbl proteins using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a battery of linear translational fusions with human SUMO isoforms were constructed to study the SUMO-SIM substrate specificity of human StUbls.

Using the linear SUMO fusion proteins a novel substrate specificity was discovered for Arkadia. It preferentially targeted substrates with SUMO1-capped SUMO2 chains in yeast. A SMO one binding motif (SOB) in Arkadia is critical for this SUMO1 specificity. This SUMO1 binding surface on Arkadia acts different from the standard SUMO interaction motifs (SIMs), which interact with the SIM interaction groove (SIG) present in all SUMO isoforms. SOB in arkadia instead interacts with the 'E67-interaction loop' in SUMO1. Our results indicate that SIM1 and SOB in Arkadia contribute to binding of a SUMO1 unit at the N-terminus of a SUMO chain, whereas SIM2 contributes to SUMO2 chain specificity. Importantly it is also demonstrated that Arkadia has StUbl activity also towards endogenous substrates in a human cervical cancer cell line (HeLa B cells). Targeting of endogenous substrates involves SUMO2 and SUMO1 modification that is dependent on and requires a functional SOB in Arkadia providing evidence for a physiological relevance of a specificity towards substrates marked with SUMO1-capped SUMO2 chains.

StUbls promote proteolysis and therefore regulate the abundance of sumoylated substrates. Here it is shown that abundance of StUbls themselves is also subjected to a proteolytic control. It is demonstrated that the stability of StUbls is regulated by a SUMO-dependent mechanism. Two different, but related regulatory mechanisms were discovered in the present study for two different StUbls: Arkadia undergoes auto-ubiquitylation and degradation by the proteasome (*auto-regulation*). The yeast StUbl Uls1 undergoes ubiquitylation by another yeast StUbl, Slx5 (*cross-regulation*).

Zusammenfassung

Post-translationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle bei der Orchestrierung vieler zellulärer Prozesse. Sumoylierung und Ubiquitylierung sind zwei solcher Protein-Modifikationen. Sumoylierung von Protein-Substraten kann entweder deren Lokalisierung in der Zelle oder deren Funktion verändern. An Substrate konjugierte SUMO-Ketten dienen als Signale für deren Erkennung durch Enzyme einer neuen Klasse von Ubiquitin-ligasen, den so genannten SUMO-spezifischen Ubiquitin-Ligasen (StUbls oder ULS). Diese binden an SUMO über SUMO-Interaktions-Motive (SIMs). Einige wenige solcher StUbl konnten bisher identifiziert werden. Das menschliche Protein Arkadia und das ULS1-Protein der Bäckerhefe sind zwei solcher StUbls, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Obwohl bereits einige StUbls charakterisiert sind, wurde die durch ihre individuellen SIMs vermittelte Substrat-Spezifität bei diesen neuen Ubiquitin-Ligasen bezüglich der in menschlichen Zellen vorkommenden SUMO-Isoformen bislang noch nicht durch *In vivo*-Studien untersucht. Im Gegensatz zu Hefezellen, die nur über eine SUMO-Isoform (Smt3) verfügen, findet man in Säugerzellen drei konjugierbare SUMO-Isoformen (SUMO1, -2 und -3). Um die Funktionsweise von StUbls aus Säugerzellen näher untersuchen zu können, wurde eine Batterie von linearen translationalen Fusionsproteinen mit menschlichen SUMO-Isoformen konstruiert, mit deren Hilfe die SUMO-SIM-vermittelte Substrat-Spezifität in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* experimentell studiert werden konnte

Mit Hilfe der linearen SUMO-Fusionsproteine wurde eine neue Substratspezifität für das Arkadia-Protein entdeckt. Es erkennt bevorzugt Substrate mit SUMO2-Ketten, die an ihrem Ende ein SUMO1 tragen („SUMO1-gedeckelte SUMO2-Ketten“). Ein SUMO1-Bindungsmotiv (SOB) in Arkadia ist für diese SUMO1-Spezifität von kritischer Bedeutung. Dieses Bindungsmotiv auf der Oberfläche von Arkadia bindet ganz anders an SUMO als die üblichen SIMs, die alle in einer SIM-Interaktions-Grube (SIG) binden, die bei allen SUMO-Isoformen in ähnlicher Form vorliegt. Das SOB von Arkadia bindet stattdessen an den so genannten 'E67 interaction loop' in SUMO1. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SIM1 und SOB in Arkadia beide zusammen die Bindung an SUMO1 am Ende der Kette vermitteln, während SIM2 für die Erkennung der SUMO2-Kette verantwortlich ist. Die StUbl-Aktivität von Arkadia wurde aber nicht nur in Hefezellen demonstriert, sondern konnte auch gegen endogene Substrate in der menschlichen Zervikalkarzinom-Zelllinie HeLa B nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten, dass für die Erkennung der endogenen Substrate deren Modifikation sowohl mit SUMO1 als auch mit SUMO2 eine Rolle spielt und dass das SOB-Motiv in Arkadia dafür benötigt wird. Diese Daten belegen, dass die Spezifität von Arkadia gegen Substrate mit SUMO1-gedeckelten SUMO2-Ketten eine physiologische Bedeutung in menschlichen Zellen hat.

StUbls vermitteln den Abbau sumoylierter Proteine und regulieren somit

deren intrazelluläre Konzentrationen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären Konzentrationen von StUbls selbst durch proteolytische Kontrolle reguliert ist. Die Stabilität der StUbls wird dabei durch SUMO-abhängige Mechanismen reguliert. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene, aber auch untereinander ähnliche Mechanismen für die Regulation zweier verschiedener StUbls entdeckt: Arkadia wird durch Auto-Ubiquitylierung und Abbau durch das Proteasom kontrolliert (*Auto-Regulation*). Das StUbl Uls1 der Hefe wird durch ein anderes StUbl (Slx5) ubiquityliert und dadurch für den Abbau markiert (*Cross-Regulation*).