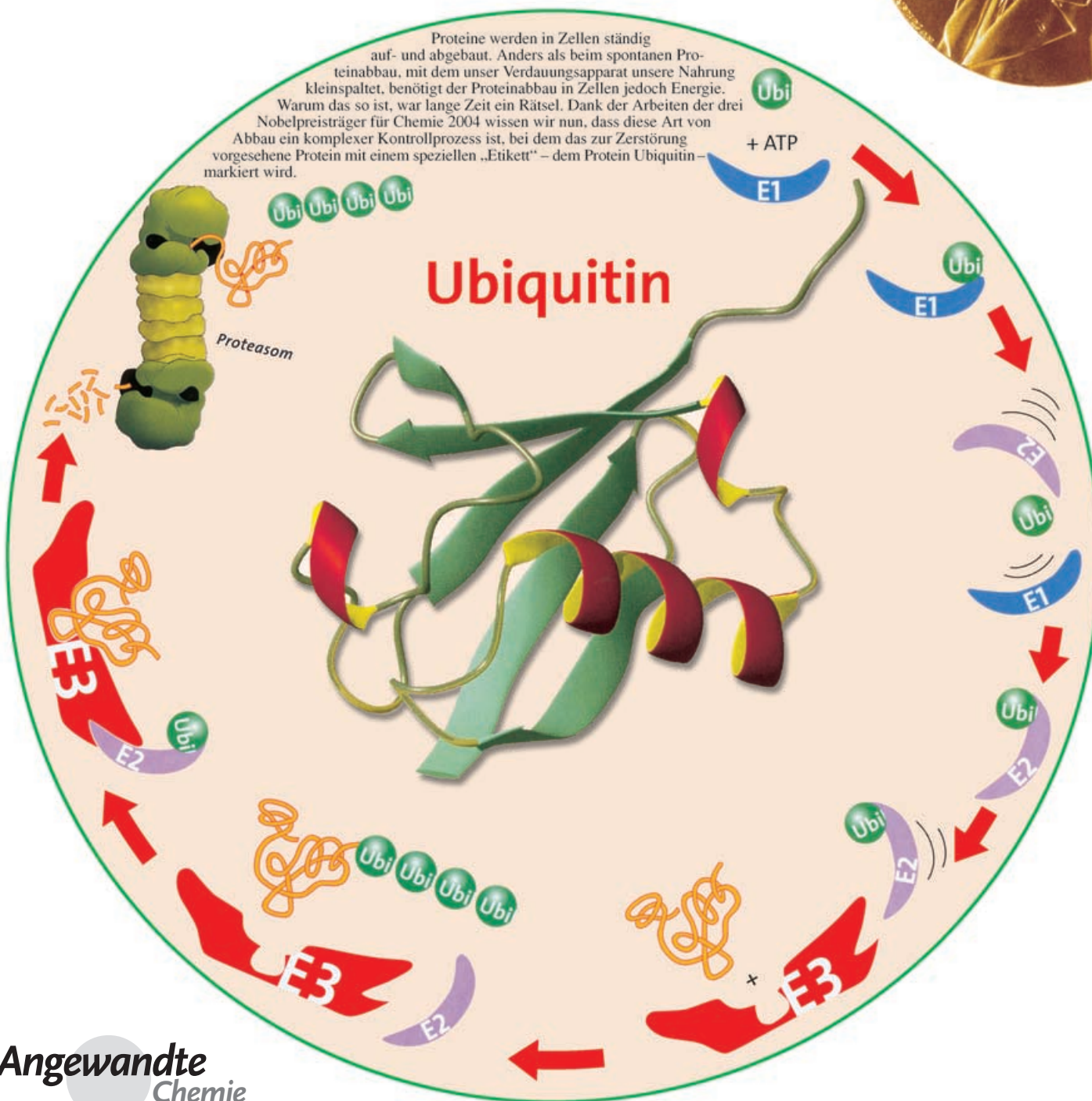


THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2004



Proteine werden in Zellen ständig auf- und abgebaut. Anders als beim spontanen Proteinabbau, mit dem unser Verdauungsapparat unsere Nahrung kleinspaltet, benötigt der Proteinabbau in Zellen jedoch Energie. Warum das so ist, war lange Zeit ein Rätsel. Dank der Arbeiten der drei Nobelpreisträger für Chemie 2004 wissen wir nun, dass diese Art von Abbau ein komplexer Kontrollprozess ist, bei dem das zur Zerstörung vorgesehene Protein mit einem speziellen „Etikett“ – dem Protein Ubiquitin – markiert wird.



