

# Die Chemie und Biologie des Ubiquitin-Signals

Liat Spasser und Ashraf Brik\*

## Stichwörter:

Chemische Synthese · Deubiquitinasen ·  
Posttranslationale Modifikationen ·  
Semisynthese · Ubiquitin

Professor Aaron Ciechanover gewidmet



**Die Ubiquitinierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen in Eukaryoten und spielt bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine Rolle, die zumeist als Signal für den proteasomalen Abbau bekannt sind. Vor kurzem stellte sich heraus, dass das Ubiquitin-Signal wesentlich komplexer ist und durch die Ubiquitin-Komponente und das Substrat bestimmt wird. Die bemerkenswerte Mannigfaltigkeit des Ubiquitin-Signalprozesses hat enorme Bemühungen zur Erforschung der Rolle der Ubiquitinierung in biologischen Prozessen ausgelöst. Trotz der seit mehr als drei Jahrzehnten andauernden Untersuchungen sind aber noch mehrere wichtige Fragestellungen offen. Eine große Hürde ist das Unvermögen, homogene Ubiquitin-Biokonjugate durch Isolierung aus Zellen oder durch enzymatische Mechanismen zugänglich zu machen. Jüngste Erfolge bei chemischen und semisynthetischen Strategien bieten zunehmend Lösungen für diese Herausforderungen, indem sie die Produktion großer Mengen homogener Ubiquitinkonjugate ermöglichen. In diesem Aufsatz diskutierten wir die fundamentalen biologischen Aspekte des Ubiquitin-Signals und stellen neuartige nichtenzymatische Ansätze vor, die diese Hindernisse umgehen.**

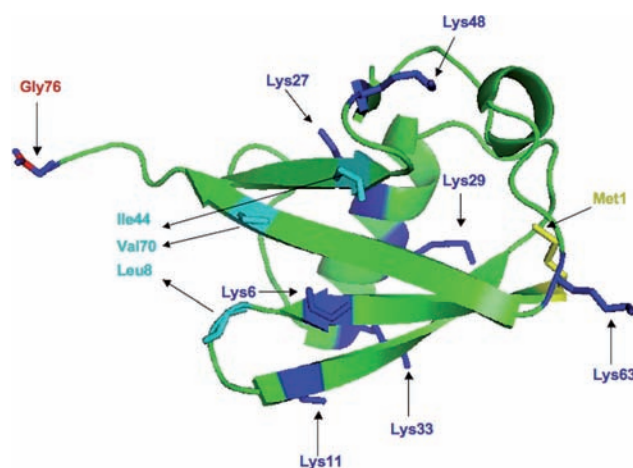
## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6947
2. Interpretation und Termination des Ub-Signals	6949
3. Herausforderungen und Grenzen beim Studium von Ub-Systemen	6952
4. Herstellung von ubiquitinierten Peptiden und Ub-Ketten durch enzymatische Methoden	6952
5. Nichtenzymatische Methoden zur Herstellung von Ub-Konjugaten	6953
6. Zusammenfassung und Ausblick	6965

## 1. Einleitung

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) spielen bei der Regulierung der Struktur und Funktion von Proteinen eine wesentliche Rolle.<sup>[1]</sup> Die Ubiquitinierung, also die Anbindung eines Ubiquitin(Ub)-Monomers oder einer Polyubiquitin-(polyUb)-Kette an ein Zielprotein, ist eine der häufigsten PTMs in Eukaryoten und an einer Vielzahl an zellulären Prozessen beteiligt. Ein Beispiel ist die Rolle der Ubiquitinierung beim Proteinabbau durch das 26S-Proteasom,<sup>[2–6]</sup> bei der es sich um die am besten charakterisierte Funktion und das bekannteste Signal handelt. Die Bedeutung dieser Forschungen wird unter anderem auch durch die Verleihung des Chemie-Nobelpreises 2004 an Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwine Rose „für die Entdeckung des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus“ verdeutlicht.<sup>[7–9]</sup> Die Schlüsselrolle obliegt dem Ub,<sup>[10]</sup> einem hoch konservierten Protein aus 76 Aminosäuren mit einer Sekundärstruktur, die sich aus dreieinhalb Turns einer  $\alpha$ -Helix, einem kurzen Stück einer  $3_{10}$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt mit fünf Strängen und sieben Reverse Turns zusammensetzt (Abbildung 1).<sup>[11]</sup> Interessanterweise erhielt Ub seinen Namen deshalb, weil es als allgegenwärtig (ubiquitinär) in sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten galt. Dies stellte sich jedoch als falsch heraus, da weitere Untersuchungen ergaben, dass es nur in Eukaryoten existiert.<sup>[7]</sup> Ub gilt als in hohem Maße stabil bei neutralem pH-Wert mit einer Denaturierungstemperatur von über 100 °C.<sup>[12,13]</sup>

An der Ubiquitinierung sind drei Enzyme beteiligt, die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden. E1, E2 und E3 verknüpfen auf koordinierte Weise das C-terminale Gly des Ub über eine Isopeptidbindung, die eine Amidbindung außerhalb des Protein-Hauptrückgrats darstellt, mit der Lys-Seitenkette des Zielproteins.<sup>[14,15]</sup> Der Prozess wird durch E1 initiiert, das

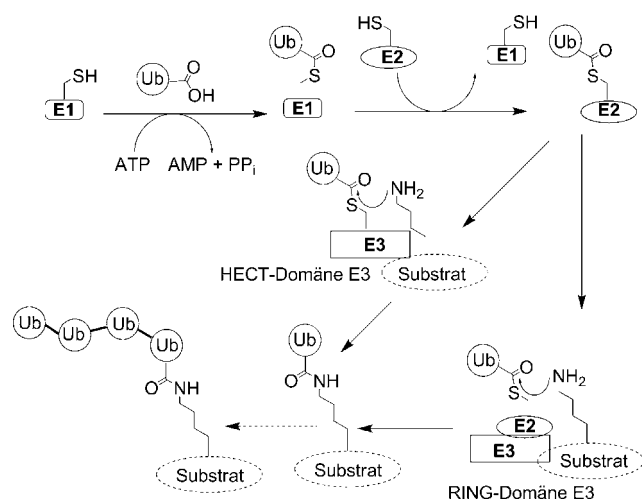


**Abbildung 1.** Bändermodell der Ub-Struktur (PDB-Code 1UBQ)<sup>[11]</sup> mit Kugel-Stab-Darstellung der Lys-Reste (K63, K48, K33, K29, K27, K11 und K6), der C- und N-Termini (G76 und M1) und des hydrophoben Bereichs (L8, I44, V70), die die meisten Ub-Protein-Wechselwirkungen vermitteln.

ATP-abhängig den C-Terminus zur Bildung eines Thioesterintermediats aktiviert.<sup>[16]</sup> Anschließend transportiert das konjugierte E2-Enzym das Ub, ebenfalls in der Thioesterform, zum nachfolgenden Schritt der Isopeptidbildung.<sup>[17]</sup> Die E3-Ligase katalysiert den Transfer von jeweils einem Ub-Molekül oder einer Ub-Kette auf das Zielprotein.<sup>[18]</sup> An

[\*] L. Spasser, A. Brik  
Department of Chemistry, Ben-Gurion University of the Negev  
Beer Sheva, 84105 (Israel)  
E-Mail: abrik@bgu.ac.il  
Homepage: <http://www.bgu.ac.il/~abrik>

diesem Mechanismus könnten Ligasen der RING-Domäne-E3-Familie beteiligt sein, die zur Bildung der Isopeptidbindung zwischen dem Zielmolekül und Ub das Ub-Thioester-E2 in die Nähe der nukleophilen  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lys-Restes bringen (Schema 1). Dieser Familie fehlt ein klassi-



**Schema 1.** Ubiquitinierung eines Proteinsubstrats unter Beteiligung der E1-, E2- und E3-Enzyme.

ches katalytisch aktives Zentrum, wie es oft ein Enzym charakterisiert.<sup>[19]</sup> Alternativ wird die Bildung der Isopeptidbindung durch eine andere Gruppe von E3-Enzymen katalysiert, die als HECT E3 bezeichnet werden (homolog zum C-Terminus des E6-AP). Hierbei wird ein katalytischer Cys-Rest genutzt, der ein transientes Thioesterintermediat zwischen Ub und dem E3 bildet.<sup>[20]</sup> Während E3 im Allgemeinen der entscheidende Faktor für die Substratspezifität ist, spielt E2 eine hauptsächliche Rolle bei der Bestimmung der Verknüpfungsart.<sup>[17]</sup> Am enzymatischen Mechanismus sind zwei E1-Enzyme, 30 bis 40 E2-Enzyme und einige hundert E3-Ligasen beteiligt.<sup>[19,21,22]</sup>

Die Konjugation von Ub an ein Zielprotein kann mit einem Ub-Molekül (Monoubiquitinierung) oder mit einer Kette von Ubs verschiedener Längen und Verknüpfungsarten (Polyubiquitinierung) erfolgen. Demzufolge lösen diese Proteinmodifikationen eine Vielzahl an molekularen Signalen aus, deren Ausgang von der Beschaffenheit der Ubiquitinierung abhängt, wie z.B. Monoubiquitinierung vs. Polyubiqui-

tinierung. Bei letzterer handelt es sich um eine hochkomplexe Modifikation, da alle sieben Lysine in Ub (K63, K48, K33, K29, K27, K11, K6) zur Verknüpfung der konsekutiven Ub-Moleküle unter Bildung einer spezifischen Kette dienen können (Abbildung 2).<sup>[23]</sup> Jüngste Proteomikstudien verdeutlichten, dass alle diese Ketten in vivo existieren, und dass einige von ihnen mehrere verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen.<sup>[24–27]</sup> Zum Beispiel zeigte die Proteomanalyse ungestörter Hefezellen, dass die am häufigsten vorhandenen Ketten K48- und K11-verknüpfte Ketten sind (29 % bzw. 28 %), während die K29- und K33-verknüpften Ketten am seltensten vorkommen (jeweils 3 %). Die K63-, K27- und K6-Ketten liegen bei 17 %, 9 % bzw. 11 %.<sup>[24]</sup>

Die K48-verknüpfte Ub-Kette ist als eine typische Kette bekannt, während Ketten, die über ein anderes der sechs Lysine konjugiert sind, als atypische Ketten bekannt sind.<sup>[28]</sup> Die Ub-Ketten können homotypisch sein, gemischt-verknüpft (über mehrere unterschiedliche Lysine) oder heterolog (Ub und Ub-artige Proteine, wie z.B. der kleine Ub-artige Modifikator (SUMO), werden für den Kettenaufbau verwendet). Außer der Verknüpfung über das Isopeptid kann auch der N-Terminus des Ub zur Bildung einer Kopf-Schwanz-Verknüpfung genutzt werden; eine solche Kette wird als lineare Kette bezeichnet (Abbildung 2).<sup>[28]</sup> Am selben Protein können mehrere Monoubiquitinierungen stattfinden, was z.B. für p53 vorgeschlagen wurde, wo eine solche Modifikation das Protein zum Abbau markiert.<sup>[29]</sup> Eine andere Art der Ubiquitinierung beruht auf Lysin-freien Bindungsstellen; in diesem Fall dienen Cys, Thr, Ser und der N-Terminus eines Proteins als Verankerungsstelle für die Ubiquitinierung.<sup>[30–37]</sup>

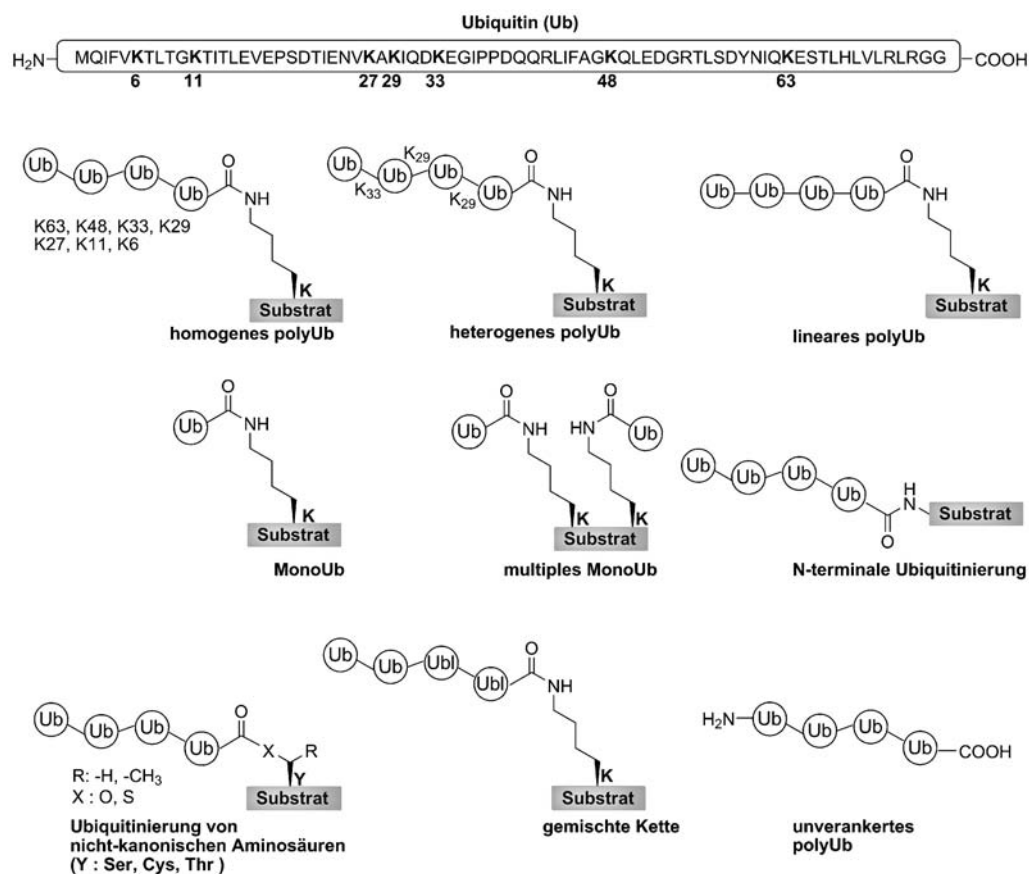
Die oben beschriebene Mannigfaltigkeit an Ubiquitinierungen mit verschiedensten Arten, Längen, Konnektivitäten und Verknüpfungsstellen (z.B. Lys, N-Terminus, Ser) liefert einige Hinweise auf den Ursprung der erstaunlichen Diversität der Ub-Signalprozesse (Tabelle 1). Während z.B. die K48-verknüpfte Kette die Erkennung durch das 26S-Proteasom und den nachfolgenden Abbau des ubiquitinierten Proteins erleichtert,<sup>[4–6]</sup> spielt die K63-verknüpfte Kette eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, der Endozytose und DNA-Reparaturprozessen.<sup>[23,38–40]</sup> Interessanterweise sprechen neue Daten auch für eine zentrale Rolle der anderen Ketten in verschiedenen biologischen Prozessen. Kürzlich wurde z.B. beschrieben, dass die K33-verknüpfte Kette eine



Ashraf Brik studierte an der Ben-Gurion University (BGU) und am Technion–Israel Institute of Technology, wo er bei Prof. Ehud Keinan in Kooperation mit Prof. Philip E. Dawson vom Scripps Research Institute promovierte. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Chi-Huey Wong am Scripps kehrte er 2007 als Assistant Professor an die BGU zurück und wurde dort 2011 zum Associate Professor befördert. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Methoden zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Er wurde mit der Ma'of Fellowship, dem Marie Curie International Re-Integration Award und dem 2011 Israel Chemical Society Prize for Outstanding Young Chemists ausgezeichnet.



Liat Spasser studierte Chemie an der Hebrew University of Jerusalem (B.Sc. 2007) und erwarb 2009 ihren M.Sc. an der Tel-Aviv University mit Arbeiten zur Synthese und Anwendung polymergestützter linearer Oligoether (Prof. Moshe Portnoy). Zurzeit ist sie Doktorandin bei Prof. Ashraf Brik an der Ben-Gurion University und erforscht die nichtenzymatische Synthese von Ubiquitinketten. 2011 wurde sie mit dem Israel Chemical Society Prize for Excellent Graduate Students ausgezeichnet.



**Abbildung 2.** Mannigfaltigkeit an Ubiquitinierungen mit verschiedenartigen Zusammensetzungen von Ub-Ketten und deren Verknüpfungsmöglichkeiten mit einem Zielprotein.

Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T-Zellen und Autoimmunreaktionen spielt,<sup>[41]</sup> während die K11-verknüpfte Kette Zellsignale und mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierten Abbau (ERAD) meldet.<sup>[42–44]</sup> Insbesondere erweist sich die Monoubiquitinierung als eine bedeutende Form der Ubiquitinierung, wie aus Proteomanalysen hervorgeht.<sup>[25]</sup> Sie spielt bei einer Vielzahl biologischer Prozesse vom Membrantransport bis hin zur transkriptionellen Regulierung und dem Proteinabbau eine Rolle.<sup>[45–49]</sup>

Protein-Ubiquitinierung vermitteln, bestehen aus Strukturereinheiten, die nichtkovalent an Ub binden und dabei molekulare Ereignisse in spezifische zelluläre Funktionen umwandeln. Mehr als 20 Mitglieder dieser Familie (z. B. MIU (motif interacting with ubiquitin) und CUE (coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation)) mit verschiedensten Faltungsstrukturen, insbesondere der  $\alpha$ -Helix, wurden bereits identifiziert. Diese Domänen sind verhältnismäßig klein (20–150 Aminosäuren), weisen für gewöhnlich eine moderate bis niedrige Bindungsaffinität ge-

## 2. Interpretation und Termination des Ub-Signals

Im Allgemeinen beginnen die molekularen Vorgänge, die nachfolgend zum Zusammenbau des Enzyms zu einem spezifischen Signal führen, mit der Erkennung des Ub-bindenden Proteins durch dessen Ub-Bindungsdomäne (UBD). Die Termination eines Signals erfolgt durch die Abtrennung eines Teils oder der gesamten Kette durch Deubiquitinasen (DUBs). Im Folgenden werden wir uns mit Teilen dieses Prozesses detaillierter auseinandersetzen.

