

Technische Universität München

Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

Charakterisierung der Funktion von  
DENEEDYLASE 1 in *Arabidopsis thaliana*

Julia Susanne Pascalina Mergner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

Univ.-Prof. Dr. B. Küster

1. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

2. Univ.-Prof. Dr. T. Dresselhaus  
(Universität Regensburg)

3. Univ.-Prof. Dr. J. Durner

Die Dissertation wurde am 07.04.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.06.2015 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungen.....	VI
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	2
1. Einleitung .....	3
1.1. Ubiquitin reguliert den Proteinabbau .....	4
1.2. NEDD8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein .....	5
1.2.1. In Arabidopsis ist NEDD8 als Fusionsprotein kodiert .....	6
1.2.2. NEDD8 wird am C-Terminus prozessiert .....	7
1.2.3. Die Neddylierung erfolgt über eine Enzymkaskade.....	8
1.2.4. MLN4924 ist ein spezifischer Inhibitor der Neddylierung.....	10
1.2.5. Es gibt nur wenige bekannte NEDD8-Substrate .....	11
1.3. NEDD8 reguliert die CRL-Aktivität.....	12
1.3.1. CRLs bilden die größte Familie der E3 Ubiquitinligasen .....	12
1.3.2. CRLs unterliegen einer komplexen Regulation .....	13
1.4. Die Deneddylierung erfolgt durch spezifische Isopeptidasen .....	14
1.5. Zielsetzung .....	16
2. Ergebnisse .....	17
2.1. DEN1 ist eine NEDD8-spezifische Protease .....	17
2.1.1. DEN1 ist innerhalb der Eukaryoten konserviert .....	17
2.1.2. Identifizierung von <i>den1</i> Mutanten.....	18
2.1.3. <i>den1</i> Mutanten akkumulieren neddylierte Proteine .....	19
2.1.4. Enzymatische Aktivität von DEN1 <i>in vitro</i> .....	21
2.1.4.1. DEN1 prozessiert das NEDD8 Vorläuferprotein .....	21
2.1.4.2. DEN1 deneddyliert NEDD8-Konjugate.....	22
2.1.5. DEN1 zeigt eine Substratspezifität <i>in vivo</i> .....	23
2.1.6. Die Deneddylasen DEN1 und CSN5 fungieren additiv.....	24
2.1.7. DEN1 lokalisiert in den Zellkern und Cytoplasma .....	26
2.1.8. DEN1 wird von Ubiquitin modifiziert.....	27
2.2. AXR1 ist ein neues NEDD8-Substrat .....	31
2.2.1. AXR1 ist p72 .....	31
2.2.2. Autoneddylierung von AXR1 und der Effekt auf die Transthoesterbildung .....	35
2.2.3. Physiologische Effekte der AXR1-Neddylierung .....	37
3. Diskussion.....	41
3.1. Die Funktion von DEN1 in Arabidopsis.....	41
3.1.1. DEN1 ist nicht essenziell für die NEDD8 Prozessierung.....	41
3.1.2. Die Deneddylasen DEN1 und CSN5 haben unterschiedliche Funktionen.....	43
3.1.3. Wird DEN1 reguliert?.....	46

3.2. Die Identifizierung neuer NEDD8-Substrate .....	46
3.3. AXR1 ist ein DEN1-spezifisches NEDD8-Substrat .....	48
3.3.1. Das E1 Enzym wird autoneeddyliert .....	48
3.3.2. AXR1, NEDD8 und die CRLs .....	49
3.3.3. Regulation oder Nebenreaktion? .....	51
3.4. Schlussfolgerung .....	53
4. Material und Methoden .....	55
4.1. Material .....	55
4.1.1. Bakterienstämme .....	55
4.1.2. Pflanzenlinien und Mutanten .....	55
4.1.2.1. Transgene Linien .....	55
4.1.2.2. T-DNA Insertionslinien .....	55
4.1.3. Proteinnachweis .....	56
4.1.3.1. Antikörper .....	56
4.1.3.2. Matrizes zur Proteinaufreinigung .....	56
4.1.4. Primer .....	57
4.1.4.1. Genotypisierungsprimer .....	57
4.1.4.2. Klonierungsprimer .....	57
4.1.5. Vektoren .....	58
4.1.6. Chemikalien und Reagenzien .....	60
4.1.6.1. Chemikalien .....	60
4.1.6.2. Enzyme und Kits .....	61
4.1.6.3. Marker und Substrate .....	61
4.2. Methoden .....	62
4.2.1. Generelle Pflanzenarbeiten .....	62
4.2.1.1. Samensterilisierung und Wachstumsbedingungen .....	62
4.2.1.2. Kreuzungen .....	62
4.2.1.3. Pflanzentransformation .....	62
4.2.1.4. Selektion transgener Pflanzenlinien .....	63
4.2.2. Physiologische Experimente .....	63
4.2.2.1. Assay zur Auxinantwort .....	63
4.2.2.2. Behandlungen mit Hormonen, Inhibitoren und anderen Substanzen .....	64
4.2.2.3. Phänotypische Analyse von <i>axr1</i> Mutanten .....	64
4.2.3. Molekularbiologische Methoden .....	64
4.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	64
4.2.3.2. Klassische Klonierung .....	65
4.2.3.3. Klonierung mittels Gateway-Technologie .....	66
4.2.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen .....	67
4.2.3.5. RNA-Extraktion aus Pflanzen .....	67
4.2.3.6. cDNA-Synthese .....	68
4.2.3.7. PCR Bedingungen .....	68
4.2.4. Biochemische Methoden .....	69
4.2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	69
4.2.4.2. Coomassie- und Silberfärbung .....	69
4.2.4.3. Western-Blot .....	69
4.2.4.4. Proteinextraktion aus Pflanzen .....	70
4.2.4.5. Proteinaufreinigung aus Pflanzen .....	70
4.2.4.5.1. FLAG-Immunopräzipitation .....	70
4.2.4.5.2. Streptavidin/Biotin-System .....	71
4.2.4.5.3. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	71
4.2.4.6. Proteinexpression in Bakterien .....	72



## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.4.7. Proteinaufreinigung aus Bakterien .....	72
4.2.4.7.1. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	72
4.2.4.7.2. Glutathion-S-Transferase .....	73
4.2.4.8. Gel-Permeations-Chromatographie.....	73
4.2.4.9. Massenspektrometrie.....	73
4.2.4.10. Enzymbestimmungen.....	74
4.2.4.10.1. AMC-Assay .....	74
4.2.4.10.2. Prozessierung und Dekonjugation.....	74
4.2.4.10.3. Thioester-Reaktion.....	74
4.2.5. Zellbiologische Methoden .....	75
4.2.5.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	75
4.2.5.2. Subzelluläre Fraktionierung.....	75
4.2.6. Sequenzanalysen und Alignments.....	75
5. Literaturverzeichnis .....	76
Danksagung.....	86
Appendix.....	87
Mergner and Schwechheimer, 2014	
Mergner et al., 2015	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Proteinabbau über das 26S Proteasom.....	5
Abbildung 2: Kristallstruktur von Ubiquitin und NEDD8.....	6
Abbildung 3: NEDD8-kodierende Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
Abbildung 4: Kandidatenproteine für die NEDD8 Prozessierung. ....	8
Abbildung 5: Aktivierung von NEDD8 über das heterodimere E1 Enzym.....	9
Abbildung 6: Neddylierung und Deneddylierung. ....	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der CRL E3 Ligasen aus Arabidopsis.....	13
Abbildung 8: CAND1 und NEDD8 regulieren CRL-Aktivität und Zusammensetzung. ....	14
Abbildung 9: DUB Funktionen. ....	14
Abbildung 10: DEN1 ist innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert. ....	17
Abbildung 11: Charakterisierung von <i>den1</i> Mutanten. ....	18
Abbildung 12: <i>den1</i> Mutanten akkumulieren NEDD8-Konjugate.....	20
Abbildung 13: DEN1 und UCH3 sind NEDD8-prozessierende Enzyme <i>in vitro</i> .....	22
Abbildung 14: DEN1 ist eine Deneddylase <i>in vitro</i> .....	23
Abbildung 15: DEN1 ist substratspezifisch <i>in vivo</i> . ....	24
Abbildung 16: DEN1 und CSN5 haben unterschiedliche Substrate <i>in vivo</i> . ....	25
Abbildung 17: DEN1 lokalisiert in den Zellkern und das Cytoplasma.....	26
Abbildung 18: Massenspektrometrische Identifizierung eines GG-Fingerabdrucks an K217 oder K218 von DEN1.....	28
Abbildung 19: DEN1 trägt eine Ubiquitin-Modifikation.....	29
Abbildung 20: DEN1K217218R verhält sich wie das wildtypische DEN1. ....	30
Abbildung 21: AXR1 ist ein neues NEDD8-Substrat. ....	33
Abbildung 22: AXR1-NEDD8 ist stabil und Teil des E1 Komplexes. ....	34
Abbildung 23: Die Modifikation von AXR1 beeinflusst die NEDD8 Thioesterbildung. ....	36
Abbildung 24: Die Neddylierung von AXR1 beeinträchtigt die Wachstumshemmung durch das Auxin 2,4-D.....	38
Abbildung 25: Der Verlust von DEN1 verstärkt den Phänotyp von <i>axr1-30</i> .....	39
Abbildung 26: Model des E1-E2 Reaktionsschemas.....	52
Abbildung 27: Die Funktion von DEN1 innerhalb des NEDD8-Systems.....	54

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der in der MS-Analyse identifizierten Proteine des NEDD8-Systems.....	31
Tabelle 2: Genotypisierungsprimer .....	57
Tabelle 3: Primerkombinationen für die Genotypisierung.....	57
Tabelle 4: Klonierungsprimer.....	57
Tabelle 5: Für Klonierungen verwendete Vektoren .....	58
Tabelle 6: Chemikalien .....	60
Tabelle 7: Enzyme und Kits .....	61
Tabelle 8: Marker und Substrate .....	61
Tabelle 9: Selektionsmittel.....	63
Tabelle 10: Über Restriktionsverdau-generierte Konstrukte.....	66
Tabelle 11: <i>Entry</i> -Klone .....	67

## Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX
AMP	Adenosinmonophosphat
ASK	Arabidopsis SKP
ATG	AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN
ATP	Adenosintriphosphat
AXL	AXR1-LIKE
AXR1	AUXIN RESISTANT 1
BCCPI	BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN 1
BRAP2	BRCA1-ASSOCIATED PROTEIN 2
BTB	BRIC-A-BRAC/TRAMTRAC/BROAD COMPLEX
CAND1	CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDYLATION-DISSOCIATED 1
CDC2	CELL DIVISION CONTROL 2
CHX	Cycloheximid
Col	Columbia
COP	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC
CRL	Cullin-RING-Ligase
CSN	COP9-Signalosom
CUL	Cullin
DCAF	DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR
DCN1	DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION 1
DDB1	DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1
DEN1	DENEDDYLASE 1
DEX	Dexamethason
DWD	DDB1-BINDING/WD-40
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUB	DEUBIQUITINATING ENZYME
DWD	DDB1-binding WD40 protein
E1	E1-aktivierendes Enzym
E2	E2-konjugierendes Enzym
E3	E3 Ligase
ECR1	E1 C-TERMINAL RELATED 1
HA	Hämagglutinin
HECT	HOMOLOGOUS TO E6-AP C-TERMINUS
HSN	HA-STREPII-NEDD8
HSUB	HA-STREPII-UBIQUITIN
HUB1	HOMOLOGOUS TO UBIQUITIN 1
ICE	INTERLEUCIN-1 $\beta$ -CONVERTING ENZYME
IP	Immunopräzipitation
ISG15	INTERFERON-INDUCED 15 kDa PROTEIN
JAMM	JAB1/MPN/MOV34
MDH1	MALAT DEHYDROGENASE 1

## Abkürzungen

---

MDM2	MOUSE DOUBLE MINUTE 2
MJD	MACHADO-JOSEPHIN DOMAIN
ML	MD-2-RELATED LIPID RECOGNITION
NBT	NitroblauTetrazoliumchlorid
NEDD8	NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8
NEDP1	NEDD8-SPECIFIC PROTEASE 1
OTU	OVARIAN TUMOR PROTEASE
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PDX11	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE SYNTHASE SUBUNIT PDX1.1
RBX1	RING-BOX 1
RCE1	RUB1 CONJUGATING ENZYME 1
RGA	REPRESSOR OF <i>ga1-3</i>
RING	REALLY INTERESTING NEW GENE
RNA	Ribonukleinsäure
RUB	RELATED TO UBIQUITIN
SCF	SKP, CUL1, F-Box
SDS	sodium dodecyl sulfate
SENP	SETRIN-SPECIFIC PROTEASE
SMURF1	SMAD UBIQUITINATION REGULATORY FACTOR 1
SUMO	SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER
T-DNA	Transfer-DNA
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
UBL	UBIQUITIN-LIKE PROTEIN
UBP	UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE
UB	UBIQUITIN
UCH	UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASE
UCHL1	UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE ISOFORM L1
UFD	UBIQUITIN FOLD DOMAIN
UFM1	UBIQUITIN-FOLD MODIFIER 1
ULP	UBIQUITIN-LIKE PROTEASE
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
URM1	UBIQUITIN-RELATED MODIFIER 1
USP	UBIQUITIN-SPECIFIC PROCESSING PROTEASE
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein
YUH1	YEAST UBIQUITIN HYDROLASE 1

## Zusammenfassung

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8) gehört wie das ebenso verwandte SUMO (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER) zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine. Natives NEDD8 wird C-terminal prozessiert und wie Ubiquitin oder SUMO reversibel an verschiedene Proteinsubstrate konjugiert. Die Culline, Gerüstuntereinheiten der Cullin-RING E3 Ubiquitinligasen (CRLs), sind die prominentesten Substrate der Neddylierung. Die Aktivität von CRLs wird unter anderem über den Zyklus von Neddylierung und Deneddylierung reguliert. Neben der CRL-Regulation sind in Pflanzen bisher keine weiteren Funktionen der Neddylierung bekannt. Dies steht im starken Gegensatz zu den vielfältigen Funktionen der Ubiquitylierung oder Sumoylierung.

Die Cysteinprotease DEN1 (DENEEDYLASE 1) hat *in vitro* eine duale Aktivität als NEDD8-prozessierendes und NEDD8-dekonjugierendes Enzym. Wie ich durch die Studie von Arabidopsis *den1* Mutanten zeigen konnte, ist DEN1 in Arabidopsis nicht essenziell für die NEDD8 Prozessierung, sondern agiert wahrscheinlich in redundanter Weise mit anderen DUBs (DEUBIQUITINATING ENZYMES) wie UCH3 (UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASE 3). *den1* Mutanten akkumulieren im Gegenteil ein breites Sortiment neddylierter Proteine, bei denen es sich nicht um Culline handelt. Diese Beobachtung ist ein klarer Hinweis auf die umstrittene Existenz weiterer noch unbekannter NEDD8-Substrate. Der Vergleich mit Mutanten der zweiten bekannten Deneddyase, der Untereinheit 5 des COP9-Signalosoms (CSN5), zeigte, dass DEN1 und CSN5 unterschiedliche Funktionsbereiche haben. Während CSN5 NEDD8 spezifisch von den Cullinen dekonjugiert, scheint DEN1 für die Deneddylierung anderer NEDD8-Substrate zu sorgen.

Mit AXR1 konnte ich das erste dieser DEN1-spezifischen NEDD8-Substrate aus Pflanzen identifizieren. AXR1 ist die katalytische Untereinheit des NEDD8 E1-aktivierenden Enzyms und wird über einen noch unbekanntem Mechanismus autoneddyliert. Wie die Analyse von *axr1 den1* Doppelmutanten und Versuche mit dem E1 Inhibitor MLN4924 zeigten, führt die Neddylierung von AXR1 zu einer verminderten E1 Aktivität und beeinträchtigt auf diese Weise die E2 Thioesterbildung und die CRL-Regulation. DEN1 funktioniert in diesem Zusammenhang entweder als Scavenger, um das Reservoir an unmodifiziertem E1 Enzym aufrechtzuerhalten oder als Teil eines Rückkopplungs-Mechanismus zur Regulation des NEDD8-Systems.

## Summary

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8) belongs to the family of ubiquitin-like proteins. Like ubiquitin or the related SUMO, native NEDD8 is C-terminally processed and reversibly conjugated to different substrate proteins. The cullins, scaffold subunits of cullin-RING E3 ubiquitin ligases (CRLs), are the most prominent neddylation substrates. Cycles of neddylation and deneddylation are one process for the regulation of CRL activity. So far, there are no other known functions for NEDD8 in plants. This is in stark contrast to the manifold functions reported for ubiquitylation or sumoylation.

The cysteine protease DEN1 (DENEDDYLASE 1) functions as a NEDD8 processing and deconjugating enzyme *in vitro*. Through the analysis of *den1* mutants from Arabidopsis, I could show that DEN1 is not essential for NEDD8 processing in Arabidopsis and may thus act redundantly with other DUBs (DEUBIQUITINATING ENZYMES) like UCH3 (UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASE 3). On the contrary, *den1* mutants accumulate a broad range of non-cullin NEDD8 conjugates. This provides direct evidence for as yet unknown NEDD8 conjugates, the existence of which has generally been questioned. The comparison with mutants of the second known deneddylase, subunit 5 of the COP9 signalosome (CSN5), showed a distinct function for DEN1 and CSN5, respectively. While CSN5 specifically cleaves the isopeptide bond between NEDD8 and the cullin proteins, DEN1 functions as a general deneddylase for these other neddylation substrates.

With AXR1, I could identify the first of these DEN1-specific NEDD8 substrates in plants. AXR1 is the regulatory subunit of the NEDD8 E1 activating enzyme that becomes autoneedylated *via* an as yet unknown mechanism. Experiments with *axr1 den1* double mutants and the E1 inhibitor MLN4924 showed that AXR1 neddylation reduces E1 activity. This has a negative effect on E2-NEDD8 thioester formation and CRL function. In this context, DEN1 might function as a scavenger to replenish the pool of unmodified E1 or as part of a feedback mechanism to regulate the NEDD8 conjugation machinery.

# 1. Einleitung

Die Steuerung zellulärer Prozesse erfordert die dynamische Regulation der Verfügbarkeit und Aktivität der beteiligten Proteine. Posttranslationale Modifikationen werden genutzt, um die Wechselwirkungen zwischen Interaktionspartnern und die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle zu beeinflussen oder um die verfügbare Menge eines Proteins zu bestimmten Zeiten zu ändern. Kleine chemische Moleküle wie Phosphat- und Acetatgruppen sind klassische Beispiele für solche reversiblen Modifikationen, die durch ihr Anhängen an Proteine eine schnelle Antwort auf interne oder externe Signale ermöglichen. Neben chemischen Gruppen können auch kleine Peptide stabile Bindungen mit einem Protein eingehen, um seine chemischen Eigenschaften zu beeinflussen. Die Konjugation von Ubiquitin (Ubiquitylierung) war in den 70er Jahren die erste solche Peptidmodifikation, die identifiziert werden konnte. Die bahnbrechenden Arbeiten von Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose zur Aufklärung des Ubiquitin-Konjugationsmechanismus und der Funktionsweise des Proteasom-Systems wurden 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt [Hershko and Ciechanover, 1998; Herrmann et al., 2007]. Fast 40 Jahre nach der Entdeckung von Ubiquitin hat das Gebiet der Peptidmodifikationen noch an Komplexität hinzugewonnen. Neben Ubiquitin wurden inzwischen eine ganze Reihe Ubiquitin-verwandter Proteine identifiziert, die durch ihre reversible Verknüpfung Prozesse wie Proteinabbau und Proteinsynthese, Signaltransduktion oder die Zellzyklusregulation beeinflussen.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist das Ubiquitin-verwandte Protein NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8). NEDD8 ist unter anderem an der Regulation des Proteinabbaus beteiligt und seine wichtige Rolle wird dadurch unterstrichen, dass ein Funktionsverlust des *NEDD8*-Gens in fast allen eukaryotischen Spezies letal ist. In Menschen erlangte das NEDD8-System in den letzten Jahren als ein vielversprechendes Ziel der Krebsforschung erhöhte Aufmerksamkeit [Soucy et al., 2009; Tanaka et al., 2012]. Für die Pflanzenforschung kennt man die Bedeutung der sogenannten Neddylierung seit den 90er Jahren bei der Regulation von Phytohormonsignalwegen und der Licht-Signaltransduktion [Santner and Estelle, 2009; Lau and Deng, 2012]. Viele Fragen zur Funktion und der Regulation von NEDD8 sind jedoch noch offen. Trotz der großen Ähnlichkeit von Peptidmodifikationen wie NEDD8, Ubiquitin und SUMO (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER) beschränkt sich das Wissen über die Modifikation mit NEDD8 auf wenige Proteine, während die Anzahl an bekannten Substraten für Ubiquitin und SUMO stetig ansteigt [Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Callis, 2014; Enchev et al., 2014]. Ein besonderer Fokus liegt daher auf der Identifizierung neuer NEDD8-Substrate, um über ihre funktionelle Charakterisierung einen Einblick in die verschiedenen Funktionen der Neddylierung zu gewinnen. Die folgenden



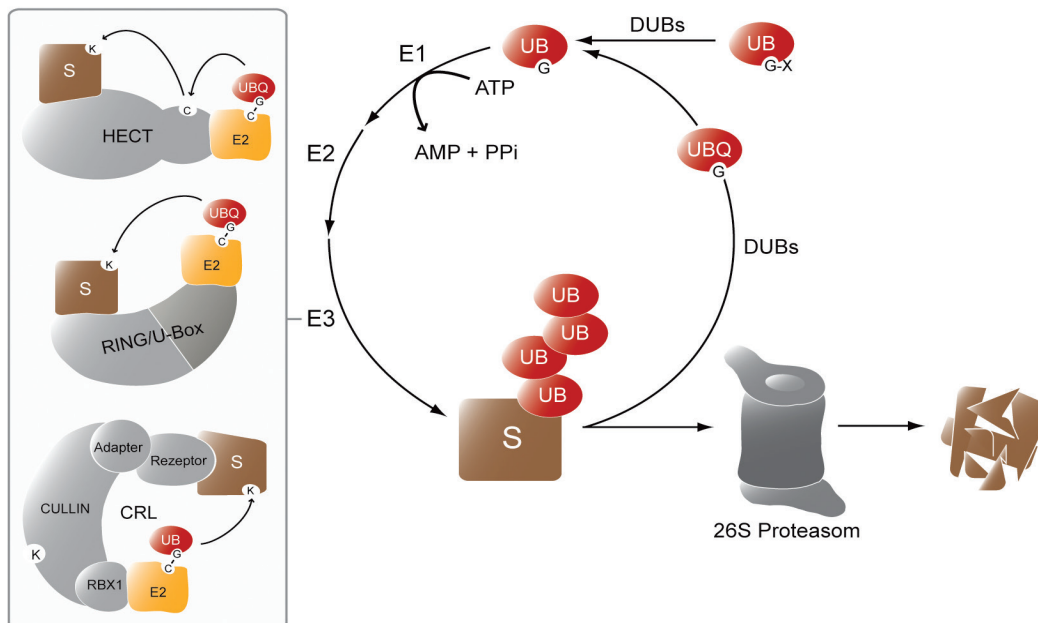
Abschnitte geben eine Einführung zu den verschiedenen Komponenten des NEDD8-Modifikationsweges und ihrer bisher bekannten Funktion.

## 1.1. Ubiquitin reguliert den Proteinabbau

NEDD8 ist nicht nur evolutionär sondern auch hinsichtlich seiner bisher bekannten Funktionen eng mit dem Ubiquitin-System verbunden. Ubiquitin ist ein innerhalb der Eukaryoten hoch konserviertes Protein von 76 Aminosäuren, das über eine Enzymkaskade bestehend aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer E3 Ubiquitinligase (E3) mit einem Substrat verknüpft wird (Abbildung 1). Dabei bildet sich eine kovalente Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin (Gly, G) von Ubiquitin und einem Lysin (Lys, K) des Zielproteins.

