



Analyse des Ubiquitincodes durch proteasebeständige Ubiquitinketten mit definierter Verknüpfung**

Tatjana Schneider, Daniel Schneider, Daniel Rösner, Saurav Malhotra, Franziska Mortensen, Thomas U. Mayer,* Martin Scheffner* und Andreas Marx*

Abstract: Ubiquitylierung ist eine komplexe posttranskriptionale Modifikation, und die Deregulierung dieses Signalweges ist mit verschiedenen menschlichen Erkrankungen assoziiert. Ubiquitylierung kommt in unterschiedlichen Varianten vor: Neben Monoubiquitylierung werden auch Ubiquitinketten mit verschiedenartiger Verknüpfung an Substratproteinen gebildet. Das Schicksal der ubiquitylierten Proteine wird dabei durch den Verknüpfungstyp der konjugierten Ubiquitin-Kette bestimmt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nur dürftig charakterisiert. Wir zeigen hier ein neues Konzept, basierend auf Kodonerweiterung und Klick-Chemie-vermittelter Polymerisation, um Ubiquitinketten mit definierten Verknüpfungen herzustellen, die widerstandsfähig gegenüber ubiquitinspezifischen Proteasen sind und natürliche Funktionen haben. Das Potenzial dieser künstlichen Ketten für die Analyse des Ubiquitincodes wird durch verknüpfungsspezifische Auswirkungen auf den Verlauf des Zellzyklus gezeigt.

Viele, wenn nicht alle eukaryotischen Proteine werden kovalent mit Ubiquitin modifiziert („Ubiquitylierung“).^[1] Tatsächlich werden zahlreiche fundamentale zelluläre Prozesse durch Ubiquitylierung reguliert, und entsprechend wird eine fehlerhafte Ubiquitylierung mit verschiedenen menschlichen Krankheiten, darunter Krebs und neurodegenerative Krankheiten, in Verbindung gebracht.^[2] Ubiquitylierung wird durch das aufeinanderfolgende Wirken von mindestens drei Enzymklassen, einem E1 Ubiquitin-aktivierenden Enzym, den E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und den E3 Ubiquitinligasen erzielt.^[3] Monoubiquitylierung beschreibt die kovalente Verknüpfung einer einzelnen Ubiqui-

tineinheit mit dem Substratprotein über eine Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe am C-terminalen Glycin von Ubiquitin und der ε-Aminogruppe eines Lysins im Substrat. In vielen Fällen kann Ubiquitin als sein eigenes Substrat fungieren, was zur Modifikation von Substratproteinen durch Ubiquitinketten führt („Polyubiquitylierung“). Da Ubiquitin sieben Lysine enthält (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) und jedes davon, wie auch die α-Aminogruppe des N-terminalen Methionins, zur Kettenbildung genutzt werden kann,^[4] birgt Polyubiquitylierung durch die Vielzahl an unterschiedlichen Verknüpfungstypen eine große Diversität an möglichen Signalen. Normalerweise werden sowohl die Lysinreste, als auch das N-terminalen Methionin ortsspezifisch durch die Konjugationsmaschinerie genutzt, was zur Entstehung homogener Ubiquitinketten führt. Der vorliegende Verknüpfungstyp in der Kette bestimmt das weitere Schicksal des polyubiquitylierten Proteins. Die am besten charakterisierte Funktion, Proteine für den Abbau durch das 26S-Proteasom zu markieren, wird durch die Modifikation des Substratproteins mit einer Ubiquitin-Kette von mindestens vier Ubiquitineinheiten, verknüpft über K48, erreicht.^[5] Darüber hinaus dienen ebenfalls K11- und möglicherweise auch K29-verknüpfte Ubiquitinketten als Signale für den proteosomalen Abbau.^[6] Im Gegensatz dazu spielen K63-verknüpfte Ubiquitinketten eine Rolle in nicht proteosomalen Prozessen wie Endozytose, DNA-Reparatur und Signaltransduktion,^[7] während lineare (N-terminal verknüpfte) Ubiquitinketten an der NF-κB-Aktivierung beteiligt sind.^[8] Die Existenz von K6-, K27- und K33-verknüpften, polyubiquitylierten Proteinen wurde beschrieben, allerdings ist deren Funktionen nach wie vor unklar.^[4b]