Ubiquitin in Fox Chase (Nobel-Vortrag)**

Irwin Rose*

Stichwörter:

Enzyme · Nobel-Vortrag · Proteinabbau · Ubiquitin

Aus dem Inhalt

1. Beginn der Forschungen zum Proteinabbau	6077
2. Wie sich alles zusammenfügte	6077
3. Das ubiquitinaktivierende Enzym	6078
4. Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase: Entdeckung und Mechanismus	6079
5. Ungelöste Fragen	6079

1. Beginn der Forschungen zum Proteinabbau

Mein Interesse am Proteinabbau wurde 1955 etwa zu der Zeit geweckt, als ich an das Biochemische Institut der Yale-Universität gelangte. Man wusste damals, dass Proteine in vollentwickelten Tieren intrazellulär abgebaut werden.^[1,2] Melvin Simpson berichtete mir 1955 von Experimenten, die er zwei Jahre zuvor veröffentlicht hatte.^[3] Darin hatte er gefunden, dass eine Reihe von Bedingungen, die zur Senkung des ATP-Spiegels in der Leber führen sollten (Anaerobiose, Cyanid, 2,4-Dinitrophenol), die Freisetzung von markiertem Methionin aus dem Protein von Rattenleberschnitten verlangsamen. Simpson und ich hatten gerade am Biochemischen Institut angefangen, und unsere Labors lagen im selben Flur. Simpson suchte seinerzeit nach einem In-vitro-System zur Synthese von Proteinen, während ich mich mit Fragen zum Enzymmechanismus der Ketose-Aldose-Isomerasen und speziell mit dem Nachweis des Protonentransfers mithilfe von Tritiummarkierungsversuchen beschäftigte,^[4] gleichzeitig aber auch die Literatur zum Proteinabbau verfolgte.

Bis zu unserem Umzug an das Institut für Krebsforschung in Fox Chase, Philadelphia, im Jahr 1963 hatte sich auf diesem Gebiet jedoch nichts Neues getan. Damals begann ich, nach einem zellfreien, ATP-abhängigen System zu suchen und verwendete hierzu die Ehrlich-Asziteszellen aus unserem Tierbestand. Mein Verfahren bestand gewöhnlich darin, die Zellen in Suspension mit einer essenziellen Aminosäure zu markieren, sie danach zu waschen, durch Homogenisieren zu lysieren und nach säurelöslichen, markierten Komponenten zu suchen, indem ich entweder ATP oder 2-Desoxyglucose plus Hexokinase zufügte, um das endogene ATP abzureichern.

1972 bot sich mir während eines halbjährigen Forschungsaufenthalts in Oxford (J. Knowles) und Jerusalem (Y. Stein)

die Gelegenheit, weitere Versuche mit Gewebe durchzuführen, das mir Hans Krebs und Jacob Mager (Avram HersHKos Doktorvater an der Hadassah Medical School) zur Verfügung gestellt hatten. Trotz aller Hilfsbereitschaft seitens Krebs und Mager gelang es mir aber nicht, ein zellfreies System zu finden. Zur der Zeit sprach ich des Öfteren mit Jacob Bar Tana vom Biochemischen Institut, und wir kamen auf die Idee einer „Pulse-Chase“-Methode, mit der man die Funktionalität, Bindungskonstante und Dissoziationsgeschwindigkeit möglicher Enzym-Substrat-Komplexe bestimmen konnte.^[5]

2. Wie sich alles zusammenfügte

Während eines Postdoc-Aufenthalts bei Gordon Tompkins in San Francisco hatte Avram HersHko Simpsons Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt, wobei er aber die Tyrosin-Aminotransferase aus Zellkulturen verwendete. Als er nach Israel zurückkehrte, um sein eigenes Labor in Haifa aufzubauen, war er ebenfalls auf der Suche nach einem zellfreien System. Ich begegnete Avram HersHko erst 1975 anlässlich einer Fogerty-Konferenz in Bethesda, wo ich mit ihm über das Thema Proteinabbau ins Gespräch kam. Tompkins war

