

Untersuchung der Substratselektivität und Zusammensetzung endogener Histondeacetylase-Komplexe durch chemische Sonden

Alexander Dose, Julia Sindlinger, Jan Bierlmeier, Ahmet Bakirbas, Klaus Schulze-Osthoff, Stephanie Einsele-Scholz, Markus Hartl, Frank Essmann, Iris Finkemeier und Dirk Schwarzer*

Abstract: Histon-Deacetylasen (HDACs) regulieren die Funktion und Aktivität von zahlreichen zellulären Proteinen durch die Entfernung von Acetylgruppen an regulatorisch aktiven Lysinen. Wir haben peptidbasierte HDAC-Sonden entwickelt, die Hydroxamat-funktionalisierte Aminosäuren enthalten. Die Hydroxamat-Bausteine unterscheiden sich in der Seitenkettenlänge und ersetzen modifizierte Lysine an bekannten Acetylierungsstellen. Das Wechselwirkungsprofil aller humanen HDACs wurde mithilfe von drei unterschiedlichen Sätzen an Sonden analysiert, die von verschiedenen Acetylierungsstellen abgeleitet wurden. Es konnte dabei ein starker Einfluss des Sequenzkontextes auf die Substraterkennung und die Zusammensetzung der HDAC-Komplexe gezeigt werden. Durch die Untersuchung der Acetylierung an K382 des Tumorsuppressors p53 konnten wir zudem zeigen, dass das Wechselwirkungsprofil die katalytischen Aktivitäten der entsprechenden HDACs widerspiegelt.

Lysin-Acetylierungen sind häufig auftretende posttranskriptionale Protein-Modifikationen (PTM). Globale Analysen dieser PTM zeigen, dass die Acetylome von Säugetieren mehrere tausend Acetylierungsstellen umfassen. Dabei handelt es sich um Proteine, die an verschiedenen zellulären

Prozessen, wie der DNA-Verpackung, der Transkription, der Signaltransduktion und dem Metabolismus beteiligt sind.^[1] Das Acetylom wird durch die Aktivität von Lysin-Acetyltransferasen und Lysin- oder Histon-Deacetylasen (HDACs) reguliert. Die letzteren Klasse von Enzymen stellt ein vielversprechendes Ziel für die Wirkstoffentwicklung dar, und synthetische Inhibitoren, wie Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA), die HDACs adressieren, sind bereits als Arzneistoffe zugelassen.^[2] Das Genom von Säugetieren kodiert elf Zn²⁺-abhängige HDACs, die entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu den Homologen in der Hefen, Rpd3 und Hda1, in die Klassen I, IIa, IIb und IV unterteilt werden.^[3] Daneben können auch die sieben NAD⁺-abhängigen Deacetylasen der Klasse III, sogenannte Sirtuine, Lysin-Acetylierungen entfernen.^[4] Biochemische Forschung an den Zn²⁺-abhängigen HDACs (nachstehend als HDACs bezeichnet) ist durch die Bildung von Multiprotein-Komplexen erschwert, und das Wissen über bevorzugte Substrate einzelner HDACs ist sehr begrenzt.

Die HDAC-Komplexe sind generell wenig verstanden und der gegenwärtige wissenschaftliche Fokus liegt auf der Erforschung, inwiefern sie Aktivität und Selektivität der Deacetylase modulieren.^[5] Eine aktuelle Herangehensweise zur Erforschung von Substraten der HDAC-Komplexe ist die Bestimmung der Lysin-Acetylome von Zellen oder Organismen, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden.^[6] Zusätzlich sind aktivitätsbasierte Sonden und immobilisierte HDAC-Inhibitoren vielversprechend für die Untersuchung von HDAC-Aktivität in Zelllysaten.^[7]