Ein großes Hindernis, um zu verstehen, wie die Art der Verknüpfungen das Schicksal eines modifizierten Proteins beeinflusst, ist die Schwierigkeit, spezifisch verknüpfte Ketten in ausreichenden Mengen zu erzeugen. Da sie nicht durch molekularbiologische Techniken zugänglich sind, wurden Ubiquitinketten enzymatisch synthetisiert, was bisher nur für K11-, K48- und K63-verknüpfte, sowie lineare Ketten möglich ist.^[4a,9] Außerdem ist die Verwendbarkeit dieser Ubiquitinketten z.B. in Zellextrakten stark durch die Tatsache eingeschränkt, dass diese Ketten schnell durch deubiquitylierende Enzyme (DUBs) abgebaut werden.^[10] Eine potenzielle Lösung des letzteren Problems wurde kürzlich durch die Verwendung der genetisch codierten Ubiquitin Mutante UbL73P gefunden, da die daraus enzymatisch aufgebauten Ubiquitinketten widerstandsfähig gegenüber DUBs sind.^[11] Um die Synthese verknüpfungsspezifischer Ubiquitinketten jeglicher Art zu ermöglichen, wurden unterschiedliche chemische Herangehensweisen angewendet, darunter

[*] T. Schneider,^[+] Dr. D. Schneider,^[+] D. Rösner,^[+] S. Malhotra, F. Mortensen, Prof. Dr. T. U. Mayer, Prof. Dr. M. Scheffner, Prof. Dr. A. Marx
Fakultäten für Chemistry und Biology, Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: thomas.u.mayer@uni-konstanz.de
martin.scheffner@uni-konstanz.de
andreas.marx@uni-konstanz.de

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken der Deutsche Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 969 „Chemical and Biological Principles of Cellular Proteostasis“. Außerdem bedanken wir uns bei der Carl Zeiss Stiftung (Stipendium für T.S.) und der Konstanz Research School Chemical Biology für finanzielle Unterstützung. Dr. M. Rubini danken wir für Diskussionen und Anregungen, das Manuskript betreffend.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407192> zu finden.

Thiol-En-Kopplung,^[12] Silber-vermittelte chemische Konensation^[13] und chemische Synthese kombiniert mit chemischer Isopeptidligation^[14] zusammengefasst in einem Übersichtsartikel^[15]). Des Weiteren haben die Gruppen um Brik und Strieter difunktionalisierte Ubiquitinvarianten synthetisiert, um Ketten durch Polymerisation herzustellen.^[12,14a] Die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Ubiquitineinheiten sind jedoch weiterhin durch DUBs spaltbar. Um die Funktion einzelner Ubiquitinketten näher zu beleuchten, werden daher zusätzliche Herangehensweisen, die die Resistenz gegenüber DUBs mit der einfachen Herstellung von jeder erwünschten Verknüpfung vereinen, dringend benötigt. Vor kurzem haben wir – sowie auch andere Gruppen – Methoden zur Herstellung von monoubiquitylierten Substraten und Ubiquitinidemeren vorgestellt. Dazu wurde der Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit bioorthogonalen Chemie kombiniert, um Triazolverknüpfungen zu erzeugen.^[16] Zu diesem Zweck wurde das azidfunktionalisierte Methionin-Analogon Azidohomoalanin (Aha; Abbildung 1a) am C-Terminus von Ubiquitin eingebaut und ein bestimmtes Lysin im Substrat durch ein alkinfunktionalisiertes Lysin-Analogon (Plk; Abbildung 1a) ersetzt, um eine Ubiquitylierung durch Cu¹-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition („Klick-Chemie“) zu ermöglichen.

