

Fluorogene ATP-Analoga zur Detektion von ATP-Verbrauch: Beobachtung der Aktivierung von Ubiquitin in Echtzeit**

Stephan M. Hacker, Dana Pagliarini, Thomas Tischer, Norman Hardt, Daniel Schneider, Martin Mex, Thomas U. Mayer, Martin Scheffner* und Andreas Marx*

Die Konjugation von Ubiquitin an verschiedene Proteine spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation zahlloser zellulärer Vorgänge.^[1] Die Fehlregulation dieses Vorgangs wurde mit verschiedenen humanen Erkrankungen, darunter Krebs und neurodegenerative Erkrankungen, in Verbindung gebracht.^[2] Für die Ubiquitylierung wird Ubiquitin zunächst von einem ubiquitinaktivierenden Enzym (E1) auf Kosten von ATP (ATP = Adenosintriphosphat) aktiviert (Abbildung 1a), wobei sich ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycin von Ubiquitin und einem Cystein von E1 bildet.^[3] Darauffolgender Transfer auf einen Cysteinrest eines ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) initiiert die Konjugation von Ubiquitin an ein Zielprotein (zumeist über eine Isopeptidbindung an einen Lysinrest). Dieser Prozess benötigt in den meisten Fällen die Hilfe einer Ubiquitin-Ligase (E3).^[3] Da UBA1 eines von nur zwei verschiedenen bekannten humanen E1-Enzymen für Ubiquitin ist,^[4] könnte die Veränderung seiner Aktivität vorteilhaft für die Behandlung verschiedener Krankheiten sein. Daher sind Assays, die es ermöglichen, die Aktivierung von Ubiquitin durch UBA1 direkt und ohne den Einfluss weiterer Enzyme der Ubiquitylierungskaskade zu studieren, wichtige Hilfsmittel, um die Aktivität von UBA1 zu analysieren und Modulatoren seiner Aktivität zu identifizieren.

Bisher wurden allerdings nur wenige Assays beschrieben, mit deren Hilfe sich die Aktivität von UBA1 direkt bestimmen lässt.^[5] Diese Assays sind arbeitsaufwändig und nicht geeignet, die Aktivität von UBA1 kontinuierlich zu messen.

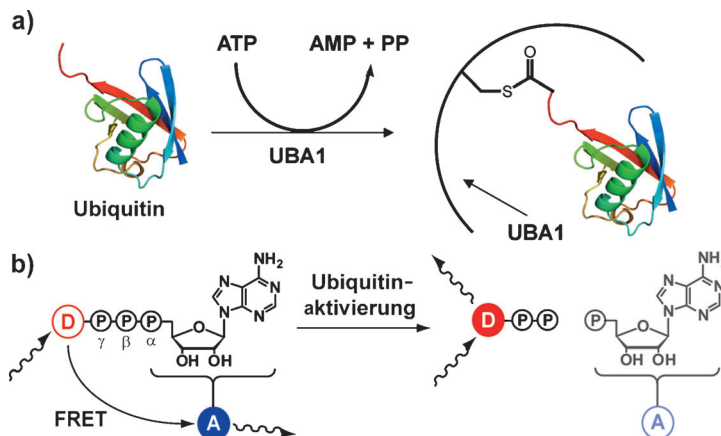


Abbildung 1. a) Mechanismus der Aktivierung von Ubiquitin durch UBA1. Ubiquitin wird unter Verbrauch von ATP über die Bildung eines Thioesters auf UBA1 geladen. AMP = Adenosinmonophosphat, PP = Pyrophosphat. b) Konzept der neuen Methode zur Untersuchung der Ubiquitinaktivierung. Das intakte ATP-Analogon zeigt Fluoreszenz des Akzeptors (A) bei Anregung der Donors (D) aufgrund von FRET. Nach der Spaltung durch UBA1 kann direkte Fluoreszenz des Donors beobachtet werden.