Wie Ubiquitin selbst, sind auch die Komponenten des Konjugationssystems (E1, E2, E3) innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert. Unterschiede zwischen den verschiedenen Organismen finden sich vor allem in der Diversität der E3 Ubiquitinligasen, die die Substratspezifität der Ubiquitylierung vermitteln. In Pflanzen unterscheidet man basierend auf ihrem Funktionsmechanismus und ihrem Aufbau drei Hauptklassen von E3 Ubiquitinligasen: HECT (HOMOLOGOUS TO E6-AP COOH TERMINUS), RING (REALLY INTERESTING NEW GENE)/ U-Box und CRL (Cullin-RING-Ligase). Während HECT und RING/U-Box E3 Ligasen aus einer einzigen Untereinheit bestehen, handelt es sich bei den CRL E3 Ligasen um Proteinkomplexe bestehend aus einem RING-Protein, das die Interaktion mit dem E2 Enzym vermittelt, einer Gerüstuntereinheit und einer Substrat-erkennenden Untereinheit [Moon et al., 2004; Chen et al., 2006] (Abbildung 1). In Arabidopsis gibt es schätzungsweise etwa 1500 verschiedene E3 Ubiquitinligasen [Kraft et al., 2005; Stone et al., 2005; Hua and Vierstra, 2011].

Ubiquitin verfügt über sieben interne Lysine. Daher kann eine Wiederholung des Konjugationszyklus zur Bildung von Ubiquitinketten führen. Die Konjugation von einem oder mehreren Ubiquitinmonomeren (Monoubiquitylierung) oder von unterschiedlich verknüpften Ketten (Polyubiquitylierung) dient jeweils als spezifische Markierung mit verschiedenen Funktionen und Konsequenzen für das Substratmolekül [Komander and Rape, 2012]. Eine über Lysin48 verknüpfte Ketten aus mindestens vier Ubiquitinmonomeren dient zum Beispiel als Erkennungssignal für den Abbau eines Proteins über das 26S Proteasom, einem ATP-abhängigen Proteasekomplex, der für die Entfaltung und den Abbau polyubiquitylierter Proteine sorgt [Chau et al., 1989; Voges et al., 1999] (Abbildung 1). Zusammen haben Ubiquitin und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) Einfluss auf beinahe alle pflanzlichen Entwicklungs- und Wachstumsprozesse, von der Regulation des Zellzyklus über die Photomorphogenese und die Phytohormon-Signalwege bis hin zur Pathogenabwehr.



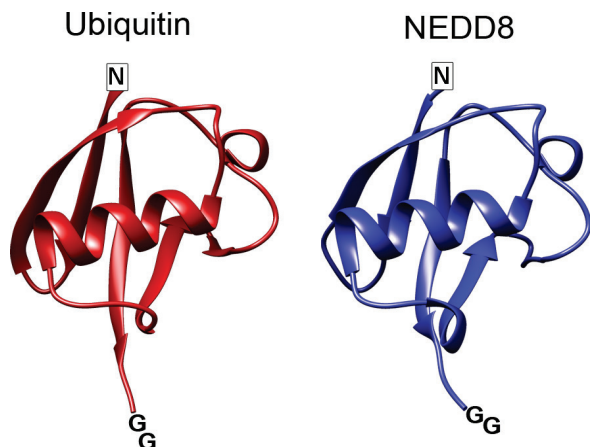
**Abbildung 1: Der Proteinabbau über das 26S Proteasom.**

Ubiquitin (UB) wird nach der Prozessierung durch ein E1-aktivierendes Enzym unter ATP-Verbrauch aktiviert, auf ein E2-konjugierendes Enzym transferiert und mittels einer E3 Ligase (HECT/ RING/U-Box/ CRL) kovalent an ein spezifisches Substrat (S) gebunden. Durch die Wiederholung des Zyklus kann eine Ubiquitinkette gebildet werden, die das Substrat für den Abbau über das 26S Proteasom markiert. Die Ubiquitine werden von deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) vor dem Abbau vom Substrat abgespalten und recycelt. Cystein (C), Glycin (G), Lysin (K), variable C-terminale Aminosäure(n) (X).

## 1.2. NEDD8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein

Basierend auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Ubiquitin konnte mittlerweile eine ganze Reihe Ubiquitin-ähnlicher Proteine identifiziert werden, die als UBLs (UBIQUITIN-LIKE PROTEINS) bezeichnet werden. UBLs zeichnen sich durch eine charakteristische 3-dimensionale Kernstruktur, dem sogenannten Ubiquitin-Faltungsmotiv aus, welches aus einer  $\alpha$ -Helix umschlossen von einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt besteht [Burroughs et al., 2012a]. In Pflanzen sind bisher die UBLs RUB (RELATED TO UBIQUITIN), SUMO, ATG8 (AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 8), ATG12 (AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 12), UFM1 (UBIQUITIN-FOLD MODIFIER 1), URM1 (UBIQUITIN-RELATED MODIFIER 1), HUB1 (HOMOLOGOUS TO UBIQUITIN 1) und einige strukturell ähnliche Proteine bekannt [Vierstra, 2012]. Unter diesen UBLs zeigt RUB, mit dessen Regulation und Substraten sich diese Arbeit beschäftigt, die größte Ähnlichkeit zu Ubiquitin. RUB und Ubiquitin haben etwa 62 % identische Aminosäuren und zudem eine bemerkenswert ähnliche Kristallstruktur [Rao-Naik et al., 1998; Singh et al., 2012] (Abbildung 2). In Menschen und tierischen Systemen wird RUB als NEDD8 bezeichnet, da es ursprünglich in einem genetischen Screen als eines von mehreren während der Gehirnentwicklung in Mäusen herunterregulierten Genen identifiziert wurde [Kamitani et al., 1997]. RUB/NEDD8 ist innerhalb der Eukaryoten hoch

konserviert [Kumar et al., 1993; Rao-Naik et al., 1998; Burroughs et al., 2012b; Mergner and Schwechheimer, 2014] und ein Verlust des NEDD8-Systems ist in den meisten Organismen letal [Jones and Candido, 2000; Osaka et al., 2000; Tateishi et al., 2001; Kurz et al., 2002; Ou et al., 2002; Dharmasiri et al., 2003]. Die einzige bekannte Ausnahme ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, in der das NEDD8-System zwar konserviert, aber nicht essenziell ist [Lammer et al., 1998; Liakopoulos et al., 1998].

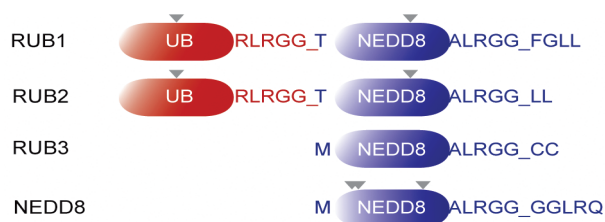


**Abbildung 2: Kristallstruktur von Ubiquitin und NEDD8.**

Die 3-dimensionale Faltung von Ubiquitin und NEDD8 ist hochkonserviert. Die Strukturen wurden der RCSB Proteindatenbank (PDB) entnommen und mit der Software UCSF Chimera nachbearbeitet. Ubiquitin (1UBQ); NEDD8 (1NDD); N-Terminus (N); Glycin75, Glycin76 (GG).

### 1.2.1. In Arabidopsis ist NEDD8 als Fusionsprotein kodiert

In Arabidopsis gibt es drei RUB/NEDD8 kodierende Gene *RUB1* (*UBQ15*), *RUB2* (*UBQ7*) und *RUB3* (*UBQ16*). Zwischen *RUB1* und *RUB2* ist nur eine der 76 Aminosäuren unterschiedlich, während *RUB3* sich in 16 Aminosäuren von *RUB1* und *RUB2* unterscheidet. Zudem sind *RUB1* und *RUB2*, aber nicht *RUB3*, als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Ubiquitin kodiert [Rao-Naik et al., 1998] (Abbildung 3).



**Abbildung 3: NEDD8-kodierende Gene in *Arabidopsis thaliana*.**

Schematische Darstellung der Proteindomänen von NEDD8-Paralogen aus Arabidopsis (*RUB1*, *RUB2*, *RUB3*) und Mensch (*NEDD8*). Hervorgehoben sind die letzten 5 Aminosäuren von Ubiquitin (UB) und NEDD8 vor den proteolytischen Schnittstellen (△), die erste Aminosäure von NEDD8 und die C-terminale Aminosäurenextension. Die Position der Introne in den jeweiligen Genen ist durch ein Dreieck markiert.

(nach Mergner and Schwechheimer [2014])

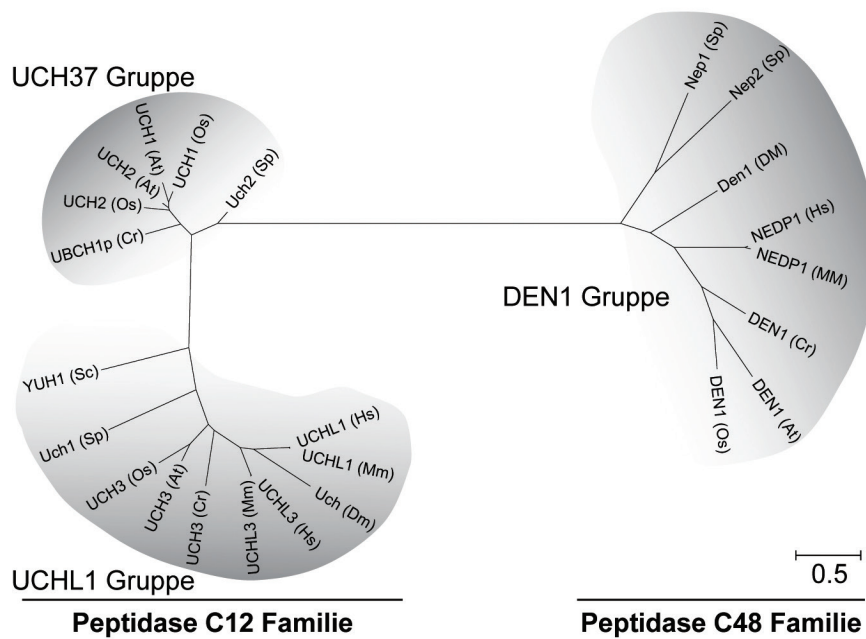
Während *RUB1* und *RUB2* in allen Organen von Arabidopsis exprimiert werden, findet sich für *RUB3* nur eine Expression in den Blütenknospen und dem Stängel. Dies weist auf eine spezielle Funktion von *RUB3* hin [Rao-Naik et al., 1998]. Die beiden Gene *RUB1* und *RUB2* haben dagegen eine redundante Funktion und in der Doppelmutante *rub1 rub2* kommt es

im Zweizellstadium zum Abbruch der Embryonalentwicklung [Bostick et al., 2004]. Durch die Prozessierung der RUB1 und RUB2 Vorläuferproteine werden die beiden reifen Untereinheiten Ubiquitin und RUB/NEDD8 freigesetzt (siehe unten). RUB/NEDD8 wird im weiteren Textverlauf als NEDD8 bezeichnet.

### 1.2.2. NEDD8 wird am C-Terminus prozessiert

Wie Ubiquitin und die meisten anderen UBLs wird NEDD8 zunächst als ein Vorläuferprotein mit einer kurzen zusätzlichen Peptidsequenz am C-Terminus gebildet, die prozessiert werden muss, um das reife NEDD8 zu bilden [Rao-Naik et al., 1998; Vierstra, 2012]. Die beiden von *RUB1* und *RUB2* kodierten Ubiquitin:NEDD8 Fusionsproteine benötigen demnach zwei Prozessierungsschritte am N-Terminus und C-Terminus von NEDD8. Welche Proteasen für die NEDD8 Prozessierung verantwortlich sind, ist gegenwärtig noch unklar [Rabut and Peter, 2008; Enchev et al., 2014; Mergner and Schwechheimer, 2014]. Vielversprechende Kandidaten finden sich in der Familie der UCHs (UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASES), die an der Prozessierung von Pro-Ubiquitin beteiligt sind [Larsen et al., 1998; Eletr and Wilkinson, 2014]. Für eine der vier UCHs aus Menschen, UCHL3 (UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL ESTERASE L3), konnte zumindest *in vitro* eine duale Spezifität für sowohl Ubiquitin als auch NEDD8 gezeigt werden [Wada et al., 1998]. Darüber hinaus konnte für Mutanten von YUH1 (YEAST UBIQUITIN HYDROLASE 1), dem einzigen UCH Homolog aus *S. cerevisiae*, eine verminderte Prozessierung des NEDD8 Vorläuferproteins gezeigt werden [Linghu et al., 2002]. In Arabidopsis gibt es drei Vertreter der UCH Familie: UCH1, UCH2 und UCH3. Phylogenetische Analysen zeigen, dass UCH1 und UCH2 nahe mit den Proteasen der UCH37-Gruppe verwandt sind. Dagegen ist UCH3 in der UCHL1-Gruppe zu finden, zu der auch UCHL3 und YUH1 gehören [Yang et al., 2007; Mergner and Schwechheimer, 2014] (Abbildung 4).

Ein weiterer Kandidat für die NEDD8 Prozessierung ist die Cysteinprotease DEN1 (DENEDDYLAASE 1), auch genannt NEDP1 (NEDD8-SPECIFIC PROTEASE 1) oder SENP8 (SENTRIN-SPECIFIC PROTEASE 8). Die orthologen Proteine aus Mensch und Drosophila sind *in vitro* in der Lage NEDD8 zu prozessieren [Gan-Erdene et al., 2003; Chan et al., 2008]. Mit der Ausnahme von YUH1 konnte jedoch für keine der genannten Proteasen eine essenzielle Funktion in der NEDD8 Prozessierung *in vivo* nachgewiesen werden.

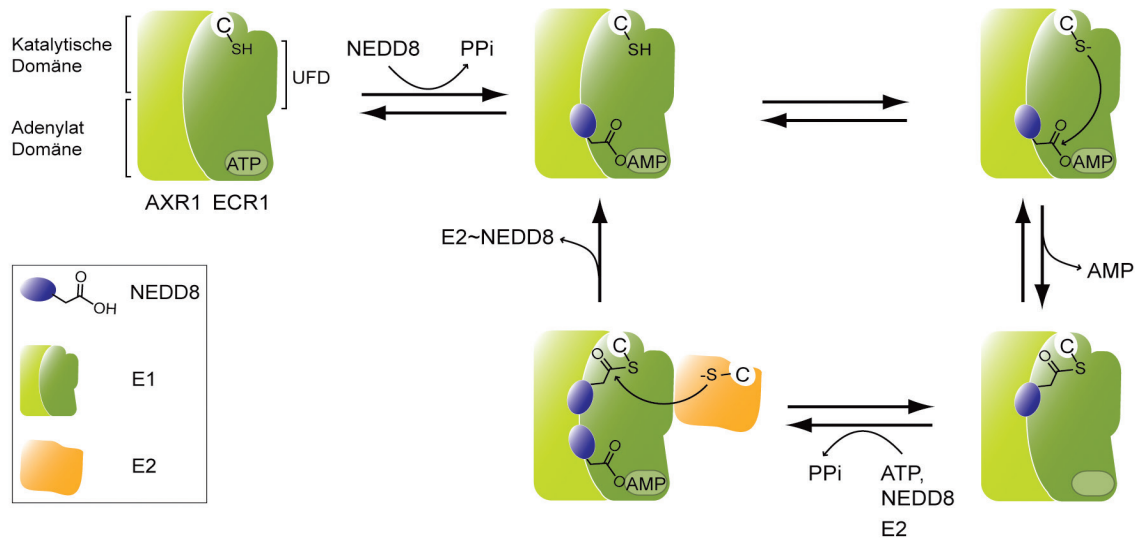


**Abbildung 4:**  
**Kandidatenproteine für die NEDD8 Prozessierung.**  
 Phylogenie repräsentativer Vertreter der UCH37, UCHL1 und DEN1 Proteine aus Arabidopsis (At), Reis (Os), Grünalge (Cr) Bäckerhefe (Sc), Spalt- hefe (Sp), Drosophila (Dm), Maus (Mm) und Mensch (Hs).  
 (nach Mergner and Schwechheimer [2014])

### 1.2.3. Die Neddylierung erfolgt über eine Enzymkaskade

Der Mechanismus der Neddylierung entspricht dem enzymatischen Ablauf der Ubiquitin-Konjugation. In der Tat sind der Mechanismus und die Komponenten des Modifikationsweges zwischen Ubiquitin und den verschiedenen UBLs erstaunlich ähnlich, was auf einen gemeinsamen Entwicklungsursprung schließen lässt [Vierstra, 2012]. Das reife NEDD8 bildet zuerst unter ATP-Verbrauch eine reaktive Thioesterbindung mit dem E1-aktivierenden Enzym (Abbildung 5). In Arabidopsis wird das E1 von einem Heterodimer aus der regulatorischen Untereinheit AXR1 (AUXIN RESISTANT 1) und der katalytischen Untereinheit ECR1 (E1 C-TERMINAL RELATED 1) gebildet. AXR1 entspricht dabei dem N-Terminus und ECR1 dem C-Terminus des aus einem einzigen Polypeptid bestehenden Ubiquitin E1 Enzyms.

Das NEDD8 E1 Enzym bindet zunächst ein ATP-Molekül in einer Nukleotidbindetasche im N-Terminus von ECR1. NEDD8 wird über die Interaktion mit der AXR1 und ECR1 Untereinheit so ausgerichtet, dass sich der NEDD8 C-Terminus ebenfalls genau in die Nukleotidbindetasche einpasst und die Bildung eines NEDD8-Adenylates ermöglicht. Diese energiereiche Bindung wird daraufhin vom Cystein des aktiven Zentrums angegriffen, so dass sich eine Thioesterbindung zwischen Cystein215 von ECR1 und dem C-terminalen Glycin76 von NEDD8 bildet [Walden et al., 2003]. Im nächsten Schritt bindet das E1 ein weiteres NEDD8 über die Adenylatdomäne, so dass ein doppelt beladenes E1 Enzym mit einem kovalent über einen Thioester gebundenen NEDD8 (NEDD8(T)) und einem zweiten nichtkovalent gebundenem NEDD8-Adenylat (NEDD8(A)) vorliegt (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Aktivierung von NEDD8 über das heterodimere E1 Enzym.**

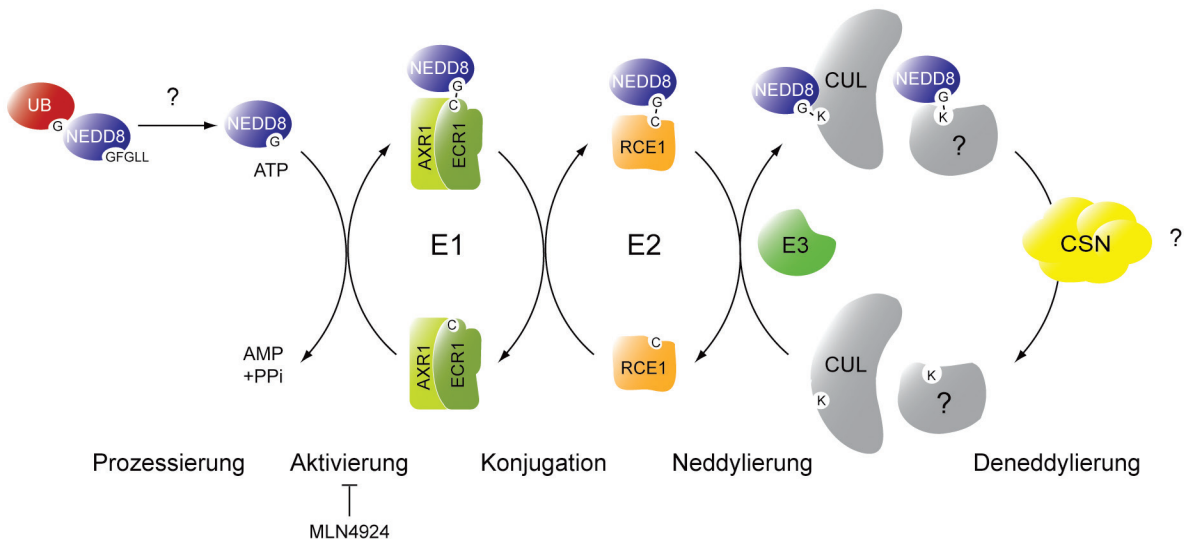
Die Aktivierung von NEDD8 durch das E1 Enzym benötigt die aufeinanderfolgende Bindung von ATP und NEDD8 über die Adenylatdomäne von ECR1. Die Konjugation von AMP aktiviert den NEDD8 C-Terminus und ermöglicht die Thioesterbindung an das Cystein (C) des aktiven Zentrums in der katalytischen Domäne von ECR1. Die Bindung eines zweiten NEDD8-Monomers über die Adenylatdomäne führt zu einer Konformationsänderung, der Bindung des E2 Enzyms über die Ubiquitin-faltung-Domäne (UFD) von ECR1 und dem Transfer von NEDD8 auf das Cystein des aktiven Zentrums von E2. (nach Enchev et al. [2014])

Durch die Doppelbelastung des E1 kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Bindung des E2-konjugierenden Enzyms, in Arabidopsis RCE1 (RUB1 CONJUGATING ENZYME 1), über die UFD (UBIQUITIN FOLD DOMAIN) Domäne von ECR1 ermöglicht. Über eine Transthoester-Reaktion wird NEDD8(T) anschließend auf das aktive Cystein113 von RCE1 übertragen und der neu gebildete E2-NEDD8 Thioester trennt sich vom E1 Enzym [Huang et al., 2007]. Der NEDD8 Thioester fungiert in diesem Zusammenhang als eine Art Schalter, der die Affinitäten der verschiedenen E1- und E2-Formen zueinander reguliert. Die Bildung des E1 Thioesters begünstigt die Interaktion mit dem freien E2, während der Übergang von NEDD8 auf das E2 zur Ablösung des E2 Thioesters von dem nun seinerseits freien E1 führt [Huang et al., 2007]. Im abschließenden Schritt der Enzymkaskade bindet der E2-NEDD8 Thioester, üblicherweise mit Hilfe einer E3 Ligase, an das jeweilige Substratprotein und es bildet sich eine kovalente Isopeptidbindung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Substrats und dem C-terminalen Glycin von NEDD8 [Walden et al., 2003] (Abbildung 6).

Im Vergleich zur großen Anzahl an E3 Ligasen des Ubiquitin-Systems haben die meisten UBLs entweder nur sehr wenige oder gar keine bekannten E3 Ligasen [Kerscher et al., 2006]. Für das NEDD8 System ist die CRL-Untereinheit RBX1 (RING BOX 1) ein Kandidat einer E3 Ligase, die die Interaktion zwischen dem NEDD8 E2 und den Cullinen ermöglicht [Morimoto et al., 2000; Gray et al., 2002]. Des Weiteren wurde DCN1

(DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION 1) als eine NEDD8 E3 Ligase beschrieben [Kurz et al., 2005; Kurz et al., 2008; Meyer-Schaller et al., 2009].

Wie Ubiquitin kann auch NEDD8 im Prinzip Ketten bilden, indem eines der internen Lysine als Modifikationsstelle für ein weiteres NEDD8 Monomer dient [Rao-Naik et al., 1998]. Es wird jedoch angenommen, dass die meisten NEDD8-Substrate an einem oder mehreren Lysinen mononeddylt werden [Girdwood et al., 2011].