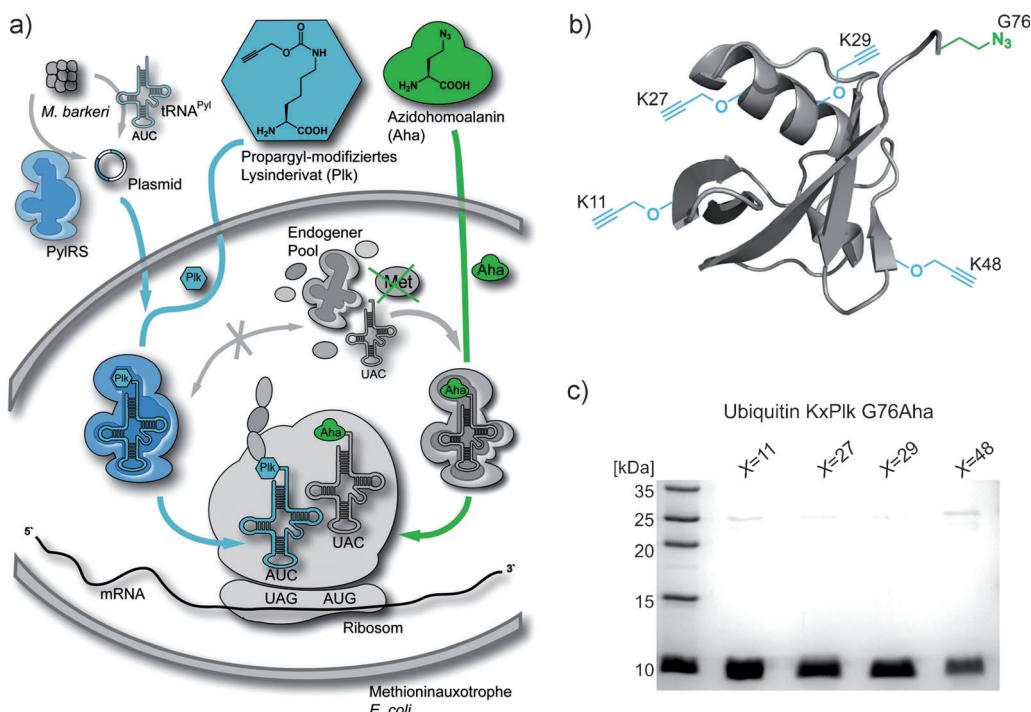


Abbildung 1. Beide nichtnatürlichen Aminosäuren, die für die Klick-Reaktion benötigt werden, können gleichzeitig und ortsspezifisch in Ubiquitin eingebaut werden. a) Konzept der angewandten Strategie. Das Zielgen wird in methioninauxotrophen *E. coli*-B834(DE3)-Zellen exprimiert. Das verwendete Minimalmedium beinhaltet statt Methionin Azidohomoalanin (Aha; grün) und ein propargyl-modifiziertes Lysinderivat (Plk; blau). Aha wird von der endogenen MetRS und tRNA^{Met} verwendet und durch SPI anstelle von Methionin ins Proteom eingebaut. Die PyIRS und tRNA^{Pyl} (blau) aus *Methanoscincus barkeri* werden mithilfe eines Helperplasmids exprimiert und akzeptieren Plk als Substrat, wodurch der Einbau eines Alkins gegenüber des amber-Stoppkodons ermöglicht wird (ACS). b) Struktur der vier hergestellten Ubiquitin KxPlk G76Aha Varianten. Die vier Alkineinheiten, die separat in die jeweilige Variante eingebaut wurden, sind in blau dargestellt und entsprechend des ersetzen Lysins beschriftet. Die in jeder Variante vorkommende C-terminale Azidgruppe, ist in grün dargestellt. c) SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung der gereinigten Ubiquitinvarianten.