Bis heute gibt es keinen Assay, der es ermöglicht, die Aktivierung von Ubiquitin in Echtzeit direkt zu untersuchen, und somit geeignet wäre, Effektoren von UBA1 auf einfache Weise zu identifizieren. Daher haben wir uns entschieden, einen konzeptionell neuen Assay auszuarbeiten: Echtzeitdetektion der Ubiquitinaktivierung durch die Beobachtung der Spaltung eines ATP-Analogons (Abbildung 1b), das mit zwei Fluorophoren markiert ist, die Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eingehen. In diesem ATP-Analogon sollte die Anregung des Fluoreszenzdonors (D) zu einer Übertragung der Anregungsenergie auf den Fluoreszenzakzeptor führen, dessen Fluoreszenz beobachtet werden kann. Nach der Spaltung der α/β -anhydridischen Bindung dieses Analogons sollte FRET nicht mehr möglich sein und daher eine direkte Emission des Donors beobachtet werden. Auf diese Art resultiert die Aktivität von UBA1 in einer großen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des ATP-Analogons. Ähnliche Ansätze wurden bereits verwendet, um die Aktivität anderer hydrolysierender Enzyme, z.B. Proteasen, zu studieren.^[6]

Für diesen zeitaufgelösten ATPase-Sensorassay (time-resolved ATPase sensor assay, TRASE) müssen zwei Fluorophore an ATP angeknüpft werden. Die N6-Position wurde schon früher als Stelle, an der ATP ohne Verlust der Substrateigenschaften für UBA1 modifiziert werden kann,^[7] identifiziert. Daher muss die zweite Modifikation an der

[*] M. Sc. S. M. Hacker, Dipl.-Biol. D. Pagliarini, Dipl.-Biochem. T. Tischer, Dipl.-Chem. N. Hardt, Dr. D. Schneider, B. Sc. M. Mex, Prof. Dr. T. U. Mayer, Prof. Dr. M. Scheffner, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereiche Chemie und Biologie, Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: martin.scheffner@uni-konstanz.de
andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Wir sind dankbar für die Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 969). Wir bedanken uns weiterhin bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Stipendium an S.M.H. und bei der Konstanz Research School Chemical Biology für finanzielle Unterstützung. S.M.H. dankt für Unterstützung durch das Zukunftskolleg der Universität Konstanz. ATP = Adenosintriphosphat.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201304723> zu finden.