### 2.1. Ub-Bindungsdomänen

Diese Domänen, die die meisten Effekte der

**Tabelle 1:** Zelluläre Signalprozesse auf der Basis verschiedener Ubiquitinspezies.<sup>[50]</sup>

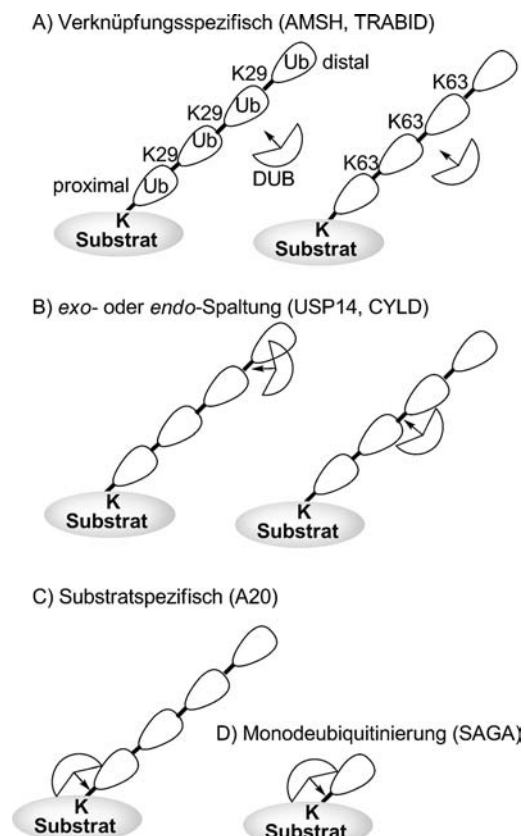
Art der Ubiquitinierung	Zelluläre Signalprozesse	Lit. (Auswahl)
Mono	DNA-Reparatur, Endozytose, Histon-Regulierung, Virus-Budding, proteasomaler und lysosomaler Abbau	[45–49, 51–55]
K63	Zellkommunikation/Kinase-Aktivierung und Zytokin-Signalprozesse, Reaktion auf DNA-Schäden, Endozytose	[39, 40, 56–58]
K48	Proteasomaler Abbau	[2–6]
K33	Immunregulierung	[41]
K29	Lysosomaler Abbau, Wnt-Signalwege	[59–61]
K27	Die physiologische Funktion ist unklar	
K11	Zellzyklus/proteasomaler Abbau, ERAD, Zellkommunikation wie z. B. TNF- und Wnt-Signalwege	[61–63]
K6	Die physiologische Funktion ist noch unklar, angenommen werden eine Inhibierung des proteasomalen Abbaus und eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden	[64, 65]
Linear	Regulierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege bei Entzündungen, Proteinabbau	[66, 67]
Multi-Mono	Endozytose, proteasomaler und lysosomaler Abbau	[29, 68]
Gemischte Ketten	MHC-I-Endozytose (K11/K63), Kinase-Aktivierung (K33/K29)	[69, 70]
Lysin-frei	Proteasomaler Abbau	[30–37]

genüber MonoUb auf ( $K_d = 10\text{--}500\ \mu\text{M}$ )<sup>[71–73]</sup> und sind dafür bekannt, verschiedenartige Ub-Oberflächen zu erkennen. Die überwiegende Mehrheit an Untersuchungen zu Ub-UBDs konzentriert sich auf die Wechselwirkungen zwischen einem Ub-Monomer und einer spezifischen Domäne. Mehrere Röntgen- und NMR-Strukturen wurden beschrieben, und molekulare Modelle zur Erkennung des Ub-Monomers durch viele dieser Domänen sind bekannt.<sup>[71–73]</sup> Das Erkennungsverhalten von UBDs gegenüber den meisten der Ub-Ketten ist allerdings noch nicht bekannt.<sup>[28,74]</sup> Darüber hinaus fehlen mechanistische Details darüber, wie diese Domänen zwischen den verschiedenen Ub-Ketten unterscheiden. Neuere Entwicklungen bei der Synthese homogener Ub-Ketten sollten ein fundamentales Verständnis der molekularen Basis im Hinblick auf die selektive Erkennung von Ketten durch die verschiedenen Domänen erlauben und unser Wissen bezüglich Ub-Signalprozessen erweitern. Vor kurzem wurde z.B. beschrieben, dass eine niedermolekulare Verbindung (Ubistatin) an eine Ub-Kette bindet und mit den Wechselwirkungen der Ub-UBDs interferiert.<sup>[75]</sup> Obgleich die pharmakokinetischen Eigenschaften von Ubistatin untergeordnet sind, bewies diese Studie, dass niedermolekulare Moleküle dazu verwendet werden können, solche Wechselwirkungen zu beeinflussen und selektiv bestimmte molekulare Vorgänge mit pharmazeutischer Relevanz zu manipulieren.

## 2.2. Deubiquitinasen

Ähnlich einigen anderen PTMs handelt es sich bei der Ubiquitinierung um einen reversiblen Prozess. Die Abtrennung des Ub vom Zielmolekül wird durch Deubiquitinasen (DUBs) bewerkstelligt. Etwa 100 DUBs wurden im menschlichen Genom durch computergestützte Methoden und Aktivitätsprofilierung identifiziert.<sup>[76–78]</sup> DUBs sind an verschiedenen Regulierungsprozessen beteiligt. Sie spielen bei einer Vielzahl an Krankheiten eine Rolle, wie z.B. neurologischen Störungen, Infektionskrankheiten und Krebserkrankungen, und repräsentieren somit neue therapeutische Zielmoleküle.<sup>[79–80]</sup> DUBs können Ub oder PolyUb aus Proteinen abspalten, Ub-Vorläufer aufbereiten und nichtverankerte PolyUb-Ketten zerlegen.<sup>[78,81–83]</sup> Mechanisch betrachtet können DUBs in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Cystein-Proteasen, die wiederum klassifiziert werden in Ub-spezifische Proteasen (USP), Ub-C-terminale Hydrolasen (UCH), Ovarialtumor-assoziierte Proteasen (OTU) und die Josephin/Machado-Joseph-Krankheit-Protease (MJD). 2) Metalloproteasen mit der JAB1/MPN/Mov34-Metallo-nzym(JAMM)-Domäne.<sup>[81–83]</sup>

Es gibt mehrere Faktoren, die die Substraterkennung und Spezifitäten ebenso wie die Wirkungsweise von DUBs bestimmen (Abbildung 3). Während manche DUBs nicht zwischen Kettenverknüpfungen unterscheiden können, verhalten sich andere ketten-spezifisch (Abbildung 3A). Die Abspaltung der Kette kann am Ende (*exo*) erfolgen oder innerhalb der Kette (*endo*), wobei die Aufnahme der Ub-Moleküle der Spaltung vorausgehen muss (Abbildung 3B). In einigen Fällen verhalten sich DUBs substratspezifisch, insofern eine



**Abbildung 3.** Beispiele von DUB-Spezifitäten: A) AMSH<sup>[84]</sup> und TRABID<sup>[85]</sup> sind spezifische DUBs für K63- bzw. K29-verknüpfte Ketten. B) USP14<sup>[86]</sup> spaltet K48-verknüpfte PolyUb-Ketten vom distalen Ende ab, wohingegen CYLD<sup>[87]</sup> interne Isopeptidverknüpfungen in K63-verknüpften PolyUb-Ketten spaltet. C) A20<sup>[88]</sup> ist TRAF6-spezifisch und entfernt die vollständige Ub-Kette. D) SAGA spaltet MonoUb aus dem H2B-Protein ab.<sup>[89–91]</sup>

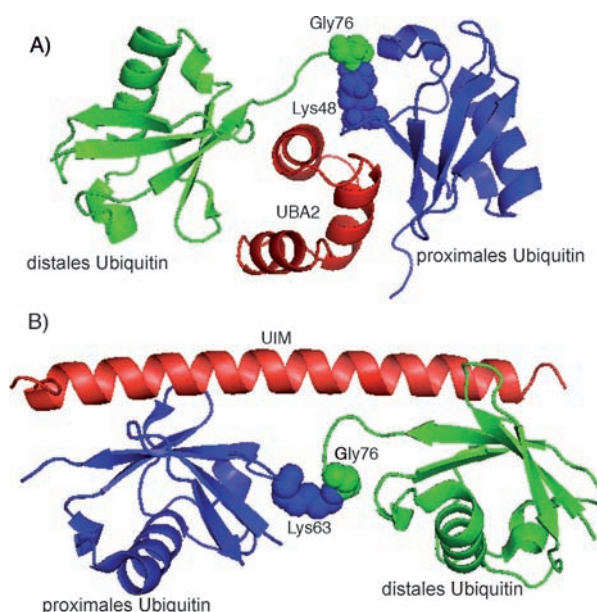
bestimmte Sequenz des Zielmoleküls erkannt wird, was zu einer Abspaltung der Kette in einem einzigen Schritt führt (Abbildung 3C,D). Nach derzeitigem Konsens wird jede Ub-Kette durch eine spezifische DUB abgebaut, allerdings ist für einige Ub-Ketten die spezifische DUB nicht bekannt, sodass es noch kein vollständiges Bild von den Spezifitäten der DUBs gibt. Dahingehende Untersuchungen waren bis vor kurzem vor allem dadurch erschwert, dass eindeutig definierte Ketten und Methoden zur Lösung der oben beschriebenen Herausforderungen nicht verfügbar waren. Wie in den folgenden Abschnitten diskutiert wird, stehen einige dieser Werkzeuge nun zur Verfügung, von denen wir uns versprechen, dass sie signifikant zum Verständnis der Rolle von DUBs bei Krankheiten und letztendlich in der Wirkstoffforschung beitragen werden.

## 2.3. Einfluss der Verknüpfungsart auf die Struktur und die Erkennung durch DUBs und UBDs

Es wird angenommen, dass die Mannigfaltigkeit an Ubiquitinierungen in einem großen Konformationsraum der Ub-Biokonjugate resultiert und entsprechend zu einer Vielfalt an

Protein-Protein-Wechselwirkungen führt und viele biologische Signalübertragungen beeinflusst. In der Tat belegten Röntgenstrukturanalysen und NMR-Untersuchungen von K48- und K63-verknüpften Ketten deutliche konformative Unterschiede zwischen diesen Ketten. Beim physiologischen pH-Wert<sup>[92,93]</sup> nimmt die K48-verknüpfte Kette überwiegend eine geschlossene Konformation ein, in der die hydrophoben Bereiche (L8, I44, V70) am Übergang zwischen zwei benachbarten Ub-Monomeren untergebracht sind. Dagegen zeigt die K63-verknüpfte Kette hauptsächlich eine gestreckte Konformation, in der der Kontakt der funktionell wichtigen Reste zwischen den beiden Monomeren fehlt.<sup>[94–96]</sup> Tabelle 2 zeigt einige Beispiele von Strukturen von Ub-Ketten in ihren nichtverankerten Formen, die NMR-spektroskopisch oder/und mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden konnten. Insbesondere wurde gezeigt, dass die K48-verknüpfte Kette ihre Konformation bei pH-Änderung deutlich ändert.<sup>[93]</sup>

Die oben beschriebenen strukturellen Unterschiede der Ub-Ketten können einen wesentlichen Einfluss auf die selektive Erkennung dieser Ketten durch verschiedene Proteinpartner haben. Zum Beispiel bindet die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA2, ubiquitin associate domain) des humanen Homologen der Hefe Rad23 (hHR23A) an K48-ver-



**Abbildung 4.** Beispiele für die Bindung von Ub-Ketten an UBDs.

A) UBA2-Domäne von hHR23A (rot), gebunden an K48-verknüpftes Di-Ub (PDB-Code 1ZO6).<sup>[110]</sup> B) K63-verknüpftes Di-Ub, gebunden an UIM von RAP80 (rot) (PDB-Code 3A1Q).<sup>[112]</sup>

**Tabelle 2:** Beispiele von gelösten Strukturen von Ub-Ketten.

Art der Kette	PDB-Code (NMR-Struktur)	PDB-Code (Röntgenstruktur)
K63-verknüpftes Di-Ub		2JF5, <sup>[97]</sup> 3H7P <sup>[98]</sup>
K63-verknüpftes Tri-Ub		3H7S <sup>[98]</sup>
K63-verknüpftes Tetra-Ub		3HM3 <sup>[95]</sup>
K48-verknüpftes Di-Ub	2PE9, <sup>[99]</sup> 2PEA, <sup>[99]</sup> 2BGF, <sup>[100]</sup>	3AUL, <sup>[101]</sup> 3M3J, <sup>[102]</sup> 1AAR <sup>[103]</sup>
K48-verknüpftes Tetra-Ub	2O6V <sup>[92]</sup>	2O6V, <sup>[92]</sup> 1TBE, <sup>[104]</sup> 1F9J <sup>[105]</sup>
K11-verknüpftes Di-Ub		3NOB, <sup>[42]</sup> 2XEW <sup>[106]</sup>
K6-verknüpftes Di-Ub		2XK5 <sup>[85]</sup>
Linear (Di-Ub)		2W9N, <sup>[97]</sup> 3AXC <sup>[107]</sup>

knüpftes Di-Ub, und K63-verknüpftes Di-Ub bindet an das UIM-Motiv (ubiquitin-interacting motif) des Rezeptor-assoziierten Proteins 80 (RAP80). RAP80 spielt bei der Rekrutierung von BRCA1 (Suszeptibilitätsgen des Brustkrebs Typ 1) für DNA-Schadstellen eine Rolle,<sup>[64]</sup> wohingegen Rad23 ein Ub-Rezeptor ist, der mit der Substraterkennung des 26S-Proteasoms assoziiert ist.<sup>[108]</sup> Die UBA2-Domäne in hHR23A bindet mit einer 3,6-fach höheren Affinität an K48-verknüpftes Tetra-Ub als die K63-verknüpften Ketten.<sup>[109]</sup> Die Struktur des Komplexes bestehend aus K48-verknüpftem Di-Ub und UBA2 von hHR23A zeigte, dass diese Domäne im Zentrum von zwei Ub-Molekülen bindet und außerdem mit der K48-Verknüpfung wechselwirkt. Zusammengefasst hat die Domäne mehr Bindungsflächen in der K48-Kette als Ub oder K63-verknüpftes Di-Ub (Abbildung 4A), was ihre Präferenz für diesen Linker erklärt.<sup>[96,110]</sup> Andererseits erklärt die Struktur des K63-verknüpften, an UIM von RAP80 gebundenen Di-Ub die Bevorzugung der K63- gegenüber der K48-verknüpften Kette (Abbildung 4B).<sup>[111]</sup> Hierbei nutzt die ausgestreckte Helix der UIM-Domäne die gestreckte Konformation der Kette und wechselwirkt mit beiden Ubs, um so

ihre Bindungsaffinität über diejenige von Mono- oder K48-verknüpftem Di-Ub hinaus zu vergrößern.

Neben der Tertiärstruktur spielen auch die Sequenzen, die die Isopeptidverknüpfung flankieren, eine wichtige Rolle für die Erkennung und die Spezifität von DUBs und UBDs. Während z.B. K63-verknüpfte und lineare PolyUb-Ketten dafür bekannt sind, gleich-

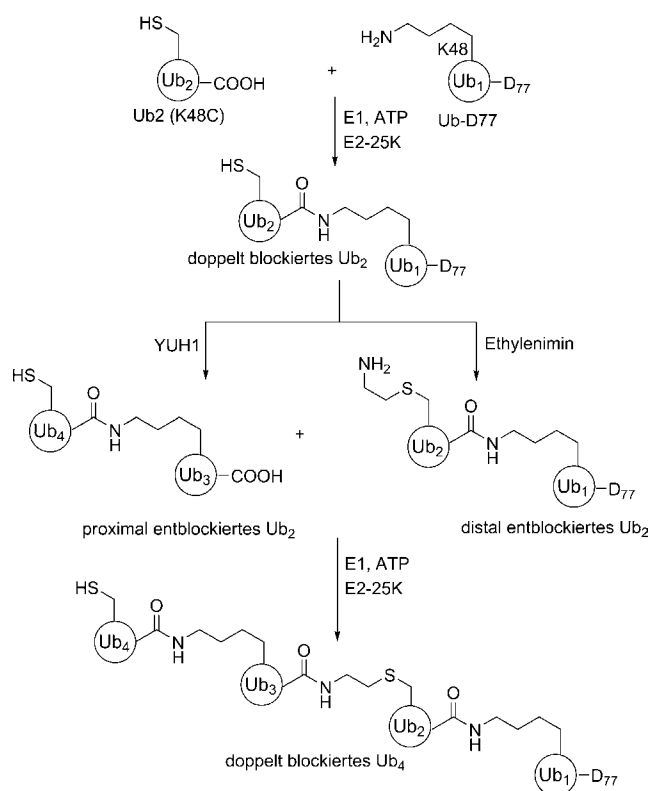
artige offene Konformationen ohne Kontakt zwischen den Monomeren einzunehmen, weisen die verschiedenen DUBs und UBDs unterschiedliche Spezifitäten auf.<sup>[97]</sup> Die vielfältigen Spezifitäten konnten der chemisch unterscheidbaren Isopeptidverknüpfung in K63 zugeschrieben werden (im Gegensatz zur gleichartigen Peptidverknüpfung in der linearen Kette). Erst vor kurzem wurde beschrieben, dass die K11-verknüpfte Di-Ub-Kette eine kompakte Konformation annimmt, die sich von der Konformation der K48-verknüpften Di-Ub-Kette unterscheidet und bevorzugt von der Cezanne-DUB hydrolysiert wird.<sup>[106]</sup> Wenngleich der Ursprung dieser Spezifität noch nicht bekannt ist, könnten die Sequenzen in der Umgebung der Isopeptidbindung eine entscheidende Rolle spielen. Entsprechende Studien weisen auf den Einfluss unterschiedlicher Verknüpfungen auf die globuläre Konformation der Ketten und deren Bedeutung für die intrinsische Spezifität des Ub-Systems für DUBs und UBDs hin. Ein umfassendes Verständnis der strukturellen und funktionellen Eigenschaften ebenso wie der Spezifitäten der verschiedenen DUBs, UBDs und ihren Substraten fehlt noch immer.

### 3. Herausforderungen und Grenzen beim Studium von Ub-Systemen

Die Forschungen auf dem Gebiet der Ubiquitine, einschließlich struktureller und funktioneller Analysen sowie der Entwicklung von Reagentien (z.B. Antikörpern, die spezifische Ketten erkennen),<sup>[113,114]</sup> konzentrierten sich hauptsächlich auf K48- und K63-verknüpfte Ketten (Di- und Tetra-Ub-Ketten). Der Grund hierfür liegt darin, dass E2- und E3-Enzyme zur In-vitro-Rekonstitution der übrigen Ketten in freier oder substratkonjugierter Form (mit Ausnahme von K11) schwer verfügbar sind.<sup>[115]</sup> Die Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von E2/E3-Enzymen für ein spezifisches Zielmolekül stellen folglich die limitierenden Schritte dieser Studien dar. Darüber hinaus wirken diese Enzyme in vitro oftmals nicht effizient und spezifisch genug, um das gewünschte Ub-Konjugat mit ausreichender Homogenität in genügenden Mengen zu liefern. Wenngleich heute schon mehr Studien an diesen „schwierigen“ Ketten wie K6<sup>[85]</sup> und K11<sup>[43,44]</sup> durchgeführt werden, hat das viele Jahre bestehende Problem, diese Ketten in ausreichenden Mengen für strukturelle und biochemische In-vitro-Studien herzustellen, die Aufklärung von Ub-Signalprozessen blockiert.<sup>[23,116]</sup> Einige fundamentale Fragestellungen sind daher noch offen, und ein vollständiges Bild der Ub-Signalprozesse ist noch nicht erreicht.

### 4. Herstellung von ubiquitinierten Peptiden und Ub-Ketten durch enzymatische Methoden

Seit der Entdeckung von Ub als Signal für den Abbau von Proteinen wurden große Anstrengungen unternommen, um enzymatische Methoden zum Aufbau von Ub-Ketten definierter Länge und Art zu entwickeln. Wie bereits beschrieben, ist eine der größten Schwierigkeiten bei diesem Ansatz die Identifizierung der E2/E3-Enzyme für ein spezifisches Ub-Konjugat. Ein weiteres Hindernis, das bei der Anwendung enzymatischer Methoden in vitro auftreten kann, ist eine ungenügende Kontrolle der Art und Länge der Ub-Ketten. Vor diesem Hintergrund identifizierten Pickard und Mitarbeiter die Konjugationsfaktoren E2-25K und Mms2/Ubc13 für den In-vitro-Aufbau von K48- bzw. K63-verknüpften Ketten.<sup>[115,117]</sup> Um eine bezüglich der Kettenlänge kontrolliert ablaufende Synthese zu erreichen, waren einige Modifikationen erforderlich, wie z.B. die Blockierung des C-Terminus von Ub1 und die Einführung von K48C- oder K48R-Mutationen in Ub2 (Schema 2). Nach der enzymatischen Kupplung dieser beiden Ub-Monomere wurde das Cys des Ub2–Ub1 durch Reaktion mit Ethylenimin zu einem Lys-Mimetikum umgewandelt (S-Aminoethylcystein), um eine weitere Kettenverlängerung zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde mithilfe der Hefe Ub-Hydrolase 1 (YUH1, yeast Ub hydrolase 1) der C-Terminus der konsekutiven Di-Ub (Ub4–Ub3) aus dem zusätzlichen C-terminalen Rest (D77) freigesetzt, um das freie Di-Ub zu ergeben. Anschließend wurden diese Di-Ub-Bausteine enzymatisch verknüpft und führten so zu den zweifach blockierten Tetra-Ub-Ketten (Ub<sub>4</sub>).<sup>[118]</sup> Bemerkenswerterweise werden durch diese Strategie Ub-Ketten



**Schema 2.** Enzymatische Synthese einer K48-verknüpften Tetra-Ub-Kette.

mit einem Isopeptidmimetikum produziert, das im Vergleich zur natürlichen Verknüpfung andere geometrische und elektronische Charakteristika aufweisen könnte.

Vor kurzem stellten Fushman und Mitarbeiter K48-verknüpfte Ketten kontrollierter Länge mit der nativen Isopeptidverknüpfung her, indem sie zur Erzeugung des Ub-Bausteins UbK48Lys(Boc) genetisch kodiertes Lys(Boc)-OH basierend auf einem Pyrrolsyl-tRNA-Synthetase/tRNAPyl-Paar einsetzten.<sup>[119]</sup> Zur Herstellung K48-verknüpfter Di-Ub-Ketten wurde UbK48Lys(Boc) in Gegenwart von E1 und E2-25K umgesetzt, wobei der C-Terminus des proximalen Ub mit D77 modifiziert wurde, um Polymerisation zu unterdrücken. Die Boc-Gruppe wurde dann entfernt, um noch einen Ubiquitinierungsschritt für eine weitere Kettenverlängerung zu ermöglichen.