Wir zeigen jetzt eine Methode zur Herstellung von DUB-resistenten Ubiquitinketten jeden Verknüpfungstyps, durch die Verwendung von difunktionalem Ubiquitin. Unser Vorgehen ist allgemein anwendbar und ohne komplizierte Ausstattung für chemische Synthesen ausführbar. Hierbei werden beide nichtnatürlichen Aminosäuren, die für die Klick-Reaktion benötigt werden, Aha und Plk, durch die gleichzeitige Anwendung von ACS („amber codon suppression“) und SPI („selective pressure incorporation“) in Ubiquitin eingebaut (Abbildung 1a). Anschließende, auf Klick-Chemie basierende Polymerisation ermöglicht dann die effiziente Bildung von gleichartigen Ubiquitinpolymeren. Um die natürliche Verknüpfungsposition zu erhalten, wurde Aha anstelle des C-terminalen Glycins in Ubiquitin eingebaut und ein einzelnes Lysin ortsspezifisch durch Plk ersetzt. Als Beispiele wurden Lysine an der Position 11, 27, 29 oder 48 als Konjugationsstelle ausgewählt, da K11- und K48-verknüpfte Ubiquitinketten bereits ausführlich charakterisiert wurden, wohingen nur wenig über K27 und K29 verknüpfte Ketten bekannt ist (Abbildung 1b). Alle vier Varianten wurden in methioninauxotrophen *E. coli*-B834(DE3)-Zellen in Minimalmedium mit Aha exprimiert, um die SPI durchzuführen. Gleichzeitig wurde Plk in das Medium gegeben, um mit einem Helperplasmid, das auf dem pEVOL-Konstrukt basiert,^[17] die ACS zu ermöglichen. Nach der Reinigung mittels GST-Tag und anschließender Thrombinspaltung^[16b] konnten Volllängenproteine, die beide nichtnatürlichen Aminosäuren enthalten, mit Ausbeuten zwischen 0.5 mg und 2.0 mg pro Liter Expressionskultur erhalten werden (Abbildung 1c). Nach Herstellung dieser difunktionalen Proteine wurden zunächst die Polymerisationseigenschaften der Ubiquitinvarianten K11Plk G76Aha, K27Plk G76Aha und K29Plk G76Aha untersucht. In allen Fällen konnte die effiziente Bildung von Oligo- und Polymeren mittels SDS-PAGE detektiert werden (Abbildung 2a). Für Ubiquitin K27Plk G76Aha und Ubiquitin K29Plk G76Aha, wurden lange Polymere mit bis zu 30 Einheiten beobachtet, was auf eine hocheffiziente Reaktion hindeutet.

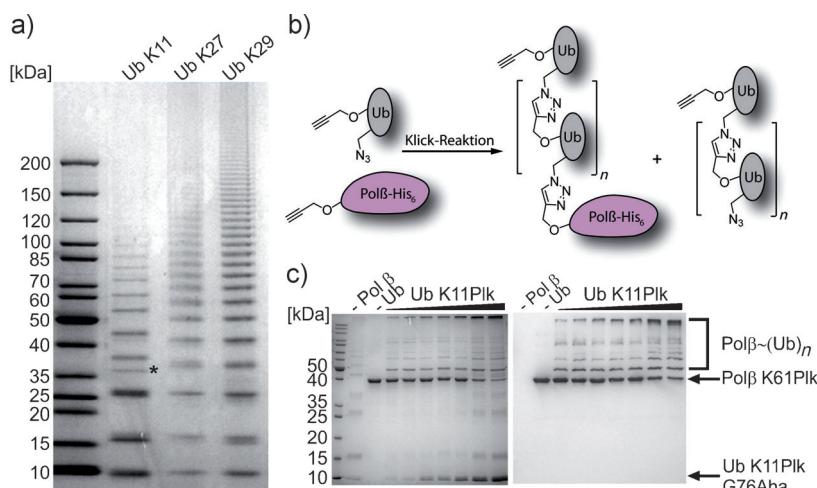


Abbildung 2. Durch Klick-Reaktion bilden Ubiquitinvarianten lange Polymere, sowohl frei in Lösung, als auch an Substratproteinen. a) Analyse der Polymerbildung mit drei Ubiquitinvarianten KxPlk G76Aha nach Klick-Reaktion mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Die Verunreinigung in Ubiquitinpräparation (Ub) K11Plk G76Aha ist mit einem Stern gekennzeichnet. b) Reaktion mit difunktionalem Ubiquitin und alkinfunktionalisierter Pol β. In der Klick-Reaktion werden sowohl freie Ubiquitinketten als auch ubiquitylierte Pol β gebildet. c) Analyse der Klick-Reaktionsprodukte bei Verwendung unterschiedlicher Mengen von Ubiquitin K11Plk G76Aha und Pol β K61Plk mittels SDS-PAGE und Coomasie-Färbung (linkes Feld) oder Western-Blot (rechtes Feld) mit einem His₆-Tag-spezifischen Antikörper.

tet. Bei den Ubiquitinvarianten mit Plk an den Positionen K11 und K48 (Abbildungen 2a und S2 in den Hintergrundinformationen) wurde eine etwas geringere Effizienz hinsichtlich langer Polymere gefunden.