[*] Prof. Dr. I. Rose
Department of Physiology & Biophysics
College of Medicine
University of California
D340 Medical Science I, Irvine, CA 92697-4560 (USA)
Fax: (+1) 949-824-8540
E-mail: irwin@lworld.net

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2004. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

inzwischen auf tragische Weise während der Operation eines Gehirntumors gestorben, und Hershko sah sich nach einem Labor in den USA um, wo er seine Forschungen vertiefen konnte. Warum er ausgerechnet unser Labor am Stadtrand von Philadelphia im Auge hatte, weiß ich nicht. Wir hatten uns auf dem Gebiet des Proteinabbaus keinen Namen gemacht und nie zu diesem Thema veröffentlicht. Außer bescheidenen Kenntnissen in mechanistischer Enzymologie war von uns nichts zu erwarten. Die drei amerikanischen Postdocs Haas, Pickart und Wilkinson, die eigens wegen dieser Forschungen zur Gruppe gestoßen waren, konnten nicht erraten, welchen Kurs ihre Forscherkarrieren nehmen würden.

Als wir uns 1977 in Fox Chase zusammentaten, hatten Etlinger und Goldberg^[6] mit Lysaten aus Kaninchen-Retikulocyten das erste erfolgreiche Experiment mit einem zellfreien System durchgeführt. Zusammen mit seinem Doktoranden Aaron Ciechanover hatte Hershko bereits mit der Fraktionierung des Retikulocytenextrakts begonnen und den hitzebeständigen Faktor APF-1 erkannt,^[7] bevor sie jenen Sommer '77 nach Fox Chase kamen. Ihre späteren Arbeiten, von denen viele gemeinsam mit Mitarbeitern unseres Labors entstanden sind, können im folgenden Nobelaufsatz von Hershko nachgelesen werden. Die entscheidende und zugleich überraschendste Entdeckung dieser Studien war, dass APF-1 von 8 kDa Ketten bildet, die vor dem Abbau an das Zielprotein binden.^[8]

Der Nachweis, dass es sich bei APF-1 um Ubiquitin handelte, gelang drei Postdocs in Fox Chase: Keith Wilkinson und Arthur Haas vom Rose/Hershko-Labor und Mike Urban vom Nachbarlabor. Urban arbeitete mit Chromatin und kannte sich gut mit dessen Bestandteilen, den Histonen, aus.^[9] Die zentrale Frage an Urban war, ob er Beispiele für zwei kovalent verknüpfte Proteine kenne. Man erinnerte sich an das Ubiquitin, ein kleines Protein mit unbekannter Funktion und kovalenter Ligand von Histon 2A. Sowohl in der Größe als auch in der Zusammensetzung der Aminosäuren stimmten das von Hershko beschriebene APF-1 und das Ubiquitin überein.



Irwin Rose promovierte 1952 an der Universität Chicago im Fach Biochemie mit einer Arbeit, in der er die Umwandlung von U-¹⁴C-Cytidin in U-¹⁴C-Desoxycytidin in der DNA von Mausgewebe nachwies. 1955 nahm er seine Forschungen am Biochemischen Institut der Yale Medical School auf. Von Melvin Simpson, der dort zur gleichen Zeit angefangen hatte, erfuhr er, dass Energiemangelbedingungen den Proteinabbau inhibieren, nicht stimulieren. In Fox Chase (1963–1997) begann er nach Studien zu Enzymmechanismen 1977 eine Zusammenar-

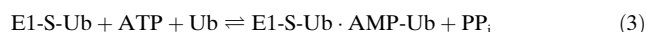
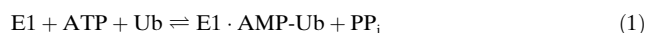
beit mit dem Hershko/Ciechanover-Team, die Fortschritte bei der Fraktionierung von Retikulocytenextrakten erzielt hatten. Zusammen mit seinen Studenten untersuchte er das ubiquitinaktivierende Enzym, das Ubiquitin-Transportprotein und die C-terminale Ubiquitin-Hydrolase. Die Forschungen führten zur Isolierung von Ubiquitininaldehyd und Einblicken in den Hydrolasemechanismus.