Im Folgenden stellen wir die Synthese von peptidbasierten Sonden vor, um Substratselektivität und Zusammensetzung von endogenen HDAC-Komplexen von Säugetieren zu untersuchen. Diese Sonden beinhalten synthetisierte Aminosäure-Bausteine, deren funktionelle Gruppe sich von bekannten HDAC-Inhibitoren ableitet. Wir haben dabei auf Hydroxamsäuren zurückgegriffen, die eine Klasse von HDAC-Inhibitoren bilden und in der Lage sind, das katalytische Zn²⁺-Ion der HDACs mit nanomolarer Affinität zu chelatisieren.^[2,7a] Die synthetisierten Hydroxamat-Bausteine ersetzen acetylierte Lysine in Peptiden, die von bekannten Acetylierungsstellen abgeleitet wurden. Der Abstand zwischen Hydroxamat-Gruppe und Peptid-Rückgrat schien kritisch, weshalb wir die Kettenlängen der Hydroxamat-Bausteine zwischen fünf (2-Aminosuberinsäure- ω -hydroxamat – AsuHd), vier (2-Aminoheptandisäure- ϵ -hydroxamat – ApmHd), drei (2-Aminoacidinsäure- δ -hydroxamat – AadHd) und zwei (Glutaminsäure- γ -hydroxamat – GluHd) Methylengruppen variiert haben (Abbildung 1).^[8] Die AsuHd- (**1**) und ApmHd-Bausteine (**2**) wurden über bereits

[*] A. Dose,^[+] J. Sindlinger,^[+] J. Bierlmeier, Prof. Dr. D. Schwarzer
Chemische Biologie, Interfakultäres Institut für Biochemie
Universität Tübingen
Hoppe-Seyler-Straße 4, 72076 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: dirk.schwarzer@uni-tuebingen.de

A. Bakirbas, Dr. M. Hartl, Prof. Dr. I. Finkemeier
Planzenproteomik
Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung
Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln (Deutschland)

Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff, Dr. S. Einsele-Scholz, Dr. F. Essmann
Molekulare Medizin, Interfakultäres Institut für Biochemie
Universität Tübingen
Hoppe-Seyler-Straße 4, 72076 Tübingen (Deutschland)

Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff
Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK)
und Deutsches Krebsforschungszentrum
69120 Heidelberg (Deutschland)

Prof. Dr. I. Finkemeier
Institut für Biologie und Biotechnologie, Universität Münster
Schlossplatz 7, 48149 Münster (Deutschland)

Dr. M. Hartl
Aktuelle Adresse: Mass Spectrometry Facility, Max F. Perutz
Laboratories (MFPL), Universität Wien, Vienna Biocenter (VBC)
Dr. Bohr-Gasse 3, 1030 Wien (Österreich)

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

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508174> zu finden.

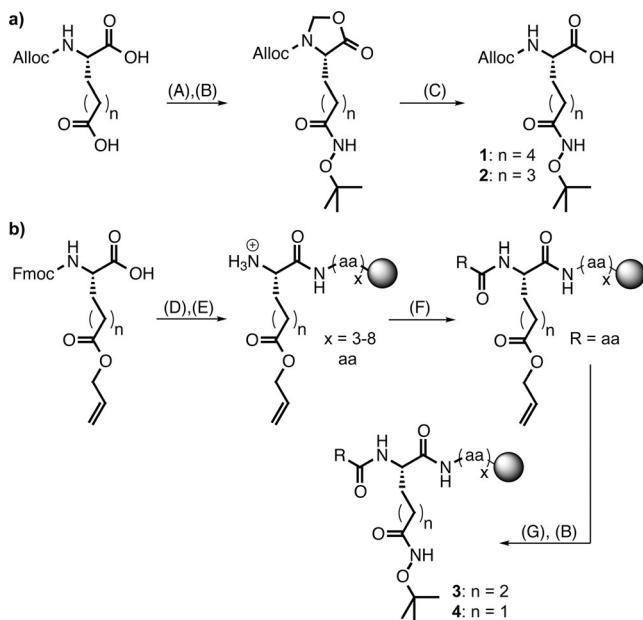


Abbildung 1. Synthese der Hydroxamat-Aminosäurebausteine und der HDAC-Sonden. a) Synthese der Bausteine AsuHd und ApmHd für SPPS. b) Strategie zum Einbau von AadHd und GluHd in Sonden-Peptide. Reagenzien und Bedingungen: A) Paraformaldehyd, TsOH in ACN, 130°C, microwave; B) O-tBu-Hydroxylamin, EDC, DMAP, DIPEA in DCM; C) 1 M LiOH (wässr.) in MeOH; D) SPPS, PyOxim, NMM in DMF; E) 2 % DBU/DMF, 1 min Waschen, dann 1 % TFA in DMF; F) Fmoc-Aminosäure, SPPS; G) $[Pd(PPh_3)_4]$, $BH_3 \cdot HNMe_2$ in DCM. ACN = Acetonitril, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, DIPEA = Diisopropylethylamin, DCM = Dichlormethan, TFA = Trifluoressigsäure.