Als nächstes – in Übereinstimmung zu jüngsten Ergebnissen von Brik und Mitarbeitern^[18] – wurde die Möglichkeit untersucht, Ubiquitinketten in einem einzigen Reaktionsschritt ortsspezifisch an einem Zielprotein aufzubauen (Abbildungen 2b,c). Als Beispiel wurde His₆-markierte humane DNA-Polymerase β (Pol β) K61Plk,^[16b] – also ein Protein mit einer Alkingruppe als einzige bioorthogonale Funktionalisierung und folglich ein Substrat für Polyubiquitylierung – mit Ubiquitin K11Plk G76Aha in verschiedenen Verhältnissen gemischt und die Klick-Reaktion durchgeführt. Wie erwartet, wurde in der Abwesenheit von Pol β K61Plk die Bildung von freien Ubiquitinketten beobachtet, während Pol β K61Plk allein eine einzelne Bande ergab. Wurden beide Proteine gemischt, konnte eine Vielzahl an hochmolekularen Banden nachgewiesen werden, deren Intensitäten mit der Menge an zugegebenem Ubiquitin zunahm. Um herauszufinden, welche Banden polyubiquitylierter Pol β entsprachen, wurden Western-Blot Analysen mit einem Antikörper gegen den His₆-tag durchgeführt. Stark polyubiquitylierte Pol β sowie mono- und diubiquitylierte Konjugate wurden sogar bei geringen Ubiquitinkonzentrationen nachgewiesen, was zeigt, dass Polyubiquitylierung von Zielproteinen in einem einzigen Reaktionsschritt realisierbar ist. Weiterhin haben wir eine ähnliche Reaktion mit nur alkinfunktionalisiertem Ubiquitin (K11Plk G76) als Substrat der Polyubiquitylierung getestet (Abbildung S1a). Wie erwartet, verringerte sich die Länge der Ubiquitinketten bei steigender Menge an K11Plk G76, was auf die Ubiquitylierung von

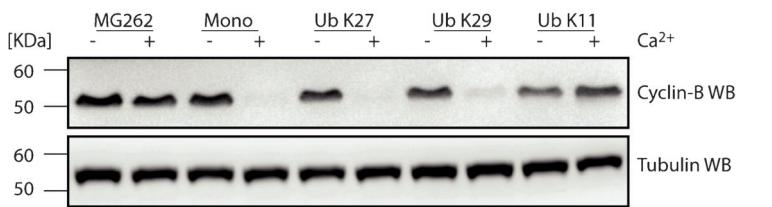
Ubiquitin K11Plk G76, welches hier als Polymerisationsterminator fungiert, hindeutet.

Da bekannt ist, dass natürlich verbundene Ubiquitinketten durch E1 aktiviert werden können,^[13a,19] haben wir im Folgenden untersucht, ob die künstlich verknüpften Ketten, die ein Glycin am C-Terminus tragen, ebenfalls vom E1-Enzym aktiviert werden und immer noch Substrate der Ubiquitylierungsmaschinerie sind. Um dies zu testen, wurde ein E6AP-Autoubiquitylierungsassay durchgeführt (Abbildungen S1b, S1c). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Klick-Reaktion hergestellte Ubiquitinketten aktiviert werden und kovalent an E6AP oder andere, freie Ubiquitinketten konjugiert werden können (was zur Bildung längerer Oligomere führt).

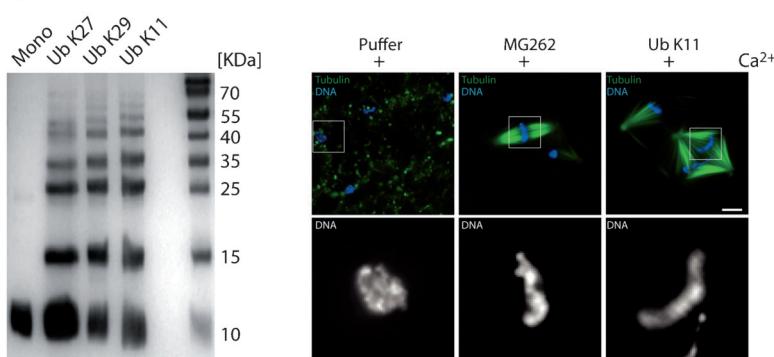
Als nächstes untersuchten wir, ob die Verknüpfung der einzelnen Ubiquiteinheiten über Triazole Ketten ergibt, die natürliche Eigenschaften aufweisen, was bereits für Diubiquitine durch Mootz und Mitarbeiter gezeigt werden konnte.^[20] Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper benutzt, der selektiv an K48-verknüpfte Ubiquitinketten bindet (Abbildung S2). Tatsächlich wurden nur K48-verknüpfte Oligomere erkannt, während für andere Ketten-topologien keine Signale detektiert werden konnten.