**Abbildung 6: Neddylierung und Deneddylierung.**

Nach der Prozessierung des Ubiquitin (UB)-NEDD8 Vorläuferproteins wird NEDD8 von dem heterodimeren E1 Enzym bestehend aus AXR1 und ECR1 unter ATP-Verbrauch aktiviert. Im nächsten Schritt wird das über einen Thioester gebundene NEDD8 an das NEDD8-konjugierende Enzym RCE1 weitergegeben und schließlich mit Hilfe einer E3 Ligase kovalent an ein Lysin des Substrats gebunden. NEDD8 kann durch Deneddylasen, wie das COP9-Signalosom (CSN), wieder abgespalten werden. Das ATP-Analog MLN4924 ist ein kompetitiver Inhibitor des Aktivierungsschrittes der Enzymkaskade und hemmt die Neddylierung. Glycin (G); Cystein (C); Lysin (K); Leucin (L); Phenylalanin (F); Cullin (CUL).

**1.2.4. MLN4924 ist ein spezifischer Inhibitor der Neddylierung**

Auf der Suche nach neuen Krebsmedikamenten wurde in der Firma Millenium Pharmaceuticals vor einigen Jahren das AMP-Analog MLN4924 als ein Inhibitor der Neddylierung entdeckt [Soucy et al., 2009]. MLN4924 bindet in der Nukleotidbindetasche von ECR1 und reagiert mit NEDD8 (T) zu einem NEDD8-MLN4924-Addukt. Diese Verbindung fungiert dann als ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der sehr stark an das E1 bindet und dadurch seine Aktivität beeinträchtigt [Brownell et al., 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass MLN4924 spezifisch nur das NEDD8-aktivierende Enzym, nicht aber die strukturell verwandten E1 Enzyme des Ubiquitin- oder SUMO-Weges inhibiert [Soucy et al., 2009]. Durch die Hemmung des NEDD8 E1 beeinflusst MLN4924 die Regulation der CRLs (siehe unten) und damit den CRL-abhängigen Proteinabbau. Da essenzielle zelluläre Abläufe wie



der Zellzyklus auf die CRL-Funktion angewiesen sind, eignet sich MLN4924 als ein neuer Ansatzpunkt für die Modulation des Ubiquitin-Systems im Rahmen der Krebsbehandlung [Soucy et al., 2009]. Aufgrund der hohen Konservierung des Neddylierungsweges in Eukaryoten kann MLN4924 auch in pflanzlichen Systemen eingesetzt werden [Hakenjos et al., 2011]. Die Reaktion auf die Behandlung mit MLN4924 ist außerdem eines der Kriterien zur Identifizierung neuer NEDD8-Substrate (siehe unten) und wurde auch in dieser Arbeit entsprechend genutzt.

### 1.2.5. Es gibt nur wenige bekannte NEDD8-Substrate

Die prominentesten und am besten charakterisierten NEDD8-Substrate sind die Culline. Culline bilden die Gerüstuntereinheiten der CRLs und spielen daher eine wichtige Rolle in der Regulation des Proteinabbaus über das 26S Proteasom. Die Position der NEDD8-Modifikation ist jeweils eine innerhalb der verschiedenen Culline konservierte Aminosäuresequenz, IVRIMKMR [Wada et al., 1999; Pan et al., 2004]. Studien in tierischen Systemen, vor allem in humanen Zellkulturen, führten in den letzten Jahren zur Entdeckung einer Reihe von weiteren NEDD8-Substraten [Rabut and Peter, 2008; Enchev et al., 2014; Mergner and Schwechheimer, 2014]. Viele dieser Substrate haben eine Verbindung zu Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Alzheimer oder Parkinson, was auch das Interesse der medizinischen Forschung für das Neddylierungssystem und seine Regulation geweckt hat. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Neddylierung in Mäusen eine wichtige Funktion in der Synapsenreifung und der Stabilität des Dornenfortsatzes spielt [Vogl et al., 2015].

In Pflanzen konnte mit ML3 bislang nur ein weiteres NEDD8-Substrat neben den Cullinen experimentell bestätigt werden. ML3 gehört zur Familie der ML-Protein, die sich durch ein Signalpeptid für den Import in das Endoplasmatische Reticulum und eine ML-Domäne auszeichnen. ML3 hat in Arabidopsis vermutlich eine Funktion in der Pathogenabwehr [Hakenjos et al., 2013]. Zusätzlich wurde für die CRL Adapter-Untereinheit DDB1a in einem *in planta* Neddylierungs-Assay eine NEDD8-Modifikation gezeigt. Über das Auftreten dieser Neddylierung unter endogenen Bedingungen und ihre mögliche molekulare Funktion ist aber noch nichts bekannt [Hotton et al., 2012].

Auch in pflanzlichen Systemen werden noch weitere NEDD8-Substrate vermutet. Ihre geringe Abundanz und die vermutlich hohen Plastizität der Modifikation gestaltet eine Identifikation jedoch als schwierig. Eine weitere Hürde für die Entdeckung neuer NEDD8-Substrate ist die nahe Verwandtschaft und Sequenzähnlichkeit zwischen NEDD8 und Ubiquitin. Zum einen ist die Unterscheidung zwischen einer NEDD8- oder Ubiquitin-Modifikation mittels Massenspektrometrie erschwert, da der standardmäßig verwendete Trypsinverdau zu einem identischen GG-Fingerabdruck an modifizierten Peptiden führt. Zum



anderen konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass ein Überschuss an NEDD8 zu einer Aktivierung des Ubiquitin E1 Enzyms mit NEDD8 führt [Hjerpe et al., 2012a; Leidecker et al., 2012; Singh et al., 2012]. Die Verlagerung des Verhältnisses zwischen freiem NEDD8 und Ubiquitin, das unter normalen Umständen in der Zelle nahe bei eins liegt, hin zu NEDD8 führt demnach zu einer fälschlichen Konjugation von NEDD8 an Ubiquitin-Substrate [Hjerpe et al., 2012b; Leidecker et al., 2012].

Die Überexpression von NEDD8 im Rahmen von experimentellen Untersuchungen kann demnach zur Bildung von Artefakten führen. Für potentielle NEDD8-Substrate sollten daher die Kriterien einer „echten“ Neddylierung beachtet werden, die kürzlich aufgestellt wurden [Rabut and Peter, 2008; Enchev et al., 2014]. Demnach sollte: (1) Eine kovalente Bindung zwischen NEDD8 und dem jeweiligen Substrat nachgewiesen werden. (2) Die Neddylierung unter homöostatischen Bedingungen und mit endogenen Konzentrationen von NEDD8 und dem Substrat erfolgen. (3) Die Reaktion sollte empfindlich gegen den NEDD8 E1-Inhibitor MLN4924 sein. Idealerweise sollten zudem die an der Reaktion beteiligten E2 und E3 Enzyme identifiziert werden und die regulatorischen oder biologischen Auswirkungen der Modifikation aufgeklärt werden.

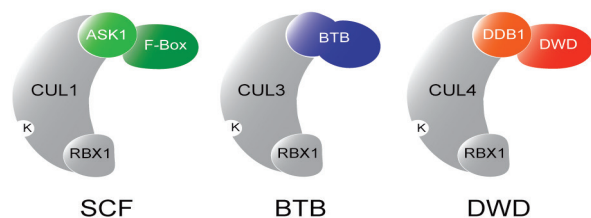
### 1.3. NEDD8 reguliert die CRL-Aktivität

#### 1.3.1. CRLs bilden die größte Familie der E3 Ubiquitinligasen

Da die Culline wichtige NEDD8-Substrate sind, ist der NEDD8-Weg intensiv mit den CRL-Komplexen und dem proteasomalen Proteinabbau verbunden. CRLs werden anhand ihrer Untereinheiten in verschiedene Kategorien unterteilt, besitzen aber grundsätzlich einen ähnlichen Aufbau (Abbildung 7). Der Kernkomplex besteht aus einem Cullin als zentraler Gerüstuntereinheit und RBX1, welches sowohl als NEDD8 E3 Ligase fungiert, als auch für die Rekrutierung des Ubiquitin E2 Enzyms sorgt [Morimoto et al., 2000; Petroski and Deshaies, 2005; Bosu and Kipreos, 2008]. Die Spezifität der jeweiligen CRL wird über die zusätzliche Substrat-erkennende Untereinheit vermittelt, die entweder direkt oder über einen Adapter an Cullin bindet. In Arabidopsis wurden bisher drei CRL-Typen charakterisiert, SCF (S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1/CELL DIVISION CONTROL PROTEIN 53/F-Box), BTB (BRIC-A-BRACK/TRAMTRACK/BROAD COMPLEX) und DWD (DDB1-BINDING/WD-40) [Hua and Vierstra, 2011].

Mit beinahe 700 Adapter/Substraterkennungs-Modulen sind SCFs die größte CRL-Gruppe in Arabidopsis. Sie bestehen aus einer Cullin1-Untereinheit, RBX1, einem Adapterprotein ASK (ARABIDOPSIS SKP) und einer variablen F-Box Proteinuntereinheit [Hua and Vierstra, 2011]. BTB-Komplexe werden von den Cullin3 Isoformen, RBX1 und einem Vertreter der diversen Familie von etwa 80 BTB Proteinen als austauschbarer

Adapter/Substratrezeptor-Untereinheit gebildet [Furukawa et al., 2003; Xu et al., 2003; Gingerich et al., 2005]. Cullin4 dient als Untereinheit der etwa 85 DWD CRLs zusammen mit RBX1, dem Adapterprotein DDB1 (DAMAGED DNA-BINDING 1) und der Substrat-erkennenden Untereinheit DWD (DDB1-BINDING/WD-40) [Bernhardt et al., 2006; Lee et al., 2008; Zhang et al., 2008; Chen et al., 2010].

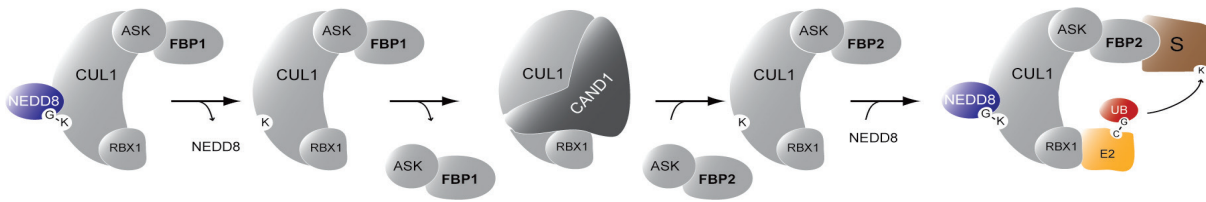


**Abbildung 7: Schematische Darstellung der CRL E3 Ligasen aus Arabidopsis.**

CRLs bestehen aus einem Kernkomplex aus der jeweiligen Cullin (CUL)-Untereinheit und RBX1, einer Adapter-Untereinheit (ASK für CUL1, DDB1 für CUL4) und einer Substrat-erkennenden Untereinheit (F-Box für CUL1, BTB für CUL3, DWD für CUL4).

### 1.3.2. CRLs unterliegen einer komplexen Regulation

Aufgrund der Vielzahl an möglichen modularen E3s bedarf es einer Regulation des Zusammenbaus und Aktivität dieser Komplexe [Petroski and Deshaies, 2005; Bosu and Kipreos, 2008]. Besondere Bedeutung haben hierbei die Cullin-Neddylierung und die Interaktion mit CAND1 (CULLIN-ASSOCIATED NEDDYLIATION-DISSOCIATED 1) (Abbildung 8). Die Neddylierung der Cullin-Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung des CRL-Komplexes, die die Bindung des beladenen Ubiquitin E2 Enzyms begünstigt und zusätzlich den Abstand zwischen E2 und dem gebundenen Substrat verringert [Duda et al., 2008; Saha and Deshaies, 2008]. Nach der Polyubiquitylierung und Freisetzung des Substrats wird die Cullin-Untereinheit deneddyliert und der CRL-Komplex somit zumindest partiell inaktiviert. Durch die Bindung von CAND1 kann daraufhin das Adapter/Substraterkennungs-Modul, welches mit CAND1 um eine Bindestelle an der Cullin-Untereinheit konkurriert, kompetitiv aus dem CRL-Komplex verdrängt werden. Der CRL-Kernkomplex bestehend aus Cullin und RBX1 wird daraufhin entweder durch CAND1 in einem „freien“ Zustand gehalten oder er bindet ein neues Adapter/Substraterkennungs-Modul. Die Cullin-Neddylierung stabilisiert dagegen einen gebildeten CRL-Komplex, da CAND1-Bindung und Cullin-Neddylierung sich ebenfalls gegenseitig ausschließen [Pierce et al., 2013; Wu et al., 2013; Zemla et al., 2013].

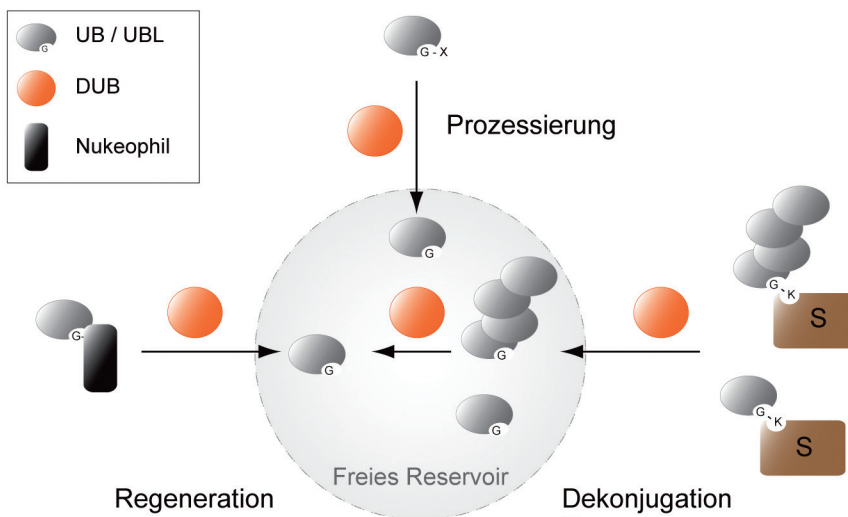


**Abbildung 8: CAND1 und NEDD8 regulieren CRL-Aktivität und Zusammensetzung.**

Schematische Darstellung der Verdrängung eines hypothetischen F-Box Proteins (FBP1) durch CAND1 nach der Deneddylierung von Cullin1 (CUL1). Die Neddylierung von CUL1 nach der Bindung eines anderen F-Box Proteins (FBP2) stabilisiert den SCF-Komplex und ermöglicht die Substrat (S)-Ubiquitylierung. Glycin (G); Lysin (K); Cystein (C); Ubiquitin (UB). (nach Mergner and Schwechheimer [2014])

### 1.4. Die Deneddylierung erfolgt durch spezifische Isopeptidasen

Bei der Markierung von Substraten mit Ubiquitin oder UBLs handelt es sich um einen reversiblen Vorgang. Durch die Aktivität von Isopeptidasen, den sogenannten DUBs (DEUBIQUITINATING ENZYMES) können die Peptidmodifikationen wieder hydrolysiert werden. DUBs haben verschiedene Funktionen innerhalb der Ubiquitin/UBL-Wege. Sie ermöglichen die Aktivierung von Ubiquitin/UBLs durch die Prozessierung der Vorläuferproteine, machen die Modifikation von Substraten rückgängig und füllen das Reservoir an freiem Ubiquitin/UBL durch das Recyceln von Ubiquitin- oder UBL-Ketten oder die Regeneration von fehlerhaften Ubiquitin/UBL-Addukten wieder auf [Komander et al., 2009; Reyes-Turcu et al., 2009] (Abbildung 9).



**Abbildung 9: DUB Funktionen.**

Verschiedene DUBs kontrollieren die Prozessierung von UB/UBL Vorläuferproteinen, die Regeneration von fehlerhaften UB/UBL-Addukten und die Dekonjugation und das anschließende Recycling von UB/UBL von den jeweiligen Substraten (S). Glycin (G); Lysin (K), variable C-terminale Aminosäure(n) (X). (nach Komander et al., [2009])

In Eukaryoten gibt es fünf DUB Familien, die über ihre katalytischen Domänen klassifiziert werden [Komander et al., 2009]: UCHs, UBPs (UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASES), OTUs (OVARIAN TUMOR PROTEASES), MJDs (MACHADO-JOSEPHIN DOMAIN) und JAMMs (JAB1/MPN/MOV34). Obwohl die meisten DUBs sehr spezifisch sind, zeigen einige DUBs Aktivität für mehrere Substrate, wie zum Beispiel USP5 (UBQ, ISG15; [Catic et al., 2007] oder USP21 (UBQ, NEDD8; [Gong et al., 2000]. Eine weitere Familie von Proteasen, SENPs (SENTRIN-SPECIFIC PROTEASES) oder ULPs (UBIQUITIN-LIKE PROTEASES), hydrolysiert die Bindung zwischen SUMO und seinen jeweiligen Substraten.

Für NEDD8 sind neben einer Reihe an DUBs mit einer dualen Spezifität für sowohl Ubiquitin als auch NEDD8 *in vitro* (Ataxin-3 [Ferro et al., 2007]; PfUCH54 [Artavanis-Tsakonas et al., 2006]; UCHL3 [Wada et al., 1998]; UCHL1 [Hemelaar et al., 2004]) nur zwei spezifische Isopeptidasen (Deneddylasen) bekannt. Eine der Deneddylasen ist das COP9-Signalosom (CSN), ein konservierter Proteinkomplex aus meist 8 Untereinheiten, der NEDD8 von den Cullinen entfernt und damit eine wichtige Funktion in dem oben beschriebenen CRL-Zyklus einnimmt [Schwechheimer and Deng, 2001; Cope and Deshaies, 2003; Schwechheimer and Isono, 2010]. Die Cullin-Deneddylierung ist die einzige bisher bekannte enzymatische Funktion des CSN-Komplexes und wird von der Untereinheit 5 (CSN5), einem Mitglied der Zink-abhängigen JAMM-Metalloproteasen, ausgeübt [Cope et al., 2002]. CSN5 ist als Teil des CSN-Komplexes und als Monomer nachweisbar, was zu Spekulationen über eine mögliche Funktion für CSN5 getrennt von CSN-Komplex und Cullin-Neddylierung geführt hat. Bisher gibt es jedoch keine experimentellen Beweise für eine eigenständige Funktion des CSN5 Monomers [Schwechheimer and Isono, 2010]. Die Interaktion zwischen CSN und CRLs ist unabhängig von der CSN5 Untereinheit und stellt eine weitere Komponente der CRL-Regulation dar [Enchev et al., 2012]. Monomeres CSN5 zeigt keine Deneddylierungsaktivität für die Culline, sondern benötigt den restlichen CSN-Komplex, um NEDD8 in seinem aktiven Zentrum zu positionieren [Sharon et al., 2009; Enchev et al., 2012].

Die andere bekannte NEDD8-spezifische Protease ist die bereits als potentiell NEDD8-prozessierendes Enzym erwähnte Cysteinprotease DEN1. Wie die weiteren Komponenten des NEDD8-Systems ist DEN1 innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert [Mendoza et al., 2003]. Eine Ausnahme bildet erneut die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, in der kein DEN1 Homolog identifiziert werden kann [Zhou and Watts, 2005]. Im Arabidopsis Genom findet sich ein einziges potentiell *DEN1*-Gen, das wie seine Homologe aus den tierischen Systemen und Spaltheife, phylogenetisch zu den SENPs gehört [Colby et al., 2006]. Wie die anderen bereits charakterisierten Vertreter der DEN1 Familie zeigt aber auch das putative DEN1 aus Arabidopsis keine Aktivität als SUMO-Isopeptidase [Colby et al.,

2006], so dass auf seine Funktion bisher nur über die Erkenntnisse zu den Homologen anderer Organismen geschlossen werden kann.

Anders als der CSN-Komplex weist das humane DEN1 *in vitro* nur eine sehr geringe Deneddylierungsaktivität für mononeddylierte Culline auf und die DEN1-Vertreter aus *Drosophila* und Spaltheefe zeigten auch keine Aktivität als Cullin-Deneddylase *in vivo* [Wu et al., 2003; Yamoah et al., 2005; Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008]. Dagegen ist DEN1 *in vitro* oder bei Überexpression der Protease auch *in vivo* in der Lage, NEDD8 von den meisten anderen bisher bekannten NEDD8-Substraten, wie beispielsweise MDM2 (MOUSE DOUBLE MINUTE 2) oder dem ribosomale Protein L11 zu hydrolysieren [Rabut and Peter, 2008; Enchev et al., 2014]. In Übereinstimmung mit dem Model, dass DEN1 *in vivo* eine komplementäre Deneddylierungsaktivität zu CSN5 hat, zeigen DEN1 *knock-out* Mutanten in Spaltheefe, *Aspergillus nidulans*, *Drosophila* und Maus einen ähnlichen molekularen Phänotyp, nämlich die Akkumulation neddylierter Proteine bei denen es sich nicht um Culline handelt [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013; Vogl et al., 2015]. Die physiologischen Phänotypen von *den1* Mutanten sind jedoch vergleichsweise mild. In *Drosophila* lässt sich kein physiologischer Effekt des DEN1 Verlustes beobachten [Chan et al., 2008]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Induktion des programmierten Zelltods in den Mutanten gehemmt ist [Broemer et al., 2010]. Mutanten des DEN1 Homologs Nep1 aus Spaltheefe zeigen eine leichte Beeinträchtigung in der zeitlichen Koordination des Zellzyklus und in *Aspergillus nidulans* scheint DenA eine Rolle in der Anfangsphase des sexuellen Entwicklungszyklus zu spielen [Zhou and Watts, 2005; Christmann et al., 2013]. Trotz der Beobachtung, dass *den1* Mutanten neddylierte Proteine akkumulieren, konnten bisher nur sehr wenige dieser DEN1-abhängigen NEDD8-Substrate identifiziert und mit einem beschriebenen Phänotyp in Verbindung gebracht werden [Enchev et al., 2014]. Für pflanzliche Systeme gibt es bislang noch keine bekannten DEN1-Substrate.

### 1.5. Zielsetzung

Die Funktion von NEDD8 innerhalb des CRL-Systems, mit den Cullinen als Substraten und CSN als Deneddylase, ist inzwischen gut erforscht. Ob es weitere biologisch relevante Substrate und Funktionen der Neddylierung gibt, wird dagegen immer noch kontrovers diskutiert. Ähnlich umstritten ist die Rolle von DEN1 als der neben CSN5 einzig anderen bekannten Deneddylase. Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der Funktion von DEN1 in *Arabidopsis* und die Identifikation noch unbekannter DEN1-spezifischer NEDD8-Substrate. Auf diese Weise sollte das Bild des NEDD8-Systems in Pflanzen über das Cullin-CSN-Model hinaus erweitert werden.