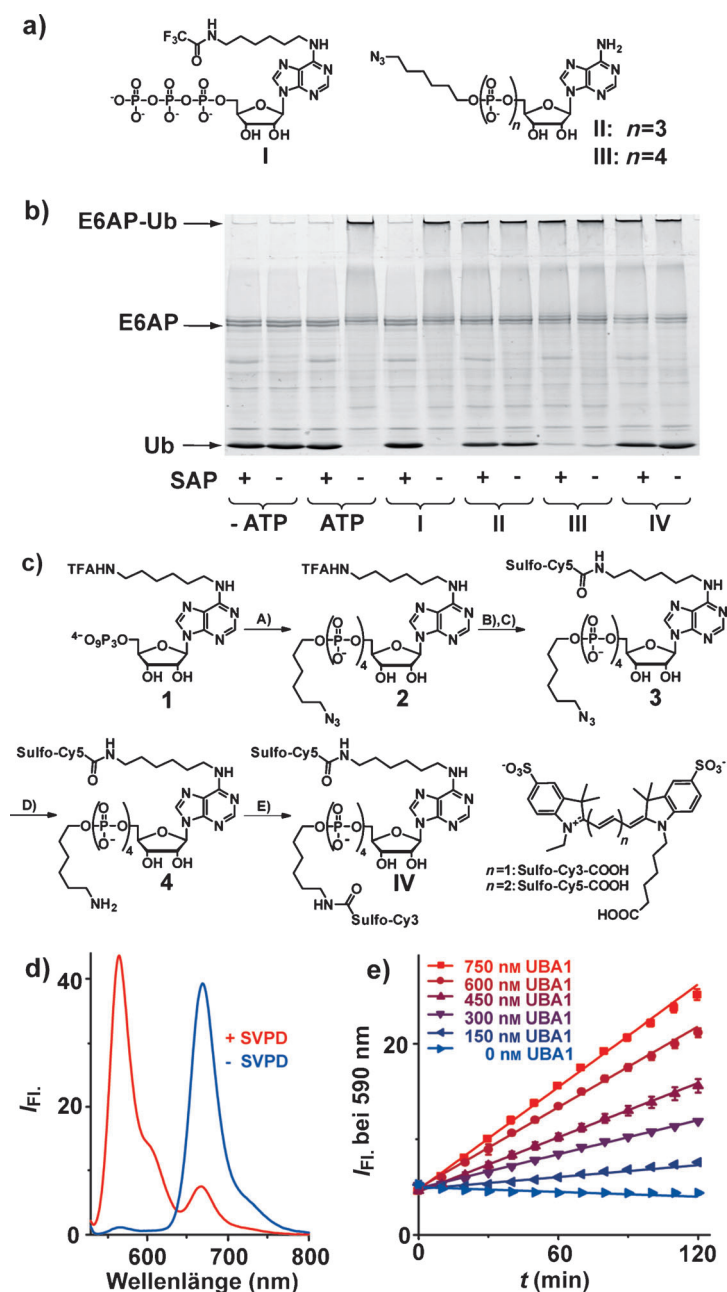


Abbildung 2. Ubiquitinaktivierung durch UBA1 kann direkt in Echtzeit beobachtet werden. a) Strukturen der ATP-Analoga, die genutzt wurden, um das Substratspektrum von UBA1 zu untersuchen. b) Untersuchung des Substratspektrums von UBA1 mit dem E6AP-Autoubiquitylierungsassay. Die Aktivität von UBA1 wird über das Entstehen von polyubiquityliertem E6AP (E6AP-Ub) und den Verbrauch von Ubiquitin in einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE detektiert. Die Proben, die mit SAP vorbehandelt wurden, sind markiert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. c) Synthese der doppelt markierten Sonde **IV**. A) 1. EDC-Hydrochlorid, DMF, 2.5 h, RT; 2. MeOH, 3 h, RT; 3. 6-Azido-hexylphosphat, 12 h, 40 °C, 23%; B) 0.1 M NaOH, 4 h, RT; C) Sulfo-Cy5-NHS-Ester, 0.1 M NaHCO₃, DMF, pH 8.7, 12 h, RT, 23% (über zwei Stufen); D) TCEP, Et₃N, H₂O, MeOH, 4 h, RT, 74%; E) Sulfo-Cy3-NHS-Ester, 0.1 M NaHCO₃, DMF, pH 8.7, 12 h, RT, 61%. d) Fluoreszenzspektren von **IV** nach Behandlung ohne (blau) und mit (rot) der Phosphodiesterase I aus *C. adamanteus* (Snake Venom Phosphodiesterase, SVPD), die **IV** quantitativ spaltet. e) Aktivierung von Ubiquitin durch verschiedene Konzentrationen an UBA1 kann direkt durch die Spaltung von **IV** detektiert werden, indem die Fluoreszenzintensität des Donors (D) gemessen wird. Werte sind Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