Plough und Mitarbeiter verwendeten ebenfalls E2-25K zur Herstellung ubiquitinerter Peptide, die aus 13 Aminosäuren bestehen und über Isopeptidbindungen mit HA-markiertem Ub verknüpft sind.<sup>[120]</sup> Dieses Substrat diente zur Aufklärung des Spaltungsmechanismus von UCH-L3, von dem man weiß, dass es die Abspaltung von kleinen Addukten vom Ub-C-Terminus katalysiert.<sup>[121–123]</sup>

Komander und Mitarbeiter setzen vor kurzem die E2-Ligase UbE2S<sup>[124]</sup> für den Aufbau der nichtverankerten K11-verknüpften Di-Ub-Kette ein. Die erhaltenen Mengen reichten für eine Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse aus. Darüber hinaus konnten vierzehn DUBs durch Screening identifiziert werden, von denen die Cezanne-DUB bevorzugt die K11-

verknüpfte Kette gegenüber den K63-, K48- und linearen Ketten spaltete.<sup>[106]</sup> Dixit und Mitarbeiter erzeugten die K11-verknüpfte Di-Ub-Kette und führten eine Röntgenstrukturanalyse durch.<sup>[42]</sup> Interessanterweise unterschied sich diese kompakte Struktur von der Komander'schen Struktur hinsichtlich der Aminosäuren, die an der Ub-Ub-Grenzfläche beteiligt sind. Dies deutet darauf hin, dass dieselbe Kette in Lösung zwei verschiedene Konformationen annehmen kann, was die dynamische Natur der Ub-Ketten widerspiegelt.<sup>[93,95]</sup>

Eine neuere Methode, die auf der Rekonstitution des Ubiquitinierungsmechanismus in Bakterien basiert, wurde zur Herstellung von ubiquitinierten Proteinen wie z. B. monoubiquitiniertem Rpn10 genutzt.<sup>[125]</sup> Für die Herstellung der noch verbleibenden Ub-Ketten (K6, K33, K27, K29) bedarf es einer weiteren Suche nach neuen enzymatischen Mechanismen.

## 5. Nichtenzymatische Methoden zur Herstellung von Ub-Konjugaten

Die chemische Totalsynthese und die Semisynthese bieten einzigartige Ansätze für die Erzeugung von hochgradig homogenen posttranslational modifizierten Proteinen sowie von Proteinen mit ungewöhnlichen Konnektivitäten. Die chemische Synthese erlaubt einen außerordentlich hohen Grad an Kontrolle auf atomarer Ebene.<sup>[126–128]</sup> Insbesondere vermeiden chemische Methoden die enzymatischen E1/E2/E3-Mechanismen, deren Identifizierung als großes Hindernis angesehen wurde. Ein weiterer Vorteil chemischer Synthesen ist die Möglichkeit, Analoga der natürlich vorkommenden Ub-Biokonjugate herzustellen (z. B. mit spezifischen Ketten ubiquitinierte Peptide und Proteine). Im Prinzip sollte es damit möglich sein, nahezu unbegrenzte Variationen (z. B. besondere Markierungen) in praktisch jede beliebige Position eines Ub-Biokonjugats einzuarbeiten. Allerdings erwiesen sich die Gegenwart der Isopeptidbindung und die Größe der Ub-Ketten als eine echte Herausforderung für die Synthesechemie, sodass zusätzlich zu dem bestehenden Syntheserepertoire etliche neue Methoden entwickelt werden mussten. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die Anwendung chemischer Ansätze zum Aufbau nativer und nichtnativer Isopeptidbindungen für die effiziente Synthese von ubiquitinierten Peptiden und Proteinen sowie von Ub-Ketten.

### 5.1. Chemische Synthese und Semisynthese des Ub-Monomers von Ub-Derivaten

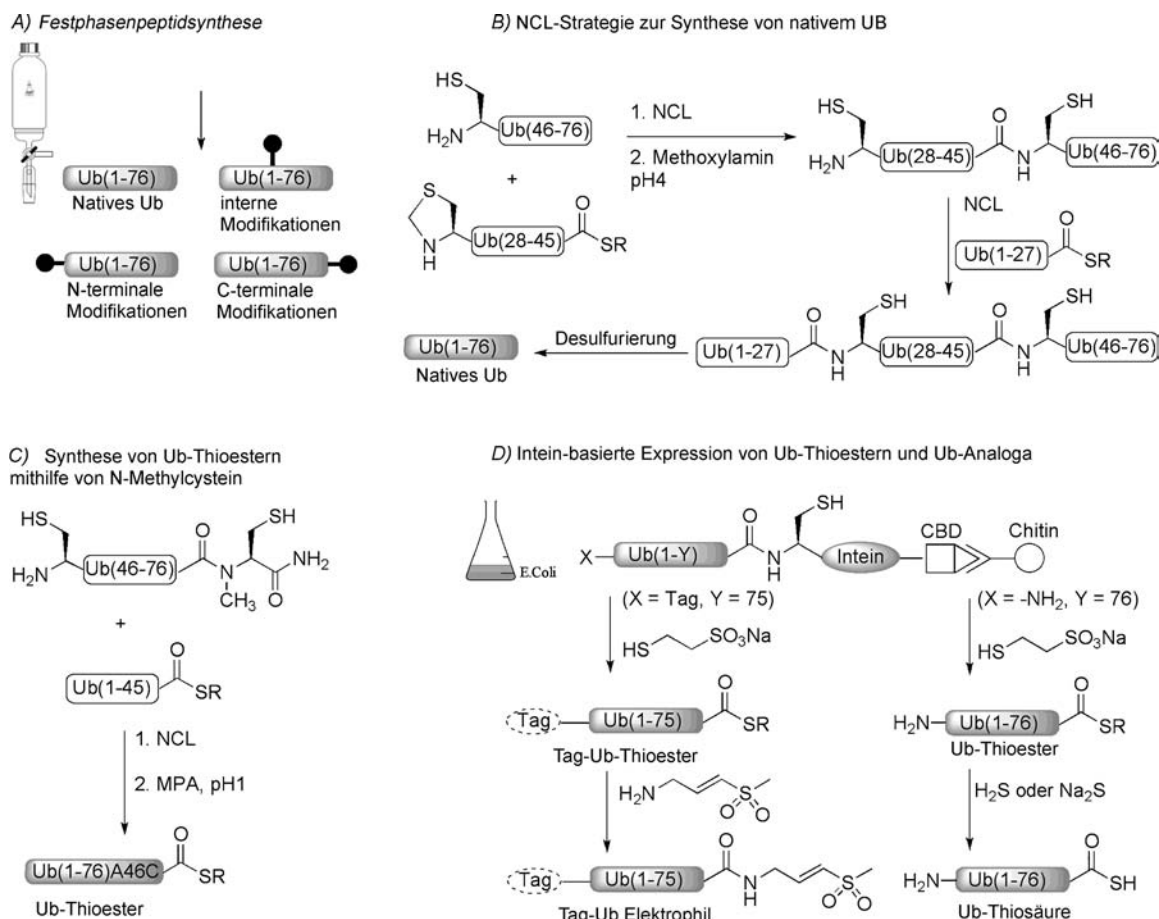
Die relativ geringe Größe von Ub (76 Aminosäuren) ermöglicht dessen direkte chemische Synthese mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis). Ramage und Mitarbeiter waren die Ersten, denen eine solche Synthese mithilfe von Fmoc-SPPS gelang (Schema 3 A).<sup>[129,130]</sup> Mit diesem Ansatz stellten sie Ub mit spezifisch fluorinierten Leu-Resten und anderen nichtnatürlichen Aminosäuren an verschiedenen Positionen her. Die Analoga wurden durch Circular dichroismus (CD), NMR-Spektroskopie und Rönt-

genstrukturanalyse charakterisiert und auf ihr Verhalten gegenüber retikulozytenaktivierenden und -konjugierenden Enzymen getestet.<sup>[131,132]</sup> Die Untersuchungen zeigten, dass die verschiedenen Ub-Analoga trotz veränderter Stabilität eine ähnliche Struktur und ähnliche biologische Eigenschaften aufwiesen wie das unmodifizierte Protein, was darauf hindeutet, dass die Gesamtstruktur und nicht die Stabilität das für die Erkennung wichtige Element ist.

Ovaa und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls eine lineare Synthese von MonoUb, wobei sie vier verschiedene Pseudoprolin-Dipeptide und zwei Dimethoxybenzyl-Dipeptide in die Synthese einsetzten.<sup>[133]</sup> Unter den Bedingungen der PyBOP/DIEA-Kupplung konnten verschiedenste Ub-Fusionen erzeugt werden, beispielsweise N- und C-terminale Modifikationen wie HA-Epitope und AMC. Unserer Arbeitsgruppe gelang es, die direkte Synthese von Ub weiter zu verbessern, indem wir nur zwei Dipeptidanaloga in Gegenwart der Kupplungsreagentien HCTU/DIEA einsetzten. Damit konnten wir Ub-Bausteine im zweistelligen Milligrammbereich produzieren, die zur Herstellung ubiquitinerter Peptide mit verschiedenen Ub-Ketten zunehmender Länge genutzt wurden (siehe Abschnitt 5.4 für weitere Details).<sup>[134]</sup>

Die Herstellung von Ub und Ub-Analoga gelang auch mithilfe von Ligationstrategien. Kent und Mitarbeiter beschrieben ein Eintopfverfahren zur Herstellung von Ub aus drei Fragmenten (Schema 3 B), bei welchem Ala46 und Ala26 zur Vereinfachung der nativen chemischen Ligation (NCL, native chemical ligation) temporär zu Cys mutiert wurden.<sup>[135]</sup> Die Cys-Mutationen wurden später mit der von Dawson und Mitarbeitern entwickelten Desulfurierungsreaktion wieder in die ursprünglichen Ala-Reste überführt.<sup>[136]</sup> Um den Effekt von D-Aminosäuren auf die Proteinfaltung und -struktur zu untersuchen, setzten Kent und Mitarbeiter Ub als Proteinmodell ein und stellten das Ub-Diastereomer (D-Q35-Ub) für kristallographische Studien her. Die Röntgenstruktur offenbarte eine große Ähnlichkeit zwischen den Molekülstrukturen von natürlichem Ub und seinem Diastereomer. Diese Ergebnisse lieferten die experimentelle Bestätigung dafür, dass der Ersatz eines natürlichen, linksdrehenden Gly (G35 in Ub) durch D-Aminosäuren keine größere Störung der lokalen oder globalen Konformation eines Proteinmoleküls verursacht.

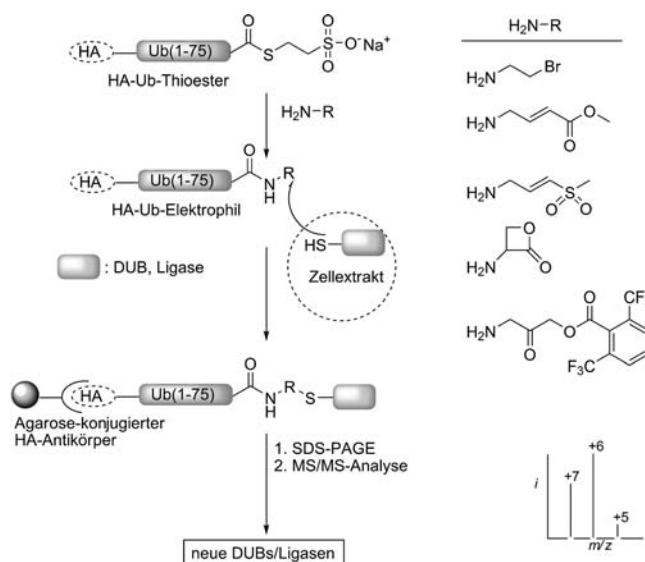
Unsere Arbeitsgruppe beschrieb die chemische Synthese des Ub-Thioesters durch NCL mit N-Methylcystein als N-S-Acyltransfersystem (Schema 3 C).<sup>[137]</sup> In dieser Synthese wurde Ub für den NCL-Schritt in die zwei Fragmente Ub(1-45) und Ub(46-76) mit einem C-terminalen Thioester bzw. einem N-terminalen Cys aufgespalten. Das C-terminale Fragment, Ub(46-76), wurde ebenfalls mit N-Methylcystein ausgestattet, um im Anschluss an den Ligationsschritt den N-S-Acyltransfer zu ermöglichen und so die Bildung des Thioesters mit externen Thiolen wie 3-Mercaptopropionsäure (MPA) zu vereinfachen.<sup>[138]</sup> Die Fähigkeit, Ub-Thioester chemisch herzustellen, erlaubt den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in diese Vorstufe. Die Bedeutung dieser Strategie und ihre Anwendung in der Synthese von Ub-Ketten wird in Abschnitt 5.4 beschrieben.



**Schema 3.** Methoden zur chemischen Synthese und Semisynthese von Ub und Ub-Analoga.

Ub-Thioester wurden auch durch Intein-basierte Expression hergestellt (Schema 3D).<sup>[139–141]</sup> Die Anwendung dieser Strategie zur Ubiquitinierung von Peptiden und Proteinen sowie zur Herstellung von Di-Ub-Ketten wird in den Abschnitten 5.2–5.5 diskutiert. Plough und Mitarbeiter waren die Ersten, die exprimierte Ub-Thioester einsetzen (Schema 3D), wobei sie durch direkte Aminolyse rekombinanter Ub-Thioester, die durch Thiolyse der entsprechenden Ub-Intein-Fusionen erzeugt wurden, Ub-Analoga mit C-terminalen Elektrophilen herstellten (Schema 3D). Diese Analoga dienten als aktivitätsbasierte Sonden zur Identifizierung von Mitgliedern des Ub-Proteasomsystems (Schema 4).<sup>[77, 142, 143]</sup> Insbesondere wurden 23 aktive DUBs identifiziert, von denen zwei eng mit dem regulatorischen Proteasom-19S wechselwirken, sowie eine DUB, die keine Sequenzhomologie mit irgendeiner der bekannten DUBs aufweist.<sup>[142]</sup> Basierend auf dieser Studie und durch Feinabstimmung der elektrophilen Komponente zur Erzeugung von Sonden der zweiten Generation, konnte eine neue Gruppe von DUBs identifiziert werden. Bemerkenswerterweise ermöglichten diese aktivitätsbasierten Sonden auch die Identifizierung von E3-Ligasen aus der HECT-Familie.<sup>[143]</sup>

Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass nur eine Ub-Einheit in der Sonde verwendet wird, wodurch der Einfluss der Kettenstruktur ebenso wie der flankierenden Sequenz der Isopeptidbindung unberücksichtigt bleibt. Diese Struktur-



**Schema 4.** Aktivitätsprofilierung zur Identifizierung neuer DUBs.

elemente sind jedoch sehr wichtig bei der Erkennung von Proteinpartnern und können eine entscheidende Rolle bei der selektiven Identifizierung spezifischer enzymatischer Mechanismen spielen. Mit den heute zur Verfügung stehen-

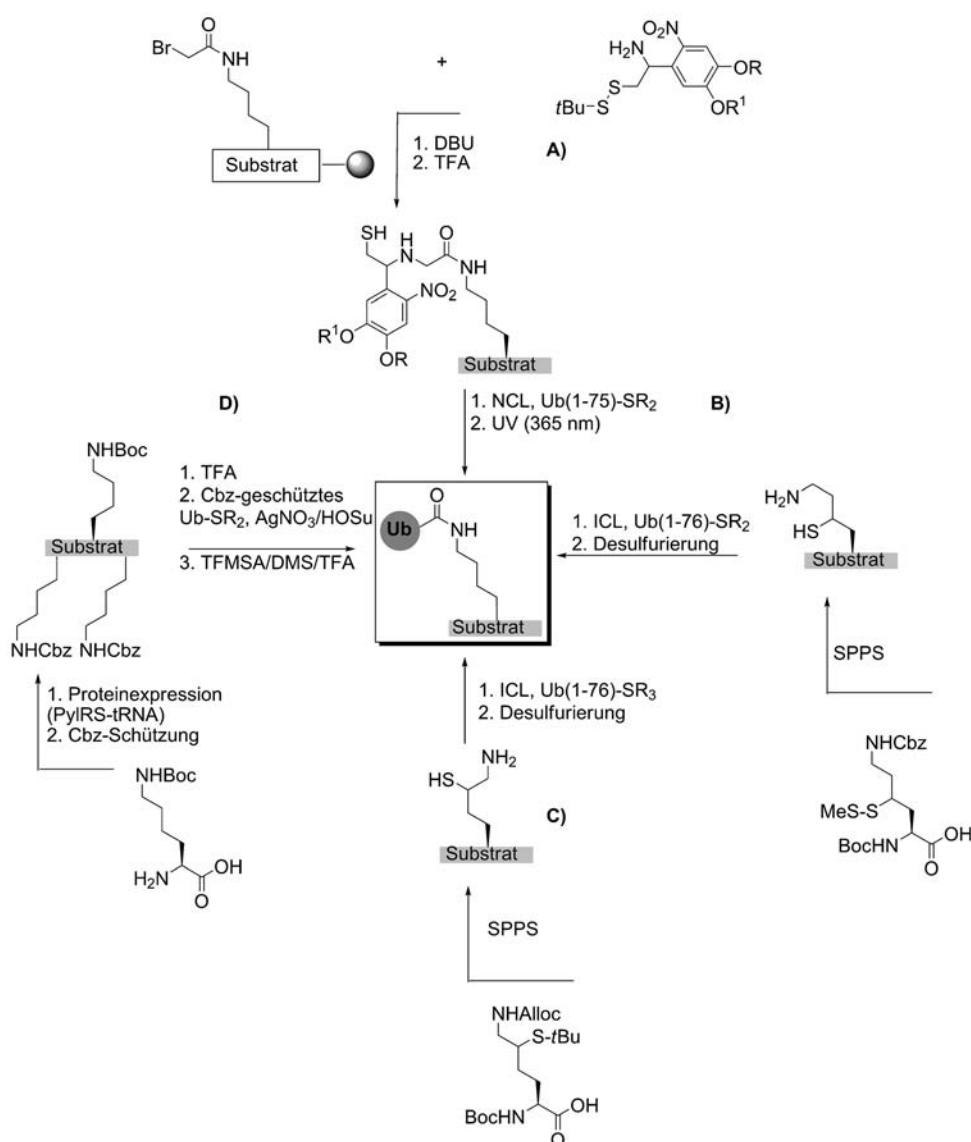
den Synthesemethoden konnte diese Strategie nun auch auf längere Ketten ausgeweitet werden, um die Identifizierung neuer Komponenten im Ub-System zu ermöglichen, die sich selektiv gegenüber einer spezifischen Kette verhalten.

## 5.2. Chemische Methoden zum Aufbau der Isopeptidbindung

In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden zum Aufbau der natürlichen Isopeptidbindung in Ub-Biokonjugaten entwickelt.<sup>[144,145]</sup> Muir et al. beschrieben eine Strategie basierend auf Auxiliär-vermittelter Ligation und Intein-Expression zum Aufbau ubiquitinerter, von H2B abgeleiteter Peptide (Schema 5A).<sup>[146]</sup> In dieser bahnbrechenden Arbeit wurde mittels Fmoc-SPPS das H2B(115-125)-Peptid hergestellt, in dem K120 orthogonal mit iv-Dde (1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl) geschützt war. Nach der Abspaltung von iv-Dde wurde Bromessigsäure an die freie Aminogruppe des K120 gekuppelt, gefolgt von der Anbindung des photospaltbaren Auxiliärs zur Aktivierung der Ligation mit dem exprimierten Ub(1-75)-Thioester. Der Ligationsschritt erwies sich als bemerkenswert langsam (5–7 Tage), was vermutlich auf die sterische Hinderung an der Ligationstelle zurückzuführen war. Im Anschluss daran wurde das Auxiliär durch Bestrahlung mit He/Cd-Laserlicht bei 325 nm entfernt, und das gewünschte ubiquitinierte Peptid wurde erhalten. Die geringe Reaktionsgeschwindigkeit und moderate Ausbeute des Ligationsschrittes schränkten die Anwendbarkeit dieser Methode ein,<sup>[147]</sup> dennoch war diese Studie der Auslöser für zahlreiche Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet.