etablierte Syntheserouten hergestellt, die weiter optimiert wurden (siehe Abbildung 1a und die Hintergrundinformationen, Note S1).^[9] Allerdings stellten sich die analogen Bausteine AadHd und GluHd während der Festphasen-Peptidsynthese (SPPS; Abbildung S1) als instabil heraus. Infolgedessen etablierten wir eine alternative Synthesestrategie, die den Einbau von Hydroxamaten in Peptiden direkt auf dem Harz ermöglicht (Abbildung 1b).

Durch diese Synthesestrategien waren wir nun in der Lage, einen ersten Satz an Peptidsonden zu synthetisieren, in denen nur zwei Aminosäuren (Gly oder Ala) den zentralen Hydroxamat-Baustein flankieren (Abbildung 2a). Diese Minisonden wurden an Agarose-Harz immobilisiert und dienen als Wechselwirkungspartner in anschließenden „Pulldown“-Experimenten. Nativer Gesamtzellextrakt von HeLa-Zellen, die alle HDACs exprimieren (Abbildung S2), wurde in gleichen Konzentrationen (1 mg mL^{-1} , 0.2 mg insgesamt) als Ausgangsmaterial für die Pulldown-Experimente verwendet, die anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für HDAC1–11 analysiert wurden (Abbildung 2b). Alle HDACs der Klassen I und IIb zeigten eine starke Bindung an Mini-AsuHd und weniger starke an Mini-ApmHd und Mini-AadHd. Mit Ausnahme von HDAC5 wechselwirken HDACs der Klasse IIa nicht in signifikantem Maß mit den Minisonden. Diese Ergebnisse weisen auf eine generelle Eignung der Sonden zur Untersuchung von HDACs

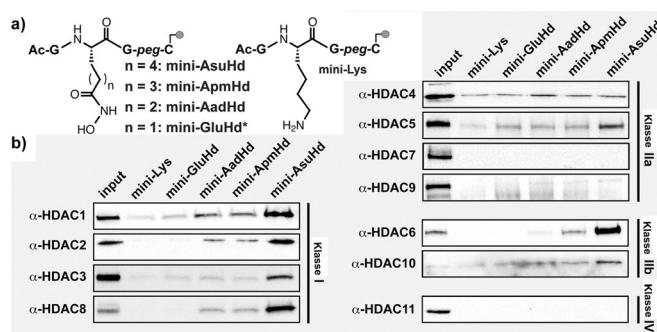


Abbildung 2. HDAC-Pulldown-Experimente mit Minisonden. a) Struktur der immobilisierten Minisonden. b) Western-Blot-Analyse der Pulldown-Experimente. * Sonden mit einem C-terminalen Alanin (siehe Note S1). peg: Polyethylenglykol.

hin. Zudem scheint der Abstand zwischen der Hydroxamat-Gruppe und dem Peptid-Rückgrat für die Stärke der Wechselwirkung wichtig zu sein. Daraufhin wurden vergleichende Pulldown-Experimente mit Mini-AsuHd und Mini-Lys durchgeführt und mittels LC-MS/MS die Interaktome der Sonden bestimmt. Dafür wurden Proteine, die von Mini-AsuHd und Mini-Lys-Sonden eluiert wurden, zunächst alkaliert, trypsinisiert, identifiziert und dann über markierungsfreie LC-MS/MS-Analysen relativ quantifiziert (Abbildung S3). Alle HDACs der Klassen I und IIb wurden im Vergleich zu Mini-Lys signifikant an Mini-AsuHd angereichert, was somit die Resultate der Western Blot-Analyse bestätigte. Die Analysen zeigten zudem bekannte und potentielle Komponenten von HDAC Komplexen, die zusammen mit den HDACs an Mini-AsuHd angereichert wurden (Tabelle S1). Dazu gehören REST-Corepressor 1 und 3 (RCOR1 und RCOR3) genauso wie die Lysin-Demethylase LSD1 (KDM1A), die alle Teil des CoREST-Komplexes sind, und welcher ebenfalls HDAC1 und 2 aus der Klasse I enthält (Abbildung 3a).^[10]