Der Grund, dass man in vielen Zellextrakten keinen ATP-abhängigen Proteinabbau beobachtet, ist vermutlich darin zu finden, dass eine lysosomale Trypsin-ähnliche Protease das Ubiquitin des Präparats zerstört. Entdeckt wurde dies von Haas et al.,^[10] die fanden, dass eine Ubiquitin-Affinitätsäule ihr Enzymbindungsvermögen verliert, wenn Leberextrakte durch die Säule eluiert werden. Mit präinkubierten Leberextrakten, deren Trypsin-ähnliche Wirkung inaktiviert worden war, konnte Haas dagegen einen ATP/Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau nachweisen. Damals war bereits bekannt, dass die Arg74-Gly75-Bindung von Ubiquitin empfindlich gegen Trypsin ist.

3. Das ubiquitinaktivierende Enzym

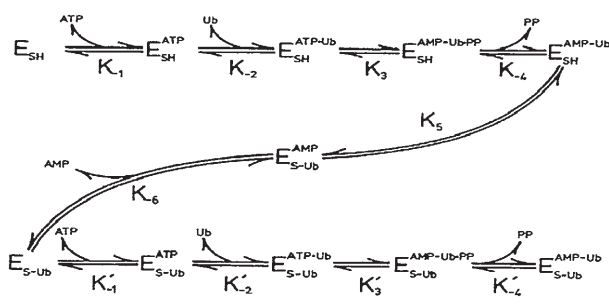
Enzymologen untersuchen gewöhnlich die Anfangsgeschwindigkeiten von Reaktionen und messen hierzu die Produktbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration oder einer anderen Variablen. Zellbiologen interessieren sich hingegen eher für den Effekt eines veränderlichen Parameters auf den Gleichgewichtszustand eines komplexen Systems. Das ubiquitinaktivierende Enzym E1, das Hershko entdeckt hatte, konnte nicht anhand der Bildungsgeschwindigkeit des Produkts untersucht werden, weil das Enzym ein kovalent gebundenes Endprodukt erzeugte. 1982 bestimmte Art Haas über den Isotopenaustausch im Gleichgewicht die Reaktionssequenz sowie eine Reihe von Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten von E1, das als einziges Enzym der Zelle Ubiquitin als Substrat nutzt.

Der Aktivierungsprozess von Ubiquitin (Ub) ist entsprechend den Gleichungen (1)–(3) durch die Bildung von zwei Äquivalenten Pyrophosphat (PP_i), einem Äquivalent gebundenem AMP-Ub und den beiden Austauschreaktionen ATP/PP_i und AMP/AMP charakterisiert.



Aus E1, ATP und Ub hergestelltes und durch Denaturieren des Enzyms eluiertes AMP-Ub ist empfindlich gegen Dithiothreitol (DTT) und Hydroxylamin, was auf das Vorliegen einer Acyl-P-Anhydridbindung schließen lässt. Durch Zugabe von PP_i und Mg²⁺ ließ sich AMP-Ub in ATP zurückverwandeln, während die Umwandlung zu E1-S-Ub weder PP_i noch Mg²⁺ erforderte.^[11–13] Da Iodacetamid nur die Bildung von enzymgebundenem Ubiquitin inhibiert, wird es vermutlich auf das Cystein des Enzyms transferiert (Ub enthält kein Cystein). Es war bereits nachgewiesen worden, dass Ubiquitin über das C-terminale Glycin bindet.^[14]

Bei der Umsetzung von E1 und E1-S-Ub wird zuerst ATP und danach Ubiquitin gebunden (Schema 1), denn oberhalb 10 μM Ub trat eine Inhibierung des ATP/PP_i-Austauschs auf, die bei 400 μM vollständig war. Die Reihenfolge der Anlagerung war folglich nicht zufällig.^[12] Die Gleichgewichtskonstanten im erweiterten Schema 1 konnten aus der Wirkung verschiedener AMP- und PP_i-Mengen auf die Konzentration