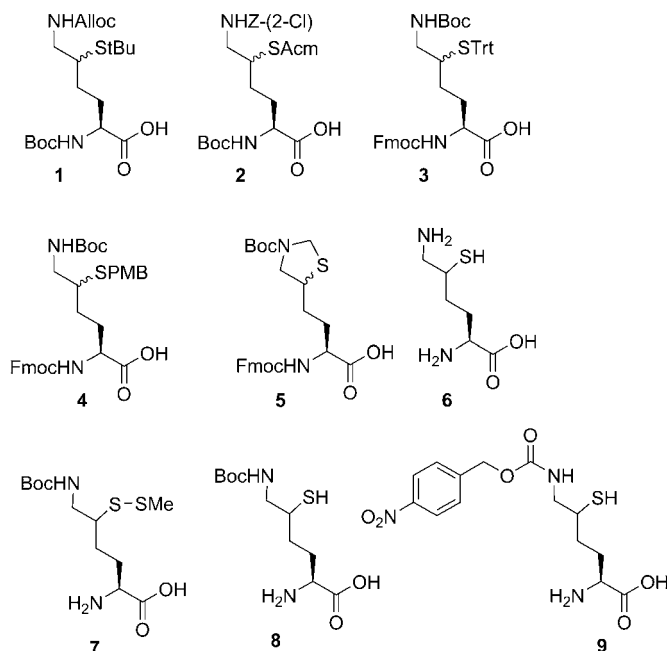
Mit dem Ziel, eine neue Methode für die effiziente Synthese ubiquitinerter Peptide zu entwickeln, beschrieben Liu und Mitarbeiter sowie unsere Arbeitsgruppe unabhängig voneinander zwei auf Mercaptolysin-Derivaten basierende Strategien zum Aufbau der Isopeptidbindung. Liu et al. setzten orthogonal geschütztes  $\gamma$ -Mercaptolysin ein, um eine se-

quentielle Ligation über die  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Amine über eine sechsgliedrige cyclische Zwischenstufe zu bewirken. Dieser synthetische Rest wurde in ein kurzes Peptid eingebaut und ermöglichte so die Ligation der Isopeptidbindung (ICL, isopeptide bond ligation) mit einem exprimierten Ub-Thioester.<sup>[148]</sup> Eine abschließende Desulfurierung unter metallfreien Bedingungen (VA-044, TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine), *t*BuSH)<sup>[149]</sup> ergab die gewünschten ubiquitinierten Peptide in guten Ausbeuten (Schema 5B). Unser Ansatz bestand darin, den Thiol-„Henkel“ am  $\epsilon$ -Kohlenstoffatom des Lysins anzubringen (also in Form des  $\delta$ -Mercaptolysins), wodurch die Ligation über das  $\epsilon$ -Amin über ein fünfgliedriges cyclisches Intermediat verlief (Schema 5C).<sup>[150,151]</sup> Außerdem erweiterten wir die Anwendung von  $\delta$ -Mercaptolysin auf Boc- und Fmoc-SPPS sowie auf sequentielle Ligationen, indem wir fünf Analoga von  $\delta$ -Mercaptolysin mit unterschiedlichen orthogonalen Schutzgrup-



**Schema 5.** Aktuelle Methoden zum Aufbau von Isopeptidbindungen.  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ ,  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ . DBU = 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-en, TFA = Trifluoressigsäure, Cbz = Carbobenzyl, HOSu = *N*-Hydroxysuccinimid, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl.

pen entwickelten (Abbildung 5, 1–5).<sup>[152]</sup> Kürzlich beschrieben Chin und Mitarbeiter ein genetisch kodierte  $\delta$ -Mercaptolysin, mit dem die Analoga 6–9 (Abbildung 5) hergestellt wurden, um deren effizienten und ortsspezifischen Einbau in rekombinante Proteine mithilfe eines Pyrrolsyl-tRNA-Synthetase/tRNA<sub>CUA</sub>-Paares zu untersuchen. Die Methode wurde anhand der Synthese von K6-verknüpftem Di-Ub und ubiquitiniertem SUMO demonstriert.<sup>[153]</sup>



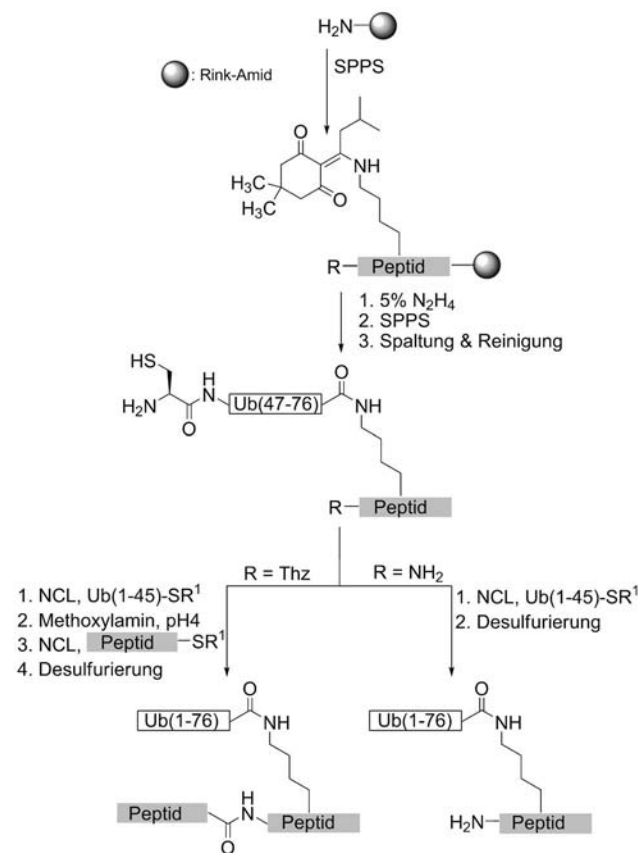
**Abbildung 5.**  $\delta$ -Mercaptolysin-Analoga, die für Boc- und Fmoc-SPPS und sequentielle Ligationen (1–5) sowie für den Einbau in rekombinante Proteine (6–9) hergestellt wurden.

Ovaa und Mitarbeiter beschrieben die Verwendung von  $\delta$ -Mercaptolysin in der Synthese von markierten Ub- und Ubl-Assays (Ubl = ubiquitin-like). Die Fluoreszenzeinheit TAMRA (5-Carboxytetramethylrhodamin) wurde an den N-Terminus des Dipeptids  $\delta$ -Mercaptolysin-Gly konjugiert, das mit Ub oder Ubl ligiert wurde, um Fluoreszenzpolarisationsassays zu erzeugen. Der Assay erwies sich als nützlich für die Analyse mehrerer DUB-Aktivitäten wie UCH-L3, USP7 und USP21 sowie zur Bestimmung ihrer kinetischen Parameter.<sup>[154]</sup>

Die Arbeitsgruppen von Komander und Chin entwickelten eine Methode zum Aufbau der Isopeptidbindung mithilfe genetisch kodierter orthogonaler Schutzgruppen und aktivierter Ligation (GOPAL, genetically encoded orthogonal protection and activated ligation).<sup>[85]</sup> Bei dieser Strategie (Schema 5D) wird genetisch kodierte Lys(Boc) in der gewünschten Position eines spezifischen Substrats eingeführt und der verbleibende Lys-Rest mit *N*-(Benzyloxycarbonyl)succinimid (Cbz-OSu) geschützt. Dann wird die Boc-Gruppe entfernt, was die direkte Kupplung mit dem vollständig Cbz-geschützten Ub-Thioester ermöglicht (erhalten durch Intein-Expression). Der Aufbau der Isopeptidbindung erfolgt durch eine selektive Acylierung des Thioesters in

Gegenwart von HOSu (*N*-Hydroxysuccinimid) und Ag<sup>I</sup>.<sup>[155]</sup> Abschließend werden die Schutzgruppen entfernt, und die Ub-Konjugate werden erhalten. Ein augenscheinlicher Nachteil dieser Methode sind die relativ aufwändigen Schutzgruppenoperationen, die niedrige Produktausbeuten zur Folge haben. Die Anwendung der Methode zur Synthese von K6- und K29-verknüpften Di-Ub-Ketten für strukturelle und funktionelle Analysen wird in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Mit dem Ziel einer verbesserten Synthese ubiquitiniert Peptide entwickelten wir eine auf SPPS und NCL basierende Methode, die ohne Mercaptolysin-Analoga auskommt (Schema 6).<sup>[156]</sup> Unsere Strategie stützte sich auf die Verwendung von orthogonal geschütztem Lys(iv-Dde), das auch von den Arbeitsgruppen von Muir<sup>[146]</sup> und Przybylski<sup>[157]</sup> zur Isopeptidbildung eingesetzt wurde. Nach der Beendigung der Peptidsynthese wurde die  $\epsilon$ -Amino-Schutzgruppe selektiv entfernt, um die Bildung der Isopeptidbindung und eine weitere Peptidverlängerung des Ub(46–76) zu ermöglichen. Das komplementäre Fragment Ub(1–45) wurde durch Fmoc-SPPS mittels *N*-Acylharnstoff-Chemie mit der Thioesterfunktionalität am C-Terminus hergestellt.<sup>[158]</sup> Die beiden Fragmente wurden mittels NCL ligiert, und der folgende Desulfurierungsschritt ergab das gewünschte ubiquitinierte Peptid in hervorragender Ausbeute. Basierend auf dieser Vorgehensweise untersuchten wir den Einfluss der Peptidsubstratlänge auf die Effizienz der Isopeptidbindungsspaltung durch UCH-L3. Vorangegangene biochemische und



**Schema 6.** Anwendung von SPPS und NCL/Desulfurierung zur Synthese von ubiquitinierten Peptiden. R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

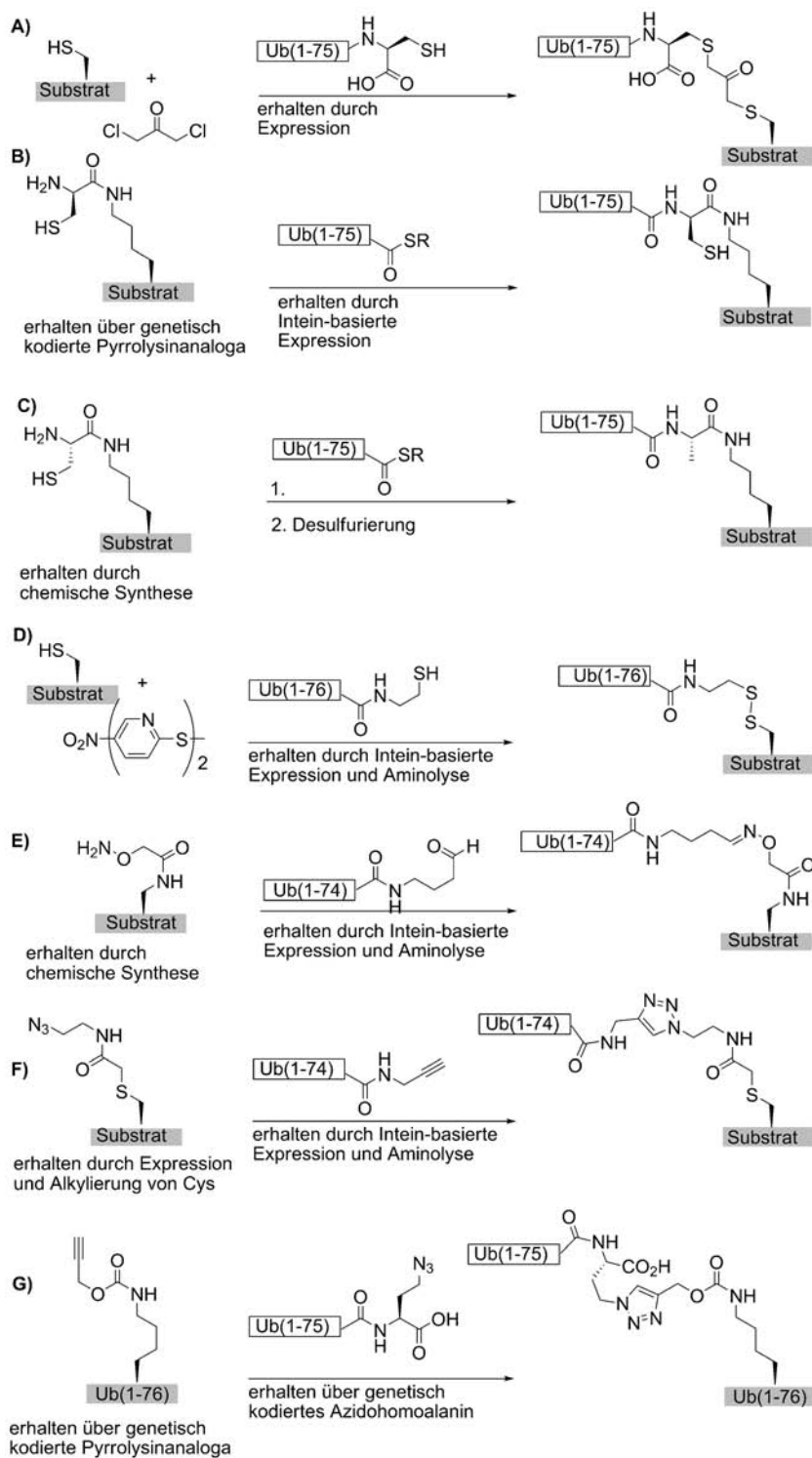
strukturelle Untersuchungen offenbarten, dass in diesem Enzym eine fehlgeordnete Crossover-Schleife bestehend aus 20 Aminosäuren am aktiven Zentrum vorliegt, die eine Substratfilterung bewirkt und den Zugang größerer Substrate einschränkt.<sup>[120,159–162]</sup> Um diese Studien weiter zu bestätigen, erzeugten wir vier ubiquitinierte Peptide unterschiedlicher Länge (8-, 15-, 21- und 31-mer), die vom C-Terminus des H2B abgeleitet waren. Die Untersuchung dieser Substrate mit UCH-L3 ergab, dass Peptide mit bis zu ca. 20 Aminosäuren die bevorzugten Substrate dieses Enzym sind, was mit den früheren strukturellen und biochemischen Daten übereinstimmt.<sup>[120–123,159–162]</sup>

### 5.3. Surrogate für die Isopeptidbindung

Parallel zu den Studien zur Synthese von Ub-Konjugaten mit natürlich vorkommenden Isopeptidbindungen beschrieben mehrere Arbeitsgruppen auch die Entwicklung chemischer und semisynthetischer Methoden zur Erzeugung von Isopeptidmimetika (Schema 7). Die Hauptziele dieser Forschungen sind eine Vereinfachung der anspruchsvollen Synthese von Ub-Konjugaten und die Herstellung stabiler Analoga für verschiedene Studien, z. B. als aktivitätsbasierte Sonden für die Proteomik, DUB-Inhibitoren und für kristallographische Untersuchungen zur Aufklärung mechanistischer Aspekte von DUBs. Allerdings eignen sich diese Analoga nicht zur Erforschung bestimmter biochemischer Aspekte von DUBs, z. B. kinetische Charakterisierungen und Spezifitätsprofile.

Wilkinson und Mitarbeiter waren die Ersten, die K63-, K48-, K29-, K11- und Kopf-Schwanz-verknüpfte Di-Ubs mit einer nichtnatürlichen Isopeptidbindung entwarfen und herstellten (Schema 7A).<sup>[163]</sup> In ihrer Strategie wurde ein Cys in den gewünschten Positionen des proximalen Ub eingeführt und Gly76 des distalen Ub durch Cys ersetzt. Zur Erzeugung des Isopeptidanalogs wurden die zwei Ub-Monomere in Gegenwart von 1,3-Dichloracetone zur Reaktion gebracht. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass diese nichthydrolysierbaren Analoga selektiv die Aktivität einiger DUBs inhibierten, z. B. von UCH-L3 und IsoT (Isopeptidase T) in der Spaltung von Ub-AMC. Die Studie belegte, dass die Verknüpfungsart der Di-Ubs eine wichtige Rolle bei der Erkennung der untersuchten DUBs spielt. Außerdem fand man heraus,

dass diese Di-Ub-Analoga in der Lage sind, die enzymatische Ubiquitinierungsmaschinerie (d. h. E1/E2/E3) zu inhibieren. Eine Erweiterung der Methode führte zu einer K29-verknüpften Tetra-Ub-Kette an Sepharose-Harz.<sup>[164]</sup> Nach Inkubation dieser immobilisierten Kette mit einem Hefe-Lysat wurden mittels Affinitätschromatographie zwei Proteine identifiziert, die sehr stark mit K29-verknüpftem PolyUb



**Schema 7.** Strategien für den Aufbau von Mimetika der Isopeptidbindung.

wechselwirken. Hierbei handelt es sich um Ubp14, dem Hefe-DUB, das ähnliche enzymatische Eigenschaften aufweist wie das in Säugetieren vorhandene IsoT, sowie um Ufd3, einen mit dem Ub-Proteasomsystem assoziierten Cofaktor.

In einer neueren Studie beschrieben Chan und Mitarbeiter Pyrrolysin-Analoga für die ortsspezifische Protein-Ubiquitinierung.<sup>[165]</sup> Hierbei wurde das Pyrrolysin-Analogon (*S,S*)-D-Cys- $\epsilon$ -Lys unter Verwendung des UAG-Codons in Gegenwart von Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase/tRNA<sup>pyl</sup> gentechnisch in das Calmodulin-Protein (CaM) eingebaut. Von CaM weiß man, dass es eine entscheidende Rolle im Calcium-Signalsystem in Eukaryoten spielt. Die Einführung dieses chemischen „Henkels“ ermöglichte eine ortsspezifische Ligation zwischen dem modifizierten Protein und dem Ub(1-75)-Thioester, wodurch ubiquitiniertes CaM mit der Mutation G76-D-Cys erhalten wurde (Schema 7B). Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Ubiquitinierung von CaM an K21 dessen regulatorische Prozesse moduliert, indem z.B. die CaM-Bindung an Kinase geschwächt wird. Das synthetische Analogon von ubiquitiniertem CaM wies eine um 85 % geringere Fähigkeit zur Modulation der Kinaseaktivität als Wt-CaM auf, was vergleichbar mit dem enzymatisch hergestellten ubiquitinierten CaM war. In einer weiteren Studie untersuchte man den Effekt des modifizierten ubiquitinierten Analogons auf die Aktivität der Proteinphosphatase 2B, die durch CaM reguliert wird. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass die Ubiquitinierung keinen Effekt auf die Fähigkeit des CaM zur Modulation der Aktivität der Phosphatase 2B hat.

Analog zur Verwendung von D-Cys in der Ligationsstelle konjugierten Muir und Mitarbeiter auf chemische Weise L-Cys an ein Peptid-Lys, um anschließend eine NCL mit dem Ub(1-75)-Thioester zu bewirken. Nach dem NCL-Schritt wurde Cys zu Ala desulfuriert und das ubiquitinierte Biokonjugat mit der Mutation G76A im Ub erhalten (Schema 7C). Die Anwendung dieser Methode in der Synthese ubiquitinierten Analoga des H2B-Proteins<sup>[166]</sup> wird in Abschnitt 5.5 diskutiert.

Die Arbeitsgruppen von Muir und Zhuang beschrieben unabhängig voneinander die Verwendung einer Disulfidbindung als Ersatz für die Isopeptidbindung, wobei sie sich den natürlichen Cys-Rest in einem Protein zunutze machten (Schema 7D).<sup>[167,168]</sup> Mit dieser genetischen Methode ist es prinzipiell möglich, jedes Protein an einer spezifischen Bindungsstelle zu ubiquitinieren. Die leichte chemische Reduktion der Disulfidbindung in biologischen Systemen und die nötige Verwendung von Reduktionsmitteln bei vielen biochemischen Experimenten könnten die Anwendbarkeit der Methode jedoch einschränken. Darüber hinaus ist die Methode auf Proteine mit einem einzigen Cys beschränkt. Die Methode konnte gut eingesetzt werden, um die Rolle der Ubiquitinierung in zwei unterschiedlichen Proteinen zu untersuchen; diese Beispiele werden in Abschnitt 5.5 näher diskutiert.