Phosphatkette angebracht werden, damit sich die beiden Fluorophore nach der enzymatischen Hydrolyse voneinander trennen. Da frühere Studien außerdem gezeigt haben, dass Phosphatester stabil sind,^[8] haben wir zunächst das γ -modifizierte Triphosphat **II** und das δ -modifizierte Tetraphosphat **III** in Bezug auf die Initialisierung der Autoubiquitylierung von E6AP getestet. Diese Reaktion benötigt UBA1 und das E2-Enzym UbcH5b (Abbildung 2a,b). E6AP ist ein E3-Enzym, das ursächlich mit der Entwicklung von drei verschiedenen humanen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde: Zervixkrebs, Angelman-Syndrom und autistische Störungen.^[9] Da nur die von UBA1 katalysierte Reaktion ATP-abhängig ist, korrelieren die Entstehung von polyubiquityliertem E6AP (E6AP-Ub), das nicht in das Gel einläuft,^[10] und der Verbrauch von Ubiquitin direkt mit dem ATP-Verbrauch durch UBA1. Interessanterweise ist das δ -modifizierte Tetraphosphat **III** ein besseres Substrat für UBA1 als das Triphosphat **II** (Abbildung 2b). Um diese Befunde zu bestätigen, wurden potenzielle Kontaminationen mit ATP durch Vorbehandlung mit der alkalischen Phosphatase aus Garnelen (shrimp alkaline phosphatase, SAP) entfernt. Dieses Enzym ist nicht in der Lage, **II** und **III** zu hydrolysieren (Abbildung 2b). Auch unter diesen Bedingungen wurde beobachtet, dass **III** ein besseres Substrat ist als **II**.

Mit dieser Information haben wir als nächstes das doppelt markierte Analogon **IV** synthetisiert (Abbildung 2c). Die Fluorophore Sulfo-Cy3 und Sulfo-Cy5 wurden ausgewählt, da sie besonders für FRET-Anwendungen bei kleinen Donor-Akzeptor-Abständen geeignet sind.^[11] Die Synthese begann mit Triphosphat **1**.^[7] Die Phosphatkette wurde durch Aktivierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und darauffolgende Zugabe von 6-Azido-hexylphosphat modifiziert, wobei **2** in 23 % Ausbeute erhalten wurde. Abspaltung der Trifluoracetamid-(TFA)-Schutzgruppe mit Natriumhydroxid, gefolgt von der Kupplung mit dem Sulfo-Cy5-NHS-Ester (NHS = *N*-Hydroxysuccinimid), ergab 23 % des einfach modifizierten Moleküls **3**. Dieses wurde in 74 % durch eine Reduktion des Azids mit Tris(2-carboxy-ethyl)phosphan (TCEP) weiter zu **4** umgesetzt. Abschließend wurde mit dem NHS-Ester von Sulfo-Cy3 gekuppelt, wodurch das Endprodukt **IV** in 61 % Ausbeute erhalten wurde.

Nach Validierung der Fluoreszenzeigenschaften von **IV** in einem Phosphodiesterase-Assay (Abbildung 2d und Hintergrundinformationen, Abbildung S1) wurde **IV** als ATP-Ersatz für UBA1 getestet. Wie an der Entstehung von polyubiquityliertem E6AP gesehen werden kann (Abbildung 2b), verwendet UBA1 tatsächlich **IV** als Substrat. Die Analyse des Ubiquitinniveaus ergab, dass in Gegenwart von **IV** viel weniger Ubiquitin konjugiert wurde als in der von ATP. Weiterhin ergab ein Titrationsexperiment, dass zumindest 250 μ M **IV** benötigt werden, um eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen (Hin-

tergrundinformationen, Abbildung S2). Dies zeigt, dass auch der K_M -Wert für **IV** deutlich höher ist als der für ATP [(4.7 ± 1.0) μM].^[12] Wegen der sperrigen Modifikationen an ATP ist dies jedoch nicht erstaunlich.

Abschließend haben wir **IV** verwendet, um die Aktivität von UBA1 in der Abwesenheit aller anderen Enzyme der Ubiquitylierungskaskade in Echtzeit zu detektieren. Hierzu haben wir **IV** und Ubiquitin mit verschiedenen Konzentrationen UBA1 in einem 384-Well-Format inkubiert und das Fluoreszenzsignal über die Zeit verfolgt (Abbildung 2e). Ein zeitabhängiger linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals des Donors Sulfo-Cy3 bei 590 nm kann für alle UBA1-Konzentrationen detektiert werden. Die Steigung der Fluoreszenzkurven korreliert linear mit der Konzentration von UBA1 (Hintergrundinformationen, Abbildung S3). Dies belegt die gute Anwendbarkeit des Assays.