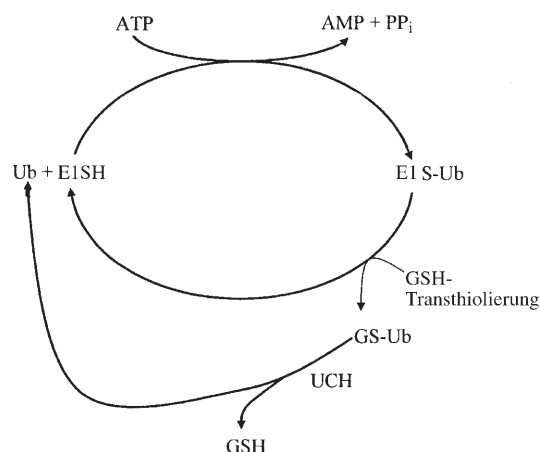


Schema 1. Sequenz und Verteilung der Enzymintermediate bei der Ubiquitin-Aktivierung.^[12]

nen von E1-AMP-Ub und E1-S-Ub ermittelt werden; diese wurden mit tritiummarkiertem ATP durch Säurefällung und mit markiertem Ub durch Elektrophorese bestimmt. Die Affinität zu ATP ($\approx 40 \mu\text{M}$) ist höher als der ATP-Spiegel der Zelle, wodurch sichergestellt ist, dass zelluläres E1 in der E1-ATP- oder der E1-S-Ub-(ATP)-Form vorliegt und damit zur Aufnahme von freiem Ubiquitin ($K_m = 0.58 \mu\text{M}$) bereit ist. Die Affinität zum Inhibitor AMP ($K_6 = 0.027 \mu\text{M}$) ist wesentlich höher als die zum ATP-Substrat, was darauf schließen lässt, dass AMP auch als Rückkopplungsinhibitor an einem allosterischen Zentrum von E1-S-Ub wirken kann.

4. Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase: Entdeckung und Mechanismus

Es wurde beobachtet, dass beim einfachen Umsatz von E1 weit mehr ATP verbraucht wird als erwartet, wenn das Testsystem Glutathion enthält. Die Erklärung: Das Ubiquitin im E1-S-Ub wird leicht nichtenzymatisch auf schwache Nucleophile wie Glutathion, Dithiothreitol und Hydroxylamin übertragen. Dies allein würde den ATP-Verbrauch entsprechend der im Testsystem vorhandenen Menge Ub erhöhen. Es wurde aber viel mehr aufgenommen. Waren die Ub-Derivate instabil? Das nach der Inkubation von AMP-Ub mit Dithiothreitol zu erwartende Ub-S-DTT konnte an einer Säule mit kovalent gebundenem Hg^+ nur bei äußerst vorsichtiger Vorgehensweise isoliert werden. Besonders aufschlussreich war der Befund, dass die Ausbeute zunahm, wenn man sofort nach der Umsetzung Harnstoff zusetzte. Dies war ein Hinweis darauf, dass ein mit AMP-Ub aus der E1-Präparation verschlepptes Enzym das Ubiquitin regenerierte. Diese beiden Beobachtungen – der Ub-Transfer von E1-S-Ub auf schwache Nucleophile und ein E1 kontaminierendes Enzym, das gebundenes Ub wieder freisetzte – konnten erklären, warum im E1-Testsystem wesentlich mehr ATP verbraucht wurde als erwartet.^[15] Die gemeinsame Wirkung von E1, Glutathion und der Hydrolase resultiert in einem nutzlosen, unproduktiven Zyklus („futile cycle“), der ATP in $\text{AMP} + \text{PP}_i$ überführt (Schema 2). AMP-Ub ist normalerweise zu fest an E1 gebunden, um in Gegenwart eines aktiven Nucleophils an einem eigenen unproduktiven Zyklus teilzunehmen.



Schema 2.