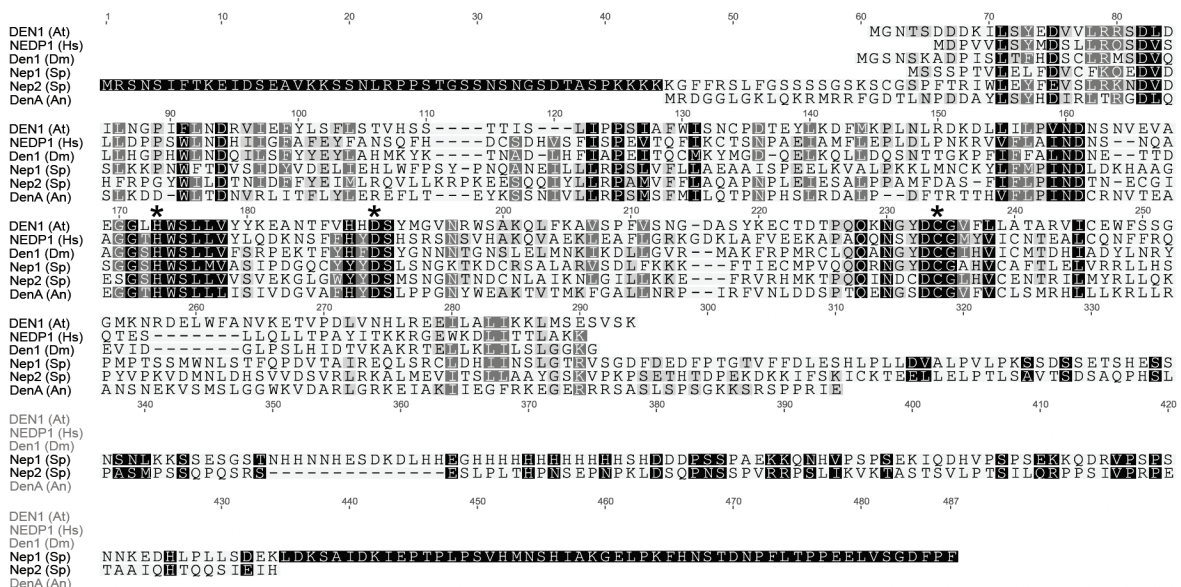
## 2. Ergebnisse

### 2.1. DEN1 ist eine NEDD8-spezifische Protease

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob es neben der Regulation der CRL-Komplexe über die Cullin-Modifikation weitere, noch unbekannte Funktionen der Neddylierung gibt. Dazu sollte insbesondere auch die Rolle von DEN1 innerhalb des pflanzlichen NEDD8-Systems erforscht und mögliche neue und DEN1-spezifische NEDD8-Substrate identifiziert werden.

#### 2.1.1. DEN1 ist innerhalb der Eukaryoten konserviert

Eine BLAST-Suche nach Proteinen der SENP-Familie ergab in Arabidopsis eine Liste von acht putativen SUMO-Isopeptidasen. Der Phylogenetische Vergleich der Arabidopsis SENPs mit den SENPs aus dem menschlichen Genom zeigte, dass eines der identifizierten Gene, AT5G60190, eine eigene Untergruppe mit NEDP1, dem humanen Vertreter der DEN1 Subfamilie bildet [Colby et al., 2006]. Aufgrund seiner hohen Sequenzähnlichkeit zu NEDP1 und der Beobachtung, dass AT5G60190 eine enzymatische Spezifität für NEDD8 aber nicht für SUMO zeigt, wurde AT5G60190 daher als das DEN1 Homolog von Arabidopsis eingeordnet [Colby et al., 2006]. DEN1 zeigt einen hohen Grad an Konservierung innerhalb der Eukaryoten (Abbildung 10).

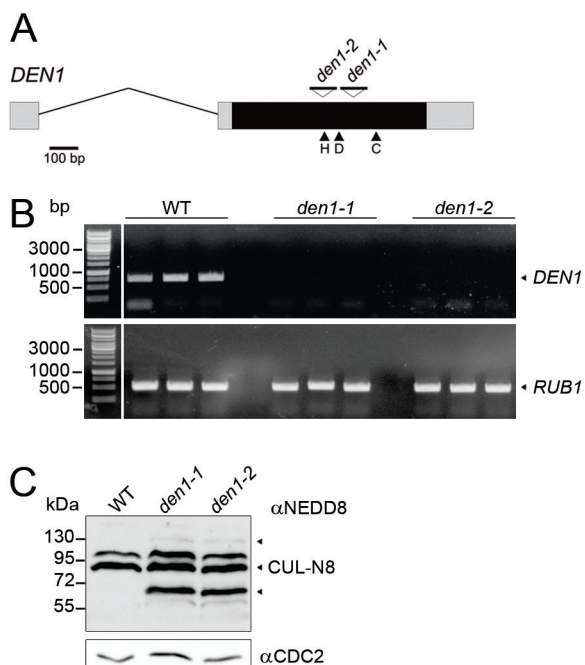


**Abbildung 10: DEN1 ist innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert.** ClustalW-Alignment der DEN1 Proteine aus Arabidopsis (At), Mensch (Hs), Drosophila (Dm), Spaltheife (Sp) und *Aspergillus nidulans* (An). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Das Protein gehört zur C48 Familie der Cysteinproteasen mit einer katalytischen Triade, bestehend aus den Aminosäuren Histidin (His, H), Asparaginsäure (Asp, D) und Cystein (Cys, C). Während es nur ein Homolog des Enzyms in Arabidopsis, Drosophila, *Aspergillus nidulans* und Mensch gibt, konnten für die Spaltheife zwei Homologe Nep1 und Nep2 identifiziert werden. Als einzige der bisher charakterisierten Vertreter der DEN1 Familie besitzen Nep1 und Nep2 außerdem zusätzliche N- und C-terminale Domänen, die möglicherweise zur Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Die Konservierung von DEN1 in Organismen aus verschiedenen Reichen der Eukaryoten weist auf eine wichtige und wahrscheinlich ebenfalls konservierte Funktion des Proteins hin.

### 2.1.2. Identifizierung von *den1* Mutanten

Der Verlust von DEN1 führt in verschiedenen Organismen zu einer Anreicherung neddylierter Proteine und zum Teil auch zu leichten Entwicklungsdefekten [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013]. Um einen Einblick in die *in vivo* Funktion von *DEN1* in Arabidopsis zu bekommen, wurden die T-DNA-Insertionslinien GK381A12 (*den1-1*) und SAIL\_588\_H02 (*den1-2*) untersucht. Beide T-DNA Insertionen sind im einzigen Exon von *DEN1* positioniert und liegen innerhalb der Aminosäuresequenz vor dem katalytisch aktiven Cystein, so dass eine möglicherweise vorhandene verkürzte Variante des Proteins keine enzymatische Aktivität aufweisen sollte (Abbildung 11A).



**Abbildung 11: Charakterisierung von *den1* Mutanten.**

**(A)** Schematische Darstellung des *DEN1*-Locus und der Position der jeweiligen T-DNA Insertionslinien. Das offene Leseraster ist als schwarzes Kästchen, die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche als graue Kästchen und das einzige Intron als Linie dargestellt. Die Positionen der Histidin (H), Asparaginsäure (D) und Cystein (C) Kodons der katalytischen Triade sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **(B)** Semiquantitative RT-PCR zeigt den Verlust der *DEN1* Expression in homozygoten *den1-1* und *den1-2* Mutanten. Als Kontrolle dient die Expression von *RUB1*. **(C)** αNEDD8-Western-Blot von Proteinextrakten (60 µg) aus sieben Tage-alten Keimlingen. NEDD8 (N8)-Konjugate sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Cullin (CUL). Als Ladekontrolle dient ein αCDC2-Western-Blot.



Eine semiquantitative RT-PCR zeigte einen vollständigen Verlust der Expression der Vollängen-mRNA in homozygoten *den1-1* und *den1-2* Mutanten (Abbildung 11B). Darüber hinaus konnte sowohl für *den1-1* als auch für *den1-2* Mutanten in einem NEDD8-Western-Blot neben den Cullinen noch weitere neddylierte Proteine detektiert werden (Abbildung 11C). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der *DEN1* Expression in Arabidopsis zu einem biochemischen Phänotyp führt, der im Weiteren genauer beschrieben wird.

Da beide T-DNA-Insertionslinien auf Transkript- und Proteinebene einen identischen Phänotyp aufweisen, wurde *den1-1* als repräsentative Mutante für alle weiteren Experimente verwendet.

### 2.1.3. *den1* Mutanten akkumulieren neddylierte Proteine

Um die *den1* Mutanten näher zu charakterisieren wurde das Neddylierungsmuster und der physiologische Phänotyp von Wildtyp und Mutante genauer untersucht. Proteinextrakte von *den1* Mutanten zeigen eine deutliche Akkumulation von NEDD8-Konjugaten (Abbildung 12A). Während im Wildtyp nur die Culline als neddylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa nachweisbar sind, konnten in der *den1* Mutante neben einem diffusen Hintergrund, der auf die Existenz weiterer entweder nur schwach neddylierter oder wenig abundanter Proteine hinweist, vor allem zwei deutliche NEDD8-Konjugate identifiziert werden. Da die Identität dieser Proteine noch nicht bekannt war, wurden sie entsprechend ihres offensichtlichen Molekulargewichtes mit den Bezeichnungen p72 (72 kDa Protein) und p130 (130 kDa Protein) versehen. Interessanterweise konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Menge an prozessiertem NEDD8-Monomer in der *den1* Mutante nicht nachweisbar verändert ist (Abbildung 12A). Diese Ergebnisse sprechen für eine Funktion von DEN1 als NEDD8-dekonjugierendes aber nicht als NEDD8-prozessierendes Enzym.

Die große strukturelle Ähnlichkeit von NEDD8 und Ubiquitin ermöglicht die Aktivierung von NEDD8 durch das E1 Enzym des Ubiquitin-Systems und dadurch auch eine anschließende unspezifische Konjugation von NEDD8 an Ubiquitin-Substrate [Hjerpe et al., 2012b]. Um zu untersuchen, ob die Neddylierung der in der *den1* Mutante beobachteten Proteine über den NEDD8-Weg und den AXR1/ECR1 E1-Komplex zustande kommt, wurde daher eine Behandlung mit dem ECR1-Inhibitor MLN4924 durchgeführt [Brownell et al., 2010]. Sowohl die Culline als auch die beiden *den1*-spezifischen Konjugate p72 und p130 zeigten eine deutlich geringere Neddylierung nach der Behandlung mit MLN4924 (Abbildung 12B). Dies beweist, dass es sich bei p72 und p130 tatsächlich um noch nicht identifizierte endogene NEDD8-Substrate handelt.

Wie in Publikationen zu anderen Komponenten des NEDD8-Systems beschrieben, haben Störungen der Neddylierung oder Deneddylierung oft einen drastischen Effekt auf die





#### 2.1.4. Enzymatische Aktivität von DEN1 *in vitro*

Vorhergehende Studien zur Funktion von DEN1 aus anderen Organismen konzentrierten sich häufig auf die Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von DEN1 als NEDD8-prozessierendes Enzym und Deneddylase *in vitro*. Vor allem die Ergebnisse zur NEDD8-Prozessierung und Cullin-Deneddylierung stehen dabei zum Teil in Widerspruch zu den aus Mutantenstudien gewonnenen Erkenntnissen zur Funktionen von DEN1 *in vivo* [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013]. Die Analyse der *in vitro* Aktivität von DEN1 eignet sich demnach nur bedingt um Aussagen über seine Funktion innerhalb eines Organismus treffen zu können. Dennoch wurden in dieser Arbeit auch einige der standardmäßig verwendeten *in vitro* Experimente durchgeführt, um die enzymatische Aktivität des pflanzlichen DEN1 Orthologs mit den beschriebenen Aktivitäten anderer Vertreter der DEN1 Familie vergleichen zu können. Als Kontrolle mit einer dualen Spezifität für sowohl NEDD8 als auch Ubiquitin wurde UCH3 in die Experimente miteinbezogen.

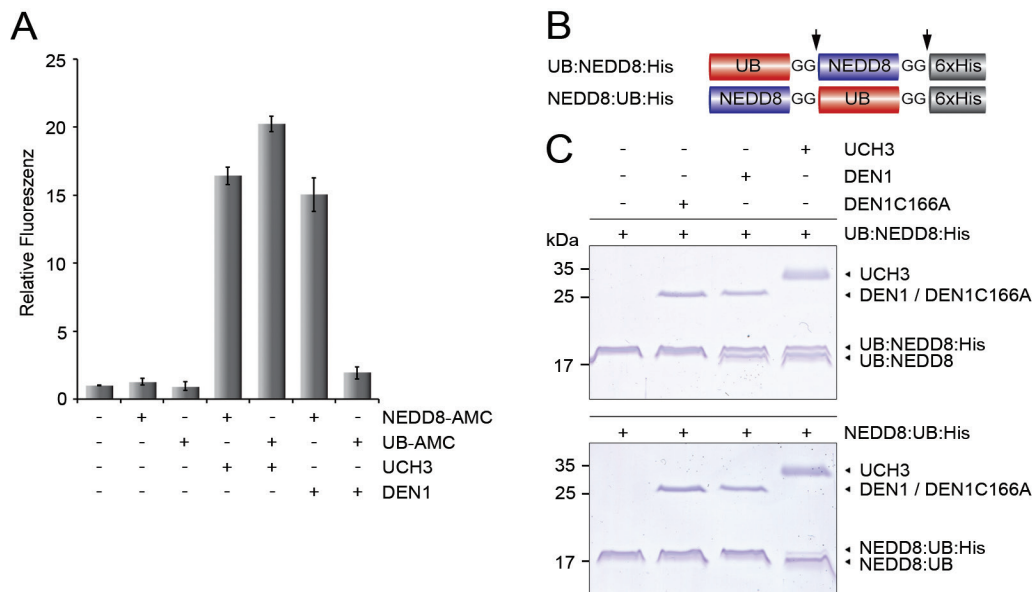
##### 2.1.4.1. DEN1 prozessiert das NEDD8 Vorläuferprotein

Um die Substratspezifität von DEN1 zu testen wurde ein AMC-Assay durchgeführt. Die aufgereinigten Enzyme DEN1 und UCH3 wurden hier auf ihre enzymatische Aktivität und ihre Spezifität hinsichtlich der nahe verwandten Substrate NEDD8-AMC und Ubiquitin-AMC getestet. Wie erwartet, zeigte DEN1 eine hohe Spezifität für die Prozessierung von NEDD8, während UCH3 in der Lage war, sowohl NEDD8 als auch Ubiquitin zu prozessieren (Abbildung 13A).

Da es sich bei den AMC-Fusionspeptiden jedoch um künstliche Substrate handelt, wurden die Enzyme zusätzlich auf ihre Aktivität gegen das natürliche NEDD8 Vorläuferprotein getestet, um zu untersuchen ob eine oder beide Proteasen als NEDD8-prozessierende Enzyme *in vivo* fungieren können. Dazu wurde das Vorläuferprotein bestehend aus einer linearen Fusion von Ubiquitin und NEDD8 (RUB1, AT1G31340) mit einem C-terminalen 6-fach Histidin-Tag in *E. coli* exprimiert. Bei einem weiteren Konstrukt wurde die Position der Domänen für Ubiquitin und NEDD8 jeweils vertauscht, um zu untersuchen, ob die Größe der C-terminalen Verlängerung einen Einfluss auf die Prozessierungsaktivität der Enzyme hat (Abbildung 13B). Als Negativkontrolle wurde eine inaktive Variante des DEN1 Enzyms verwendet, in der das enzymatisch aktive Cystein166 durch Alanin ersetzt ist.

Es zeigte sich, dass UCH3 in der Lage ist, kurze Peptidfragmente vom C-Terminus von sowohl NEDD8 als auch Ubiquitin abzuspalten. DEN1 hingegen weist nur für den C-Terminus von NEDD8 eine enzymatische Aktivität auf. Interessanterweise scheinen beide Enzyme in ihrer Aktivität auf die Prozessierung kurzer Peptidfragmente begrenzt zu sein, da

weder DEN1 noch UCH3 die  $\alpha$ -Peptidbindung zwischen Ubiquitin und NEDD8 oder NEDD8 und Ubiquitin zu hydrolysieren vermochten (Abbildung 13C).



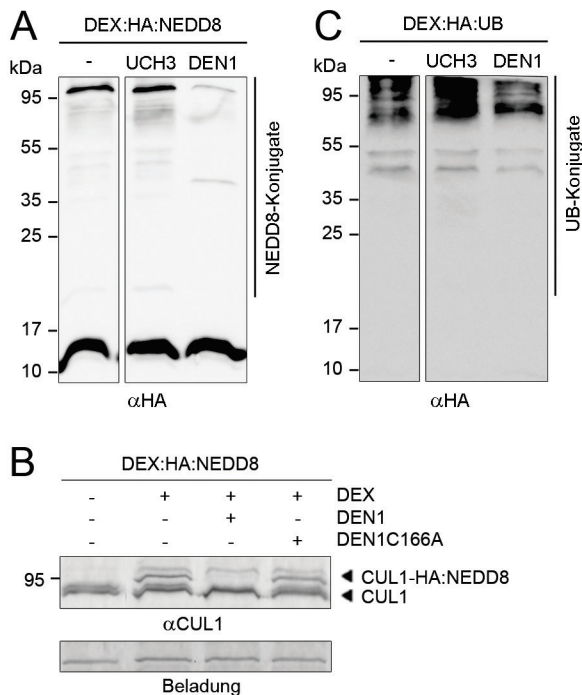
**Abbildung 13: DEN1 und UCH3 sind NEDD8-prozessierende Enzyme *in vitro*.**

**(A)** Fluoreszenzsignal nach der enzymatischen Hydrolyse von NEDD8-AMC oder Ubiquitin (UB)-AMC durch UCH3 oder DEN1. Die Fluoreszenz ist relativ zur Eigenfluoreszenz des Puffers dargestellt. **(B)** Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte zum Nachweis der Prozessierungsaktivität und Substratspezifität. Der Reporter basiert auf dem natürlich vorkommenden Ubiquitin:NEDD8 Fusionsprotein (AT1G31340) mit einem zusätzlichen C-terminalen 6-fach Histidin-Tag. Die NEDD8 Domäne wurde einmal an die C-terminale (UB:NEDD8:His) und einmal an die N-terminale (NEDD8:UB:His) Position gesetzt. Potenzielle Schnittstellen der Proteasen nach den beiden di-Glycin-Motiven sind durch Pfeile markiert. **(C)** Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbte SDS-PAGE Gele zum Nachweis der Prozessierungsaktivität von UCH3 und DEN1. Das enzymatisch inaktive DEN1C166A wurde als Negativkontrolle verwendet. Aufgereinigte Enzyme und die prozessierten und unprozessierten Reporterformen sind durch Pfeile markiert.

#### 2.1.4.2. DEN1 deneddyliert NEDD8-Konjugate

Neben ihrer postulierten Funktion in der Prozessierung des NEDD8 Vorläuferproteins sind die DEN1 Orthologe anderer Organismen außerdem als Deneddylasen beschrieben [Wu et al., 2003; Chan et al., 2008]. Um die Funktion von DEN1 als Deneddylase in *Arabidopsis in vitro* zu testen, wurde das aufgereinigte Enzym mit verschiedenen Proteinextrakten inkubiert. Durch die Überexpression eines HA-getaggtten NEDD8 oder Ubiquitin in Keimlingen kann eine Anreicherung neddylierter oder ubiquitylierter Proteine im Pflanzenextrakt hervorgerufen werden [Hakenjos et al., 2011]. Die Zugabe von DEN1 führte zu einer unspezifischen Deneddylierung dieser unbekanntenen Konjugate (Abbildung 14A), ebenso wie des bekannten NEDD8-Konjugats Cullin1 (Abbildung 14B). Wie die Behandlung von HSUB-Extrakten mit DEN1 zeigte, hat das Enzym dagegen keine Aktivität als Deubiquitinase, sondern ist auch bei der Dekonjugation spezifisch für NEDD8 (Abbildung 14C).

Interessanterweise zeigte UCH3 keine enzymatische Aktivität in diesen Dekonjugations-Assays (Abbildung 14A, C). Während DEN1 also - zumindest *in vitro* - sowohl  $\alpha$ -Peptidbindungen (NEDD8-Prozessierung) als auch  $\epsilon$ -Peptidbindungen (NEDD8-Dekonjugation) zu hydrolysieren vermag, ist die enzymatische Aktivität von UCH3 auf die Prozessierungsfunktion beschränkt.

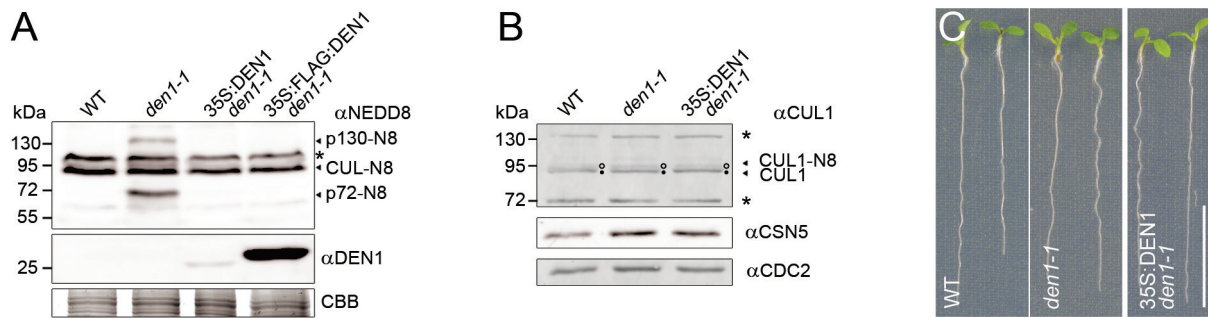


**Abbildung 14: DEN1 ist eine Deneddylase *in vitro*.**

**(A)**  $\alpha$ HA-Western-Blot von Proteinextrakten (15  $\mu$ g) aus sieben Tage-alten HSN-Keimlingen induziert mit Dexamethason (DEX) und inkubiert mit aufgereinigtem UCH3 oder DEN1. **(B)**  $\alpha$ Cullin1 (CUL1)-Western-Blot von Proteinextrakten aus sieben Tage-alten HSN Keimlingen induziert mit DEX und inkubiert mit aufgereinigtem DEN1 oder DEN1C166A. Eine kreuzreagierende Bande des CUL1-Western-Blots wurde als Ladekontrolle verwendet. **(C)**  $\alpha$ HA-Western-Blot von Proteinextrakten (60  $\mu$ g) aus sieben Tage-alten HSN-Keimlingen induziert mit DEX und inkubiert mit aufgereinigtem UCH3 oder DEN1.

### 2.1.5. DEN1 zeigt eine Substratspezifität *in vivo*

Da DEN1 *in vitro* eine unspezifische Deneddylaseaktivität zeigte und auch die Culline effizient deneddylert werden konnten, wurde die Frage aufgeworfen, ob eine Überexpression von DEN1 zu einer Beeinträchtigung des Gleichgewichts zwischen neddylierten und unneddylerten Cullinen *in vivo* führt. Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Konstrukte für die Expression von getaggttem und ungetaggttem DEN1 unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors hergestellt und in *den1* Mutanten transformiert. Pflanzenlinien, die ein *DEN1* Transgen exprimieren, wiesen das Neddylierungsmuster des Wildtyps auf und zeigten somit eine Komplementierung des *den1* Phänotyps (Abbildung 15A). Interessanterweise hatte die Überexpression von DEN1 im Gegensatz keinen Effekt auf die Cullin-Neddylierung *in vivo* und führte auch nicht zu einem physiologischen Phänotyp (Abbildung 15A-C). Damit konnte die Hypothese widerlegt werden, dass DEN1 auch *in vivo* als eine unspezifische Deneddylase agiert.