In weiteren Studien zur Einführung neuer Surrogate von Isopeptidbindungen entwickelten Ovaa und Mitarbeiter eine Methode zur Herstellung ubiquitinierten Peptide, deren natürliche Isopeptidbindung durch eine Oximverknüpfung ersetzt ist (Schema 7E).<sup>[169]</sup> Die Methode umfasst die Synthese

zweier kurzer, von K48- und K63-verknüpften Di-Ub-Ketten abstammender Peptide, die die Umgebung der Isopeptidbindung des proximalen Ub nachahmen. Der Lys-Rest in beiden Peptiden wurde durch Aminoxycetyl-L-diaminopropionsäure ersetzt, um das nichtnatürliche Isopeptid ortsspezifisch einzuführen. Ub(1-74) mit einer Aminobutanal-Funktion reagierte mit dem Aminoxypeptid unter Bildung der Oximbindung. Mithilfe dieser Biokonjugate konnten Oberflächenplasmonenresonanzstudien durchgeführt werden, um den Einfluss der Peptidsequenz in der Umgebung der Isopeptidbindung auf die Spezifität bekannter DUBs wie USP7, USP4 und USP21 zu untersuchen. Die Bindungsstudien ergaben, dass die getesteten DUBs zwischen den verschiedenen stabilen Ub-Biokonjugaten differenzieren können, und dass die Peptidsequenz, die die Isopeptidbindung flankiert, eine wichtige Rolle für die Selektivität spielt.

Mootz und Mitarbeiter setzten Cu<sup>I</sup>-katalysierte Klickreaktionen zur Herstellung SUMOlierter und ubiquitinierten Substrate mit einer Triazolverknüpfung ein (Schema 7F).<sup>[170]</sup> Die Methode umfasst die Intein-basierte Expression von SUMO1, SUMO2, Hefe Smt3 und Ub, in dem die beiden Gly-Reste am C-Terminus ausgespart wurden, mit anschließender Substitution der Thioesterfunktionalität durch Propargylamin. Die Seitenkette des Cys im Substrat wurde mit Iodacetamidethylazid zur Einführung der Azidfunktion alkyliert, um die Bildung des Triazols aus den beiden Vorstufenmolekülen zu ermöglichen. Die Methode wurde auch zur Synthese des SUMO-haltigen SUMO-spezifischen E2-Enzyms (Ubc9) unter Verwendung von *p*-Azidophenylalanin verwendet, um den Einfluss von SUMO2 auf die enzymatische Aktivität von Ubc9 zu untersuchen.<sup>[171]</sup> Die Studie zeigte, dass SUMOyliertes Ubc9 mit SUMO2 eine veränderte Substratpräferenz für Sp100- und RanGAP-Proteine hat, wie dies zuvor auch für SUMO1 aufgedeckt wurde.<sup>[172]</sup> Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SUMOylierung von Ubc9 ein allgemeiner Mechanismus dieses Enzyms sein könnte, mit dem es die Differenzierung seiner Zielmoleküle reguliert.

Rubini und Mitarbeiter nutzten ebenfalls eine Klickreaktion zur Herstellung von Lys-verknüpften Di-Ub-Ketten.<sup>[173]</sup> Hierbei wurde der Lys-Rest des proximalen Ub durch ein Propargyl-geschütztes Lys ersetzt, während das C-terminale Gly des distalen Ub durch Azidohomoalanin ersetzt wurde (Schema 7G). Es wurde gefunden, dass die Ketten mit der Triazolverknüpfung durch die Ubiquitinierungsmaschinerie erkannt werden. Mootz und Mitarbeiter nutzten ebenfalls Klickchemie zur Herstellung von Lys-verknüpften Di-Ub-Analoga. Sie erhielten Triazol-modifizierte Ketten in Mengen zwischen 100  $\mu$ g bis einigen mg, was die Untersuchung ihrer Bindungsaffinität für die UBA-Domäne des Mud1-Proteins ermöglichte.<sup>[174]</sup> Das K48-Analogon ging die stärkste Bindung ein, die K27- und K11-Triazolanaloga banden schwächer, und die übrigen Ketten zeigten keinerlei Bindung an diese Domäne.

Da die Spezifität einer Ub-Kette in hohem Maße durch ihre charakteristische Konformation bestimmt wird, ist es für vergleichende Messungen entscheidend, dass eine Modifikation der Verknüpfungsart die Konformation nicht stört. Bisher ist allerdings unklar, welchen Einfluss der Austausch einer Isopeptidbindung auf die Dynamik und die Konfor-

mation einer spezifischen Kette hat. Prinzipiell ist nicht auszuschließen, dass strukturelle Eigenschaften verändert werden, was dann zu fehlerhaften Analysen führen kann. Da die hier beschriebenen Synthesestrategien auf Expressionsmethoden basieren, sollte es möglich sein, markierte Ub-Bausteine (z. B.  $^{15}\text{N}$ ) für NMR-Studien zu erzeugen, an denen der Effekt von Isopeptidmimetika mit Blick auf die oben genannten Aspekte untersucht werden könnte.

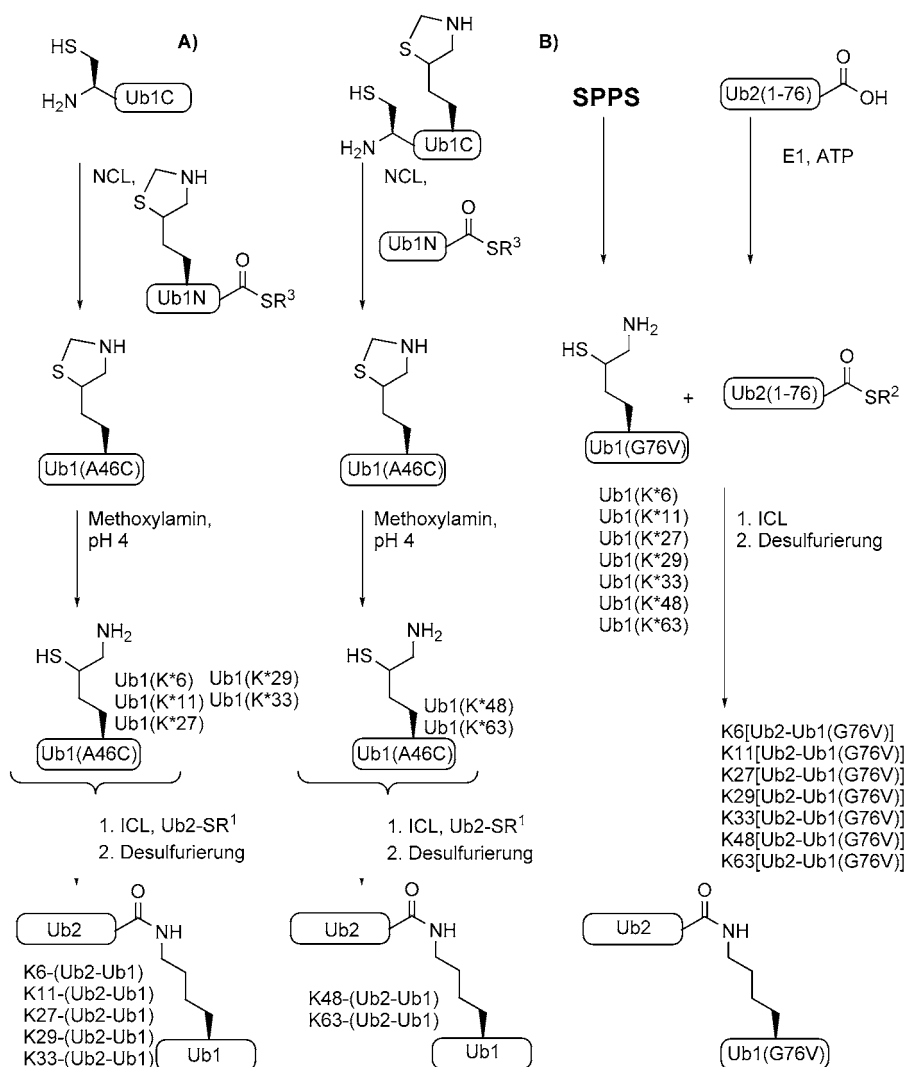
#### 5.4. Synthese von Ub-Ketten mit natürlichen Isopeptidbindungen

Ein wichtiger Fortschritt in der chemischen Biologie des Ub war die Entwicklung von Strategien zur Herstellung von hochgradig homogenen Ub-Ketten, ohne dabei die für jede Kette spezifische enzymatische Maschinerie heranziehen zu müssen. In dieser Hinsicht gelang unserer Arbeitsgruppe erstmals die Herstellung von Lys-verknüpften Di-Ub-Ketten mithilfe eines vollständig synthetischen Ansatzes.<sup>[175]</sup> Unsere Methode beruhte auf der Synthese des proximalen Ub aus zwei Fragmenten Ub1C (Ub46-76) und Ub1N (Ub1-45), das das  $\delta$ -Mercaptolysin in gewünschter Position enthielt (Schema 8A). Das proximale Ub wurde anschließend durch  $\delta$ -Mercaptolysin-vermittelte ICL mit dem distalen Ub-Thioester verknüpft. Ein Desulfurierungsschritt überführte den Cys46-Rest in jeder Di-Ub-Kette in das natürliche Ala46 und entfernte gleichzeitig den Thiol-Henkel der Isopeptidbindung, wodurch die natürliche Di-Ub-Struktur entstand. Die Ketten wurden in mg-Mengen und mit hoher Reinheit erhalten. Ihre korrekte Faltung wurde CD-spektroskopisch bestätigt, und ihre Aktivitäten gegenüber den beiden DUBs UCH-L3 und IsoT wurden untersucht. IsoT vermittelt den Abbau von nichtverankerten PolyUb-Ketten *in vivo*.<sup>[176,177]</sup> Unsere Ergebnisse zeigten, dass IsoT die meisten dieser Ketten spalten kann, was die große Substratbandbreite dieses Enzyms bestätigt, wohingegen UCH-L3 keinerlei Aktivität gegen eine dieser Ketten aufwies.<sup>[175]</sup>

Wir nutzten einen Semisyntheseansatz zur Isotopenmarkierung einzelner Segmente von Ub-Ketten, um deren monomerspezifisches molekulares Verhalten aufzuklären.<sup>[178]</sup> Die schwachen Wechselwirkungen zwischen den Monomeren der Ub-Ketten erschweren die strukturelle Charakterisierung durch Röntgenstrukturanalyse, dennoch gab es be-

reits mehrere erfolgreiche Studien.<sup>[42,85,92,95,97,106]</sup> Die Schwierigkeiten sind darauf zurückzuführen, dass die Ub-Ketten entweder nicht kristallisieren oder dass die resultierenden Kristallstrukturen oftmals nicht die physiologisch relevanten Konformationen in Lösung widerspiegeln.<sup>[23,92,93,95]</sup> Dies macht die NMR-Spektroskopie zu einem sehr wichtigen Werkzeug zur Untersuchung der Konformation und Dynamik dieser Ketten. Leider ist es aufgrund der homopolymeren Beschaffenheit der PolyUbs nahezu unmöglich, die NMR-Signale der individuellen Ub-Einheiten der Kette aufzulösen, sofern die Ubs nicht durch Isotopenmarkierung differenziert werden.

Um diese Herausforderungen anzugehen, stellten wir K48- und K33-verknüpfte Di-Ub-Ketten mit einheitlich  $^{15}\text{N}$ -angereichertem distalem Ub her. Wir verwendeten moderne NMR-Methoden basierend auf Isotopen-Editing/Filterung, um die distalen und proximalen Ubs in ein und derselben Kette zu untersuchen.<sup>[175]</sup> Diese Studie ermöglichte erstmals die Charakterisierung der Struktur, der lokalen intramono-



**Schema 8.** Synthese vollständig Lys-verknüpfter Di-Ub-Ketten: A) vollsynthetischer Ansatz; B) enzymatischer Ansatz in Kombination mit chemischen Methoden. K\* =  $\delta$ -Mercaptolysin, R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me.

meren Dynamik, der konformativen Eigenschaften und der Ligandenbindungseigenschaften von K33-verknüpftem Di-Ub. Die NMR-Daten offenbarten relativ schwache Kontakte zwischen den Domänen in K33-verknüpftem Di-Ub, die über die hydrophobe Region des distalen Ub vermittelt werden. Außerdem zeigten unsere Daten, dass UBA2 von hHR23A die K33-verknüpfte Kette zehnfach schwächer bindet als die K48-verknüpfte Di-Ub-Kette, was darauf hindeutet, dass diese Kette nicht als Signal für den proteasomalen Abbau dient. Eine Beschränkung unserer Methode besteht darin, dass das proximale Ub chemisch synthetisiert wird und es sehr schwierig ist, es auf die gleiche Art zu markieren wie das exprimierte distale Ub. Ein neuer Ansatz unter Verwendung von genetisch kodiertem  $\delta$ -Mercaptolysin könnte hier Abhilfe schaffen und es ermöglichen, gewünschte Markierungen in sowohl das distale als auch das proximale Ub einzuführen.<sup>[153]</sup>

Kurz nach Erscheinen unserer Veröffentlichung zur Synthese der Lys-verknüpften Di-Ubs beschrieben Ova und Mitarbeiter eine Semisynthese dieser Zielmoleküle (Schema 8B).<sup>[133]</sup> Die Autoren erzeugten das proximale Ub durch direkte Synthese an fester Phase (siehe Abschnitt 5.1) unter Verwendung von  $\delta$ -Mercaptolysin<sup>[150]</sup> zur Vermittlung des ICL-Schrittes. Ein sehr interessanter Aspekt dieser Synthese ist der Einsatz des E1-Enzyms zur Herstellung des distalen Ub in Form des Thioesters. Gly76 wurde im proximalen Ub zu Val mutiert, um eine Aktivierung des C-Terminus als Thioester durch das E1-Enzym zu vermeiden.

Das Konzept der Verwendung des E1-Enzyms zur Herstellung des Ub-Thioesters wurde durch Fushman und Mitarbeiter auf die Synthese von Di- und Tri-Ub-Thioestern ausgeweitet. Die Autoren modifizierten außerdem die GOPAL-Strategie,<sup>[85]</sup> indem sie anstelle von Cbz die unter milden Bedingungen abspaltbare Alloc-Schutzgruppe einsetzen. Auf diese Weise erzeugten sie K11-verknüpfte Di-, Tri- und Tetra-Ubs, K33-verknüpftes Di-Ub und gemischte Verknüpfungen von K11 und K33 in der Tri-Ub-Kette. Durch Markierung einzelner Segmente gelang es außerdem, das mittlere Ub im homogenen und gemischt-verknüpften K11-Tri-Ub NMR-spektroskopisch zu charakterisieren.<sup>[179]</sup>

Die Arbeitsgruppen von Liu und Liu beschrieben ebenfalls eine Synthese der K48-verknüpften Di-Ub-Kette. Das proximale Ub wurde durch sequentielle Ligation aus drei Fragmenten aufgebaut, wobei K48 durch  $\gamma$ -Mercaptolysin ersetzt wurde, um die Ligation des Rückgrats und des Isopeptids zu ermöglichen.<sup>[180]</sup>

Die Arbeitsgruppen von Chin und Komander nutzten die in Abschnitt 5.2 beschriebene GOPAL-Strategie<sup>[85]</sup> zur Herstellung von K6- und K29-verknüpften Di-Ub-Ketten. Dies ermöglichte erstmals die Aufklärung der Kristallstruktur der K6-verknüpften Di-Ub-Kette, die eine kompakte, asymmetrische Konformation erkennen ließ, in der die bekannte hydrophobe Region des proximalen Ub mit einer bis dahin unbekannten hydrophoben Region bestehend aus L71, I36 und L8 des distalen Ub wechselwirkt. Die Autoren testeten außerdem elf DUBs aus verschiedenen Familien auf ihre proteolytischen Aktivitäten und Spezifitäten gegenüber diesen Ub-Ketten. Interessanterweise zeigte das TRABID-Enzym, das als spezifisch für K63-verknüpfte Ketten ange-

nommen wurde, eine 40-fach höhere Spaltungseffizienz gegenüber K29-verknüpftem Di-Ub.

Mit der Verfügbarkeit aller Arten von Di-Ub-Ketten besteht die Möglichkeit, diese in vergleichenden Studien zu untersuchen. Solche Experimente können Aufschluss über die Beziehung zwischen einer Kettenstruktur und ihrer Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber verschiedenen UBDs und DUBs geben. Zum Beispiel testeten Sixma und Mitarbeiter alle verfügbaren Di-Ub-Ketten gegen zwölf USP-Isopeptidasen und fanden, dass die Enzyme alle Verknüpfungen hydrolysierten, ohne dabei eine besondere Spezifität für eine bestimmte Kette zu zeigen.<sup>[181]</sup> In einer ähnlichen Studie führten Komander und Mitarbeiter ein umfassendes Screening aller Di-Ub-Ketten gegen die humane Ovarialkarzinom-Domäne von TRABID durch und fanden, dass dieses Enzym spezifisch sowohl die K29- als auch die K33-verknüpfte Kette hydrolysiert. Interessanterweise brachte diese Studie eine neue UBD-Domäne bestehend aus Ankyrin-Wiederholungseinheiten zum Vorschein, die sich als entscheidend für die katalytische Aktivität und Spezifität von TRABID erwies.<sup>[182]</sup>

Die oben beschriebenen Studien mit Di-Ub-Ketten lieferten nützliche Informationen über verschiedene Aspekte der Ub-Biologie und werden auch in Zukunft wichtig für das Gebiet sein. Darüber hinaus gilt aber weiterhin ein Hauptaugenmerk der Synthese von Ketten, die unterschiedliche Verknüpfungsarten (Abbildung 2) und eine zunehmende Anzahl an Ub-Monomeren über Di-Ub hinaus enthalten. Mehrere In-vitro-Studien deckten z. B. auf, dass zwar die meisten UBDs an das Ub-Monomer binden, dass aber eine steigende Zahl an Ub-Einheiten in einer spezifischen Kette zu einer stärkeren Bindung führen kann und möglicherweise auch die zelluläre Spezifität der Wechselwirkung mit anderen Proteinen, wie z. B. DUBs, verstärkt wird.<sup>[71–73, 81, 82]</sup> Auch kann es sein, dass die von einer Di-Ub-Kette übernommene Strukturinformation die native Struktur der längeren Kette, z. B. Tetra-Ub, nicht vollständig repräsentiert.<sup>[92]</sup> Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Kettenlänge und ihren Einfluss auf das Schicksal ubiquitinierten Proteine kann im Falle der K48-verknüpften Kette beobachtet werden. Es war allgemein akzeptiert, dass das minimale Signal für einen proteasomalen Abbau eine Kette aus vier Ub-Molekülen ist.<sup>[183]</sup> Dennoch wurde gefunden, dass einige verhältnismäßig kleine Proteine effizient in ihrer monoubiquitinierten Form abgebaut werden.<sup>[5, 47–49, 184]</sup> Für andere Ketten ist die zur Weiterleitung eines bestimmten Signals bevorzugte Länge noch unklar. Infolgedessen ist die Herstellung von Ketten unterschiedlicher Längen in freier oder verankerter Form entscheidend, um einige der offenen Fragestellungen in diesem Gebiet lösen zu können.

Mit Blick auf diese Aspekte berichteten wir kürzlich über die erste chemische Totalsynthese einer verankerten K48-verknüpften Tetra-Ub-Kette. Die Kette besteht aus 304 Aminosäuren und ist damit das bisher längste chemisch synthetisierte Protein.<sup>[185]</sup> Zum Aufbau der Kette setzten wir lineare und konvergente Strategien ein, wobei der Schlüsselschritt der Aufbau von Di-Ub mit einer C-terminalen Thioesterfunktionalität war (Schema 9). Bei der Entwicklung und Umsetzung dieser Synthesestrategie waren allerdings meh-

rere Hindernisse zu beseitigen. Da z.B. mehrere Ligationsschritte zum Aufbau der verschiedenen Ub-Bausteine und der finalen Konjugation des Tetra-Ub nötig waren, blieb die Ausbeute zunächst relativ gering. Auch erschwerte die Gegenwart von sieben Thiolgruppen in der letzten Stufe die vollständige Desulfurierung, sodass wir gezwungen waren, die Cys46-Reste in jedem Baustein einzeln zu desulfurieren, bevor wir die finale Konjugation des Tetra-Ub mit der korrekten Faltung und der gewünschten Aktivität gegenüber IsoT vornehmen konnten.