Amide des Ubiquitins wurden als Substrate der neuen Ubiquitin-Thioesterase untersucht. Die Synthese der Ub-Amide war zuvor Cecile Pickart durch Einwirken von E1 + E2 auf primäre Amine gelungen.^[16] Diese Forschungen waren von großem Interesse, da man die Enzyme, die zur Rückgewinnung von Ubiquitin aus den neu entdeckten Ub-Konjugaten benötigt wurden, für Isopeptidasen hielt. Ein E1-E2-S-Ub-Komplex überträgt Ubiquitin normalerweise auf die $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppe des Lysins von Proteinen. Bei der Bestimmung der Substratspezifität dieses Systems stellte Dr. Pickart fest, dass einige kleine primäre Amine bei wesentlich höherer Konzentration ebenfalls als sehr gute Ub-Acceptoren fungieren. Die Ub-Amide waren gute Substrate für die zuvor gereinigte Ub-Thioesterase, die von da an als Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase (UCH) bezeichnet wurde. Das reine Enzym ($M_w = 29 \text{ kDa}$) ließ sich leicht aus reifen menschlichen roten Blutzellen erhalten (ca. 0.1 Einheiten pro mL dicht gepackter Zellen). Seine Umsatzgeschwindigkeit ist trotz der eingeschränkten Diffusion recht hoch, V_{max} beträgt etwa 10 s^{-1} . Ub-Konjugate mit Glutathion oder einem Polyamin dürften in Zellen mit dieser Aktivität zu vernachlässigen sein.

Die Geschwindigkeit des E1-E2-UCH-Amin-Systems lässt sich durch Messung des ATP-Verbrauchs in einem unproduktiven Zyklus ähnlich dem in Schema 2 bestimmen. Anhand der Geschwindigkeitskonstanten lassen sich Aussagen über die Aktivität oder die Spezifität der in geschwindigkeitsbestimmender Menge vorliegenden Komponente treffen. Die Größe von UCH-Enzymen wird durch die Substrate begrenzt, auf die sie wirken, und es ist fraglich, ob diese Enzyme bei der Ubiquitinabspaltung aus Polyubiquitinketten eine Rolle spielen. Diese Aufgabe übernehmen die wesentlich größeren deubiquitinierenden Enzyme (DUBs).

Die Überlegungen zum Mechanismus der UCH gehen von der Beobachtung aus, dass diese Enzyme durch Iodacetamid inaktiviert und durch Ubiquitin geschützt werden. Daher ist anzunehmen, dass sie eine Thiolgruppe im aktiven Zentrum exponieren und möglicherweise eine Ub-Thiolester-Zwischenstufe bilden. Wir konnten nachweisen, dass UCH auch in Gegenwart von Ubiquitin durch tritiiertes Borhydrid