Als nächstes haben wir getestet, ob das Analogon **IV**, das für UBA1 optimiert wurde, auch für die Untersuchung anderer E1-Enzyme ubiquitinähnlicher Proteine (Ubiquitin-like proteins, Ubls) verwendet werden kann.^[13] In diesem Zusammenhang haben wir die Aktivierung von NEDD8 durch APPBP1/UBA3^[13,14] und von SUMO1 durch SAE1/SAE2^[13,15] in Gegenwart von **IV** untersucht (Abbildung 3a).

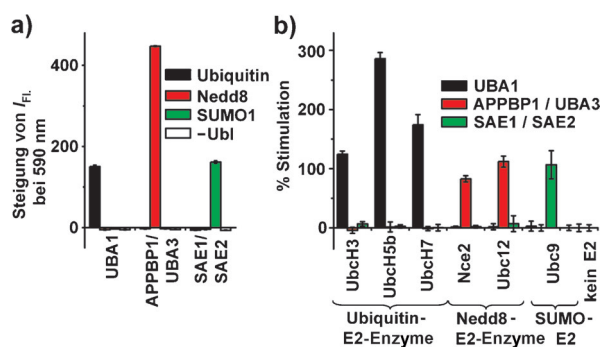


Abbildung 3. Anwendungsbreite der Methode. a) Aktivierung von Ubiquitin und von den Ubls NEDD8 und SUMO1 durch ihre kognaten E1-Enzyme. b) Stimulierender Effekt der E2-Enzyme auf ihre kognaten E1-Enzyme. Die Steigung der Fluoreszenzintensität wurde durch lineare Anpassung an die Fluoreszenzintensität über die Zeit bestimmt. % Stimulation wurde aus der Steigung der Fluoreszenz bei 590 nm relativ zum Mittelwert der Steigung ohne E2 berechnet. Werte sind Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

Alle drei E1-Enzyme können mit dem TRASE-Assay untersucht werden, wie an der Steigung der Fluoreszenz in Gegenwart des kognaten Ubl zu erkennen ist. Weiterhin konnte Aktivität ausschließlich detektiert werden, wenn das korrekte E1-Ubl-Paar verwendet wurde.

Um die Anwendbarkeit des Assays weiter zu untermauern, haben wir den möglichen Einfluss von E2-Enzymen auf die E1-Aktivität untersucht. Wie in Abbildung 3b zu sehen ist, wurde ein Anstieg der Aktivität der einzelnen E1-Enzyme in Gegenwart der kognaten E2-Enzyme detektiert, während keine Stimulation durch nicht-kognate E2-Enzyme gemessen wurde. Damit ist TRASE ein einfaches Hilfsmittel, um die Spezifität von E2- für E1-Enzyme zu bestimmen und, generell, um positive und negative Effektoren der E1-Aktivität zu untersuchen.

Inhibitoren von UBA1 wurden für die Behandlung bestimmter Krebsarten vorgeschlagen.^[16] Dennoch sind bis heute nur wenige UBA1-Inhibitoren bekannt,^[16–18] was daran liegen könnte, dass bisher keine robusten Assays zur Detektion der UBA1-Aktivität in einem Hochdurchsatzverfahren verfügbar waren. Tatsächlich beruhten bisherige Screens auf der Verwendung von zellbasierten Assays, die die Degradation eines Zielproteins detektieren,^[18] oder auf der Verwendung der Detektion von Ubiquitinketten in vitro.^[19] In diesen Assays werden auch Inhibitoren aller anderen Enzyme der Ubiquitylierungskaskade gefunden, die während aufwändiger Validierung ausgeschlossen werden müssen. Im Unterschied hierzu detektiert TRASE die Aktivität von UBA1 direkt (d.h. in Abwesenheit jeglicher anderer Enzyme oder Reagentien) und scheint daher sehr gut geeignet für das Screening von UBA1-Inhibitoren zu sein. Da der Assay weiterhin mehrere Datenpunkte zu verschiedenen Zeiten liefert, können Verbindungen, die die Fluoreszenzcharakteristika von **IV** verändern anstatt UBA1 zu inhibieren, einfach ausgeschlossen werden.