Wir konnten diese Hindernisse kürzlich überwinden, indem wir die Bausteine direkt an einer Festphase herstellten, wodurch sich die Zahl an Ligationsschritten und Thiolgruppen verringern ließ.<sup>[134]</sup> Auf diese Weise gelang es uns, einen Satz ubiquitinerter Peptide unterschiedlicher Kettenlängen (Mono-, Di-, Tri- und Tetra-) und Verknüpfungsarten (K63, K38) in einem effizienten, konvergenten Prozess herzustellen (Abbildung 6). Wir verwendeten diese Sätze ubiquitinerter Peptide, um erstmals die

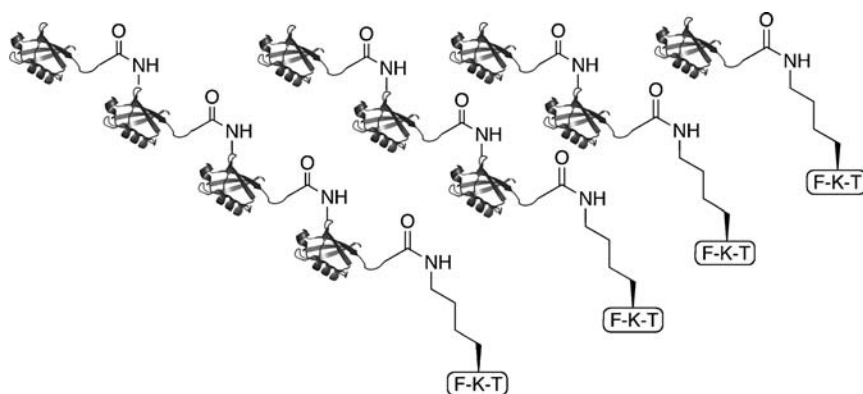


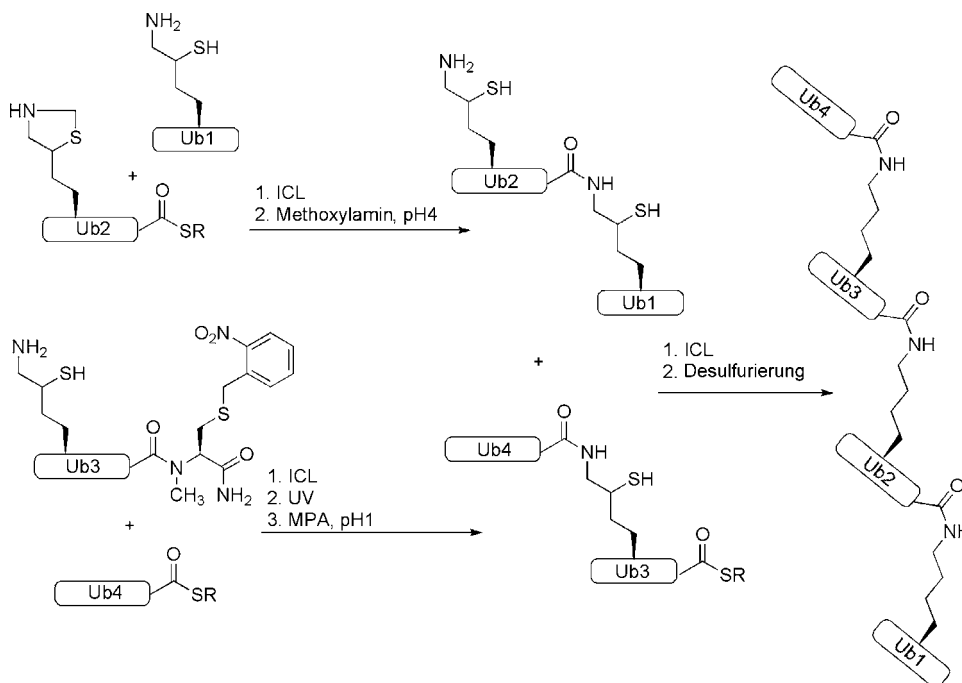
Abbildung 6. Das Tripeptid FKT, verknüpft mit Mono-, K48- oder K63-Di-, Tri- und Tetra-Ub.

### 5.5. Synthese und Semisynthese monoubiquitinerter Proteine

Die oben beschriebenen Methoden zum Aufbau der nativen Isopeptidbindung und ihren Mimetika konnten auch zur Synthese monoubiquitinerter Proteine genutzt werden. Dies ermöglichte eine Vielzahl von Studien zur Analyse des Einflusses der Monoubiquitinierung auf die Proteinstruktur und -funktion. Die Produkte wurden mit hoher Homogenität und

in relativ großen Mengen erhalten. Interessanterweise zeigten neue Proteomikstudien, dass die Monoubiquitinierung eine Hauptform der Mannigfaltigkeit von Ub-Bio-konjugaten ist.<sup>[25]</sup>

Die Synthese von monoubiquitiniertem H2B stellt das erste Beispiel für die Anwendung chemischer Methoden in Kombination mit einer Semisynthese zur Herstellung eines monoubiquitinierten Proteins dar. Das H2B-Protein ist eines der vier Histon-Proteine (H2A, H2B, H3 und H4), die das Nukleosom bilden, das von 147 Basenpaaren der DNA im eukaryotischen Chromatin umhüllt ist.<sup>[186]</sup> Histone unterliegen verschiedenen post-translationalen Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinierungen, und zwar überwiegend an ihren N- und C-terminalen Enden. Diese Modifikationen spielen wesentliche Rollen bei der Regulierung der Chromatindynamik, der Genexpression und der DNA-Reparatur.<sup>[187,188]</sup> Das Histon H2B liegt in Säuetieren an K120 monoubiquitiniert vor, und kürzlich wurde beschrieben, dass es auch an K34 eine Monoubiquitinierung eingeht.<sup>[189]</sup> Trotz intensiver Studien zur Rolle der K120-Ubiquitinierung bleiben jedoch mehrere Fragen offen. Zum Beispiel weiß man noch nicht, wie ubi-



Schema 9. Konvergenter Ansatz zur Herstellung von Tetra-Ub. Die Ub-Bausteine 1–4 wurden chemisch synthetisiert. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.

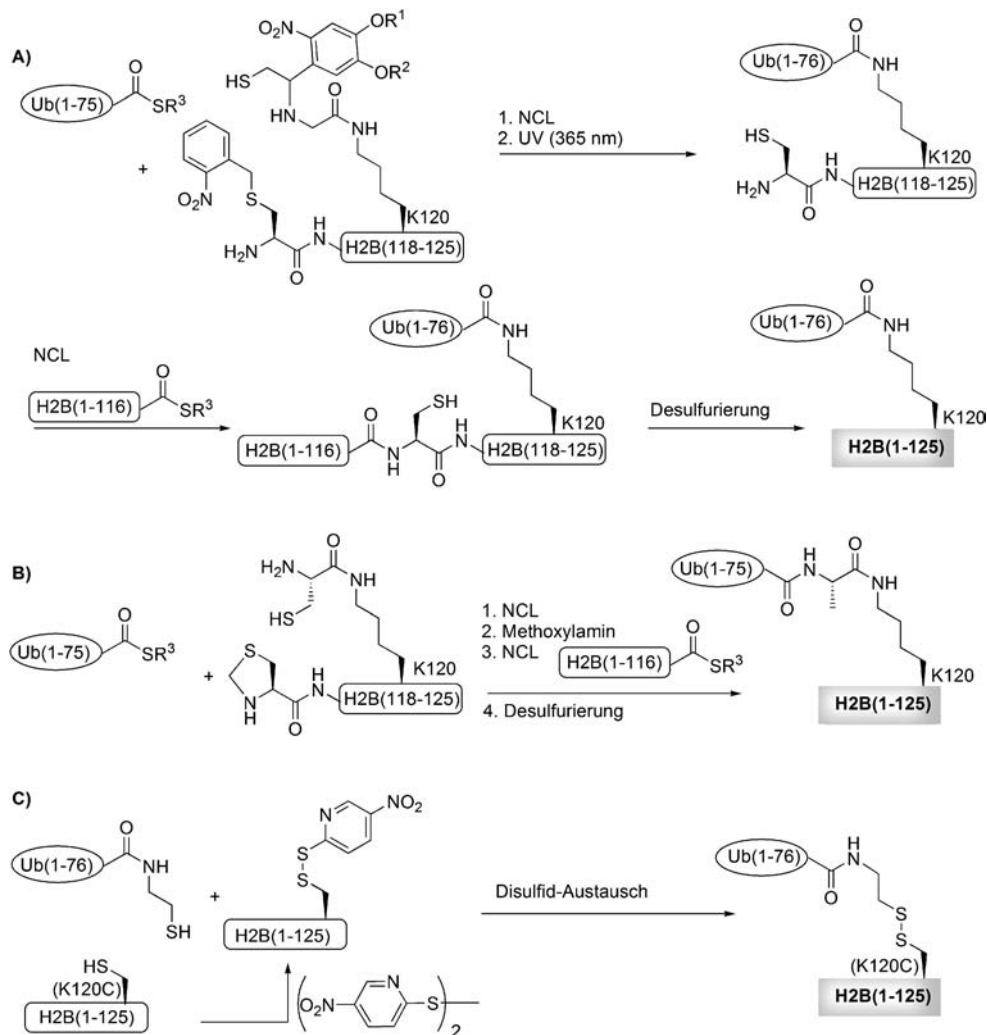
Aktivität zweier DUBs, UCH-L3 und IsoT, zu bestimmen. Unsere Studie zeigte deutlich auf, dass mit steigender Kettenlänge die Hydrolyseeffizienz sank, obgleich UCH-L3 das Tripeptid vom proximalen Ub beider Kettenarten (K48 und K63) abspalten kann. Das Absinken der Spaltungseffizienz war bei den K63-verknüpften Ketten stärker ausgeprägt als bei der K48-verknüpften Kette.

Die oben beschriebenen Methoden zum Aufbau der nativen Isopeptidbindung und ihren Mimetika konnten auch zur Synthese monoubiquitinerter Proteine genutzt werden. Dies ermöglichte eine Vielzahl von Studien zur Analyse des Einflusses der Monoubiquitinierung auf die Proteinstruktur und -funktion. Die Produkte wurden mit hoher Homogenität und

quitiertes H2B in Chromatin erkannt und von den bekannten DUBs verarbeitet wird, ob es Kreuzbeziehungen zwischen den verschiedenen PTMs gibt und wie sich diese zahlreichen Modifikationen auf die Regulierung der Genexpression auswirken. Ein wichtiges Hindernis bei entsprechenden Studien war das Fehlen geeigneter Reagentien auf der Basis von homogen ubiquitiniertem H2B.

Eine spezielle Frage betrifft die Kreuzbeziehung zwischen der Ubiquitinierung und der Methylierung von K79 von H3. Diese Modifikation, die eine der wichtigsten PTMs darstellt, beeinflusst die Chromatinstruktur und reguliert die Genexpression. Frühere Daten zeigten eine Korrelation zwischen der Ubiquitinierung und einer verstärkten Methylierung von K79, die durch die K79-spezifische Methyltransferase Dot1L (disrupter of telomeric silencing 1-like) katalysiert wird.<sup>[190–193]</sup> Der Mechanismus einer solchen Kreuzbeziehung blieb allerdings unbekannt. Es wurde vorgeschlagen, dass die Ubiquitinierung von H2B direkt eine K79-Methylierung induzieren könnte, entweder durch eine Änderung der nukleosomalen Zugänglichkeit oder durch die Verstärkung der enzymatischen Funktion.<sup>[194,195]</sup>

Um Aufschluss über diesen Prozess zu erhalten, entwickelten Muir und Mitarbeiter eine Semisynthese zur erstmaligen Herstellung von monoubiquitiniertem H2B (Schema 10 A).<sup>[196,197]</sup> In ihrer Synthese wurde das H2B in zwei Fragmente aufgeteilt: H2B(1-116) und H2B(117-125) von denen das letztere mit einem photolytisch aktiven Auxiliar ausgestattet (Abschnitt 5.2) und zusätzlich am N-Terminus mit orthogonal geschütztem Cys (ursprünglich Ala117) versehen wurde. Der Aufbau des ubiquitinierten H2B begann mit einer Auxiliar-vermittelten Ligation des H2B(117-125)-Peptids mit dem Ub(1-75)-Thioester, wobei unter Lichteinwirkung simultan das Auxiliar und die 2-Nitrobenzylgruppe abgespalten wurden und so ubiquitiniertes H2B(117-125) in moderater Ausbeute resultierte. Im Anschluss daran wurde dieses Fragment mit exprimiertem H2B(1-116)-Thioester ligiert, um das ubiquitinierte H2B(A117C) in voller Länge zu erhalten. Durch einen abschließenden Desulfurierungsschritt



**Schema 10.** Strategien zur Herstellung von Ub-H2B über native und nichtnative Isopeptidbindungen.  $R^1 = (\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ .

wurde Cys117 in Ala117 überführt, und es entstand das native ubiquitinierte H2B in hervorragender Reinheit.

Die semisynthetische Variante des ubiquitinierten H2B wurde erfolgreich in das Histon-Oktamer mit rekombinantem Wt-H2A, H3 und H4 eingebaut. Auch andere modifizierte Histon-Oktamere mit rekombinantem mutiertem H3-(K79R) mit und ohne ubiquitiniertem H2B wurden hergestellt. Dinukleosomen mit asymmetrischer Insertion von ubiquitiniertem H2B und H3(K79R) wurden ebenfalls gebildet. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass ubiquitiniertes H2B direkt die Methylierung von H3K79 durch Dot1L aktiviert. Darüber hinaus waren die asymmetrischen Dinukleosomen ein Nachweis dafür, dass eine effiziente Methylierung von H3K79 die Gegenwart von ubiquitiniertem H2B in demselben Nukleosom erfordert, was eine direkte biochemische Kreuzbeziehung zwischen der Methylierung und der Ubiquitinierung an separaten Histon-Proteinen innerhalb eines Nukleosoms belegt.

In Anbetracht der moderaten Ausbeute und des relativ langsamen Auxiliar-vermittelten Ligationsschrittes begannen Muir und Mitarbeiter mit der Suche nach alternativen Stra-

tegien für die Synthese von monoubiquitiniertem H2B (Schema 10B,C). Zwei Strategien wurden entwickelt, die zwar eine effiziente Synthese ermöglichten, andererseits aber die native Struktur des ubiquitinierten H2B beeinträchtigten. Bei der ersten Methode wurde mit Ub-G76C verzweigtes H2B(117-125) für die NCL mit dem Ub(1-75)-Thioester verwendet. Die nach der NCL noch ausstehenden Schritte ähnelten der vorangegangenen Strategie, wobei der abschließende Desulfurierungsschritt das ubiquitinierte H2B-Konstrukt mit einer G76A-Mutation ergab (Schema 10B).<sup>[166]</sup> Trotzdem stimulierte dieses Analogon die Dot1L-Aktivität auf ähnlichem Niveau wie der Wildtyp. Den Autoren gelang es, eine kinetische Charakterisierung der Dot1L-Aktivität anhand der ubiquitinierten H2B-haltigen Nukleosome durchzuführen, während man in früheren Untersuchungen auf Peptid- und Proteinsubstrate zurückgegriffen hatte. Hierbei wurde eine Beschleunigung der katalytischen Wirkung von Dot1L auf nukleosomale Substrate festgestellt. Um die Bedeutung der strukturellen Eigenschaften von Ub für die Aktivität von Dot1L zu beurteilen, wurde Ub durch Smt3 (Ubl) ersetzt. Dieser Wechsel führte zu einem Ausbleiben der Dot1L-Stimulierung, was wahrscheinlich in der spezifischen Erkennung der Ub-Oberfläche begründet ist. Interessanterweise hatte eine Mutation von zwei der drei Aminosäuren der hydrophoben Region in Ub (L8A/I44A) (zusätzlich zu G76A) keinen Einfluss auf den Methylierungsschritt, was darauf hindeutet, dass die hydrophobe Region nicht an der Erkennung von Dot1L beteiligt ist.

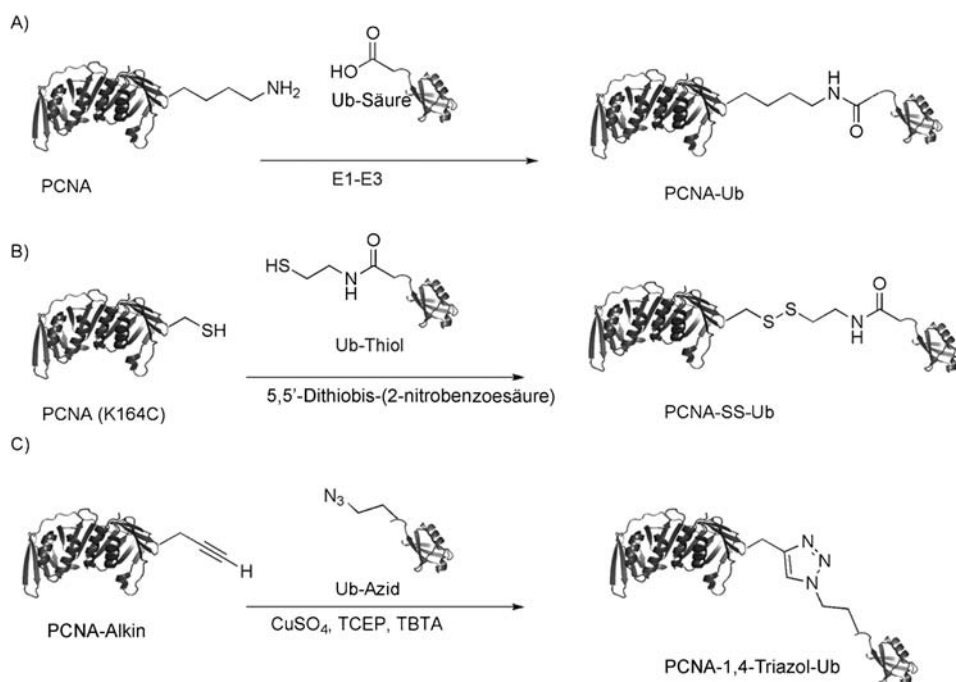
Trotz der Tatsache, dass dieses Ub-H2B-Analogon die Isopeptidbindung enthält, könnte der Austausch von G76A die Aktivitäten von DUBs beeinflussen, die bekannte Spezifitäten für Ub-H2B aufweisen, z.B. das deubiquitinierende SAGA-Modul.<sup>[89-91]</sup> Dies verbleibt zu prüfen, um die Anwendung dieses Ub-H2B-Analogons auf Studien von DUBs erweitern zu können.

Die zweite von Muir und Mitarbeitern beschriebene Strategie zur Synthese von monoubiquitiniertem H2B basiert auf einer Disulfidverknüpfung als Ersatz für die Isopeptidbindung (Schema 10C).<sup>[167]</sup> Um dies zu erreichen, wurde Lys120 zu Cys mutiert, während eine Intein-vermittelte Thioumesterung mit Cysteamin einen Thiol-Henkel am C-Terminus des Ub erzeugte. Im Anschluss daran wurde das H2B(K120C), nach Aktivierung mit 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) (DTNP), mit dem Ub-Thiol umgesetzt und das Disulfid-Analogon von ubiquitiniertem H2B erhalten. Bemerkenswert ist, dass dieses Analogon eine gegen Dot1L stabile Methylierung aufweist. Mit dieser Methode gelang die Synthese eines kleinen Satzes an ubiquitinierten H2B, wobei die Position der Ubiquitinierung von H2B (108, 116, 125) sowie Position 22 von H2A verändert wurden, sodass Ub an unterschiedlichen Oberflächenstellen des Nukleosoms präsentiert wurde. Interessanterweise stimulierte die Ubiquitinierung von H2B in Position 125 und von Position 22 in H2A (die in der Nähe der Bindungsstelle des Ub in nativem ubiquitiniertem H2B liegt) einen Großteil der Dot1L-Aktivität. Ubiquitinierung in den Positionen 108 und 116 verminderte die Dot1L-Aktivität dagegen deutlich.