Daraufhin haben wir einen neuen Satz an Sonden synthetisiert, die sich von der Acetylierungsstelle an K382 des Tumorsuppressorproteins p53 ableitet. Die p53-Sonden enthielten entweder AsuHd, ApmHd, AadHd oder Lysin an der Position K382 und sind aufgrund der großen Zahl an Lysinen und Argininen positiv geladen (Abbildung 3b). Pulldown-Experimente zeigten, dass HDAC1–5 an der p53-Sonden angereichert werden konnten (siehe Abbildung 3c und Abbildung S4). Die Konzentration des HeLa-Zellextraktes wurde mindestens auf ein Fünftel reduziert ($\leq 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g}$ insgesamt), was dazu führte, dass die Anreicherung von HDAC1–3 an Mini-AsuHd deutlich verringert wurde. Dagegen wurden HDAC1–3 auch aus diesen verdünnten Lysaten an p53-AsuHd angereichert und sogar an den Sonden p53-ApmHd und p53-AadHd, welche die weniger affinen Hydroxamat-Aminosäuren enthalten. HDAC6 und HDAC8 zeigten ein anderes Bindungsverhalten und wurden an p53-AsuHd und Mini-AsuHd in vergleichbarem Maße angereichert.

Ein weiterer Satz an Sonden, der auf der Acetylierungsstelle an K4 des nukleären Transportfaktors 2 (NTF2) basiert, zeigte ein anderes Wechselwirkungsprofil (siehe Abbil-

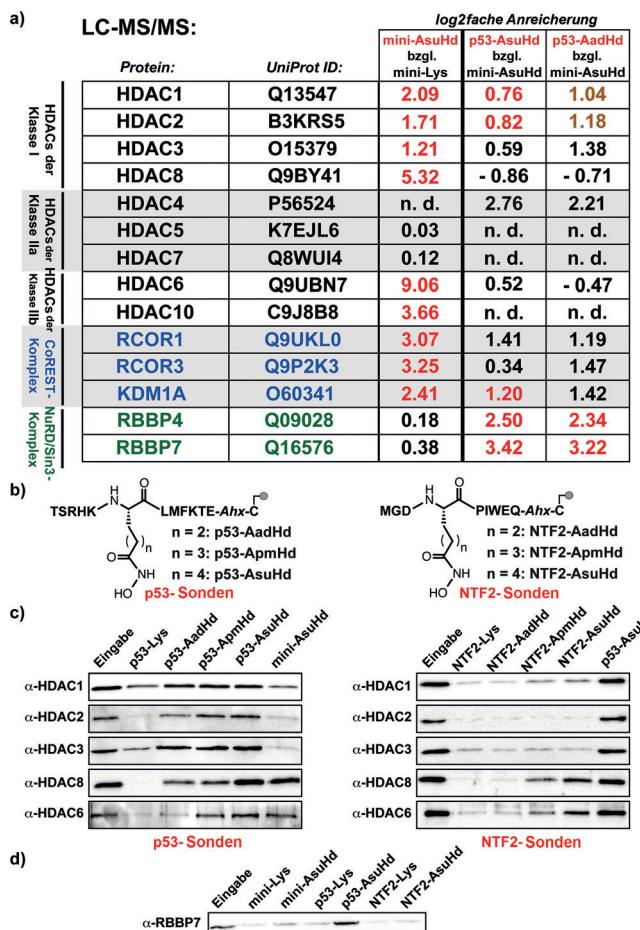


Abbildung 3. HDAC-Pulldown-Experimente mit p53- und NTF2-Sonden. a) Ausgewählte Proteine, die nach Pulldown mit LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert wurden. Die Werte zeigen die mediane Anreicherung des Proteins von zwei (bei p53-AsuHd und p53-AadHd) bzw. drei (bei mini-AsuHd) unabhängigen Experimenten, rot: Signifikanz ($p < 0.05$); braun: weniger signifikante Proteine ($p = 0.05–0.09$) mit einer log₂-fachen Anreicherung > 0.6 ; schwarz: keine Signifikanz ($p > 0.1$) oder mit einer log₂-fachen Anreicherung > 0.6 . (b) Struktur der p53- und NTF2-Sonden. c) Western-Blot-Analyse der HDACs nach Pulldown. d) Western-Blot-Analyse von RBBP7 nach Pulldown.