**Abbildung 15: DEN1 ist substratspezifisch *in vivo*.**

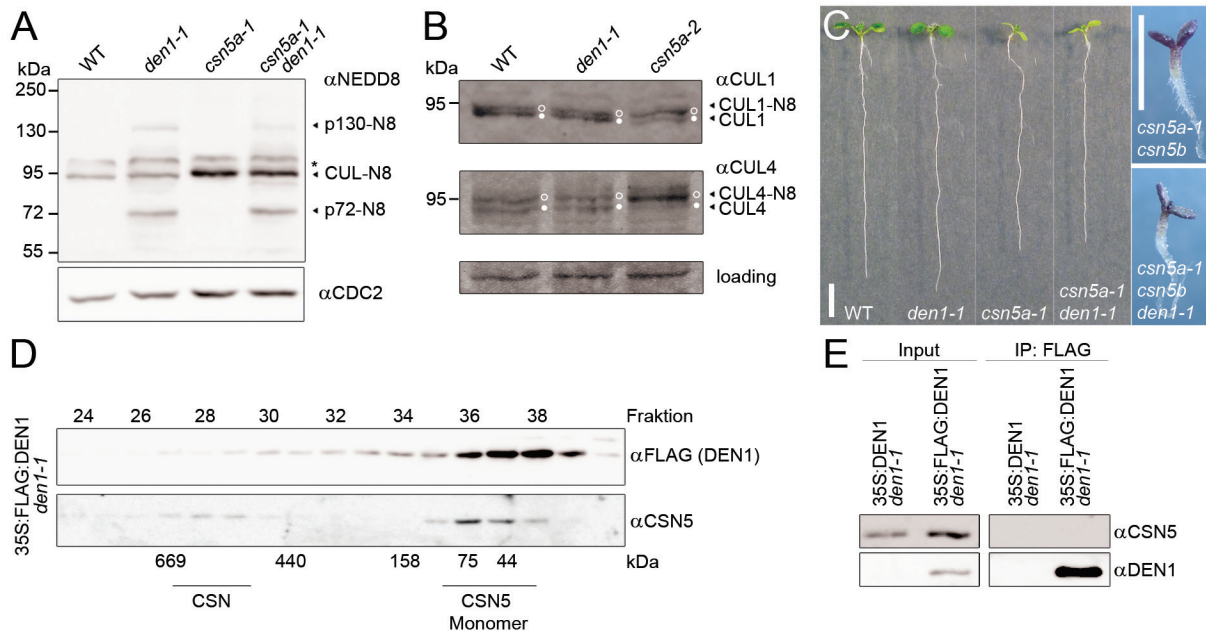
**(A)** Analyse von Proteinextrakten (60 µg) aus sieben Tage-alten Keimlingen. Western-Blots wurden mit αNEDD8- und αDEN1-Antikörpern inkubiert. NEDD8 (N8)-Konjugate sind mit einem Pfeil, eine unspezifische Hintergrundbande ist mit einem Stern gekennzeichnet. Als Ladekontrolle dient ein Ausschnitt eines CBB-gefärbten SDS-Geles. **(B)** Analyse von Proteinextrakten (30 µg) aus sieben Tage-alten Keimlingen. Western-Blots wurden mit αCullin1 (CUL1)- und αCSN5-Antikörpern inkubiert. CUL1 und CUL1-N8 sind mit Pfeilen, kreuzreagierende Banden des CUL1 Antikörpers mit einem Stern gekennzeichnet. Als Ladekontrolle dient ein αCDC2-Western-Blot. **(C)** Photos von sieben Tage-alten Keimlinge, angezogen unter Dauerlicht. Die Überexpression von DEN1 hat keine physiologischen Auswirkungen. Maßstabsbalken = 1 cm.

### 2.1.6. Die Deneddylasen DEN1 und CSN5 fungieren additiv

Die Untereinheit 5 des COP9-Signalosoms (CSN5) ist verantwortlich für die Deneddylierung der Culline *in vivo*. Um die Beobachtung zu verstärken, dass DEN1 nicht in die Deneddylierung der Culline involviert ist, wurde eine genetische Analyse durchgeführt. Außerdem sollten auf diese Weise Rückschlüsse über einen funktionellen Zusammenhang und eine mögliche gemeinsame biologische Rolle der beiden Deneddylasen getroffen werden.

Dafür wurde die *den1* Mutation in den schwachen *csn5a* (*csn5a-1* oder *csn5a-2*) und den starken *csn5a csn5b* Hintergrund eingebracht. Die resultierenden Doppel- und Trippelmutanten wurden dann in Hinblick auf ihren biochemischen und physiologischen Phänotyp untersucht. Doppelmutanten von *csn5a* und *den1* wiesen auf biochemischer Ebene eine Kombination des Neddylierungsmusters der Einzelmutanten auf. Sie zeigten eine deutlich verstärkte Neddylierung der Culline (95 kDa), wie in *csn5a* Mutanten, und gleichzeitig die für die *den1* Mutante charakteristischen neddylierten Proteine p72 und p130 (Abbildung 16A). Zudem zeigte der direkte Vergleich des Verhältnisses von neddyliertem und unneddyliertem Cullin1 und Cullin4 in *den1* und *csn5a* Mutanten, dass nur CSN5 als Deneddylase für die Culline fungiert (Abbildung 16B). Hinsichtlich des physiologischen Erscheinungsbildes der verschiedenen genetischen Kombinationen ließ sich durch die *den1* Mutation kein zusätzlicher Effekt auf den Phänotyp der *csn5a* oder *csn5a csn5b* Mutanten beobachten (Abbildung 16C). Die Mutation der beiden Deneddylasen zeigt einen additiven Effekt. Diese Ergebnisse belegen eine unterschiedliche Substratspezifität von DEN1 und CSN5 *in vivo*.





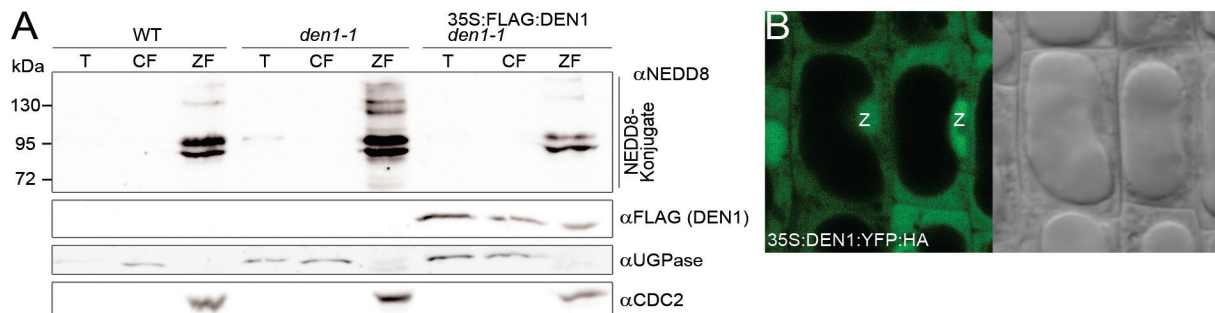
**Abbildung 16: DEN1 und CSN5 haben unterschiedliche Substrate *in vivo*.**

(A)  $\alpha$ NEDD8-Western-Blot von Proteinextrakten (60  $\mu$ g) aus sieben Tage-alten Keimlingen. NEDD8 (N8)-Konjugate sind mit einem Pfeil, eine kreuzreagierende Hintergrundbande ist mit einem Stern gekennzeichnet. (B) Analyse von Proteinextrakten (30  $\mu$ g) aus sieben Tage-alten Keimlingen. Western-Blots wurden mit  $\alpha$ Cullin1 (CUL1)- und  $\alpha$ Cullin4 (CUL4)-Antikörpern inkubiert. Die NEDD8 (N8)-konjugierten und unkonjugierten CUL-Formen sind jeweils angegeben. Als Ladekontrolle dient eine kreuzreagierende Bande des  $\alpha$ CUL1-Western-Blots. (C) Repräsentative Aufnahmen sieben Tage-alter Keimlinge des Wildtyps (WT) und homozygoter Mutanten, angezogen unter Dauerlicht. Die jeweiligen Mutantenlinien sind in der Abbildung angegeben. Maßstabsbalken = 0,5 cm. (D) Gelfiltration (Superose 6) von Proteinextrakt aus sieben Tage-alten FLAG:DEN1 exprimierenden Keimlingen. 20  $\mu$ l Aliquots wurden in Western-Blots mit  $\alpha$ FLAG- und  $\alpha$ CSN5-Antikörpern untersucht. Fraktionsnummern und Molekulargewichte sind entsprechend angegeben. CSN5 ist als Teil des CSN-Komplexes und als Monomer nachweisbar. (E) Immunopräzipitation (IP) von FLAG:DEN1 aus sieben Tage-alten Keimlingen mit anti-FLAG Agarose. 30  $\mu$ l des Rohextraktes wurden als Input-Kontrolle geladen (linkes Bild). Das Ergebnis der IP ist im rechten Bild dargestellt. Western-Blots wurden mit  $\alpha$ CSN5- und  $\alpha$ DEN1-Antikörpern inkubiert.

Aufgrund der Beobachtung, dass DEN1 in anderen Organismen mit Untereinheiten des CSN Komplexes interagiert [Zhou and Watts, 2005; Christmann et al., 2013], wurde untersucht, ob DEN1 auch in Arabidopsis Teil eines Komplexes ist und ob sich eine Interaktion mit Untereinheiten des CSN Komplexes, speziell mit CSN5, beobachten lässt. Es zeigte sich, dass DEN1 in Arabidopsis als Monomer vorliegt und im Gegensatz zu CSN5 auch nicht als Teil eines Komplexes nachweisbar ist (Abbildung 16D). Im Einklang damit konnte eine zusätzliche Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von DEN1 und CSN5 ebenfalls keine Interaktion zwischen den beiden Deneddylasen belegen (Abbildung 16E).

### 2.1.7. DEN1 lokalisiert in den Zellkern und Cytoplasma

Eine Erklärung für die in den oberen Abschnitten beschriebene unterschiedliche enzymatische Aktivität von DEN1 *in vitro* und *in vivo* wäre eine räumliche Trennung des Enzyms und seiner potentiellen Substrate innerhalb der Zelle. Da die Hauptaktivität der Neddylierung im Zellkern vermutet wird, stellte sich die Frage ob DEN1 ebenfalls in dieses Zellkompartiment lokalisiert. Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit 35S:FLAG:DEN1 Keimlingen durchgeführt. Neddylierte Proteine akkumulierten wie erwartet in der Zellkern-Fraktion (Abbildung 17A). Dabei zeigte die *den1* Mutante wieder eine deutlich größere Bandbreite an neddylierten Proteinen als der Wildtyp und die Komplementationslinie 35S:FLAG:DEN1 (*den1-1*). DEN1 konnte sowohl in der cytosolischen als auch in der Zellkern-Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 17A).



**Abbildung 17: DEN1 lokalisiert in den Zellkern und das Cytoplasma**

**(A)** Western-Blots von Gesamtproteinextrakt (T) und Fraktionen der subzellulären Fraktionierung durch differenzielle Zentrifugation. Cytoplasmafraktion (CF), Zellkernfraktion (ZF). Für die Fraktionierung wurden 14 Tage-alte Keimlinge verwendet. Western-Blots wurden mit αNEDD8-, αFLAG-, αUGPase- und αCDC2-Antikörpern inkubiert. **(B)** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahmen von DEN1:YFP:HA exprimiert unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors. Für die Aufnahmen wurden Wurzelepidermiszellen von sechs Tage-alten Keimlingen verwendet. Zwei der Zellkerne sind als solche markiert (Z).

Da die Verwendung von Protein-Tags in manchen Fällen zu einer fehlerhaften Lokalisierung des Proteins in der Zelle führen kann, sollte diese Möglichkeit von Artefakten durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Nachweismethoden und Protein-Tags minimiert werden. Daher wurden die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung zusätzlich mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bestätigt. Ein Fusionsprotein von DEN1 mit YFP:HA unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors wurde im *den1* Hintergrund exprimiert. Auch mit dieser Nachweismethode konnte ein Signal für DEN1:YFP:HA im Zellkern und im Cytoplasma beobachtet werden, woraus sich schließen ließ, dass DEN1 tatsächlich in beide Kompartimente lokalisiert (Abbildung 17B). Die Aussagekraft dieser Beobachtung wird allerdings dadurch etwas gemindert, dass es die Membran des Zellkerns Proteinen kleiner und mittlerer Größe bis etwa 90 kDa erlaubt, zwischen den beiden Kompartimenten zu

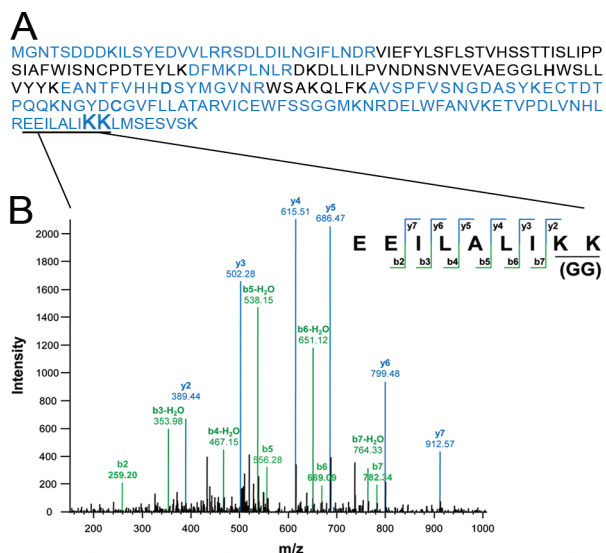
diffundieren [Wang and Brattain, 2007]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Überexpression des Proteins die beobachtete Lokalisierung innerhalb der Zelle beeinflusst. Dennoch konnte mit den vorliegenden Ergebnissen gezeigt werden, dass die Lokalisation von DEN1 in den Zellkern nicht zu einer unspezifischen Deneddylierung führt und eine potentielle räumliche Trennung von Enzym und Substrat daher nicht ausreicht um die Substratspezifität von DEN1 *in vivo* zu erklären.

### 2.1.8. DEN1 wird von Ubiquitin modifiziert

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass DEN1 nicht an der Cullin-Deneddylierung beteiligt ist und wahrscheinlich eine Funktion unabhängig von der CRL-Regulation und dem CSN-Komplex hat. Um Hinweise darauf zu finden, an welchen biologischen Prozessen DEN1 beteiligt ist, wurde mittels LC-MS/MS nach potentiellen Interaktoren gesucht. Dazu wurde FLAG:DEN1 unter nativen Bedingungen aus Arabidopsis-Keimlingen aufgereinigt. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der Gelfiltration, die DEN1 als ein vornehmlich monomeres Protein zeigte, ergab die massenspektrometrische (MS)-Analyse allerdings nur wenige Kandidaten für mögliche Interaktionspartner (siehe Appendix, Tabelle 1). Von den identifizierten Proteinen wurde nur die Interaktion zwischen DCAF1 und DEN1 mittels Co-IP experimentell getestet. Dazu wurde myc-getaggtetes DCAF1 in den 35S:FLAG:DEN1 *den1-1* Hintergrund eingebracht. DCAF1 ist eine Untereinheit einer CUL4-basierten CRL und daher ein interessanter Kandidat, der DEN1 mit verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen in Verbindung bringen würde [Zhang et al., 2008]. Eine Interaktion der beiden Proteine konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Für DEN1 selbst wurde in der MS-Analyse eine Peptidabdeckung von etwa 65 % erreicht (Daten von Stephanie Heinzlmeir, Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik, TU München, Abbildung 18A). Überraschenderweise wurde dabei für eines der DEN1 Peptide eine di-Glycin (GG)-Modifikation entdeckt. Der GG-Fingerabdruck ist ein typischer Hinweis auf eine Neddylierung oder Ubiquitylierung von Proteinen, da sowohl NEDD8 als auch Ubiquitin nach dem Verdau mit Trypsin im Zuge der Proteinpräparation für die MS-Analyse ein kurzes GG-Peptid an ihrem jeweiligen Konjugat hinterlassen. Für DEN1 wurden zwei aufeinanderfolgende Lysine im C-Terminus, K217 und K218, als mögliche Modifizierungsstellen identifiziert (Abbildung 18A,B).





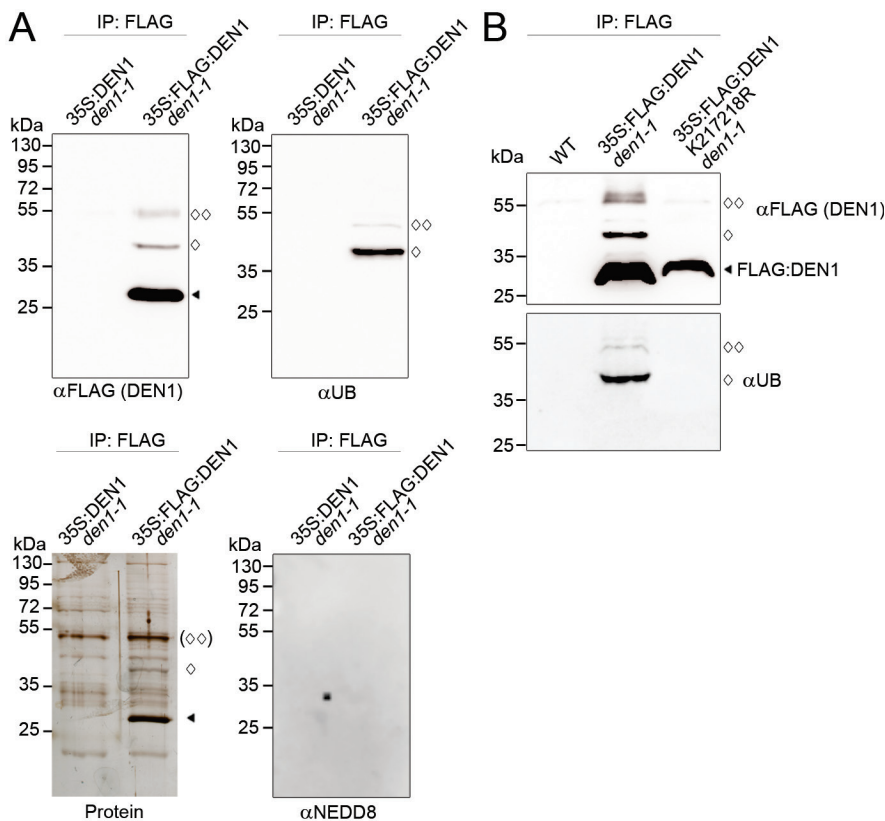
**Abbildung 18: Massenspektrometrische Identifizierung eines GG-Fingerabdrucks an K217 oder K218 von DEN1.**

**(A)** Aminosäuresequenz von DEN1. Die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Sequenzen sind in blau gezeigt. Die beiden benachbarten Lysine K217 und K218 sind vergrößert dargestellt. **(B)** Massenspektrum für das Peptid EEILALIKK, das mit einer di-Glycin (GG)-Modifizierung, dem typischen Fingerabdruck einer Ubiquitin- oder NEDD8-Modifizierung identifiziert wurde (Daten von Stephanie Heinzlmeir, Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik, TU München).

Da es anhand der LC-MS/MS Daten nicht möglich ist zwischen einer Modifizierung mit NEDD8 oder Ubiquitin zu unterscheiden, wurden die für die MS-Untersuchung verwendeten Immunopräzipitations-Proben mittels Western-Blot analysiert. Nach der FLAG-Immunopräzipitation waren das Monomer FLAG:DEN1 sowie zwei weitere höhermolekulare Banden mit dem  $\alpha$ FLAG-Antikörper nachweisbar (Abbildung 19A). Dies bestätigte, dass DEN1 eine posttranslationale Modifikation trägt. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei dieser Modifikation um NEDD8 oder Ubiquitin handelt, wurden die Proben darüber hinaus mit den Antikörpern für Ubiquitin und NEDD8 getestet. Der Nachweis mit  $\alpha$ Ubiquitin ergab in der 35S:FLAG:DEN1 Probe zwei deutliche Banden, die von ihrer Laufhöhe her den beiden höhermolekularen Banden des  $\alpha$ FLAG-Western-Blots entsprechen (Abbildung 19A). Für NEDD8 konnte dagegen kein Signal detektiert werden (Abbildung 19A). Es konnte somit gezeigt werden, dass DEN1 eine posttranslationale Modifikation trägt und dass es sich bei dieser Modifikation um eine Ubiquitylierung handelt.

Bei der Modifikation mit Ubiquitin kann es sich um Monoubiquitylierungen oder eine Polyubiquitylierung handeln. Das Bandenmuster von FLAG:DEN1 zeigt hauptsächlich monoubiquityliertes DEN1, aber auch eine schwache Bande die einem di-Ubiquitin-modifiziertem FLAG:DEN1 entsprechen würde (Abbildung 19A). Um zu untersuchen, ob die Lysine K217 und K218 die einzige Modifikationsstelle für Ubiquitin in DEN1 sind, wurden die beiden Aminosäuren daher zu Arginin mutiert und das veränderte DEN1 in den *den1* Hintergrund transformiert. Anhand einer FLAG-Immunopräzipitation des wildtypischen und mutierten DEN1 aus Keimlingen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Lysinen K217 und K218 in der Tat um die Modifizierungsstelle für Ubiquitin handelt und dass die Mutation dieser beiden Lysine ausreicht, um die Ubiquitylierung von DEN1 zu verhindern (Abbildung 19B). Dies ist ein klarer Hinweis, dass es sich bei der mehrfach modifizierten Form von

FLAG:DEN1 um eine Polyubiquitylierung und nicht um mehrere Monoubiquitylierungen an verschiedenen Lysinen handelt.

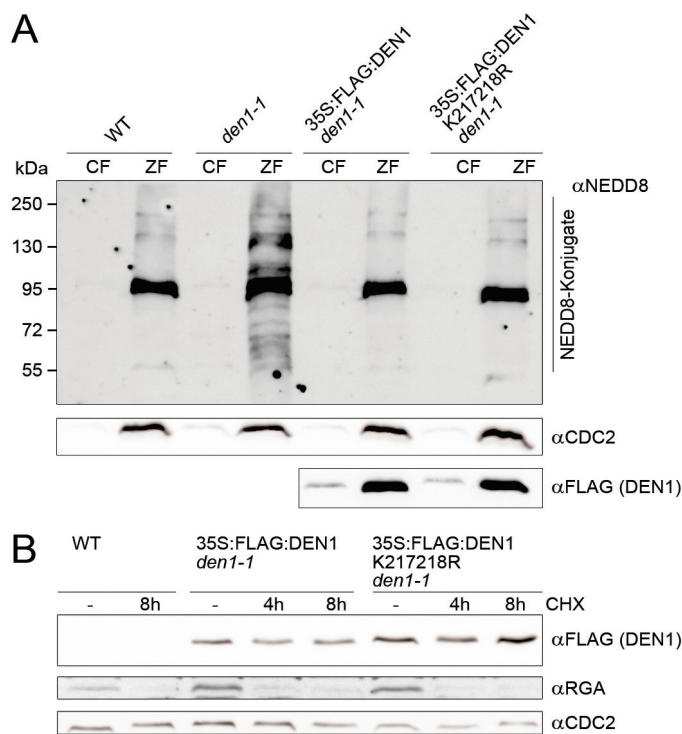


**Abbildung 19: DEN1 trägt eine Ubiquitin-Modifikation.**

(A) Immunopräzipitation (IP) von FLAG:DEN1 aus sieben Tage-alten Keimlingen mit anti-FLAG Agarose. Die beiden oberen Western-Blots zeigen das Ergebnis der Inkubation der IP-Proben mit  $\alpha$ FLAG- und  $\alpha$ Ubiquitin (UB)-Antikörpern. FLAG:DEN1 ist durch einen Pfeil, modifiziertes FLAG:DEN1 durch Rauten markiert. Das linke untere Bild zeigt eine Silberfärbung des Gesamtproteins nach der IP, das rechte Bild einen  $\alpha$ NEDD8-Western-Blot der Proben. (B) Western-Blot Analyse mit  $\alpha$ FLAG- und  $\alpha$ Ubiquitin (UB)-Anti-körpern nach Immunopräzipitation (IP) aus sieben Tage-alten Wildtyp (WT) und transgenen Keimlingen. FLAG:DEN1 und FLAG:DEN1 K217218R wurden mit anti-FLAG Agarose aufgereinigt. FLAG:DEN1 ist durch einen Pfeil, modifiziertes FLAG:DEN1 durch Rauten markiert.