Um die Anwendbarkeit von TRASE für die Identifizierung von UBA1-Inhibitoren zu demonstrieren, haben wir 1279 Verbindungen getestet, die entweder Naturstoffe oder von der FDA zugelassene Medikamente sind. Hierbei wurden fünf Verbindungen identifiziert, die die Aktivität von UBA1 um mindestens 90 % inhibieren (siehe auch Hintergrundinformationen, Abbildungen S4 und S5). Die weitere Charakterisierung mit dem TRASE-Assay ergab, dass eine Verbindung – β -Lapachon (Abbildung 4a) – die E1-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von (1.62 ± 0.13) μM inhibiert (Abbildung 4b). Diese Verbindung ist auch in der Lage, die Auto-ubiquitylierung von E6AP mit einem ähnlichen IC_{50} -Wert von (1.59 ± 0.07) μM zu inhibieren (Abbildung 4b und Hintergrundinformationen, Abbildung S6). β -Lapachon ist ein bekannter Stoff mit antikarzinogener und proapoptotischer Aktivität in verschiedenen Zelllinien,^[20] wurde aber bisher noch nicht mit der Inhibition des Ubiquitylierungswegs in Verbindung gebracht. Um weitere Belege zu erhalten, dass β -Lapachon mit der E1-Aktivität in einem physiologisch relevanten System interferiert, haben wir uns entschieden, β -Lapachon im Extrakt aus *Xenopus-laevis*-Eiern zu untersuchen,^[21] der ein wertvolles System ist, um den Ubiquitylierungsweg im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation zu untersuchen. Der in der Metaphase arretrierte Extrakt wurde mit β -Lapachon oder DMSO, in einem für diese Reaktionen üblichen System, vorbehandelt.^[22] Durch die Zugabe von Calcium wurde der Arrest in der Metaphase aufgehoben, was zur Aktivierung der E3-Ligase „Anaphase Promoting Complex/Cyclosome“ (APC/C)^[23] und damit zum Abbau von Cyclin B führt. In der Gegenwart von DMSO verringern sich die Niveaus an Cyclin B schnell. Dies zeigt an, dass es ubiquityliert und durch das proteasomale System abgebaut wurde (Abbildung 4c). Im Unterschied hierzu bleibt Cyclin B in Gegenwart von β -Lapachon für eine längere Zeit detektierbar. Daher lassen diese Daten darauf schließen, dass β -Lapachon den Abbau von Cyclin B durch Inhibition der Beladung von E1 im *Xenopus-laevis*-Eiextrakt verhindert.

Wir präsentieren hier mit TRASE eine neuartige Methode, um die Aktivität des ATP-verbrauchenden Enzyms