Um zu beweisen, dass die künstlich verknüpften Ubiquitinketten über Potenzial bei der Untersuchung der Ubiquitinsignalwege verfügen, haben wir deren Auswirkungen auf die Aktivität des 26S-Proteasoms in *Xenopus laevis*-Eiextrakten, einem Modellsystem zur funktionalen Analyse der Zellzyklusregulierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System, untersucht. Wir postulierten, dass im Fall einer korrekten Topologie der künstlichen Ketten, diese vom 26S-Proteasom oder anderen für den proteosomalen Abbau benötigten Faktoren erkannt werden, aber aufgrund der Triazolbindung DUB-resistant sind und so am Proteasom gebunden bleiben und mit dem Abbau natürlicher Substrate konkurrieren. Um dies zu testen, wurde der zellzyklusabhängige Abbau von Cyclin-B beobachtet. Da bekannt ist, dass Cyclin-B mittels K11-verknüpfter Ubiquitylierung für proteosomalen Abbau markiert wird,^[6b] haben wir die künstlich verknüpften K11 Ketten benutzt. Außerdem wurden K27- und K29-verknüpfe Ketten getestet, da bislang unklar ist, ob sie effizient vom Proteasom erkannt werden und den Abbau von Substratproteinen vermitteln. Cyclin-B wird nach Ca²⁺-Zugabe, aufgrund der Aktivierung der multimeren E3-Ligase „Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome“ mittels einer Signalkaskade, die Fertilisation imitiert, schnell abgebaut.^[21] In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass freie Ubiquitinmonomere nicht vom Proteasom erkannt werden, beeinflusste die Zugabe von monomerem Ubiquitin K11Plk G76Aha den Abbau von Cyclin-B nicht (Abbildung 3a). Bemerkenswerterweise konnte durch die Zugabe der gleichen Menge (und sogar geringeren Mengen; Abbildung S3) an K11-verknüpften Ketten die calciuminduzierte Abbau von

a)



b)



c)

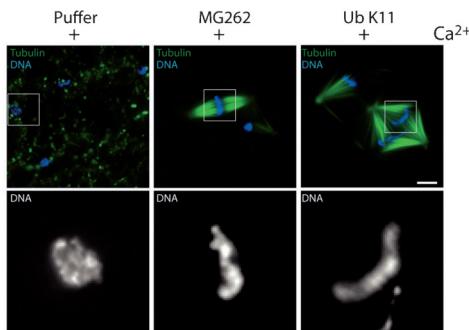


Abbildung 3. K11-verknüpfte Ketten verhindern den Abbau von Cyclin-B im *Xenopus*-Eiextrakt. a) Im Cyclin-B-Western-Blot ist zu erkennen, dass nach der Zugabe von Calcium (Ca²⁺), Cyclin-B in Extrakten, die mit K11-verknüpften Ketten oder MG262 behandelt wurden stabil bleibt, wohingegen es effektiv abgebaut wird, wenn die Extrakte mit Mono-Ub K11Plk G76Aha, K27-verknüpften und K29-verknüpften Ketten behandelt werden. Tubulin dient dabei als Ladekontrolle. b) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Analyse der Ubiquitinpräparationen, die in den *Xenopus*-Eiextrakt Experimenten eingesetzt wurden. Die in jeder Spur aufgetragene Proteinmenge entspricht der in (a) eingesetzten Menge. c) Pufferbehandelte Extrakte verlassen nach der Zugabe von Ca²⁺ das meiotische Stadium, weisen Interphasenchromatin (Vergrößerung des markierten Bereichs in der unteren Reihe) und keine Mikrotubuli-Spindelstrukturen auf, wohingegen Extrakte, die mit MG262 oder K11-verknüpften Ketten behandelt wurden, meiotestypische, bipolare Spindeln (obere Reihe) und kondensiertes Chromatin (Vergrößerung des markierten Bereichs in unterer Reihe) zeigen. Spindeln und Chromosomen wurden durch die Zugabe von TRITC-Tubulin bzw. DAPI visualisiert.