Die Modifizierung mit Ubiquitin kann verschiedene Auswirkungen auf ein Protein haben. Monoubiquitylierungen werden dabei oft mit einer veränderten Aktivität oder Lokalisation in Verbindung gebracht, Polyubiquitylierungen mit einer verminderten Stabilität [Komander and Rape, 2012]. Um zu testen, ob sich das wildtypische DEN1 und das mutierte Protein DEN1K217218R hinsichtlich ihrer Aktivität und Lokalisation unterscheiden, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit Keimlingen der beiden transgenen Linien durchgeführt. Es zeigte sich, dass das mutierte Enzym den biochemischen *den1* Phänotyp ebenso komplementiert wie das wildtypische DEN1 (Abbildung 20A). Ebenso konnte keine Veränderung der subzellulären Lokalisation zwischen den beiden Proteinvarianten

festgestellt werden (Abbildung 20A). DEN1 scheint nur sehr schwach polyubiquityliert zu werden (Abbildung 19A). Dennoch wurde untersucht, ob die Ubiquitinmodifikation DEN1 für den Abbau markiert. In diesem Fall sollte die Mutation der Modifizierungsstelle zu einer Stabilisierung von DEN1 führen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Keimlinge, die entweder wildtypisches und modifiziertes DEN1 exprimieren, mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Da die Neusynthese von Proteinen durch CHX gehemmt wird, kann durch eine Behandlungs-Zeitreihe ein Einblick in die Abbaudynamik des jeweiligen Proteins gewonnen werden. Als Kontrolle der Effizienz der CHX-Behandlung diente der Nachweis von RGA in den jeweiligen Proteinextrakten. RGA Proteine haben nur eine kurze Halbwertszeit und werden rasch über das 26S Proteasom abgebaut [Dill et al., 2004]. DEN1 erwies sich dagegen als ein sehr stabiles Protein, für das auch nach mehrstündiger Behandlung mit CHX kein deutlicher Abbau nachweisbar war. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigte auch das modifizierte DEN1 Protein keine veränderte Abbaudynamik (Abbildung 20B). Welche Funktion die Modifikation von DEN1 hat, konnte in der vorliegenden Studie somit noch nicht geklärt werden.



**Abbildung 20: DEN1K217218R verhält sich wie das wildtypische DEN1.**

**(A)** Western-Blots von Fraktionen der subzellulären Fraktionierung. Cytoplasmafraktion (CF), Zellkernfraktion (ZF). Für die Fraktionierung wurden 14 Tage alte Keimlinge verwendet. Western-Blots wurden mit  $\alpha$ NEDD8-,  $\alpha$ FLAG- und  $\alpha$ CDC2-Antikörpern inkubiert. FLAG: DEN1 und FLAG: DEN1K217218R zeigen die gleiche Lokalisation und komplementieren beide den *den1* Phänotyp. **(B)** Cycloheximid (CHX)-Behandlung. Wildtyp (WT)-Keimlinge und Keimlinge, die FLAG: DEN1 oder FLAG: DEN1K217218R exprimieren, wurden sieben Tage lang auf GM angezogen und anschließend für bis zu 8 h in Flüssig-GM mit 50  $\mu$ M CHX inkubiert. Die Stabilität von FLAG: DEN1 und FLAG: DEN1K217218R über die Zeit wurde mittels eines  $\alpha$ FLAG-Western-Blots verfolgt. Der  $\alpha$ CDC2-Blot dient als Ladekontrolle, der Western-Blot gegen das instabile RGA-Protein zur Kontrolle der CHX-Behandlung.

## 2.2. AXR1 ist ein neues NEDD8-Substrat

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Substrate des NEDD8-Modifikationswegs, und insbesondere von Proteinen, die speziell von DEN1 deneddyliert werden. Zu diesem Zweck wurde eine im Labor generierte transgene Linie verwendet, die ein His:StrepII:NEDD8 Fusionsprotein bestehend aus einem 6-fach His-, StrepII-Tag und NEDD8 unter der Kontrolle des endogenen *RUB1* Promotors (RHSN) in einem *rub2 den1* Hintergrund exprimiert. Da bei Aufreinigungen unter nicht-denaturierenden Bedingungen sowohl NEDD8-interagierende als auch NEDD8-konjugierte Proteine angereichert werden, was die Identifikation von echten NEDD8-Konjugaten erschwert, wurde ein System mit zwei aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritten gewählt. In einem ersten Schritt wurden NEDD8-Interaktoren und Konjugate nicht-denaturierend unter Verwendung des StrepII-Tags aufgereinigt, während in einem zweiten Schritt der 6-fach Histidin-Tag für eine denaturierende Aufreinigung genutzt wurde. Anschließend wurden die Proben mit Trypsin verdaut und mittels Nanoflow LC-MS/MS analysiert. Obwohl die Anzahl an neddylierten Proteinen im *den1* Hintergrund erhöht ist, konnten in der MS-Analyse insgesamt nur wenige Proteine identifiziert werden (Daten von Stephanie Heinzlmeir, Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik, TU München, siehe Appendix Tabelle 2). Dies ließe sich wohl durch die generelle geringe Abundanz oder die große Heterogenität neddylierter Substrate erklären, kann aber zum Teil auch an den stringenten Aufreinigungsbedingungen liegen. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich auch die beiden Untereinheiten des NEDD8 E1 Enzyms AXR1 und ECR1, das NEDD8 E2 Enzym RCE1 und Cullin1 (Tabelle 1).

Tabelle 1: Liste der in der MS-Analyse identifizierten Proteine des NEDD8-Systems.

AGI Code	Name	Genbeschreibung	Häufigkeit (raw abundance)							
			StrepII		Quotient	log(2) Quotient	His		Quotient	log(2) Quotient
			WT	RHSN			WT	RHSN		
		<i>NEDD8-Weg</i>								
At1g05180	AXR1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	56	251027	4509.6	12.1	18	20053	1134.5	10.1
At4g36800	RCE1	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	761	149195	196.1	7.6	106	174296	1639.0	10.7
At5g19180	ECR1	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	65	207141	3192.4	11.6	77	1499	19.3	4.3
		<i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>								
At4g02570	CUL1	Cullin-1	232	54209	234.1	7.9	27	13708	511.6	9.0

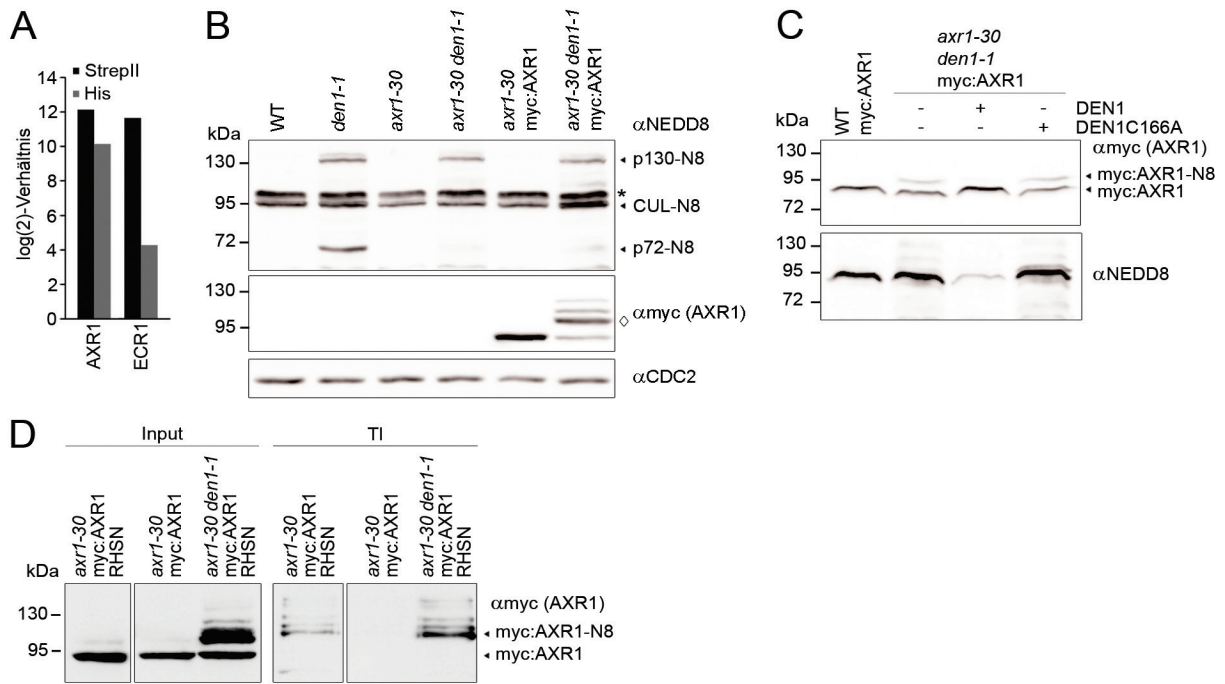
### 2.2.1. AXR1 ist p72

Ein überraschendes Resultat der zweistufigen Aufreinigung war die Beobachtung, dass die beiden Untereinheiten des NEDD8-aktivierenden Enzyms ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Während sowohl AXR1 als auch ECR1 nach dem ersten Aufreinigungsschritt in

vergleichbarem Maße angereichert waren, konnte nach dem zweiten Aufreinigungsschritt eine deutlich stärkere Anreicherung für AXR1 beobachtet werden (Tabelle 1, Abbildung 21A). Da die zweite Stufe der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen stattfand und dieser Schritt speziell der Selektion auf NEDD8-konjugierte Substrate diente, lag die Hypothese nahe, dass es sich bei AXR1 nicht nur um eine Komponente der Neddylierung, sondern auch um ein direktes NEDD8-Substrat handelt.

Das unmodifizierte AXR1 Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von etwa 60 kDa und wäre somit ein möglicher Kandidat für das bislang nicht identifizierte *den1*-spezifische NEDD8-Substrat p72. Um diese Hypothese zu testen, wurde die *den1* Mutante mit einer *axr1* Mutante gekreuzt und die resultierenden Doppelmutanten auf ihren biochemischen Phänotyp hin untersucht. Zudem wurde die *den1* Mutation in eine transgene Linie eingebracht, die zur Komplementierung des *axr1* Phänotyps ein myc-getaggtes AXR1 Protein unter der Kontrolle des endogenen *AXR1* Promotors exprimiert. Es zeigte sich, dass das als p72 deklarierte NEDD8-Substrat in der *axr1 den1* Doppelmutante nicht länger im Proteinextrakt nachweisbar war. Im Gegensatz dazu ließ sich für die anderen prominenten NEDD8-Substrate, wie den Cullinen oder p130, kein Effekt beobachten (Abbildung 21B). Dieses Ergebnis war ein klarer Hinweis darauf, dass es sich bei p72 tatsächlich um AXR1 handelt. Im Einklang damit konnte zudem gezeigt werden, dass myc-getaggtes AXR1 im *den1* Hintergrund eine posttranslationale Modifikation aufweist. Während myc:AXR1 im *axr1* Hintergrund bei etwa 90 kDa nachweisbar war, zeigte das myc:AXR1 Fusionsprotein im *axr1 den1* Hintergrund zusätzlich eine prominente Bande von etwa 100 kDa sowie weitere schwächere höhermolekulare Banden (Abbildung 21B).

Da das Molekulargewicht der modifizierten myc:AXR1 Form mit 100 kDa in etwa dem Molekulargewicht der NEDD8-modifizierten Culline entspricht, überlagern sich die Banden dieser Protein in einem  $\alpha$ NEDD8-Western-Blot. Somit konnte die Hypothese, dass es sich bei der Modifikation an AXR1 um eine Neddylierung handelt, nicht unter der Verwendung von unbehandeltem Proteinextrakt bestätigt werden. Daher wurde die spezifische enzymatische Aktivität des rekombinanten DEN1 Enzyms als Deneddylase für den Nachweis der NEDD8 Modifikation genutzt. Proteinextrakt von Keimlingen, die myc:AXR1 im *axr1 den1* Hintergrund exprimieren, wurde entweder mit enzymatisch aktivem oder inaktivem DEN1 Enzym inkubiert. Die Beobachtung, dass die modifizierte Form von myc:AXR1 nach der Behandlung mit enzymatisch aktivem DEN1 nicht länger nachweisbar ist, bestätigte die Hypothese, dass myc:AXR1 im *den1* Hintergrund eine NEDD8-Modifikation trägt (Abbildung 21C).



**Abbildung 21: AXR1 ist ein neues NEDD8-Substrat.**

(A) Graphische Darstellung der relativen Abundanz der E1-Untereinheiten AXR1 und ECR1 nach zwei aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritten von His:StrepII:NEDD8-Konjugaten unter nicht-denaturierenden (StrepII) und denaturierenden (His) Bedingungen. Das log(2)-Verhältnis beschreibt den Quotienten der gemessenen Häufigkeit (*raw abundance*) in der His:StrepII:NEDD8-Probe im Vergleich zur Kontrollprobe. (B) Western-Blot Analyse von Proteinextrakten sieben Tage-alter Keimlinge mit αNEDD8-, αmyc- und αCDC2-Antikörpern. Die Position von NEDD8 (N8)-Konjugaten ist jeweils angegeben, eine unspezifische Hintergrundbande ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die modifizierte Form von AXR1 ist mit einer Raute markiert. Der αCDC2-Western-Blot dient als Ladekontrolle. (C) Proteinextrakte von sieben Tage-alten *axr1-30 den1-1 myc:AXR1* Keimlingen wurden mit aufgereinigtem DEN1 oder DEN1C166A inkubiert. Proteinextrakt von myc:AXR1, exprimiert im wildtypischen Hintergrund, diente als Negativkontrolle. Die Hydrolyse der modifizierten AXR1-Form wurde mittels αmyc-Western-Blot überprüft. Pfeile markieren die Position von freiem und NEDD8 (N8)-modifiziertem AXR1. Der αNEDD8-Western-Blot dient zur Kontrolle der Deneddylaseaktivität von DEN1. (D) αmyc-Western-Blot vor und nach der Aufreinigung von His:StrepII:NEDD8-Konjugaten mittels Co<sup>2+</sup>-Talon Matrix (TI) aus sieben Tage-alten Keimlingen. Die entsprechenden Genotypen der Keimlinge sind in der Abbildung angegeben. Die Teile des Immunoblots stammen vom selben Experiment und derselben Belichtung, wurden aber nachträglich anders zusammengefügt. Pfeile markieren die Positionen von freiem und NEDD8 (N8)-modifiziertem AXR1.

Durch die vorliegenden Ergebnisse wurde die Frage aufgeworfen, ob AXR1 auch im wildtypischen Hintergrund neddyliert wird. Die denaturierende Aufreinigung von His-StrepII-getagtem NEDD8 aus Pflanzenlinien mit myc:AXR1 im Wildtyp oder *den1* Hintergrund zeigte, dass eine neddylierte Form von myc:AXR1 auch im wildtypischen Hintergrund präsent ist (Abbildung 21D). Allerdings ist das Verhältnis von modifizierter im Vergleich zu unmodifizierter Form von myc:AXR1 im Wildtyp so gering, dass die neddylierte Form erst durch die Anreicherung neddylierter Proteine nach der Aufreinigung nachweisbar war.

Wie die Ubiquitylierung wird auch die Modifikation mit NEDD8 mit unterschiedlichen Effekten in Verbindung gebracht. Eine mögliche Auswirkung der Neddylierung ist eine veränderte Proteininstabilität. Daher wurde untersucht, ob die modifizierte und unmodifizierte

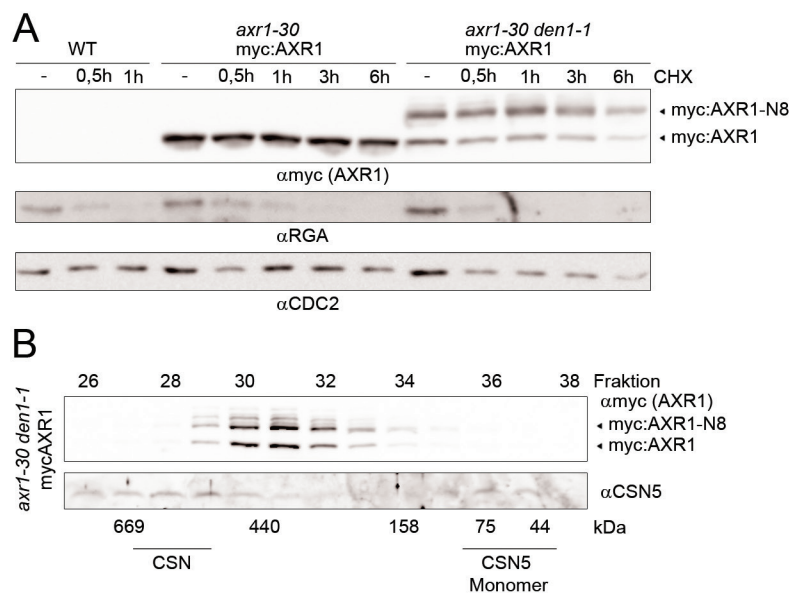


Form von AXR1 unterschiedliche Abbaudynamiken aufweisen. Beide Formen erwiesen sich bei der Behandlung mit CHX jedoch als ähnlich stabil (Abbildung 22A). Die Neddylierung von AXR1 dient demnach nicht als Signal für einen beschleunigten oder verzögerten Abbau des Proteins. Die Modifikation mit NEDD8 kann auch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen. Da AXR1 Teil eines Heterodimers mit ECR1 ist, stellte sich die Frage, ob AXR1-NEDD8 immer noch einen Komplex mit ECR1 bilden kann. Um diese Frage zu beantworten wurde eine Gelfiltrationsanalyse mit Proteinextrakt aus *axr1-30 den1-1 myc:AXR1* Keimlingen durchgeführt. Obwohl der Heterodimer von AXR1 und ECR1 eine Größe von etwa 110 kDa (AXR1: 60 kDa; ECR1: 50,5 kDa) aufweisen sollte, befindet sich der Peak des Proteinsignals bei etwa 400 kDa, was auf die Anwesenheit des E1 Enzyms innerhalb eines größeren Komplexes hinweist (Abbildung 22B). AXR1 und AXR1-NEDD8 zeigen allerdings das gleiche Elutionsprofil, also sind beide Formen fähig mit ECR1 zu interagieren (Abbildung 22B).

**Abbildung 22: AXR1-NEDD8 ist stabil und Teil des E1 Komplexes.**

**(A)** Cycloheximid (CHX)-Behandlung. Wildtyp (WT)-Keimlinge und Keimlinge, die *myc:AXR1* im *axr1-30* oder *axr1-30 den1-1* Hintergrund exprimieren wurden sieben Tage lang auf GM angezogen und anschließend für bis zu 6 h in Flüssig-GM mit 50  $\mu$ M CHX inkubiert. Die Stabilität von *myc:AXR1* und *myc:AXR1-NEDD8* (N8) über die Zeit wurde mittels *amyc*-Western-Blot verfolgt. Pfeile markieren die Positionen von freiem und NEDD8 (N8)-modifiziertem AXR1. Der  $\alpha$ CDC2-blot dient als Ladekontrolle, der Western-Blot gegen das instabile RGA-Protein zur Kontrolle der CHX-Behandlung.

**(B)** Gelfiltration (Superose 6) von Proteinextrakt aus sieben Tage-alten *axr1-30 den1-1 myc:AXR1* Keimlingen. 20  $\mu$ l Aliquots wurden in Western-Blots mit *amyc*- und  $\alpha$ CSN5-Antikörpern untersucht. Pfeile markieren die Position von freiem und NEDD8 (N8)-modifiziertem AXR1. Fraktionsnummern und Molekulargewichte sind entsprechend angegeben. CSN5 ist als Teil des CSN-Komplexes und als Monomer nachweisbar.



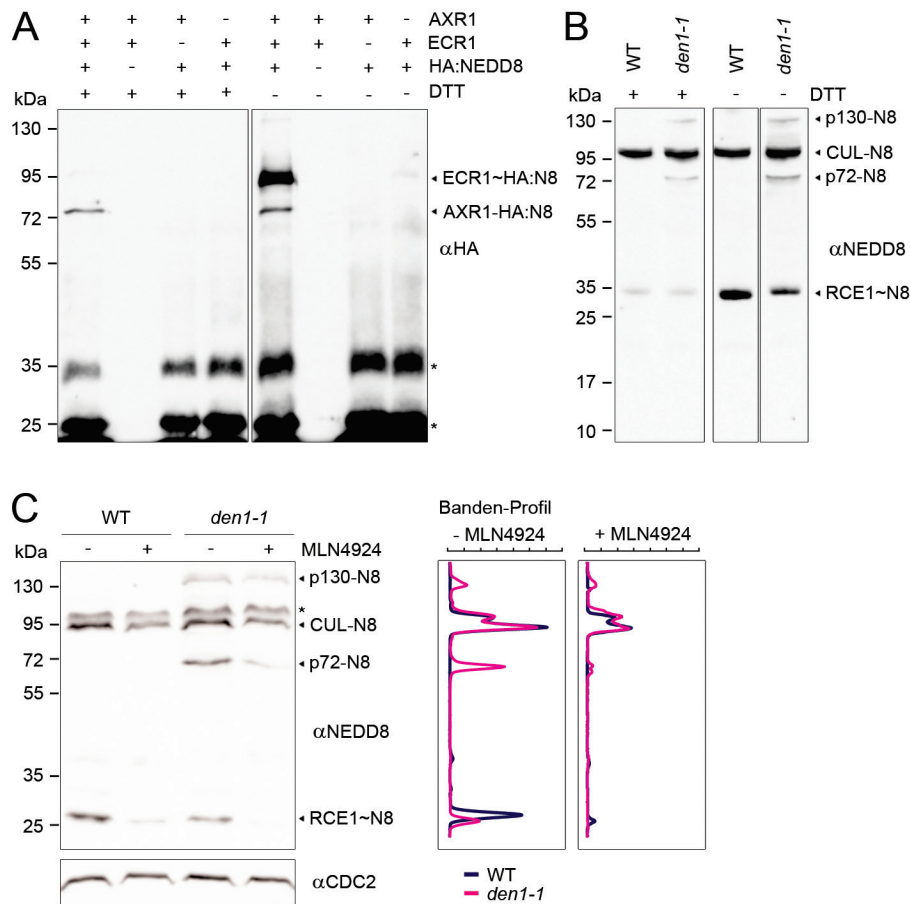
## 2.2.2. Autoneddylierung von AXR1 und der Effekt auf die Transthoesterbildung

Für die Modifizierung eines Substrats mit NEDD8 benötigt es üblicherweise die Aktivität der gesamten enzymatischen Kaskade bestehend aus E1 und E2 sowie einer E3 Ligase. Im Falle des neddylierten AXR1 ist jedoch auch eine Autoneddylierung innerhalb des E1 Heterodimers denkbar. Ähnliche Automodifizierungen sind beispielsweise für E1 und E2 Komponenten des Ubiquitin- und SUMO-Modifikationsweges bekannt [Arnold and Gevers, 1990; Zhou et al., 2004]. Für eine generelle Charakterisierung der Automodifizierung der NEDD8 E1 Untereinheiten wurden Komponenten des NEDD8-Systems rekombinant in *E. coli* exprimiert, um den ersten Schritt des Neddylierungsweges, nämlich die Bildung des E1-NEDD8 Thioesters, *in vitro* zu untersuchen. Thioesterbindungen sind hochreaktiv und können durch die Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) leicht gespalten werden. Die Inkubation der E1 Komponenten AXR1 und ECR1 mit NEDD8 und ATP führte unter nicht-reduzierenden Bedingungen zur Bildung eines Thioesterprodukts, das gemäß seines Molekulargewichtes von etwa 95 kDa als eine Bindung von GST-getagtem ECR1 mit His:HA-getagtem NEDD8 identifiziert wurde (Abbildung 23A). Ein weiteres NEDD8-Konjugat konnte bei etwa 72 kDa nachgewiesen werden. Dieses Konjugat konnte im Gegensatz zu dem ECR1-NEDD8 Thioester nicht durch die Behandlung mit DTT gespalten werden, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um eine Isopeptidbindung handelt. Das Molekulargewicht des Konjugats entspricht zudem der erwarteten Größe von neddyliertem AXR1. Weder der ECR1-NEDD8 Thioester noch das mutmaßlichen AXR1-NEDD8 Konjugat konnten in Abwesenheit eines funktionellen E1 Heterodimers gebildet werden, wenn entweder ECR1 oder AXR1 im Reaktionsansatz fehlten. Diese Ergebnisse erlauben die Hypothese, dass es auch *in vivo* zu einer Autoneddylierung des NEDD8 E1 Enzyms kommen kann, und dass vor allem die AXR1 Untereinheit durch die Automodifizierung betroffen ist.