Unter Verwendung des Disulfid-Analogons von ubiquitiniertem H2B untersuchten Muir und Mitarbeiter auch den

Einfluss der Ubiquitinierung auf die lokale und höhere Ordnung von Chromatinfasern.<sup>[198]</sup> Die dynamische Struktur mit unterschiedlichen Zuständen ist eine bemerkenswerte Eigenschaft des Chromatins und spielt eine wichtige Rolle bei der Genregulierung. Die Primärstruktur des Chromatins faltet sich zu einer kompakten Sekundärstruktur aus 30 nm großen Fasern sowie zu einer riesigen Tertiärstruktur, die letztlich ein vollständiges Chromosom bildet. Die Verdichtung der Fasern wird durch PTMs reguliert,<sup>[199]</sup> z.B. durch eine Acetylierung von K16 in H4.<sup>[200]</sup> Trotz mehrerer Vorschläge und Modelle zum Einfluss der Ubiquitinierung auf die Stabilisierung des Nukleosoms<sup>[201,202]</sup> stand eine detaillierte Analyse dieser Modifikation auf die Chromatin-Verdichtung lange Zeit aus. Muir und Mitarbeiter nutzten ihre chemisch definierten Nukleosom-Arrays in Kombination mit einem Fluoreszenzpolarisationsassay, um Aufschluss über diesen Prozess zu erlangen. Dabei zeigte sich, dass die Ubiquitinierung auf eine Weise mit der Verdichtung der Chromatinfasern interferiert, die eine offene und zugängliche Konformation der Fasern zur Folge hat. Zwei bedeutsame Erkenntnisse konnten aus dieser Studie gewonnen werden: 1) Ubiquitiniertes H2B und acetyliertes H4 beeinflussten die Chromatin-Verdichtung über unterschiedliche Mechanismen, und sofern beide Modifikationen vorhanden sind inhibieren sie die Chromatinstruktur höherer Ordnung auf synergistische Weise. 2) Der Ersatz von Ub in Ub-H2B durch Hub1, einem Ubl mit ähnlicher Faltung und zu 23 % mit Ub übereinstimmender Sequenzhomologie, bewirkte keine signifikante Chromatin-Verdichtung. Das letztere Ergebnis spricht dafür, dass das Aufreißen der Faser spezifisch für Ub ist, was vermutlich auf dessen einzigartige Oberfläche und nicht auf eine sterische Hinderung zurückzuführen ist.

Parallel zu den Arbeiten von Muir et al., die einen Thiol-Austausch für den Aufbau von Ub-H2B-Analoga nutzten, beschrieben Zhuang und Mitarbeiter eine sehr ähnliche Vorgehensweise zur Synthese von ubiquitiniertem PCNA (proliferating cell nuclear antigen).<sup>[168]</sup> PCNA ist an der DNA-Replikation und DNA-Reparatur, der Kontrolle des Zellzyklus und der Chromatin-Remodellierung beteiligt.<sup>[58]</sup> Es ist außerdem dafür bekannt, Monoubiquitinierungen in Position 164 einzugehen (Schema 11A), was eine entscheidende Rolle in der eukaryotischen Translasionssynthese (TLS) spielt.<sup>[203]</sup> Bei der DNA-Reparatur erfordert der Prozess den Ersatz der replikativen Polymerase durch eine nichtklassische Polymerase, ein Vorgang, an dem ubiquitiniertes PCNA mitwirkt. Im Speziellen erhöht ubiquitiniertes PCNA die Affinität von TLS-Polymerasen wie Polη, das eine UBD für PCNA besitzt und die TLS-Polymerasen zu DNA-Schadstellen rekrutiert. Die Rekonstitution von ubiquitiniertem PCNA in vitro unter Zuhilfenahme der enzymatischen Maschinerie ergab nur wenige µg dieses Biokonjugats. Mithilfe der beschriebenen Disulfidmethode (Schema 11B) gelang es jedoch, mg-Mengen eines hochgradig homogenen PCNA zu erzeugen. Dieses Analogon wies im Vergleich zum nativen PCNA normale Aktivität im Polymeraseaustauschtest auf. Ermutigt durch diese Ergebnisse wurden mehrere PCNA-Analoga hergestellt, die in unterschiedlichen Positionen ubiquitiniert waren, darunter K164, K127, K107 und R44. Interessanterweise hatte die Ubiquitinierungsposition keinen



**Scheme 11.** Synthese von monoubiquitiniertem PCNA durch A) einen enzymatischen Ansatz, B) Thiol-Austausch und C) Klickchemie.

signifikanten Einfluss auf die Effizienz des Polymeraseaustauschs. Dieser Befund wurde der Tatsache zugeschrieben, dass Ub aufgrund der Flexibilität der Disulfidverknüpfung einen großen Konformationsraum einnehmen kann, was die Bildung funktioneller ternärer Komplexe mit den Polymerasen ermöglicht.

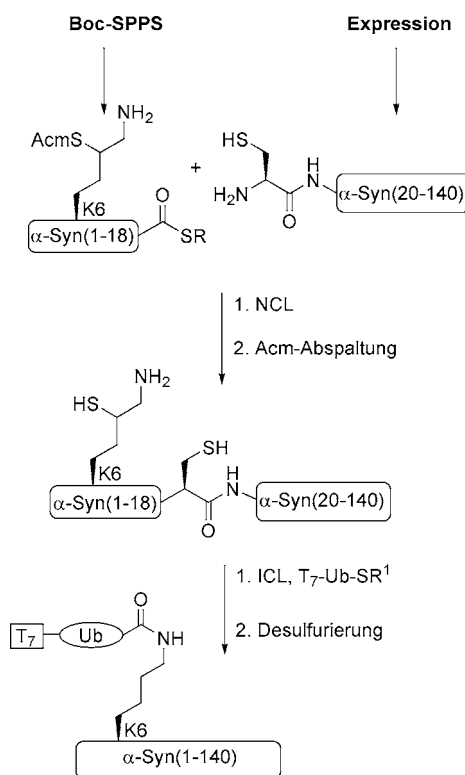
Die Arbeitsgruppen von Marx und Rubini nutzten ebenfalls Klickchemie, um monoubiquitinierte PCNA mit einer Triazolverknüpfung als Isopeptidsurrogat herzustellen (Schema 11 C).<sup>[204]</sup> Dieses synthetische Mimetikum von Ub-PCNA besaß die Fähigkeit, die DNA-Synthese zu stimulieren, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als unmodifiziertes PCNA.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Lashual unternahmen wir die erste Semisynthese von monoubiquitiniertem  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -syn) als ein erster Schritt zur Aufklärung der Rolle der Ubiquitinierung in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit (PD).<sup>[205]</sup> Entsprechende Kenntnisse sind entscheidend für das Verständnis der Biologie von  $\alpha$ -syn und können letztendlich zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur Behandlung von PD führen.<sup>[206]</sup> Die Krankheit ist gekennzeichnet durch den Verlust dopaminerger Neuronen sowie die Gegenwart intrazellulärer, hauptsächlich aus  $\alpha$ -syn bestehender Inklusionen, die als Lewy-Körperchen (LBs, Lewy bodies) bezeichnet werden. Es wurde berichtet, dass die meisten in LBs gefundenen  $\alpha$ -syn-Spezies mono- oder diubiquitiniert und, zu einem geringeren Teil, auch an multiplen Lysinresten mehrfach ubiquitiniert sind.<sup>[207–209]</sup> Mehrere Arbeitsgruppen haben daher versucht, die Rolle der Ubiquitinierung bei der Regulierung der  $\alpha$ -syn-Aggregation und der Toxizität aufzuklären.

Eine ortsspezifische Ubiquitinierung von  $\alpha$ -syn gelang unter der Verwendung enzymatischer Mechanismen bisher

nicht, und demzufolge war es schwierig, den Einfluss der Ubiquitinierung an bestimmten Lysinresten zu erforschen.<sup>[210–212]</sup> Um dieses Hindernis zu umgehen, beschrieben wir vor kurzem die Semisynthese von an K6 monoubiquitiniertem  $\alpha$ -syn (T7-Ub- $\alpha$ -syn(K6)). Hierzu erzeugten wir monoubiquitiniertes  $\alpha$ -syn aus einem rekombinant exprimierten  $\alpha$ -syn-Fragment,  $\alpha$ -syn(19–140), das einen N-terminalen Cys-Rest enthält, sowie einen synthetischen Peptidthioester  $\alpha$ -syn(1–18) mit orthogonal geschütztem  $\delta$ -Mercaptolysin in Position 6 (Schema 12).<sup>[152]</sup> Im Anschluss an den Ligationsschritt wurde die Acm-Schutzgruppe quantitativ abgespalten, um eine ortsspezifische Ubiquitinierung an K6 zu ermöglichen. Der abschließende Desulfurierungsschritt ergab

das native monoubiquitinierte  $\alpha$ -syn T7-Ub- $\alpha$ -syn(K6) in hoher Ausbeute und mit hoher Homogenität. Die Verbindung wurde zahlreichen biophysikalischen Untersuchungen unterworfen, die alle auf eine korrekte Faltung hindeuteten.



**Scheme 12.** Semisynthese von monoubiquitiniertem  $\alpha$ -Synuklein.  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ .

Interessanterweise offenbarten ein ThT-Bindungsassay (ThT = Thioflavin T) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), dass die Ubiquitinierung an K6 eine signifikante Hemmung der  $\alpha$ -syn-Fibrillenbildung bewirkte. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die N-terminale Ubiquitinierung von  $\alpha$ -syn die monomere Form dieses Proteins stabilisiert und somit dessen Oligomerisierung und Fibrillogenese *in vitro* verhindert.

Frühere Studien hatten eine enge Verbindung zwischen der Ubiquitinierung und der Phosphorylierung von  $\alpha$ -syn an S129 innerhalb der Lewy-Körperchen gezeigt.<sup>[207,208,213]</sup> Der Effekt von ubiquitiniertem  $\alpha$ -syn auf die Phosphorylierung wurde allerdings noch nicht untersucht. Interessanterweise ergaben unsere Studien, dass die Ubiquitinierung an K6 nicht die Phosphorylierung an S87 und S129 durch phosphorylierende Kinasen beeinflusst.

Unsere Studie belegt eindrucksvoll, welchen Nutzen die Semisynthese von Proteinen zur Aufklärung der Rolle von PTMs bei der Modulation der  $\alpha$ -syn-Funktion hat. Es bleibt noch zu testen, inwieweit die Verlagerung der Ub-Position von K6 auf andere Aminosäuren, z.B. K23, einen ähnlichen Effekt auf die Aggregation und die Kinaseaktivität hat.

Mithilfe der Disulfid-Methode zur Verknüpfung von Ub mit einem Proteinsubstrat stellten Pratt und Mitarbeiter neun ubiquitinierte  $\alpha$ -syn-Derivate her, in denen K6, K10, K12, K21, K23, K32, K34, K46 und K96 des  $\alpha$ -syn einzeln zu Cys mutiert waren. Diese Studie zeigte, dass verschiedene Ubiquitinierungspositionen unterschiedliche Effekte auf die Bildung von  $\alpha$ -syn-Fibrillen ausüben.<sup>[214]</sup>

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Gebiet der Ubiquitine ist dank der Entwicklung neuer Synthesemethoden in eine neue Ära eingetreten. Mithilfe dieser Methoden lassen sich nun wertvolle Biokonjugate zur Untersuchung zahlreicher Aspekte der Ub-Biologie zugänglich machen. Verschiedene ubiquitinierte Peptide und Proteine wurde hergestellt, die gegenwärtig zur Beantwortung fundamentaler Fragen auf diesem Gebiet untersucht werden. Sämtliche Formen von Ub-Ketten mit definierten Längen und Arten stehen nun zur Verfügung, und einige sind bereits kommerzialisiert. Diese Biokonjugate wurden sowohl mit der nativen Isopeptidbindung als auch mit anderen, nichtnativen Verknüpfungen hergestellt, um verschiedene Aspekte von UBDs, DUBs und E2/E3-Ligasen studieren zu können. Forschungen dieser Art werden unser Wissen darüber erweitern, wie diese Ub-Maschinerien ihre Funktionen und Spezifitäten auf molekularer Ebene entwickeln.

Jüngere Fortschritte auf dem Gebiet der genetisch kodierten nichtnatürlichen Aminosäuren ermöglichten den direkten Einbau von  $\delta$ -Mercaptolysin in rekombinante Proteine, was prinzipiell die Einführung von Ub und Ubl an jeder beliebigen Position eines Proteins unabhängig von seiner Größe erlauben sollte. Diesen Methoden stehen die chemischen Methoden gegenüber, die sich dadurch auszeichnen, dass sie eine vollständige Kontrolle der atomaren Struktur erlauben, was für eine Vielzahl von Untersuchungen nützlich sein könnte, z. B. zur hochspezifischen Markierung der Ketten

und zur Analyse der Querbeziehungen zwischen PTMs. Mit den heute verfügbaren Methoden sollte auch die herausfordernde Synthese polyubiquitinerter Proteine möglich sein. Hieraus könnten sich interessante Einblicke zum Einfluss der Kettenlänge und Kettenart auf das Ub-Signal ergeben, z. B. welche Proteinsubstrate im Anschluss an die Mono- oder Polyubiquitinierung abgebaut werden.

Die beiden Vorgänge der Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Proteinen weisen mehrere Ähnlichkeiten auf, wovon man in der Wirkstoffforschung profitieren könnte.<sup>[215]</sup> Während das therapeutische Potential von Kinaseinhibitoren ausführlich erforscht wurde (was zur Entwicklung mehrerer Wirkstoffe für die Krebstherapie führte), verläuft die Wirkstoffentwicklung auf dem Gebiet des Ubiquitins deutlich langsamer. Durch die hohe Diversität des Ub-Systems (das in dieser Hinsicht die Phosphorylierung deutlich übertrifft) und aufgrund der Beteiligung einer beträchtlichen Zahl von Komponenten (E1/E2/E3-Enzyme, DUBs, 19S-Komponente des Proteasoms) bieten sich mehrere Ansatzpunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen, die auf das Ub-System abzielen. In dieser Hinsicht glauben wir, dass sich die hier vorgestellten chemischen Methoden als äußerst nützlich für die Wirkstoffentwicklung erweisen könnten, indem sie z. B. Ub-basierte Sonden und Assays zur Vereinfachung des Entwicklungsprozesses verfügbar machen.<sup>[216]</sup> Insgesamt glauben wir, dass diese Strategien in einer Weise zur Erforschung des Ub-Signals beitragen können, die anderweitig nicht möglich sind.

*Diese Arbeit wurde von der Israel Science Foundation und der Edmond J. Safra Foundation gefördert.*

Eingegangen am 2. Januar 2012

Online veröffentlicht am 13. Juni 2012

Übersetzt von Dr. Farina Schill, Göttingen

- [1] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, Jr., *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7508–7539; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372.
- [2] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- [3] A. Ciechanover, Y. Hod, A. Hershko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 1100–1105.
- [4] M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373–428.
- [5] A. M. Weissman, N. Shabek, A. Ciechanover, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 605–620.
- [6] D. Finley, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 477–513.
- [7] A. Ciechanover, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6095–6119; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5944–5967.
- [8] A. Hershko, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6082–6094; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5932–5943.
- [9] I. Rose, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6076–6081; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5926–5931.
- [10] G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, E. A. Boyse, D. H. Schlesinger, H. D. Niall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 11–15.
- [11] S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, W. J. Cook, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531–544.
- [12] G. I. Makhataдзе, M. M. Lopez, J. M. Richardson, S. T. Thomas, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 689–697.

- [13] S. E. Jackson, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1845–1853.
- [14] C. M. Pickart, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 503–533.
- [15] A. M. Weissman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 169–178.
- [16] A. L. Haas, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10329–10337.
- [17] Y. Ye, M. Rape, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 755–764.
- [18] M. Hochstrasser, *Cell* **2006**, *124*, 27–34.
- [19] R. J. Deshaies, C. A. P. Joazeiro, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 399–434.
- [20] S. Fang, A. M. Weissman, *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1546–1561.
- [21] G. Markson, C. Kiel, R. Hyde, S. Brown, P. Charalabous, A. Bremm, J. Semple, J. Woodsmith, S. Duley, K. Salehi-Ashtiani, M. Vidal, D. Komander, L. Serrano, P. Lehner, C. M. Sander-son, *Genome Res.* **2009**, *19*, 1905–1911.
- [22] M. Groettrup, C. Pelzer, G. Schmidtke, K. Hofmann, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 230–237.
- [23] C. M. Pickart, D. Fushman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 610–616.
- [24] P. Xu, D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, J. Peng, *Cell* **2009**, *137*, 133–145.
- [25] I. Ziv, Y. Matiuhin, D. S. Kirkpatrick, Z. Erpapazoglou, S. Leon, M. Pantazopoulou, W. Kim, S. P. Gygi, R. Haguenauer-Tsapis, N. Reis, M. H. Glickman, O. Kleifeld, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M111.009753.
- [26] S. A. Wagner, P. Beli, B. T. Weinert, M. L. Nielsen, J. Cox, M. Mann, C. Choudhary, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M111.013284.
- [27] W. Kim, E. J. Bennett, E. L. Huttlin, A. Guo, J. Li, A. Posse-mato, M. E. Sowa, R. Rad, J. Rush, M. J. Comb, J. W. Harper, S. P. Gygi, *Mol. Cell* **2011**, *44*, 325–340.
- [28] F. Ikeda, I. Dikic, *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 536–542.
- [29] M. S. Rodriguez, J. M. P. Desterro, S. Lain, D. P. Lane, R. T. Hay, *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 8458–8467.
- [30] K. Cadwell, L. Coscoy, *Science* **2005**, *309*, 127–130.
- [31] X. Wang, R. A. Herr, W. J. Chua, L. Lybarger, E. J. H. J. Wiertz, T. H. Hansen, *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 613–624.
- [32] S. Ishikura, A. M. Weissman, J. S. Bonifacino, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23916–23924.
- [33] A. F. Carvalho, M. P. Pinto, C. P. Grou, I. S. Alencastre, M. Fransen, C. Sa-Miranda, J. E. Azevedo, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31267–31272.
- [34] C. Williams, M. van den Berg, R. R. Sprenger, B. Distel, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22534–22543.
- [35] S. W. G. Tait, E. de Vries, C. Maas, A. M. Keller, C. S. D'Santos, J. Borst, *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1453–1466.
- [36] Y. Shimizu, Y. Okuda-Shimizu, L. M. Hendershot, *Mol. Cell* **2010**, *40*, 917–926.
- [37] A. Ciechanover, R. Ben-Saadon, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 103–106.
- [38] R. M. Hofmann, C. M. Pickart, *Cell* **1999**, *96*, 645–653.
- [39] Z. J. Chen, L. J. Sun, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 275–286.
- [40] B. Skaug, X. Jiang, Z. J. Chen, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 769–796.
- [41] H. Huang, M. S. Jeon, L. Liao, C. Yang, C. Elly, J. R. Yates, Y. C. Liu, *Immunity* **2010**, *33*, 60–70.
- [42] M. L. Matsumoto, K. E. Wickliffe, K. C. Dong, C. Yu, I. Bo-sanac, D. Bustos, L. Phu, D. S. Kirkpatrick, S. G. Hymowitz, M. Rape, R. F. Kelley, V. M. Dixit, *Mol. Cell* **2010**, *39*, 477–484.
- [43] A. Bremm, D. Komander, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 355–363.
- [44] C. Behrends, J. W. Harper, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 520–528.
- [45] L. Hicke, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 195–201.
- [46] K. Haglund, P. P. Di Fiore, I. Dikic, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 598–603.
- [47] J. R. Shaeffer, M. A. Kania, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4015–4021.
- [48] S. C. Boutet, M. H. Disatnik, L. S. Chan, K. Iori, T. A. Rando, *Cell* **2007**, *130*, 349–362.
- [49] Y. Kravtsova-Ivantsiv, S. Cohen, A. Ciechanover, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 496–504.
- [50] D. Komander, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 937–953.
- [51] T. T. Huang, A. D. D'Andrea, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 323–334.
- [52] S. Liu, Z. J. Chen, *Cell Res.* **2011**, *21*, 6–21.
- [53] P. K. Kim, D. W. Hailey, R. T. Mullen, J. Lippincott-Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20567–20574.
- [54] A. Shilatfard, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 243–269.
- [55] N. Minsky, E. Shema, Y. Field, M. Schuster, E. Segal, M. Oren, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 483–488.
- [56] W. L. Yang, X. Zhang, H. K. Lin, *Oncogene* **2010**, *29*, 4493–4503.
- [57] L. M. Duncan, S. Piper, R. B. Dodd, M. K. Saville, C. M. Sanderson, J. P. Luzio, P. J. Lehner, *EMBO J.* **2006**, *25*, 1635–1645.
- [58] G. L. Moldovan, B. Pfander, S. Jentsch, *Cell* **2007**, *129*, 665–679.
- [59] T. Zotti, A. Uva, A. Ferravante, M. Vessichelli, I. Scudiero, M. Ceccarelli, P. Vito, R. Stilo, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22924–22933.
- [60] P. Chastagner, A. Israel, C. Brou, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1147–1153.
- [61] A. Hay-Koren, M. Caspi, A. Zilberberg, R. Rosin-Arbesfeld, *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 399–411.
- [62] J. N. Dynek, T. Goncharov, E. C. Dueber, A. V. Fedorova, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, E. Helgason, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, D. S. Kirkpatrick, D. Vucic, *EMBO J.* **2010**, *29*, 4198–4209.
- [63] L. Jin, A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, M. Rape, *Cell* **2008**, *133*, 653–665.
- [64] B. Sobhian, G. Shao, D. R. Lilli, A. C. Culhane, L. A. Moreau, B. Xia, D. M. Livingston, R. A. Greenberg, *Science* **2007**, *316*, 1198–1202.
- [65] F. Shang, G. Deng, Q. Liu, W. Guo, A. L. Haas, B. Crosas, D. Finley, A. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20365–20374.
- [66] K. Iwai, F. Tokunaga, *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 706–713.
- [67] S. Zhao, H. D. Ulrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 7704–7709.
- [68] K. Haglund, S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P. P. Di Fiore, I. Dikic, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 461–466.
- [69] A. K. Al-Hakim, A. Zagorska, L. Chapman, M. Deak, M. Pegg, D. R. Alessi, *Biochem. J.* **2008**, *411*, 249–260.
- [70] J. M. Boname, M. Thomas, H. R. Stagg, P. Xu, J. Peng, P. J. Lehner, *Traffic* **2010**, *11*, 210–220.
- [71] L. Hicke, H. L. Schubert, C. P. Hill, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 610–621.
- [72] I. Dikic, S. Wakatsuki, K. J. Walters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 659–671.
- [73] J. H. Hurley, S. Lee, G. Prag, *Biochem. J.* **2006**, *399*, 361–372.
- [74] F. Ikeda, N. Crosetto, I. Dikic, *Cell* **2010**, *143*, 677–681.
- [75] R. Verma, N. R. Peters, M. D'Onofrio, G. P. Tochtrop, K. M. Sakamoto, R. Varadan, M. Zhang, P. Coffino, D. Fushman, R. J. Deshaies, R. W. King, *Science* **2004**, *306*, 117–120.
- [76] S. M. B. Nijman, M. P. A. Luna-Vargas, A. Velds, T. R. Brummelkamp, A. M. G. Dirac, T. K. Sixma, R. Bernards, *Cell* **2005**, *123*, 773–786.
- [77] J. Hemelaar, P. J. Galaray, A. Borodovsky, B. M. Kessler, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 268–276.
- [78] K. R. Love, A. Catic, C. Schlieker, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 697–705.
- [79] S. J. Goldenberg, J. L. McDermott, T. R. Butt, M. R. Mattern, B. Nicholson, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 828–832.
- [80] B. Nicholson, J. G. Marblstone, T. R. Butt, M. R. Mattern, *Future Oncol.* **2007**, *3*, 191–199.