Cyclin-B verhindert werden. Zusätzlich wurden auch die DNA-Morphologie und die Bildung des Spindelapparates überprüft. Nach Ca²⁺-Zugabe zeigten die pufferbehandelten Extrakte eine typische Interphasenkernstruktur (Abbildung 3c), was den Austritt aus der Meiose in Folge des Cyclin-B-Abbaus bestätigt. Dagegen zeigten Extrakte, die mit K11-verknüpften Ketten oder mit dem Proteasominhibitor MG262 behandelt wurden, kondensiertes Chromatin und bipolare Spindelstrukturen (Abbildung 3c), was auf die Aufrechterhaltung der Meiose hindeutet, da Cyclin-B nicht mehr abgebaut werden kann. Diese Daten zeigen somit, dass die künstlichen Ubiquitinpolymere in Zellextrakten physiologisch funktionell sind.

Interessant ist, dass Zugabe der gleichen Menge an sowohl K27-verknüpften wie auch K29-verknüpften Ketten den Cyclin-B-Abbau nicht beeinträchtigt (Abbildung 3a,b).

Dies deutet darauf hin, dass K27-verknüpfte und K29-verknüpfte Ketten nicht oder nur schwach vom Proteasom gebunden werden und damit vermutlich andere zelluläre Funktionen haben als ein Signal für proteosomalen Abbau darzustellen. Alternativ könnten im meiotischen Extrakt

auch diejenigen Proteine fehlen, die mit K27- und K29-verknüpften Ketten modifizierte Proteine zum Proteasom transportieren.

Zusammenfassend haben wir eine direkte und einzigartige Herangehensweise für die Herstellung von Ubiquitininen mit zwei nichtnatürlichen Aminosäuren entwickelt, die für bioorthogonale Polymerisationen geeignet ist. Dabei wurde Glycin 76 durch ein Azid ersetzt, während ein alkinfunktionalisiertes Lysinderivat ortsspezifisch anstelle eines der sieben natürlichen Lysine eingebaut wurde. Für die vier untersuchten, doppelt modifizierten Ubiquitinvarianten wurden Ausbeuten im Milligrammbereich erhalten, und Klick-Chemie lieferte Ubiquitinketten mit definierter Verknüpfung. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass unsere Herangehensweise das Potenzial hat, problemlos definierte polyubiquitylierte Zielproteine in einem einzigen Reaktionsschritt herzustellen. Aufgrund der Widerstandsfähigkeit dieser Ketten gegenüber Proteasen konnten verknüpfungsspezifische Effekte auf den Fortschritt der Meiose im komplexen biologischen System von *Xenopus-laevis*-Eiextrakten untersucht werden. Tatsächlich fanden wir heraus, dass, anders als K11-verknüpfte Ubiquitinketten, K27- und K29-verknüpfte Ketten nicht als Signal des proteosomalen Abbaus dienen. Des Weiteren lieferten wir Hinweise dafür, dass Ubiquitinketten durch die Ubiquitylierungsmaschinerie aktiviert und en bloc auf Substrate übertragen werden können. Demzufolge ergibt sich aus den beiden Eigenschaften der Ketten, nämlich die definierte Verknüpfung und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber DUBs, dass es sich bei ihnen um außerordentlich wertvolle Werkzeuge für die Analyse des Ubiquitincodes in komplexen biologischen Systemen handelt.

Eingegangen am 14. Juli 2014

Online veröffentlicht am 4. September 2014

Stichwörter: Klick-Chemie · Kodonerweiterung ·

Nichtnatürliche Aminosäuren ·

Posttranskriptionale Modifikationen · Ubiquitinketten

- [1] a) K. Haglund, I. Dikic, *EMBO J.* **2005**, *24*, 3353–3359; b) L. Spasser, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6840–6862; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6946–6969; c) A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- [2] a) A. Ciechanover, P. Brundin, *Neuron* **2003**, *40*, 427–446; b) D. Hoeller, C. M. Hecker, I. Dikic, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 776–788.
- [3] a) M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373–428; b) M. Scheffner, U. Nuber, J. M. Huibregtse, *Nature* **1995**, *373*, 81–83.
- [4] a) T. Kirisako, K. Kamei, S. Murata, M. Kato, H. Fukumoto, M. Kanie, S. Sano, F. Tokunaga, K. Tanaka, K. Iwai, *EMBO J.* **2006**, *25*, 4877–4887; b) J. Peng, D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Tho-