Um den Effekt der *den1* Mutation auf die NEDD8-Thioesterbildung *in vivo* zu charakterisieren, wurden Proteinextrakte von Wildtyp und *den1* Mutanten unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen aufgearbeitet und ihre Neddylierungsmuster verglichen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ließ sich zusätzlich zu den DTT-insensitiven NEDD8-Konjugaten eine DTT-sensitive Bande bei etwa 32 kDa im  $\alpha$ NEDD8-Western-Blot nachweisen (Abbildung 23B). Seinem offensichtlichen Molekulargewicht nach zu urteilen, handelt es sich bei diesem Thioesterprodukt um den E2 Thioester RCE1-NEDD8. Dagegen konnte das E1 Thioesterprodukt ECR1-NEDD8 überraschenderweise nicht im Proteinextrakt nachgewiesen werden, so dass über die Effizienz der E1 Thioesterbildung in Wildtyp und *den1* Mutante keine Aussage getroffen



werden konnte. In einem unabhängigen zweiten Versuchsansatz konnte allerdings die im vorherigen Versuch beobachtete Reduktion von RCE1-NEDD8 in der *den1* Mutante bestätigt werden (Abbildung 23B,C). Eine quantitative Darstellung des NEDD8-Bandenprofils von Wildtyp und *den1* Mutante zeigte einen Rückgang des E2 Thioestersignals auf etwa die Hälfte des Wildtyp-Niveaus (Abbildung 23B,C). Die Signalstärke für Cullin-NEDD8 ist dagegen in beiden Genotypen vergleichbar (Abbildung 23B,C).



**Abbildung 23: Die Modifikation von AXR1 beeinflusst die NEDD8 Thioesterbildung.**

**(A)** Thioester-Reaktion mit aufgereinigtem rekombinanten His:AXR1 (AXR1), GST:ECR1 (ECR1) und His:HA:NEDD8 (HA:NEDD8). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer mit oder ohne Zugabe von DTT gestoppt und die Bildung von Thioesterprodukten mittels αHA-Western-Blot überprüft. Pfeile markieren die Positionen von spezifischen Reaktionsprodukten, Sternchen bezeichnen kreuzreagierende Hintergrundbanden des αHA-Antikörpers. **(B)** Proteinextrakte (60 µg) aus sieben Tage-alten Keimlingen wurden mit SDS-Ladepuffer mit oder ohne DTT aufgekocht, über ein Bis/Tris-Gel aufgetrennt und mittels αNEDD8-Western-Blot analysiert. NEDD8 (N8)-Konjugate und NEDD8 (N8)-Thioester sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Teile des Immunoblots stammen vom selben Experiment und derselben Belichtung, wurden aber nachträglich anders zusammengefügt. **(C)** SDS-PAGE und αNEDD8-Western-Blot von Proteinextrakten (60 µg) sieben Tage-alter Keimlinge unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne 10 µM MLN4924 angezogen. NEDD8 (N8)-Konjugate und NEDD8 (N8)-Thioester sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der αCDC2-Western-Blot dient als Ladekontrolle. Ein Profil der Bandenintensität für die Wildtyp (WT) und *den1-1* Proben mit oder ohne MLN4924-Behandlung wurde mit der Analysesoftware MultiGauge erstellt.

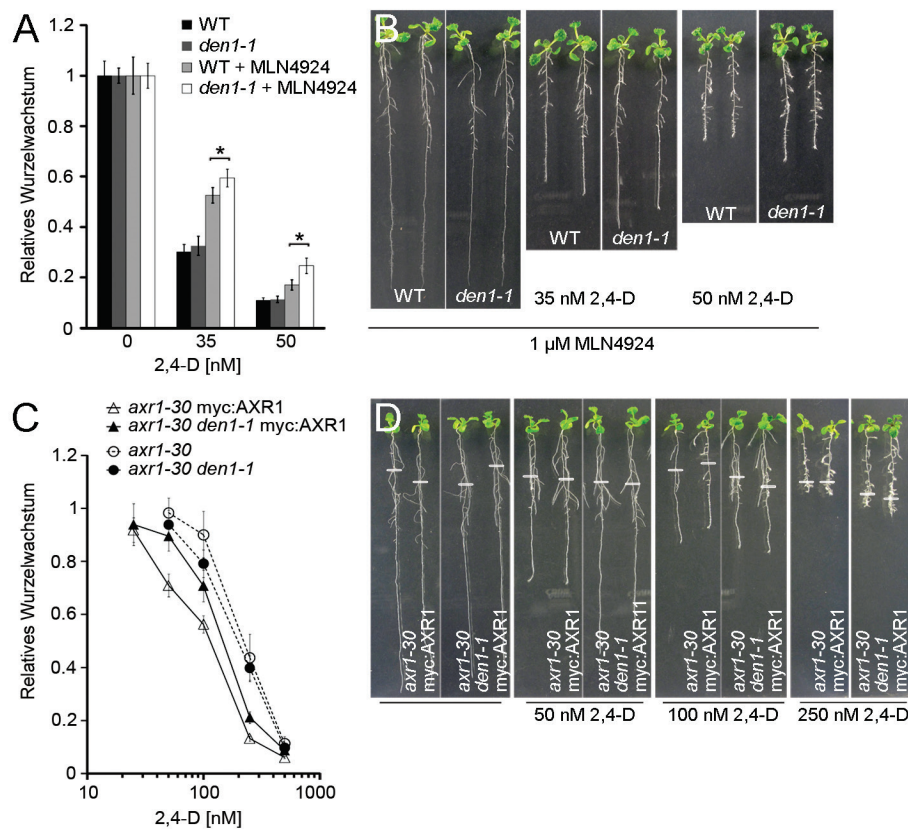
Einen zusätzlichen Beweis dafür, dass es sich bei der 32 kDA Bande um RCE1-NEDD8 handelt, lieferte die Behandlung mit MLN4924. Die Bildung von RCE1-NEDD8 ist abhängig von der Aktivität des NEDD8 E1 Enzyms und die 32 kDa Bande war wie erwartet sensitiv für MLN4924 (Abbildung 23C). Die vorliegenden Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die E2 Thioesterbildung in der *den1* Mutante beeinträchtigt ist. Ob dieser Effekt durch eine verminderte E1 Thioesterbildung oder eine Störung der Transtioester-Reaktion hervorgerufen wird konnte jedoch nicht geklärt werden, da eine direkte Untersuchung der E1 Thioesterbildung *in vivo* nicht möglich war.

### 2.2.3. Physiologische Effekte der AXR1-Neddylierung

Die Neddylierung von AXR1 hat den bisherigen Ergebnissen zu Folge also einen negativen Einfluss auf einen der ersten Schritte der NEDD8-Konjugationskaskade. Damit spiegelt sie zu einem gewissen Grad den Effekt der E1 Inhibierung durch MLN4924 wider. Basierend auf diesen Ergebnissen lag die Vermutung nahe, dass *den1* Mutanten auf physiologischer Ebene eine schwache Beeinträchtigung der CRL-Aktivität aufweisen. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass eine gestörte Regulation der CRL-Aktivität zu Auxin-insensitiven Phänotypen führt. So inhibiert beispielsweise das künstliche Auxin 2,4-D das Wurzelwachstum von Keimlingen. Dementsprechend wurden Wildtyp und *den1* Keimlinge für vier Tage auf Platten mit normalem Wachstumsmedium angezogen und anschließend auf Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-D transferiert. Um den Effekt der *den1* Mutation zu verstärken, enthielten die Platten neben 2,4-D auch noch MLN4924. Mit 1  $\mu$ M wurde die Konzentration von MLN4924 dabei so gewählt, dass das Wurzelwachstum der Keimlinge ohne die Zugabe von 2,4-D nicht inhibiert war [Hakenjos et al., 2011]. Nach weiteren vier Tagen wurde die Zunahme der Wurzellänge quantitativ ausgewertet. Wie erwartet zeigten *den1* Mutanten in diesem durch MLN4924 sensibilisierten Hintergrund eine weniger starke Auxinantwort und daher ein geringfügig stärkeres Wurzellängenwachstum als der Wildtyp (Abbildung 24A,B). Die beobachteten Unterschiede sind nur sehr schwach ausgeprägt, aber statistisch signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ) und konnten zudem in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen reproduziert werden.

AXR1 wurde ursprünglich in einem Screen für Mutanten identifiziert, die insensitive auf die exogene Zugabe von Auxin reagieren [Lincoln et al., 1990]. Mit zunehmender Stärke des jeweiligen Mutantenalleles gehen dabei ein zunehmend gravierender physiologischer Phänotyp und eine steigende Insensitivität gegen die exogene Behandlung mit Auxin einher. Die Neddylierung von AXR1 sollte demnach in *axr1* Mutanten zu einer Verstärkung des bereits existierenden Phänotyps führen. Aus diesem Grund wurde das Wurzelwachstum verschiedener *axr1 den1* Mutantenlinien unter dem Einfluss steigender 2,4-D-Konzentrationen untersucht und die resultierenden Ergebnisse in einer Dosis-Wirkungskurve

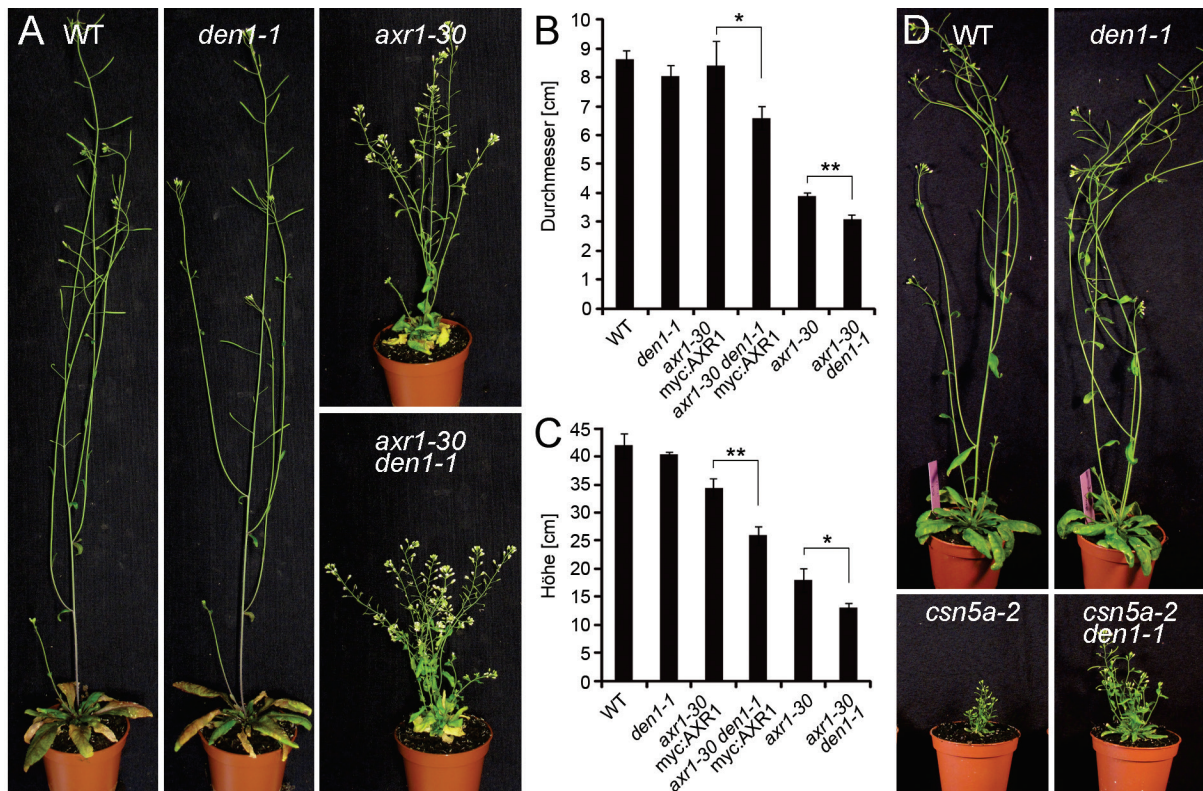
zusammengefasst. Bei *axr1-30* handelt es sich um ein starkes *axr1* Allel [Gilkerson et al., 2009], das augenscheinlich die Auswirkung der *den1* Mutation maskiert, so dass die Auxinantwort der *axr1-30 den1* Doppelmutante der der parentalen *axr1-30* Mutante gleicht (Abbildung 24C). Im Gegensatz dazu können die zuvor beschriebenen *myc:AXR1* Linien als schwache *axr1* Mutanten betrachtet werden, da die Expression von *myc*-getaggetem AXR1 nicht zu einer vollständigen Komplementation des *axr1-30* Phänotyps führt [Hotton et al., 2011]. Für die *myc:AXR1* Linien zeigte sich ein klarer Effekt der *den1* Mutation. *axr1-30 den1 myc:AXR1*-Pflanzen sind deutlich weniger Auxin-sensitiv als *myc:AXR1* Pflanzen mit funktionellem DEN1 (Abbildung 24C,D).



**Abbildung 24: Die Neddylierung von AXR1 beeinträchtigt die Wachstumshemmung durch das Auxin 2,4-D.**

(A) und (B) Quantitative Auswertung des Wurzelwachstums von Wildtyp (WT) und *den1-1* Keimlingen, die im Alter von fünf Tagen für weitere fünf Tage auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen von MLN4924 und 2,4-D umgesetzt wurden. (A) Die Zunahme der Wurzellänge wurde mit ImageJ gemessen und auf den Zuwachs der unbehandelten Wurzeln normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler ( $n \geq 12$ ), Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied (t-Test;  $p < 0,05$ ). (B) Repräsentative Aufnahmen 10 Tage alter WT und *den1-1* Keimlinge. (C) und (D) Wurzelwachstum von *axr1* Mutantenlinien in Abhängigkeit von 2,4-D. Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf Medium mit verschiedenen 2,4-D-Konzentrationen (25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) umgesetzt und der Zuwachs der Wurzellänge nach weiteren fünf Tagen quantitativ ausgewertet. (C) Das Wurzelwachstum wurde mit ImageJ gemessen und auf den Zuwachs der unbehandelten Wurzeln normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler ( $n \geq 10$ ). (D) Repräsentative Aufnahmen von 10 Tage-alten *axr1-30 myc:AXR1* und *axr1-30 den1-1 myc:AXR1* Keimlingen nach fünf Tagen auf Medium mit 0 nM, 50 nM, 100 nM oder 250 nM 2,4-D.

Der Phänotyp von *axr1* Mutanten ist im adulten Stadium am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 25A). Daher wurden *axr1-30* Einzel- und *axr1-30 den1* Doppelmutanten hinsichtlich ihres Rosettendurchmessers im Alter von vier Wochen und ihrer Blütenstandhöhe im Alter von sieben Wochen analysiert. *axr1-30* Pflanzen sind zwergwüchsig mit kleinen Blättern und ihr Rosettendurchmesser ist nur 45% des Durchmessers des Wildtyps im gleichen Alter (Abbildung 25A,B). In der Doppelmutante *axr1-30 den1* ist der Rosettendurchmesser im Vergleich zu *axr1-30* hoch signifikant reduziert (t-Test,  $p < 0,01$ ) (Abbildung 24B). Die Expression von *myc:AXR1* im *axr1-30* Hintergrund stellt den Phänotyp des Wildtyps wieder her. Dagegen ist der Rosettendurchmesser in *axr1-30 den1 myc:AXR1* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp um 24 % reduziert (Abbildung 25B).



**Abbildung 25: Der Verlust von DEN1 verstärkt den Phänotyp von *axr1-30*.**

(A) Repräsentative Aufnahmen von sechs Wochen-altem Wildtyp (WT) und homozygoten Mutanten, angezogen unter Dauerlicht. *axr1-30 den1-1* Doppelmutanten zeigen einen stärkeren Zwergwuchs als *axr1-30* Mutanten. (B) Rosettendurchmesser von 28 Tage-alten Pflanzen. Mittelwerte und Standardabweichung der Kombination von 3 unabhängigen biologischen Replikaten. (C) Blütenstandhöhe von 49 Tage-alten Pflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler ( $n \geq 8$ ). (D) Repräsentative Aufnahmen von sechs Wochen-altem Wildtyp (WT) und homozygoten Mutanten, angezogen unter Dauerlicht. *csn5a-2 den1-1* Doppelmutanten zeigen einen schwächeren Zwergwuchs als *csn5a-2* Mutanten.

Bei der Messung der Blütenstandhöhe von sieben Wochen alten Pflanzen waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutantenlinien am offensichtlichsten. Die Expression von *myc:AXR1* führte nicht zu einer vollständigen Rettung des *axr1-30* Phänotyps und die Kombination mit dem *den1* Allel verstärkte diesen Effekt noch weiter (Abbildung 25C) (t-Test,  $p < 0,01$ ). *axr1-30* Mutanten hatten eine Höhe von durchschnittlich 18,1 cm und unterschieden sich damit signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) von *axr1-30 den1* Mutanten mit durchschnittlich 13,2 cm Höhe (Abbildung 24C). Ein gegenläufiger Trend ließ sich bei der Kombination des schwachen *csn5* Allels *csn5a-2* mit *den1* beobachten. Während Doppelmutanten mit dem stärkeren *csn5* Allel *csn5a-1 den1* sich in ihrem Phänotyp nicht von der *csn5a-1* Einzelmutante unterschieden, zeigten Doppelmutanten mit *csn5a-2* einen leicht abgeschwächten Phänotyp in den adulten Pflanzen (Abbildung 25D). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Neddylierung von AXR1 zu einer Verminderung der NEDD8 E1 Aktivität führt und sich daher schlussendlich auch auf die Funktionalität der CRLs auswirkt.



### 3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Einordnung des DEN1/NEDP1/SENPA8 Homologes aus Arabidopsis in das pflanzliche NEDD8-System und die Identifizierung neuer DEN1-spezifischer NEDD8-Substrate.

Ich konnte zeigen, dass es sich bei dem Gen AT5G60190 tatsächlich um eine Cysteinprotease mit einer hohen Spezifität für NEDD8, und damit um das DEN1 Ortholog in Arabidopsis handelt. DEN1 zeigt *in vitro* eine duale Funktion als NEDD8-prozessierendes und NEDD8-dekonjugierendes Enzym. *In vivo* ist seine Hauptfunktion jedoch die Deneddylierung von NEDD8-Substraten.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass sich die biochemische Aktivität von UCH3, des bislang noch nicht charakterisierten Vertreters der UCH-Familie in Arabidopsis, *in vitro* auf die Prozessierung von Ubiquitin oder NEDD8 beschränkt. Das rekombinante Enzym weist dagegen keine Aktivität als Deneddylase oder Deubiquitinase auf.

Mit AXR1 konnte ich eine der prominenten Banden von neddylierten Proteinen, die in Arabidopsis *den1* Mutanten akkumulieren identifizieren. AXR1 ist damit neben den Cullinen und ML3 das dritte beschriebene NEDD8-Substrat in Pflanzen und das erste nachgewiesene Substrat für DEN1. Bei AXR1 handelt es sich um die regulatorische Untereinheit des NEDD8 E1 Enzyms. Seine Neddylierung vermindert die Effizienz des E1 Enzyms und beeinträchtigt dadurch die Funktion der CRL-Ligasen und den CRL-abhängigen Proteinabbau.

Da sowohl das DEN1 Ortholog aus Arabidopsis erfolgreich charakterisiert als auch mit AXR1 ein neues NEDD8-Substrat identifiziert werden konnte, wurden die Ziele dieser Promotionsstudie erreicht.

#### 3.1. Die Funktion von DEN1 in Arabidopsis

##### 3.1.1. DEN1 ist nicht essenziell für die NEDD8 Prozessierung

DEN1 wurde ursprünglich als eine NEDD8-spezifische Protease mit dualer Funktion in der Prozessierung und Dekonjugation von NEDD8 charakterisiert [Wu et al., 2003]. Biochemische Studien haben gezeigt, dass das humane NEDP1 und DEN1 aus *Drosophila* *in vitro* in der Lage sind,  $\alpha$ -Peptidbindungen am C-Terminus von NEDD8 zu prozessieren [Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003; Chan et al., 2008]. Dagegen zeigt DenA, das DEN1 Ortholog aus *Aspergillus nidulans*, keine Aktivität als NEDD8 C-terminale Hydrolase [Christmann et al., 2013]. Die große Konservierung und strukturelle Ähnlichkeit der DEN1 Proteasen erlaubt demnach nicht zwangsläufig eine Vorhersage ihrer Aktivität oder Funktion in unterschiedlichen Organismen. Der Test der *in vitro* Aktivität von DEN1 aus Arabidopsis zeigte, dass das Enzym als NEDD8 C-terminale Hydrolase zu

fungieren vermag. Dabei ist die Aktivität jedoch von der Art der C-terminalen Peptidextensionen abhängig. Während ein C-terminaler 6-fach Histidin-Tag effizient hydrolysiert wurde, konnte die Peptidbindung zwischen NEDD8 und einem an den C-Terminus fusionierten Ubiquitin nicht von DEN1 gespalten werden. Im Gegensatz dazu ist das humane NEDP1 beispielsweise in der Lage auch größere Proteine wie GFP oder GST am C-Terminus von NEDD8 zu prozessieren [Shin et al., 2011; Christmann et al., 2013]. Welche strukturellen Attribute die Aktivität der verschiedenen DEN1 Orthologe für die Hydrolyse von  $\alpha$ -Peptidbindungen regulieren ist noch unklar.

Für die menschlichen UCHs konnte mittels Strukturanalysen gezeigt werden, dass die Länge der C-terminalen Extension des Substrats entscheidend für die Proteaseaktivität ist. Eine unterschiedlich lange ungeordnete Schleife der Protease reguliert hier die Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums [Popp et al., 2009; Maiti et al., 2011]. UCHL3 spaltet beispielsweise Peptidanhänge von bis zu 20 Aminosäuren von Ubiquitin, während größere Anhänge nicht hydrolysiert werden können [Johnston et al., 1997]. Es ist wahrscheinlich, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die beobachtete Prozessierungsaktivität der Cysteinprotease UCH3 aus Arabidopsis verantwortlich ist. Ähnlich wie DEN1 zeigte auch UCH3 eine enzymatische Aktivität in der Prozessierung von kurzen C-terminalen Anhängen an NEDD8. Während DEN1 jedoch spezifisch für NEDD8 war, konnte UCH3 sowohl NEDD8 als auch Ubiquitin effizient prozessieren. Diese duale Spezifität von UCH3 Orthologen für Ubiquitin und NEDD8 ist evolutionär konserviert und konnte in dieser Arbeit nun auch für das erste UCH3 Ortholog aus Pflanzen bestätigt werden [Frickel et al., 2007].

Die Spezifität der mutmaßlichen Prozessierungsenzyme für kurze Peptidextensionen, zusammen mit der Beobachtung, dass die Prozessierung der Vorläuferproteine ein sehr effizienter Vorgang ist, dessen Zwischenprodukte nicht experimentell nachweisbar sind, führten zu der Hypothese der ko-translationalen Prozessierung [Larsen et al., 1998]. Demnach würde die Prozessierung - im physiologischen Kontext - stattfinden noch bevor die Proteine ihre strukturierte, gefaltete Formation erlangen [Larsen et al., 1998].