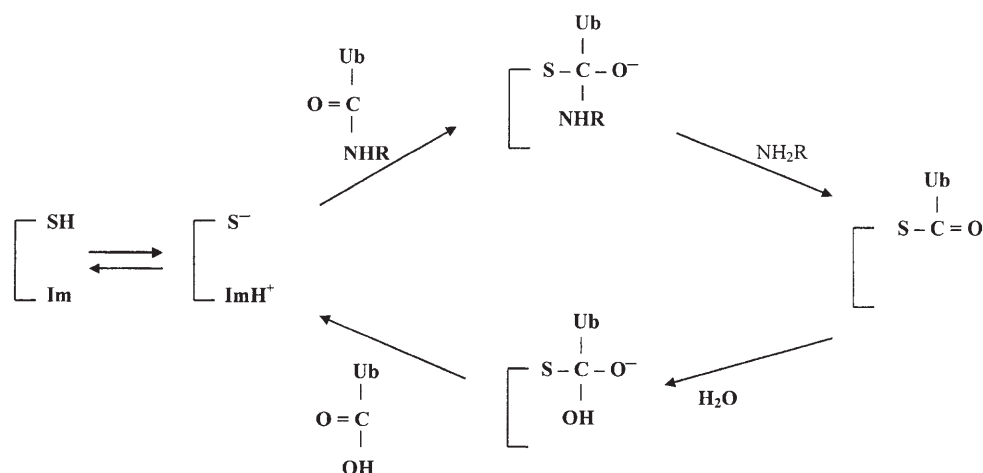
inaktiviert wird.^[17] An das inaktive Enzym waren sowohl das Tritium aus dem Borhydrid als auch der Marker aus dem Ubiquitin fest gebunden. Beide Isotope wurden bei der Denaturierung mit schwacher Säure abgespalten, wobei Tritium am Ubiquitin verblieb. In einem Testsystem mit dem Substrat [³H]-Butanol-4-NH₂-Ub wirkte das abgespaltene Produkt etwa 1000-mal stärker inhibierend als Ubiquitin. Dieser Effekt trat nicht auf, wenn man dem Inhibitor zuerst das Enzym zusetzte und ihn so vor der Reduktion durch Borhydrid schützte. Wir folgerten daraus, dass der durch Säure freigesetzte Inhibitor die C-terminale Aldehydform von Ubiquitin (Ubal) sein musste. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde die Reduktion mit [³H]-NaBH₄ durchgeführt, und nach der sauren Hydrolyse wurde [³H]-Ethanolamin als eines der Produkte erhalten. Das Enzym schützt den Ubiquitinaldehyd offenbar durch Bildung eines starken Komplexes, der die Aldehydgruppe abschirmt. Eine Koordination der SH-Gruppe im aktiven Zentrum an die Carbonylgruppe hätte mehrere chemische und physikalische Effekte zur Folge. Zum einen würde ein Thiohalbacetal entstehen, zum anderen käme es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum und dem übrigen Teil von Ubal. Eine zusätzliche Stabilisierung könnte dadurch zustande kommen, dass das Thiohalbacetal den tetraedrischen Zwischenstufen und Übergangszuständen der Amidase-Reaktion ähnelt, wie man sie für Papain und Cathepsin B darstellen würde (Schema 3).

Diese Interpretation des Wirkmechanismus von Ubal wurde durch röntgenographische Strukturanalysen zweier Komplexe bestätigt und verfeinert. Untersucht wurden die Komplexe von Ubal mit der UCH Yuh 1 aus Hefe (Johnston et al.)^[18] und mit der aus 352 Aminosäureresten bestehenden UCH-Domäne, die aus den insgesamt 1102 Bausteinen des deubiquitinierenden Enzyms HAUSP („herpesvirus proassociated ubiquitin-specific protease“) herausgeschnitten wurde (Hu et al.).^[19] In beiden Komplexen verursachte der Ubiquitinaldehyd eine signifikante Umorganisation von Abständen und Winkeln in den katalytischen Triadenregionen.^[19,20] Die H-bindenden Reste werden dabei so angeordnet, dass sie das erwartete Oxyanion eines Thiohalbacetal-Ub-Addukts aufnehmen können.

Die großen DUBs, von denen etwa 80 identifiziert wurden, machen die Verlängerung der Polyubiquitinketten rückgängig, die zum Abbau des Zielproteins am Proteasom führt. So ist HAUSP auch als Tumorsuppressor-Coprotein bekannt, weil es den Tumorsuppressor-Transkriptionsfaktor p53 des Gewebes deubiquitiniert und dadurch dessen Gleichgewichtsspiegel erhöht. Die Größe der DUBs ist in Einklang mit ihrer hohen Spezifität und Signalkontrolle. Über die Aufgaben der UCHs weiß man hingegen erst wenig. Diese kleineren Enzyme können Teile der Ub-Verlängerung entfernen, die kleiner sind als ein Ubiquitin, sodass im Deubiquitinierungsprozess entstehende Zwischenstufen der Ub-Ub-Spaltung durch eine UCH nicht weiter abgebaut werden.