dung 3c und Abbildung S5). Saure und hydrophobe Reste bestimmen den Sequenzkontext der NTF2-Sonden, die verglichen mit p53-AsuHd schwächere Wechselwirkungen mit HDAC1–3 vermitteln (siehe Abbildung 3c und Abbildung S6). Jedoch konnten HDAC6 und HDAC8 ebenfalls an NTF2-AsuHd angereichert werden. Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass der Sequenzkontext der HDAC-Sonden die Erkennung des Substrates reguliert und zudem HDAC1–3 eine wichtige Rolle bei der Deacetylierung von p53-K382ac spielen.

Im Folgenden wurde der potenzielle Deacetylase-Komplex von p53 K382ac in Proteom-umfassenden Experimenten untersucht (Note S2, Tabelle S2 und S3). Pulldowns von p53-AsuHd wurden gegen Mini-AsuHd und p53-AadHd wurden gegen Mini-AsuHd mittels SILAC („stable isotope labeling with amino acids in cell culture“) und quantitativer Massenspektrometrie verglichen, um so präzise auch geringe Anreicherungen bestimmen zu können.^[11] Die LC-MS/MS-Analyse

zeigte eine signifikante Anreicherung ($\log_2 > 0.6$) von HDAC 1 und HDAC 2 an beiden p53-Sonden (p53-AsuHd, $p \leq 0.05$) wohingegen p53-AadHd nur eine marginale Signifikanz von 0.08 aufwies. Die anderen HDACs wurden entweder nicht ausreichend angereichert oder wiesen keine statistische Signifikanz ($p > 0.1$) auf (Abbildung 3c). Die potenzielle Deacetylierung von p53 K382ac durch HDAC1 und 2 wurde durch die Anreicherung der Proteine RBBP4 und RBBP7 („retinoblastoma binding protein“ 4 und 7) an beiden p53-Sonden unterstützt. Dies sind charakteristische Proteine der NuRD- und Sin3A-Komplexe. Die Mini-AsuHd-Sonde konnte RBBP4 und RBBP7 nicht signifikant anreichern, im Gegensatz zu HDAC1 und 2, was auf eine bevorzugte Rekrutierung des CoREST-Komplexes an Mini-AsuHd hindeutet. Die Bindung von RBBP7 an die p53-AsuHd-Sonde konnte auch durch unabhängige Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 3d).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die NuRD- und Sin3A-Komplexe die Substratselektivität der in ihnen enthaltenen HDAC1 und 2 hin zu der Acetylierungsstelle p53-K382ac steuern.

Studien über die Deacetylierung von p53-K382ac sind teils widersprüchlich und deuten je nach experimentellen Bedingungen auf HDAC1, HDAC6, HDAC8 oder das Sirtuin SIRT1 hin.^[12] In Experimenten mit rekombinantem HDAC8 konnte eine starke Präferenz für Substrate gezeigt werden, die von p53-K382ac abgeleitet wurden. Die hier vorgestellten Pulldown-Experimente mit p53-Sonden konnten dies jedoch nicht bestätigen. Um zu überprüfen, ob die Pulldown-Versuche mit den neu etablierten HDAC-Sonden ein korrektes Vorhersagen der Substratselektivität der Deacetylase ermöglichen, untersuchten wir die katalytischen Eigenschaften von ausgewählten HDACs in Zelllysaten. Wie zuvor gezeigt, lässt sich die globale Deacetylase-Aktivität in Zelllysaten mit synthetischen acetylierten Peptiden mittels MALDI-TOF-MS quantitativ bestimmen.^[13] Ein p53-Peptid-Substrat mit acetyliertem K382 wurde im Folgenden durch endogene HDACs aus Zelllysaten deacetyliert und die Produktbildung unter Zuhilfenahme eines isotopenmarkierten Referenzpeptids quantitativ untersucht (Abbildung S7). In ersten Experimenten konnten wir beobachten, dass HDAC1 und 2 redundant für die Deacetylierung von Lysin 382 des p53-Proteins zu sein scheinen (Abbildung S8).