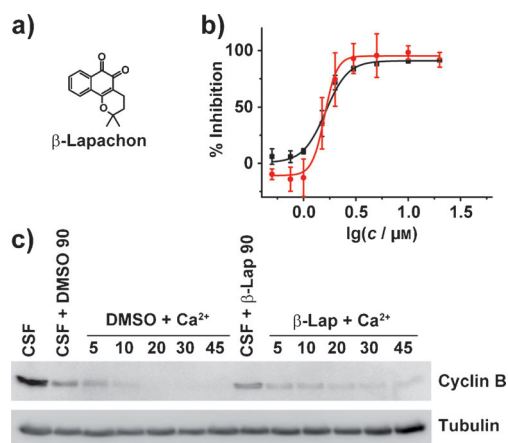


Abbildung 4. Inhibition der Ubiquitinaktivierung durch β -Lapachon. a) Struktur von β -Lapachon. b) Konzentrationsabhängigkeit der UBA1-Inhibition durch β -Lapachon gemessen im TRASE-Assay (schwarze Quadrate) und im E6AP-Autoubiquitylierungsassay (rote Kreise). Die Steigung der Fluoreszenzintensität im TRASE-Assay wurde durch lineare Anpassung an die Fluoreszenzintensität über die Zeit berechnet. Verbrauch von Ubiquitin im E6AP-Autoubiquitylierungsassay wurde durch Quantifizierung der Ubiquitinbande berechnet. % Inhibition wurde aus diesen Werten relativ zu den Positiv- und Negativkontrollen berechnet. Werte sind Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen. c) Calciuminduzierter Abbau von Cyclin B in *Xenopus laevis*-Extrakten, vorbehandelt mit DMSO oder 500 μM β -Lapachon; Zeitangaben in Minuten. Die Proben wurden durch Immunanfärbung gegen Cyclin B analysiert. Ubiquitinabhängiger Abbau von Cyclin B wird durch β -Lapachon verlangsamt. CSF: Zelleextrakt, der durch Cyto-statinfaktor in der Metaphase arretiert ist. Tubulin fungiert als Ladekontrolle. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. β -Lap: β -Lapachon.

UBA1 zu messen. Die Methode basiert auf der Verwendung eines fluorogenen ATP-Analogons, das seine Fluoreszenzcharakteristik bei Spaltung deutlich ändert. Die Methode ermöglicht die Detektion und Quantifizierung der Aktivierung von Ubiquitin und von ubiquitinähnlichen Proteinen durch ihre kognaten E1-Enzyme in Abwesenheit der restlichen Ubiquitylierungskaskade in Echtzeit auf eine einfache und parallele Art und Weise. Zusätzlich kann die Methode verwendet werden, um Auswirkungen von Proteininteraktionen auf die E1-Aktivität zu studieren, wie exemplarisch für die E1-E2-Interaktion gezeigt. Dies eröffnet z.B. die Möglichkeit, TRASE auch für das Screening von Inhibitoren von E2-Enzymen einzusetzen. Weiterhin können wir zeigen, dass die Methode gut für Hochdurchsatzverfahren geeignet ist, und identifizieren β -Lapachon als neuartigen Inhibitor für UBA1. Der präsentierte Assay könnte aber nicht nur zur Verfolgung der Aktivität von E1-Enzymen geeignet sein; er hat auch das Potenzial für die Untersuchung anderer ATP-verbrauchender Enzyme.

Eingegangen am 31. Mai 2013,
veränderte Fassung am 19. Juli 2013
Online veröffentlicht am 17. September 2013