5. Ungelöste Fragen

- Die derzeitigen Diskussionen über das E1-E2-E3-System berücksichtigen häufig nicht, dass E1-AMP-Ub ohne Dissoziation des E1-E2-Komplexes Ub-Einheiten zwischen dem Solvens und E1-SH zu E2 transportieren könnte. Diese Möglichkeit sollte durch Pulse-Chase-Experimente mit isotoopenmarkiertem und unmarkiertem Ubiquitin und massenspektrometrischer Sequenzierung zur Analyse des Produkts leicht zu untersuchen sein.
- Diese Methode kann fehlschlagen, wenn die E2-E3-Proteinwechselwirkungen schwach sind. Darüber hinaus sollte das Experiment mechanistische Informationen über das System liefern, z. B. wie viele Ubiquitinmoleküle in Folge angefügt werden können.
- Mit einem solchen Experiment sollte sich auch die Frage beantworten lassen, ob die Ub-Einheiten am distalen Ende der wachsenden Kette angeknüpft werden.
- Ein interessantes Problem ergibt sich aus Cecile Pickarts Beobachtung,^[16,17] dass Hydroxylamin bei $K_m \approx 1$ mM die C-terminale Hydrolase von Erythrocyten und vielleicht alle UCHs in Gegenwart von Ubiquitin inaktiviert. Mit dem Ubiquitinhydroxamat als Substrat erforderte die vollständige Inaktivierung des Enzyms ca. 2000 Turnover. Am zurückgewonnenen Enzym war kein markiertes Ub nachweisbar, und seine Aktivität konnte nicht wiederher-



Schema 3.

gestellt werden. Wenn Hydroxylamin nicht auf unbekannte Weise mit dem Schwefel der Ub-Thiolester-Enzym-Zwischenstufe reagiert, dann sollten Ub-Hydroxamat und das aktive Enzym die klassischen Reaktionsprodukte sein. In Anbetracht der wichtigen Rolle der Ubiquitin abspaltenden Enzyme und des praktischen Interesses an ihrer Inaktivierung ist es wichtig, die Wirkungsweise von Hydroxylamin zu verstehen.

Es ist mir eine Freude, Avram Hershko zu danken, der mit seinem analytischen Gespür und seiner unverkrampften Art für eine stets harmonische Zusammenarbeit sorgte. Sein Doktorand Aaron Ciechanover spielte eine wichtige Rolle dabei, die in Israel und in Fox Chase erzielten Fortschritte zu koordinieren und zu vermitteln. Neben Aaron Ciechanover haben auch die Postdocs Art Haas, Cecile Pickart und Keith Wilkinson maßgebliche Beiträge geleistet und die Arbeiten auf dem Ubiquitingebiet später mit bemerkenswertem Erfolg fortgesetzt. Mein Dank geht außerdem an Hannah Heller und Jesse Warms für ihre Mitarbeit im Labor.

Eingegangen am 18. März 2005

Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

-
- [1] R. Schoenheimer, *The Dynamic State of Body Constituents*, Harvard University Press, Cambridge, **1942**.
- [2] R. T. Schimke, D. Doyle, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, *39*, 929–976.
- [3] M. V. Simpson, *J. Biol. Chem.* **1953**, *200*, 143–154.
- [4] Siehe auch die Anmerkung in der Kurzbiographie.
- [5] I. A. Rose, E. L. O'Connell, S. Litwin, J. Bar Tana, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5163–5168.
- [6] J. D. Etlinger, A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *86*, 7751–7755.
- [7] A. Ciechanover, Y. Hod, A. Hershko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 1100–1105.
- [8] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, I. A. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1783–1786.
- [9] K. D. Wilkinson, M. K. Urban, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7529–7532.
- [10] A. L. Haas, K. E. Murphy, P. M. Bright, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4694–4703.
- [11] A. L. Haas, J. V. B. Warms, A. Hershko, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2543–2548.
- [12] A. L. Haas, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10329–10337.
- [13] A. L. Haas, J. V. B. Warms, I. A. Rose, *Biochemistry* **1983**, *22*, 4388–4394.
- [14] A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1525–1528.
- [15] I. A. Rose, J. V. B. Warms, *Biochemistry* **1983**, *22*, 4288–4294.
- [16] C. M. Pickart, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 7903–7910.
- [17] C. M. Pickart, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10210–10217.
- [18] S. C. Johnston, S. M. Riddle, R. E. Cohen, C. P. Hill, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3877–3887.
- [19] M. Hu, P. Li, M. Li, W. Li, T. Yao, J.-W. Wu, W. Gu, R. E. Cohen, Y. Shi, *Cell* **2002**, *111*, 1041–1054.
- [20] S. C. Johnston, C. N. Larsen, W. J. Cook, K. D. Wilkinson, C. P. Hill, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3787–3796.
-