Wir fokussierten uns auf HDAC1 und verglichen die Deacetylaseaktivität mit der von HDAC6 und HDAC8. Hierfür wurden native Lysate von HEK-Zellen, die HDAC1, HDAC6 oder HDAC8 überexprimieren, hergestellt und auf Deacetylase-Aktivität von p53-K382ac hin überprüft (Abbildung 4a). Lediglich die Überexpression von HDAC1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Deacetylaseaktivität an dem p53-Substrat (Abbildung 4b). Ferner untersuchten wir die Deacetylierung von p53-K382ac in lebenden Zellen und transfizierten hierfür HEK-Zellen mit Konstrukten für die Expression von p53 und p300/CBP, welche eine Acetyltransferase ist, die p53-K382 acetylieren kann.^[12a] Die Kotransfektion beider Konstrukte ergab eine Acetylierung von p53-K382, die mittels eines modifikationsspezifischen Antikörpers detektiert werden konnte (Abbildung 4c). Eine zusätzliche Expression von HDAC8 konnte den Acetylier-

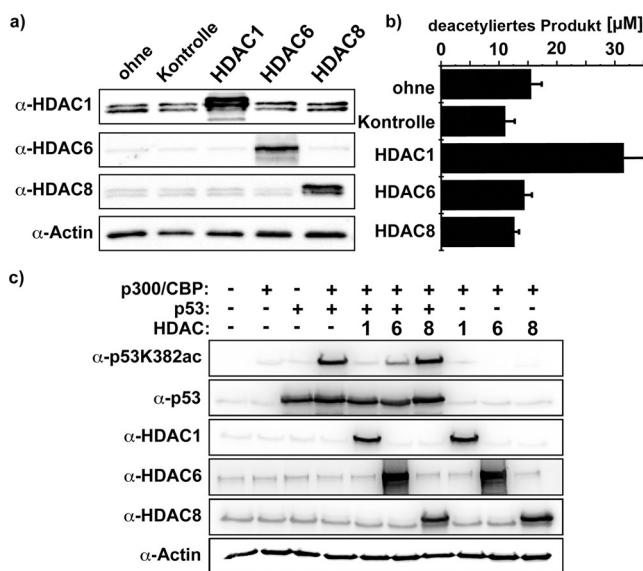


Abbildung 4. Deacetylierung von p53 K382ac durch HDACs. a) Überexpression von HDAC1, 6 und 8 in HEK-Zellen. b) Deacetylierung von p53-K382ac in HEK-Zelllysat. Konzentrationsbestimmung des gebildeten Produktes nach 4 h Inkubation mit 200 μM p53-K382ac-Substrat, durch MALDI-TOF MS. Ein vom Produkt abgeleitetes, isotopenmarkiertes Peptid diente als interne Referenz für die Quantifizierung. c) Western-Blot-Analyse des in vivo deacetylierten p53-K382ac-Substrates. Kontrolle: Transfektion eines leeren Kontrollvektors.

rungsgrad von p53-K382ac nicht reduzieren, im Unterschied zu HDAC1. Die Überexpression von HDAC6 reduzierte ebenfalls das p53-K382ac-Signal, aber nicht im gleichen Maße wie die von HDAC1. Dieses Ergebnis könnte mit der starken Überexpression von HDAC6 erklärt werden. Aber es sollte auch erwähnt werden, dass die hier verwendeten Hydroxamat-Sonden möglicherweise nicht alle Aspekte der HDAC-Substraterkennung widerspiegeln können.

Zusammenfassend haben wir HDAC-Sonden auf Peptidbasis etabliert mit deren Hilfe Untersuchungen von endogenen Deacetylaseaktivitäten in Zellextrakten auf Selektivität und Redundanz möglich sind. Diese Sonden können auch zur Untersuchung der Zusammensetzung von HDAC-Komplexen verwendet werden, wenn sie mit Proteomik-Methoden kombiniert werden. Die SPPS ermöglicht einen einfachen Zugang zu diesen Sonden, die zukünftig auch andere Acetylierungstellen abdecken oder weitere PTMs beinhalten können. Moderne Strategien, wie die Protein-Semisyntthese, ermöglichen weiterhin den Einbau der Hydroxamat-Bau steine in Proteine. Die etablierten HDAC-Sonden scheinen daher ein sehr viel seitiges Hilfsmittel für Untersuchungen von Zn²⁺-abhängigen Lysin-Deacetylase-Komplexen zu sein.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Schwerpunktprogramm SPP 1623 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Aktenzeichen SCHW 1163/4-1, und das Emmy-Noether-Stipendium FI 1655/1-1.