- [81] F. E. Reyes-Turcu, K. D. Wilkinson, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1495–1508.
- [82] D. Komander, M. J. Clague, S. Urbe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 550–563.
- [83] A. Y. Amerik, M. Hochstrasser, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2004**, *1695*, 189–207.
- [84] Y. Sato, A. Yoshikawa, A. Yamagata, H. Mimura, M. Yamashita, K. Ookata, O. Nureki, K. Iwai, M. Komada, S. Fukai, *Nature* **2008**, *455*, 358–362.
- [85] S. Virdee, Y. Ye, D. P. Nguyen, D. Komander, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 750–757.
- [86] M. Hu, P. Li, L. Song, P. D. Jeffrey, T. A. Chenova, K. D. Wilkinson, R. E. Cohen, Y. Shi, *EMBO J.* **2005**, *24*, 3747–3756.
- [87] D. Komander, C. J. Lord, H. Scheel, S. Swift, K. Hofmann, A. Ashworth, D. Barford, *Mol. Cell* **2008**, *29*, 451–464.
- [88] S. C. Lin, J. Y. Chung, B. Lamothe, K. Rajashankar, M. Lu, Y. C. Lo, A. Y. Lam, B. G. Darnay, H. Wu, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 526–540.
- [89] E. Koutelou, C. L. Hirsch, S. Y. R. Dent, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 374–382.
- [90] S. Rodríguez-Navarro, *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 843–850.
- [91] N. L. Samara, A. B. Datta, C. E. Berndsen, X. Zhang, T. Yao, R. E. Cohen, C. Wolberger, *Science* **2010**, *328*, 1025–1029.
- [92] M. J. Eddins, R. Varadan, D. Fushman, C. M. Pickart, C. Wolberger, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 204–211.
- [93] R. Varadan, O. Walker, C. Pickart, D. Fushman, *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 637–647.
- [94] T. Tenno, K. Fujiwara, H. Tochio, K. Iwai, E. H. Morita, H. Hayashi, S. Murata, H. Hiroaki, M. Sato, K. Tanaka, M. Shirakawa, *Genes Cells* **2004**, *9*, 865–875.
- [95] A. B. Datta, G. L. Hura, C. Wolberger, *J. Mol. Biol.* **2009**, *392*, 1117–1124.
- [96] R. Varadan, M. Assfalg, A. Haririnia, S. Raasi, C. Pickart, D. Fushman, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7055–7063.
- [97] D. Komander, F. Reyes-Turcu, J. D. F. Licchesi, P. Odenwaelder, K. D. Wilkinson, D. Barford, *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 466–473.
- [98] S. D. Weeks, K. C. Grasty, L. Hernandez-Cuevas, P. J. Loll, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, *77*, 753–759.
- [99] Y. Ryabov, D. Fushman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7894–7902.
- [100] A. D. J. van Dijk, D. Fushman, A. M. J. J. Bonvin, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *60*, 367–381.
- [101] T. Hirano, O. Serve, M. Yagi-Utsumi, E. Takemoto, T. Hiro-moto, T. Satoh, T. Mizushima, K. Kato, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 37496–37502.
- [102] J. F. Trempe, N. R. Brown, M. E. M. Noble, J. A. Endicott, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2010**, *66*, 994–998.
- [103] W. J. Cook, L. C. Jeffrey, M. Carson, Z. Chen, C. M. Pickart, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16467–16471.
- [104] W. J. Cook, L. C. Jeffrey, E. Kasperek, C. M. Pickart, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 601–609.
- [105] C. L. Phillips, J. Thrower, C. M. Pickart, C. P. Hill, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2001**, *57*, 341–344.
- [106] A. Bremm, S. M. V. Freund, D. Komander, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 939–947.
- [107] A. Rohaim, M. Kawasaki, R. Kato, I. Dikic, S. Wakatsuki, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2012**, *68*, 102–108.
- [108] L. Chen, K. Madura, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 4902–4913.
- [109] S. Raasi, R. Varadan, D. Fushman, C. M. Pickart, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 708–714.
- [110] R. Varadan, M. Assfalg, S. Raasi, C. Pickart, D. Fushman, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 687–698.
- [111] J. J. Sims, R. E. Cohen, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 775–783.
- [112] Y. Sato, A. Yoshikawa, H. Mimura, M. Yamashita, A. Yamagata, S. Fukai, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2461–2468.
- [113] K. Newton, M. L. Matsumoto, I. E. Wertz, D. S. Kirkpatrick, J. R. Lill, J. Tan, D. Dugger, N. Gordon, S. S. Sidhu, F. A. Fellouse, L. Komuves, D. M. French, R. E. Ferrando, C. Lam, D. Compagnon, C. Yu, I. Bosanac, S. G. Hymowitz, R. F. Kelley, V. M. Dixit, *Cell* **2008**, *134*, 668–678.
- [114] H. Wang, A. Matsuzawa, S. A. Brown, J. Zhou, C. S. Guy, P. H. Tseng, K. Forbes, T. P. Nicholson, P. W. Sheppard, H. Hacker, M. Karin, D. A. A. Vignali, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20197–20202.
- [115] J. Piotrowski, R. Beal, L. Hoffman, K. D. Wilkinson, R. E. Cohen, C. M. Pickart, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23712–23721.
- [116] T. Woelk, S. Sigismund, L. Penengo, S. Polo, *Cell Div.* **2007**, *2*, 11.
- [117] R. M. Hofmann, C. M. Pickart, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27936–27943.
- [118] C. M. Pickart, S. Raasi, *Methods Enzymol.* **2005**, *399*, 21–36.
- [119] C. A. Castañeda, J. Liu, T. R. Kashyap, R. K. Singh, D. Fushman, T. A. Cropp, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2026–2028.
- [120] S. Misaghi, P. J. Galardy, W. J. N. Meester, H. Ovaa, H. L. Ploegh, R. Gaudet, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1512–1520.
- [121] C. M. Pickart, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 7903–7910.
- [122] K. D. Wilkinson, M. J. Cox, A. N. Mayer, T. Frey, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6644–6649.
- [123] C. N. Larsen, B. A. Krantz, K. D. Wilkinson, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3358–3368.
- [124] O. V. Baboshina, A. L. Haas, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2823–2831.
- [125] T. Keren-Kaplan, I. Attali, K. Motamedchaboki, B. A. Davis, N. Tanner, Y. Reshef, E. Laudon, M. Kolot, O. Levin-Kravets, O. Kleinfeld, M. Glickman, B. F. Horazdovsky, D. A. Wolf, *G. Prag, EMBO J.* **2012**, *31*, 378–390.
- [126] K. S. A. Kumar, A. Brik, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 524–529.
- [127] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.
- [128] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [129] R. Ramage, J. Green, T. W. Muir, O. M. Ogunjobi, S. Love, K. Shaw, *Biochem. J.* **1994**, *299*, 151–158.
- [130] R. Ramage, J. Green, O. M. Ogunjobi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2149–2152.
- [131] S. G. Love, T. W. Muir, R. Ramage, K. T. Shaw, D. Alexeev, L. Sawyer, S. M. Kelly, N. C. Price, J. E. Arnold, M. P. Mee, R. J. Mayer, *Biochem. J.* **1997**, *323*, 727–734.
- [132] D. Alexeev, P. N. Barlow, S. M. Bury, J. D. Charrier, A. Cooper, D. Hadfield, C. Jamieson, S. M. Kelly, R. Layfield, R. J. Mayer, H. McSparron, N. C. Price, R. Ramage, L. Sawyer, B. A. Starkmann, D. Uhrin, J. Wilken, D. W. Young, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 894–896.
- [133] F. El Oualid, R. Merckx, R. Ekkebus, D. S. Hameed, J. J. Smit, A. de Jong, H. Hilkmann, T. K. Sixma, H. Ovaa, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10347–10351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10149–10153.
- [134] S. N. Bavikar, L. Spasser, M. Haj-Yahya, S. V. Karthikeyan, T. Moyal, K. S. A. Kumar, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 758–763.
- [135] D. Bang, G. I. Makhatadze, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3920–3924; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3852–3856.
- [136] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533.
- [137] L. A. Erlich, K. S. A. Kumar, M. Haj-Yahya, P. E. Dawson, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2392–2396.
- [138] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28.
- [139] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [140] M. Vila-Perelló, T. W. Muir, *Cell* **2010**, *143*, 191–200.

- [141] T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2256–2264.
- [142] A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1149–1159.
- [143] K. R. Love, R. K. Pandya, E. Spooner, H. L. Ploegh, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 275–287.
- [144] L. J. Martin, R. T. Raines, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9226–9228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9042–9044.
- [145] a) T. Fekner, X. Li, M. K. Chan, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 21–33; b) E. R. Strieter, D. A. Korasick, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 52–63.
- [146] C. Chatterjee, R. K. McGinty, J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2872–2876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814–2818.
- [147] C. P. R. Hackenberger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1221–1223.
- [148] R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X. W. Liu, C. F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13592–13593.
- [149] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
- [150] K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8234–8238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8090–8094.
- [151] K. S. A. Kumar, A. Brik, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 900–907.
- [152] M. Haj-Yahya, K. S. A. Kumar, L. A. Erlich, A. Brik, *Biopolymers* **2010**, *94*, 504–510.
- [153] S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliott, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10708–10711.
- [154] P. P. Geurink, F. El Oualid, A. Jonker, D. S. Hameed, H. Ovaa, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 293–297.
- [155] S. Aimoto, *Biopolymers* **1999**, *51*, 247–265.
- [156] K. S. A. Kumar, L. Spasser, S. Ohayon, L. A. Erlich, A. Brik, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 137–143.
- [157] J. E. Jung, H. P. Wollscheid, A. Marquardt, M. Manea, M. Scheffner, M. Przybylski, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1152–1162.
- [158] J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6957–6961; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851–6855.
- [159] S. C. Johnston, C. N. Larsen, W. J. Cook, K. D. Wilkinson, C. P. Hill, *EMBO J.* **1997**, *16*, 3787–3796.
- [160] S. C. Johnston, S. M. Riddle, R. E. Cohen, C. P. Hill, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3877–3887.
- [161] M. W. Popp, K. Artavanis-Tsakonas, H. L. Ploegh, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3593–3602.
- [162] K. D. Wilkinson, E. Laleli-Sahin, J. Urbauer, C. N. Larsen, G. H. Shih, A. L. Haas, S. T. R. Walsh, A. J. Wand, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 1067–1077.
- [163] L. Yin, B. Krantz, N. S. Russell, S. Deshpande, K. D. Wilkinson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10001–10010.
- [164] N. S. Russell, K. D. Wilkinson, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4844–4854.
- [165] X. Li, T. Fekner, J. J. Ottesen, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9348–9351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9184–9187.
- [166] R. K. McGinty, M. Kohn, C. Chatterjee, K. P. Chiang, M. R. Pratt, T. W. Muir, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 958–968.
- [167] C. Chatterjee, R. K. McGinty, B. Fierz, T. W. Muir, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 267–269.
- [168] J. Chen, Y. Ai, J. Wang, L. Haracska, Z. Zhuang, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 270–272.
- [169] A. Shanmugham, A. Fish, M. P. A. Luna-Vargas, A. C. Faesen, F. El Oualid, T. K. Sixma, H. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8834–8835.
- [170] N. D. Weikart, H. D. Mootz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 774–777.
- [171] S. Sommer, N. D. Weikart, A. Brockmeyer, P. Janning, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10062–10066; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9888–9892.
- [172] P. Knipscheer, A. Flotho, H. Klug, J. V. Olsen, W. J. van Dijk, A. Fish, E. S. Johnson, M. Mann, T. K. Sixma, A. Pichler, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 371–382.
- [173] S. Eger, M. Scheffner, A. Marx, M. Rubini, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16337–16339.
- [174] N. D. Weikart, S. Sommer, H. D. Mootz, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 296–298.
- [175] K. S. A. Kumar, L. Spasser, L. A. Erlich, S. N. Bavikar, A. Brik, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9312–9317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9126–9131.
- [176] F. E. Reyes-Turcu, J. R. Horton, J. E. Mullally, A. Heroux, X. Cheng, K. D. Wilkinson, *Cell* **2006**, *124*, 1197–1208.
- [177] K. D. Wilkinson, V. L. Tashayev, L. B. O'Connor, C. N. Larsen, E. Kasperek, C. M. Pickart, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14535–14546.
- [178] C. A. Castañeda, L. Spasser, S. N. Bavikar, A. Brik, D. Fushman, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11406–11410; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11210–11214.
- [179] C. Castañeda, J. Liu, A. Chaturvedi, U. Nowicka, T. A. Cropp, D. Fushman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17855–17868.
- [180] R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X. W. Liu, C. F. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7199–7201.
- [181] A. C. Faesen, M. P. A. Luna-Vargas, P. P. Geurink, M. Clerici, R. Merkx, W. J. van Dijk, D. S. Hameed, F. El Oualid, H. Ovaa, T. K. Sixma, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1550–1561.
- [182] J. D. F. Licchesi, J. Mieszczynek, T. E. T. Mevissen, T. J. Rutherford, M. Akutsu, S. Virdee, F. El Oualid, J. W. Chin, H. Ovaa, M. Bienz, D. Komander, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 62–71.
- [183] J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, C. M. Pickart, *EMBO J.* **2000**, *19*, 94–102.
- [184] N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, A. Ciechanover, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11907–11912.
- [185] K. S. A. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6261–6265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6137–6141.
- [186] R. D. Kornberg, *Science* **1974**, *184*, 868–871.
- [187] C. Chatterjee, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11045–11050.
- [188] T. Jenuwein, C. D. Allis, *Science* **2001**, *293*, 1074–1080.
- [189] L. Wu, B. M. Zee, Y. Wang, B. A. Garcia, Y. Dou, *Mol. Cell* **2011**, *43*, 132–144.
- [190] J. Kim, S. B. Hake, R. G. Roeder, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 759–770.
- [191] B. Zhu, Y. Zheng, A. D. Pham, S. S. Mandal, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 601–611.
- [192] H. H. Ng, R. M. Xu, Y. Zhang, K. Struhl, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 34655–34657.
- [193] S. D. Briggs, T. Xiao, Z. W. Sun, J. A. Caldwell, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, C. D. Allis, B. D. Strahl, *Nature* **2002**, *418*, 498.
- [194] K. W. Henry, S. L. Berger, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 565–566.
- [195] Z. W. Sun, C. D. Allis, *Nature* **2002**, *418*, 104–108.
- [196] R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, T. W. Muir, *Nature* **2008**, *453*, 812–816.
- [197] R. K. McGinty, C. Chatterjee, T. W. Muir, *Methods Enzymol.* **2009**, *462*, 225–243.
- [198] B. Fierz, C. Chatterjee, R. K. McGinty, M. Bar-Dagan, D. P. Raleigh, T. W. Muir, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 113–119.
- [199] B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41–45.
- [200] M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* **2006**, *311*, 844–847.
- [201] M. B. Chandrasekharan, F. Huang, Z. W. Sun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16686–16691.
- [202] A. B. Fleming, C. F. Kao, C. Hillyer, M. Pikaart, M. A. Osley, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 57–66.
- [203] J. Chen, W. Bozza, Z. Zhuang, *Cell Biochem. Biophys.* **2011**, *60*, 47–60.

- [204] S. Eger, B. Castrec, U. Hubscher, M. Scheffner, M. Rubini, A. Marx, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2807–2812.
- [205] M. Hejjaoui, M. Haj-Yahya, K. S. A. Kumar, A. Brik, H. A. Lashuel, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 425–429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 405–409.
- [206] A. Oueslati, M. Fournier, H. A. Lashuel, *Prog. Brain Res.* **2010**, *183*, 115–145.
- [207] J. P. Anderson, D. E. Walker, J. M. Goldstein, R. de Laat, K. Banducci, R. J. Caccavello, R. Barbour, J. Huang, K. Kling, M. Lee, L. Diep, P. S. Keim, X. Shen, T. Chataway, M. G. Schlossmacher, P. Seubert, D. Schenk, S. Sinha, W. P. Gai, T. J. Chilcote, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29739–29752.
- [208] M. Hasegawa, H. Fujiwara, T. Nonaka, K. Wakabayashi, H. Takahashi, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, D. Mann, T. Iwatsubo, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49071–49076.
- [209] D. M. Sampathu, B. I. Giasson, A. C. Pawlyk, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 91–100.
- [210] R. Rott, R. Szargel, J. Haskin, V. Shani, A. Shainskaya, I. Manov, E. Liani, E. Avraham, S. Engelender, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 3316–3328.
- [211] J. T. Lee, T. C. Wheeler, L. Li, L. S. Chin, *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 906–917.
- [212] T. Nonaka, T. Iwatsubo, M. Hasegawa, *Biochemistry* **2005**, *44*, 361–368.
- [213] G. K. Tofaris, A. Razzaq, B. Ghetti, K. S. Lilley, M. G. Spillantini, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44405–44411.
- [214] F. Meier, T. Abeywardana, A. Dhall, N. P. Marotta, J. Varkey, R. Langen, C. Chatterjee, M. R. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5468–5471.
- [215] P. Cohen, M. Tcherpakov, *Cell* **2010**, *143*, 686–693.
- [216] S. Ohayon, L. Spasser, A. Aharoni, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3281–3289.