Stichwörter: ATPasen · FRET · Lapachon · Nucleotide · Ubiquitin

- [1] a) T. Ravid, M. Hochstrasser, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 679; b) R. L. Welchmann, C. Gordon, R. J. Mayer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 599.
- [2] a) D. Rotin, S. Kumar, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 10, 398; b) R. J. Deshaies, C. A. P. Joazeiro, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 399.
- [3] a) A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425; b) D. T. Huang, H. Walden, D. Duda, B. A. Schulman, *Oncogene* **2004**, 23, 1958; c) B. A. Schulman, J. W. Harper, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 10, 319.
- [4] a) J. Jin, X. Li, S. P. Gygi, J. W. Harper, *Nature* **2007**, 447, 1135; b) C. Pelzer, I. Kassner, K. Matentzoglou, R. K. Singh, H.-P. Wollscheid, M. Scheffner, G. Schmidtke, M. Groettrup, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 23010.
- [5] a) A. Hershko, H. Heller, S. Elias, A. Ciechanover, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8206; b) A. Ciechanover, H. Heller, R. Katzeitzion, A. Hershko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 761; c) C. E. Berndsen, C. Wolberger, *Anal. Biochem.* **2011**, 418, 102.
- [6] a) A. C. Correa, C. Schulz in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: FRET and FLIM techniques*, Vol. 15 (Hrsg.: T. W. J. Gadella), Elsevier, Oxford, **2009**, S. 225; b) C. Lombard, J. Saulnier, J. Wallach, *Biochimie* **2005**, 87, 265; c) V. V. Didenko, *Biotechniques* **2001**, 31, 1106; d) E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, 247, 954; e) R. T. Cummings, S. P. Salowe, B. R. Cunningham, J. Wiltse, Y. W. Park, L. M. Sonatore, D. Wisniewski, C. M. Douglas, J. D. Hermes, E. M. Scolnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6603; f) O. Wichmann, J. Wittbrodt, C. Schulz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 522; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 508.
- [7] S. M. Hacker, N. Hardt, A. Buntru, D. Pagliarini, M. Möckel, T. U. Mayer, M. Scheffner, C. R. Hauck, A. Marx, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1588.
- [8] S. M. Hacker, M. Mex, A. Marx, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10450.
- [9] M. Scheffner, S. Kumar, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.03.024 (available online PMID: 23545411).
- [10] U. Nuber, S. E. Schwarz, M. Scheffner, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 643.
- [11] A. Dietrich, V. Buschmann, C. Müller, M. Sauer, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 82, 211.
- [12] K. E. Wee, Z. Lai, K. R. Auger, J. Ma, K. Y. Horiuchi, R. L. Dowling, C. S. Dougherty, J. I. Corman, R. Wynn, R. A. Copeland, *J. Protein Chem.* **2000**, 19, 489.
- [13] A. G. van der Veen, H. L. Ploegh, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, 81, 323.
- [14] F. Osaka, H. Kawasaki, N. Aida, M. Saeki, T. Chiba, S. Kawashima, K. Tanaka, S. Kato, *Genes Dev.* **1998**, 12, 2263.
- [15] T. Okuma, R. Honda, G. Ichikawa, N. Tsumagari, H. Yasuda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 254, 693.
- [16] S. R. da Silva, S.-L. Paiva, J. L. Lukkarila, P. T. Gunning, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2165.
- [17] a) J. J. Chen et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 40867; b) Y. Yang et al., *Cancer Res.* **2007**, 67, 9472; c) S. Tsukamoto, H. Hirota, M. Imachi, M. Fujimuro, H. Onuki, T. Ohtaa, H. Yokosawae, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 191; d) D. Ungermannova, S. J. Parker, C. G. Nasveschuk, W. Wang, B. Quade, G. Zhang, R. D. Kuchta, A. J. Phillips, X. Liu, *PLoS One* **2012**, 7, e29208; e) M. Matsuzawa, H. Takeya, J. Yamaguchi, M. Shoji, R. Onose, H. Osada, Y. Hayashi, *Chem. Asian J.* **2006**, 1, 845.
- [18] D. Ungermannova, S. J. Parker, C. G. Nasveschuk, D. A. Chapnick, A. J. Phillips, R. D. Kuchta, X. Liu, *J. Biomol. Screening* **2012**, 17, 421.
- [19] I. V. Davydov, D. Woods, Y. J. Safiran, P. Oberoi, H. O. Fearnhead, S. Fang, J. P. Jensen, A. M. Weissman, J. H. Kenten, K. H. Vousden, *J. Biomol. Screening* **2004**, 9, 695.

- [20] Y. Li, X. Sun, J. T. LaMont, A. B. Pardee, C. J. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2674.
- [21] A. W. Murray, *Methods Cell. Biol.* **1991**, *36*, 581.
- [22] a) T. Tischer, E. Hörmanseder, T. U. Mayer, *Science* **2012**, *338*, 520; b) E. Hörmanseder, T. Tischer, S. Heubes, O. Stemmann, T. U. Mayer, *EMBO Rep.* **2011**, *12*, 436; c) M. Gaffre, A. Martoriati, N. Belhachemi, J. P. Chembon, E. Houlston, C. Jesus, A. Karaiskou, *Development* **2011**, *138*, 3735.
- [23] N. R. Rauh, A. Schmidt, J. Bormann, E. A. Nigg, T. U. Mayer, *Nature* **2005**, *437*, 1048.
-