Stichwörter: Aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung · Chemische Sonden · HDAC · Lysin-Acetylierung · Proteomik

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 1192–1195
Angew. Chem. 2016, 128, 1208–1211

- [1] C. Choudhary, B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 536–550.
- [2] P. Gallinari, S. Di Marco, P. Jones, M. Pallaoro, C. Steinkuhler, *Cell Res.* **2007**, *17*, 195–211.
- [3] X. J. Yang, E. Seto, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 206–218.
- [4] R. H. Houtkooper, E. Pirinen, J. Auwerx, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 225–238.
- [5] P. Joshi, T. M. Greco, A. J. Guise, Y. Luo, F. Yu, A. I. Nesvizhskii, I. M. Cristea, *Mol. Syst. Biol.* **2013**, *9*.
- [6] C. Schölz, B. T. Weinert, S. A. Wagner, P. Beli, Y. Miyake, J. Qi, L. J. Jensen, W. Streicher, A. R. McCarthy, N. J. Westwood, S. Lain, J. Cox, P. Matthias, M. Mann, J. E. Bradner, C. Choudhary, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 415–423.
- [7] a) M. Bantscheff, C. Hopf, M. M. Savitski, A. Dittmann, P. Grandi, A. M. Michon, J. Schlegl, Y. Abraham, I. Becher, G. Bergamini, M. Boesche, M. Delling, B. Dumpelfeld, D. Eberhard, C. Huthmacher, T. Mathieson, D. Poeckel, V. Reader, K. Strunk, G. Sweetman, U. Kruse, G. Neubauer, N. G. Ramsden, G. Drewes, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 255–U124; b) M. Minoshima, K. Kikuchi, *Anal. Sci.* **2015**, *31*, 287–292; c) C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1171–1176; d) C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2184–2194.
- [8] a) R. Furumai, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida, S. Horinouchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 87–92; b) M. Jung, A. Kozikowski, A. Dritschilo, *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 1452–1461; c) S. Wittich, H. Scherf, C. P. Xie, G. Brosch, P. Loidl, C. Gerhauser, M. Jung, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3296–3309.
- [9] a) S. Belvedere, D. J. Witter, J. Yan, J. P. Secrist, V. Richon, T. A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3969–3971; b) T. Liu, G. Kapustin, F. A. Etzkorn, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2003–2006; c) D. M. Wilson, L. N. Silverman, M. Bergauer, K. R. Keshari, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 151–153.
- [10] R. D. W. Kelly, S. M. Cowley, *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 741–749.
- [11] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376–386.
- [12] a) A. Chakrabarti, I. Oehme, O. Witt, G. Oliveira, W. Sippl, C. Romier, R. J. Pierce, M. Jung, *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 481–492; b) A. Dose, S. Liokatis, F. X. Theillet, P. Selenko, D. Schwarzer, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 419–424; c) D. G. Watkins, W. P. Zheng, *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 82–88; d) S. L. Gant, S. G. Gattis, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6170–6178; e) A. Ito, Y. Kawaguchi, C. H. Lai, J. J. Kovacs, Y. Higashimoto, E. Appella, T. P. Yao, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6236–6245; f) L. J. Juan, W. J. Shia, M. H. Chen, W. M. Yang, E. Seto, Y. S. Lin, C. W. Wu, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20436–20443; g) D. Li, N. D. Marchenko, U. M. Moll, *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1904–1913; h) H. Vaziri, S. K. Dessain, E. N. Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, R. A. Weinberg, *Cell* **2001**, *107*, 149–159.
- [13] J. O. Jost, A. Hanswillemeneke, D. Schwarzer, *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 1820–1823.

Eingegangen am 1. September 2015
Online veröffentlicht am 14. Dezember 2015