- reen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, S. P. Gygi, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 921–926.
- [5] J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, C. M. Pickart, *EMBO J.* **2000**, *19*, 94–102.
- [6] a) P. Chastagner, A. Israel, C. Brou, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1147–1153; b) L. Jin, A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, M. Rape, *Cell* **2008**, *133*, 653–665; c) M. Koegl, T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, S. Jentsch, *Cell* **1999**, *96*, 635–644.
- [7] a) D. Komander, M. Rape, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 203–229; b) R. L. Welchman, C. Gordon, R. J. Mayer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 599–609.
- [8] a) K. Iwai, *Cell Cycle* **2011**, *10*, 3095–3104; b) F. Ikeda, Y. L. Deribe, S. S. Skanland, B. Stieglitz, C. Grabbe, M. Franz-Wachtel, S. J. van Wijk, P. Goswami, V. Nagy, J. Terzic, F. Tokunaga, A. Androulidaki, T. Nakagawa, M. Pasparakis, K. Iwai, J. P. Sundberg, L. Schaefer, K. Rittinger, B. Macek, I. Dikic, *Nature* **2011**, *471*, 637–641.
- [9] a) C. M. Pickart, S. Raasi, *Methods Enzymol.* **2005**, *399*, 21–36; b) M. Rape, *Subcell. Biochem.* **2010**, *54*, 107–115.
- [10] F. E. Reyes-Turcu, K. H. Ventii, K. D. Wilkinson, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 363–397.
- [11] M. Békés, K. Okamoto, S. B. Crist, M. J. Jones, J. R. Chapman, B. B. Brasher, F. D. Melandri, B. M. Ueberheide, E. L. Denchi, T. T. Huang, *Cell Rep.* **2013**, *5*, 826–838.
- [12] V. H. Trang, E. M. Valkevich, S. Minami, Y. C. Chen, Y. Ge, E. R. Strieter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 13085–13088; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 13262–13265.
- [13] a) C. Castañeda, J. Liu, A. Chaturvedi, U. Nowicka, T. A. Cropp, D. Fushman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17855–17868; b) E. K. Dixon, C. A. Castañeda, T. R. Kashyap, Y. Wang, D. Fushman, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3421–3429; c) S. Virdee, Y. Ye, D. P. Nguyen, D. Komander, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 750–757.
- [14] a) T. Moyal, S. N. Bavikar, S. V. Karthikeyan, H. P. Hemantha, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16085–16092; b) K. S. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6137–6141; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6261–6265; c) S. N. Bavikar, L. Spasser, M. Haj-Yahya, S. V. Karthikeyan, T. Moyal, K. S. Ajish Kumar, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 758–763; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 782–787.
- [15] a) A. Brik, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3398–3399; b) H. P. Hemantha, A. Brik, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3411–3420.
- [16] a) S. Eger, M. Scheffner, A. Marx, M. Rubini, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16337–16339; b) D. Schneider, T. Schneider, D. Rösner, M. Scheffner, A. Marx, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3430–3435; c) S. Sommer, N. D. Weikart, A. Brockmeyer, P. Janning, H. D. Mootz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9888–9892; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10062–10066; d) S. Eger, B. Castrec, U. Hübscher, M. Scheffner, M. Rubini, A. Marx, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2807–2812.
- [17] T. S. Young, I. Ahmad, J. A. Yin, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 361–374.
- [18] H. P. Hemantha, S. N. Bavikar, Y. Herman-Bachinsky, N. Haj-Yahya, S. Bondalapati, A. Ciechanover, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2665–2673.
- [19] a) O. N. Burchak, M. Jaquinod, C. Cottin, L. Mugherli, K. Iwai, F. Chatelain, M. Y. Balakirev, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1667–1669; b) S. van Nocker, R. D. Vierstra, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24766–24773.
- [20] T. Dresselhaus, N. D. Weikart, H. D. Mootz, M. P. Waller, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16122–16129.
- [21] N. R. Rauh, A. Schmidt, J. Bormann, E. A. Nigg, T. U. Mayer, *Nature* **2005**, *437*, 1048–1052.