Die beiden Enzyme DEN1 und UCH3 kommen aufgrund ihrer *in vitro* Aktivität als NEDD8-prozessierende Enzyme *in planta* in Frage. Allerdings zeigten die Arabidopsis *den1* Mutanten keinen Phänotyp, der auf eine Beeinträchtigung der NEDD8-Prozessierung hinweist. Dies bestätigt Experimente aus Drosophila, *Aspergillus nidulans* und Spaltheefe, bei denen der Verlust des DEN1 Enzyms ebenfalls keinen Effekt auf die NEDD8-Prozessierung hatte [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013]. Einen weiteren Einblick in die Komponenten der NEDD8 Prozessierung in Arabidopsis könnte die Analyse von Doppelmutanten der beiden Enzyme DEN1 und UCH3 bringen. Vorhergehende Arbeiten zu den anderen Vertretern der UCH Familie in Arabidopsis, UCH1 und UCH2, konnten

bereits zeigen, dass der Verlust der beiden redundanten Enzyme nicht zu einer erkennbaren Störung der Ubiquitin oder NEDD8 Prozessierung *in vivo* führt [Yang et al., 2007].

Die bisherigen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die NEDD8 Prozessierung ein hohes Maß an Redundanz aufweist und von einer Reihe von DUBs bewerkstelligt wird. Die große Ähnlichkeit von NEDD8 zu Ubiquitin und die Existenz mehrerer DUBs mit dualer Spezifität legen außerdem die Vermutung nahe, dass die Prozessierung beider Proteine durch dieselben DUBs ausgeführt werden kann. In *Arabidopsis* benötigt die Abspaltung der Ubiquitin-Domäne am NEDD8 N-Terminus ohnehin auch die Aktivität eines Ubiquitin-prozessierenden Enzyms. Welche Enzyme *in vivo* an der Prozessierung von NEDD8 beteiligt sind, wird sich demnach wohl nur durch die Analyse komplexer Mutanten klären lassen. So zeigte etwa eine Spaltheefe Quadrupel-Mutante beider *DEN1* Orthologe (*nep1* und *nep2*) und beider *UCH* Homologe (*uch1* und *uch2*) nur eine leichte Reduktion der Cullin-Neddylierung in einem *csn5* Mutantenhintergrund [O'Donoghue et al., 2013]. Dies weist darauf hin, dass es neben den postulierten Prozessierungsenzymen aus den Familien der UCH und DEN1 Proteasen noch weitere DUBs gibt, die diese Funktion ausüben können.

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist bislang der einzige Organismus, in dem mit YUH1 eine spezifische Protease für die NEDD8 Prozessierung identifiziert werden konnte. Hinsichtlich des NEDD8-Systems nimmt die Bäckerhefe jedoch eine Sonderrolle ein, so dass sich manche Erkenntnisse nicht auf andere Organismen übertragen lassen. Als einziger bisher untersuchter Modellorganismus ist das NEDD8-System in der Bäckerhefe beispielsweise nicht essenziell [Lammer et al., 1998] und es gibt auch kein offensichtliches Homolog aus der DEN1 Familie [Zhou and Watts, 2005].

Die physiologische Relevanz der Prozessierungsaktivität von DEN1 und UCH3 konnte in der vorliegenden Studie aus Zeitgründen nicht abschließend geklärt werden. Höchstwahrscheinlich gibt es neben DEN1 und UCH3 noch weitere DUBs, die an der Prozessierung des NEDD8 Vorläuferproteins beteiligt sind. Da DEN1 *in vivo* somit keine essenzielle Rolle in der NEDD8 Prozessierung spielt, liegt die Hauptfunktion des Enzyms vermutlich in seiner anderen enzymatischen Aktivität, der Aktivität als Deneddylase.

### 3.1.2. Die Deneddylasen DEN1 und CSN5 haben unterschiedliche Funktionen

Die Analyse der *in vitro* Aktivität von DEN1 zeigte, dass das Enzym in der Lage ist NEDD8 von einer Vielzahl von Substraten abzuspalten. Besonders beachtenswert ist die Beobachtung, dass unter *in vitro* Bedingungen auch die Culline deneddyliert werden können. Diese Aktivität als Cullin-Deneddylase war schon früher in *in vitro* Studien für das humane NEDP1 gezeigt worden [Wu et al., 2003]. Gegenüber CSN5 ist die Effizienz von NEDP1 bei



der Spaltung der Cullin-NEDD8 Isopeptidbindung allerdings vergleichsweise gering [Wu et al., 2003; Yamoah et al., 2005]. Trotz seiner *in vitro* Aktivität spielt DEN1 keine Rolle in der Cullin-Deneddylierung von *Drosophila* oder Spaltheife *in vivo* [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008]. *den1* Mutanten in *Arabidopsis* zeigten ebenfalls keine offensichtliche Veränderung des Cullin-Neddylierungsmusters und auch in *csn5a-1 den1* Doppelmutanten ließ sich kein synergistischer Effekt hinsichtlich der Cullin-Deneddylierung beobachten. Wie sich aus dem additiven Phänotyp der Doppelmutante und dem jeweils charakteristischen Neddylierungsmuster der Einzelmutanten schließen lässt, verfügen beide Deneddylasen über einen unterschiedlichen Substratbereich.

Die Unterschiede zwischen der *in vitro* und *in vivo* Aktivität von DEN1 hinsichtlich der Cullin können verschiedene Ursachen haben. So ist die Menge an DEN1 Enzym, die für die *in vitro* Experimente verwendet wurde, sehr viel höher als das endogene DEN1, das mit dem verwendeten  $\alpha$ DEN1-Antikörper im Pflanzenextrakt nicht nachweisbar war. Die Beobachtungen, dass die Überexpression von DEN1 in *Arabidopsis* zwar den biochemischen *den1* Phänotyp rettet, aber keinen Effekt auf die Cullin-Neddylierung hat, spricht gegen die Möglichkeit, dass allein die erhöhte Enzymkonzentration von DEN1 zu einer künstlichen Aktivität der Protease für die Cullin führt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter *in vivo* Bedingungen der Effekt einer erhöhten DEN1-Konzentration auf den Gleichgewichtszustand der Cullin-Neddylierung durch eine erhöhte Aktivität der NEDD8-Konjugationskaskade kompensiert wird. Um diese Frage abschließend zu klären wäre die Behandlung von DEN1-Überexpressionslinien mit dem E1 Inhibitor MLN4924 und ein anschließender quantitativer Vergleich der Cullin-Neddylierung in unbehandelten und behandelten Pflanzen nötig.

Die Aktivität von DUB Proteasen wird zum Teil auch über die subzelluläre Lokalisation von Enzym und Substraten *in vivo* reguliert [Komander et al., 2009]. Wie die vorliegende Studie zeigen konnte, ist DEN1 in *Arabidopsis* jedoch sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern zu finden. Der enzymatisch aktive CSN-Komplex und andere Komponenten des NEDD8-Systems sind im Zellkern lokalisiert [Chamovitz et al., 1996; del Pozo et al., 1998; Kwok et al., 1998; Yeh et al., 2000; del Pozo et al., 2002], so dass davon ausgegangen wird, dass auch die Cullin-Deneddylierung in diesem Kompartiment stattfindet. Die subzelluläre Lokalisation von DEN1 und den Cullinen bietet demnach keine schlüssige Erklärung für die Spezifität von DEN1 *in vivo*. Denkbar ist jedoch, dass die Cullin-NEDD8 Bindung durch den CRL-Komplex selbst oder seine Interaktion mit dem CSN-Komplex maskiert wird und dadurch eine Bindung von DEN1 und die anschließende Abspaltung von NEDD8 verhindert wird [Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001; Wu et al., 2003; Enchev et al., 2012]. Demnach würde die *in vitro* Aktivität von DEN1

dadurch ermöglicht, dass Proteinkomplexe während der Proteinextraktion destabilisiert und die Cullin-NEDD8-Bindung dadurch für DEN1 zugänglich wird.

Zusätzlich zu der Beobachtung, dass DEN1 und CSN5 in *Arabidopsis* unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen, konnte auch eine Interaktion zwischen DEN1 und dem CSN-Komplex nicht belegt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die differenzielle Funktion der beiden Deneddylasen. Im Gegensatz zu CSN5, das sowohl als Monomer als auch als Teil des CSN-Komplexes zu detektieren war, war DEN1 in *Arabidopsis* nur als monomeres Protein nachweisbar. Auch eine mögliche Interaktion mit CSN5 konnte nicht experimentell bestätigt werden. Eine vergleichbare Gelfiltrations-Analyse von myc-getagtem Nep1, dem DEN1 Ortholog aus Spaltheife, hatte die Anwesenheit von Nep1 in einem Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 200 - 400 kDa gezeigt, bei dem es sich jedoch nicht um den CSN-Komplex zu handeln scheint. In einem weiteren Experiment konnte zudem eine direkte Interaktion zwischen Nep1 und der cytoplasmatischen Fraktion von monomerem Csn5 nachgewiesen werden [Zhou and Watts, 2005]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Nep1 im Vergleich zu den anderen Vertretern der DEN1 Familie über eine zusätzliche C-terminale Domäne verfügt, die möglicherweise an der Interaktion mit weiteren Proteinen beteiligt ist. Es ist denkbar, dass DEN1 trotz seiner augenscheinlich konservierten Funktion in verschiedenen Organismen mit unterschiedlichen Komplexen und Proteinen interagiert. So konnte beispielsweise für das humane NEDP1 eine Interaktion mit der Untereinheit 1 und für DenA aus *Aspergillus nidulans* mit der Untereinheit 7 des CSN-Komplexes gezeigt werden [Christmann et al., 2013].

Die Beobachtung, dass die Interaktionspartner von DEN1 zwischen den verschiedenen untersuchten Organismen nicht streng konserviert sind, legt die Vermutung nahe, dass auch das Spektrum potentieller Substrate der DEN1 Deneddylasefunktion einige Unterschiede aufweist. Der Verlust von DEN1 führt in verschiedenen Organismen zu einem ähnlichen biochemischen Phänotyp, nämlich der Anreicherung neddylierter Proteine, bei denen es sich nicht um die Culline handelt [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008]. Während Mutationen von CSN5 jedoch jeweils ein ähnliches Neddylierungsmuster durch die Anreicherung neddylierter Culline hervorrufen, unterscheiden sich die Neddylierungsmuster von *den1* Mutanten verschiedener Spezies [Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013]. Generell lässt sich in den *den1* Mutanten jedoch ein erhöhtes diffuses Hintergrundsignal beobachten, das auf die Existenz weiterer nur schwach neddylierter oder wenig abundanter Proteine hinweist. Experimentelle Befunde zu vielen NEDD8-Substraten zeigten jeweils nur ein geringes Verhältnis von modifizierter zu unmodifizierter Form [Oved et al., 2006; Watson et al., 2006; Abida et al., 2007; Sundqvist et al., 2009; Benjamin and Steller, 2010; Broemer et al., 2010; Choo et al., 2012; Singh et al., 2012; Vogl et al., 2015]. Die meisten NEDD8-Substrate sind demnach wohl nur kurzzeitig

und zu einem geringen Prozentsatz neddyliert, was mit der Beobachtung des erhöhten schwachen NEDD8-Hintergrunds in *den1* Mutanten übereinstimmen würde und auch eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an bekannten NEDD8-Substraten ist.

### 3.1.3. Wird DEN1 reguliert?

Die Aktivität und Spezifität von Proteasen wie den DUBs ist oft genau reguliert und kann beispielsweise durch die Bindung von Interaktionspartnern, durch die subzelluläre Lokalisation oder auch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden [Reyes-Turcu et al., 2009]. Für die beiden DEN1 Orthologe NEDP1 und DenA konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass die Interaktion mit dem CSN-Komplex den Abbau der Proteasen begünstigt [Christmann et al., 2013]. In diesem Zusammenhang war die Entdeckung, dass DEN1 in Arabidopsis eine Ubiquitin-Modifikation trägt, die oft als Signal für den Proteinabbau über das 26S Proteasom dient, von hohem Interesse. DEN1 wird in Arabidopsis jedoch vor allem monoubiquityliert. Obwohl auch eine schwache Polyubiquitylierung gezeigt werden konnte, ist unklar, aus wie vielen Monomeren und welchem Kettentyp diese Modifikation besteht. Unter Cycloheximid-Behandlung zeigte sich DEN1 als ein sehr stabiles Protein *in vivo* und die Mutation des Enzyms zu der nicht länger modifizierbaren Form DEN1K217218R führte auch nicht zu einer erkennbaren Veränderung seiner Aktivität, Lokalisation oder Stabilität. Ob die Ubiquitylierung von DEN1 eine biologisch relevante Funktion hat, ist daher leider noch nicht geklärt. Durch die Überexpression ist die Menge an DEN1 in den transgenen Pflanzen sehr viel höher als unter natürlichen Bedingungen. Bedenkt man, dass nur ein geringer Teil von DEN1 in ubiquitylierter Form vorliegt, ist es daher auch möglich, dass der Effekt der Ubiquitin-Modifikation auf DEN1 durch die Überexpression maskiert wird. Um die Bedeutung der Modifikation aufzudecken, wären daher weitere Untersuchungen mit einer endogenen Proteinkonzentration von DEN1 nötig.

## 3.2. Die Identifizierung neuer NEDD8-Substrate

Seit langem wird vermutet, dass es neben den Cullinen noch weitere Substrate der NEDD8-Modifikation gibt. Obwohl vor allem in den letzten Jahren eine Reihe an neuen Substraten beschrieben wurde, ist die Zahl an bekannten Substraten im Vergleich zu Ubiquitin und dem UBL SUMO immer noch gering [Enchev et al., 2014; Mergner and Schwechheimer, 2014]. Im Allgemeinen zeichnet sich jedoch das Bild einer Aufteilung in CSN-abhängige NEDD8-Substrate und DEN1-abhängige NEDD8-Substrate ab. Die Deneddylierungsaktivität des CSN-Komplexes scheint auf die Culline beschränkt zu sein, während DEN1 für die Deneddylierung anderer NEDD8-Substrate sorgt [Enchev et al., 2014].

Für die Identifikation neuer noch unbekannter NEDD8-Substrate in *Arabidopsis* wurde hier ein getaggtetes NEDD8-Konstrukt in einem *den1* Mutantenhintergrund exprimiert. Auf diese Weise konnte für die nachfolgende Aufreinigung die Tatsache ausgenutzt werden, dass die modifizierte Form von NEDD8-Substraten in der Abwesenheit der Neddylaseaktivität von DEN1 angereichert ist. Das Konstrukt wurde unter der Kontrolle des endogenen *RUB1* Promotors exprimiert, um das Auftreten von Überexpressionsartefakten zu vermeiden. Des Weiteren erfolgte ein Schritt der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen, so dass zwischen NEDD8-Interaktoren und Substraten unterschieden werden konnte. Die Liste möglicher NEDD8-Substrate enthielt neben Proteinen aus dem NEDD8-Weg und Cullin1 auch eine Reihe an ribosomalen Proteinen und Enzymen (siehe Appendix, Tabelle 2). Die gemessene Menge der ribosomalen Proteine und ihre Anreicherung im Vergleich zur Kontrolle ist jedoch zu gering, um sie als potentielle NEDD8-Substrate zu betrachten. Das Auftreten ribosomaler Proteine ist andererseits allerdings interessant, da in anderen Proteomik-Studien gezeigt werden konnte, dass ribosomale Proteine eine NEDD8-Modifikation tragen [Xirodimas et al., 2008]. Unter den Enzymen konnte PDX11, ein Enzym des Pyridoxal-5'-Phosphat-Biosynthese-Wegs, als ein potentieller NEDD8-Interaktor und MDH1 (MALAT DEHYDROGENASE 1) und BCCP1 (BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN 1) als potentielle NEDD8-Substrate identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Enzyme jedoch vorerst nicht weiter untersucht. Obwohl es sich bei dem Großteil der bekannten NEDD8-Substrate um E3 Ubiquitinligasen oder Transkriptionsfaktoren handelt, konnte die vorliegende Studie keine potentiellen Substrate aus diesen Proteinklassen identifizieren. Eine Erklärung hierfür wäre wiederum die geringe Expression und/oder Modifikation potentieller NEDD8-Substrate [Rabut and Peter, 2008]. So konnten andere Proteomik-Studien beispielsweise neben den abundanten Cullinen mit p53 ebenfalls nur ein weiteres vorher beschriebenes NEDD8-Substrat bestätigen [Li et al., 2006].

Allgemein haben sich NEDD8-Substrate in Proteomik-Studien aufgrund ihrer geringen Abundanz als nur schwer fassbar erwiesen [Norman and Shiekhattar, 2006; Jones et al., 2008; Xirodimas et al., 2008; Hotton et al., 2012; Hakenjos et al., 2013]. Die Überexpression von NEDD8 zur Anreicherung neddylierter Proteine ist jedoch aufgrund der Durchlässigkeit des Ubiquitin-Konjugationssystems für NEDD8 unter diesen Bedingungen nicht empfehlenswert [Hjerpe et al., 2012a]. Die Verwendung einer Neddylierungs-Mutante wie *den1*, in der die neddylierte Form von Proteinen unter endogenen Bedingungen angereichert ist, liefert daher einen eleganten Ansatz zur Entdeckung neuer Substrate. In der Tat konnte in dieser Arbeit für eines der über die MS-Analyse identifizierten Proteine, AXR1, die Modifikation mit NEDD8 bestätigt werden.

### 3.3. AXR1 ist ein DEN1-spezifisches NEDD8-Substrat

Da es sich bei AXR1 um die regulatorische Untereinheit des NEDD8 E1-aktivierenden Enzyms aus Arabidopsis handelt, ist seine Identifizierung innerhalb einer Proteomik-Studie für NEDD8 nicht verwunderlich. Erst die Beobachtung, dass AXR1 nach der Aufreinigung von NEDD8-Konjugaten unter denaturierenden Bedingungen in stärkerem Maß als die katalytische E1 Untereinheit ECR1 angereichert war, führte zu der Vermutung, dass AXR1 nicht nur ein Teil des NEDD8-Systems ist, sondern auch selbst neddyliert wird. Die Untersuchung von *axr1 den1* Doppelmutanten konnte zeigen, dass AXR1 das zuvor als p72 bezeichnete Protein ist, das in *den1* Mutanten zu einem ähnlich starken Grad wie die Culline neddyliert wird. Damit handelt es sich bei AXR1 um das erste beschriebene DEN1-spezifische NEDD8-Substrat aus Pflanzen. Die Western-Blot Analysen von *axr1 den1* Doppelmutanten zeigten immer noch ein schwaches NEDD8-Signal bei 72 kDa, obwohl das *axr1-30* Allel eine *knock-out* Mutante ist [Gilkerson et al., 2009]. Neben AXR1 gibt es in Arabidopsis das nah verwandte Protein AXL (AXR1-LIKE), das AXR1 funktionell fast vollständig ersetzen kann [del Pozo et al., 1998; Dharmasiri et al., 2007; Hotton et al., 2011]. Da die Größe von AXR1 und AXL beinahe identisch ist und die beiden Proteine etwa 80 % Aminosäureidentität haben, kann AXL vermutlich ebenfalls neddyliert werden, was das verbleibende Western-Blot Signal erklären würde.

Die katalytische E1 Untereinheit ECR1 ist über einen Thioester an NEDD8 gebunden. Dass die Modifikation von AXR1 auch unter reduzierenden Bedingungen stabil nachweisbar ist, spricht jedoch dafür, dass es sich bei der Bindung zwischen AXR1 und NEDD8 um eine Isopeptidbindung handelt, wie sie üblicherweise zwischen dem C-terminalen Glycin von NEDD8 und einem Lysin des Substrats gebildet wird. Für myc:AXR1 sind im *den1* Hintergrund mehrere modifizierte Banden im Western-Blot erkennbar, so dass anzunehmen ist, dass AXR1 an multiplen Lysinen neddyliert werden kann. Solche multiplen Neddylierungen wurden bereits für NEDD8-Substrate anderer Spezies beschrieben, wobei es sich zum Teil auch um NEDD8-Ketten zu handeln scheint [Rabut and Peter, 2008; Hakenjos et al., 2013; Ma et al., 2013]. Welche Lysine in AXR1 modifiziert werden und ob es sich um multiple Mononeddylierungen oder um eine Polyneddylierung handelt, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Keines der 40 internen Lysine wurde als Neddylierungsstelle in MS-Analysen gefunden, obwohl für AXR1 eine Abdeckung der Peptidsequenz von 64 % erreicht wurde.

#### 3.3.1. Das E1 Enzym wird autoneddyliert

Während NEDD8-Substrate üblicherweise über die Enzymkaskade aus E1-aktivierendem Enzym, E2-konjugierendem Enzym und E3 Ligase modifiziert werden ist die Neddylierung

von AXR1 höchstwahrscheinlich das Ergebnis einer Autoneddylierung des E1 Enzyms. Frühere Studien beschreiben eine solche Automodifizierung für E1 und E2 Enzyme von Ubiquitin und SUMO [Arnold and Gevers, 1990; Banerjee et al., 1993; Bencsath et al., 2002; Zhou et al., 2004; Hsiao et al., 2009]. Wie die Versuche mit den aufgereinigten Proteinen AXR1, ECR1 und HA:NEDD8 gezeigt haben, kann AXR1 *in vitro* ohne die Anwesenheit eines E2 oder E3 Enzyms modifiziert werden. Denkbar ist, dass entweder die reaktive NEDD8-AMP Verbindung mit dem E1 Enzym reagiert oder dass der NEDD8-ECR1 Thioester von einem Lysin von AXR1 angegriffen wird. Interessant ist jedoch vor allem die Beobachtung, dass in beiden Fällen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, nur AXR1 und nicht ECR1 Opfer dieser Autoneddylierung wird. Nähere Einblicke in den Mechanismus könnte daher die Identifizierung der Modifizierungsstelle in AXR1 im Kontext mit dem detailliert beschriebenen Aktivierungsmechanismus des NEDD8 E1 Enzyms bringen [Walden et al., 2003; Huang et al., 2007].

*In vivo* wird NEDD8 scheinbar sehr effizient von ECR1 auf das E2 Enzym RCE1 übertragen, so dass der ECR1-NEDD8 Thioester nicht mittels Western-Blot nachweisbar ist. Nimmt man an, dass die E1 Thioesterbildung für die Neddylierung von AXR1 notwendig ist, wirft dies die Frage auf, warum es unter diesen Bedingungen zu der Bildung von AXR1-NEDD8 kommt. Die Expressionslevel der Komponenten des NEDD8-Systems sind relativ vergleichbar [Woodward et al., 2007], so dass ausreichend E2 Enzym zur Verfügung stehen sollte, um NEDD8 vom E1 Enzym zu übernehmen. Eine Erklärung könnte in den Bindeaffinitäten von E1, E2 und E3 Enzymen liegen. Die E1 und E3 Bindedomänen im E2 Enzym überlappen sich, so dass nur eine aufeinanderfolgende Bindung E1 zu E2 beziehungsweise E2 zu E3 möglich ist [Bencsath et al., 2002; Eletr et al., 2005; Huang et al., 2005; Reverter and Lima, 2005]. Ein Teil des E2 Enzymreservoirs pendelt demnach zwischen dem E1 Enzym und der jeweiligen E3 hin und her, wodurch es zu einem Mangel an freiem E2 für die Übernahme des NEDD8 Thioesters kommen könnte. Die Überexpression von RCE1 in *den1* Mutanten könnte wohl Auskunft darüber geben, ob die AXR1-Neddylierung *in vivo* mit der Transthioester-Reaktion konkurriert (siehe Abbildung 26).

### 3.3.2. AXR1, NEDD8 und die CRLs

Die Modifikation mit NEDD8 kann unterschiedliche Effekte auf die Funktion eines Substrats haben. Einige Proteine werden stabilisiert oder destabilisiert, zeigen ein anderes Interaktionsverhalten oder ändern ihre Lokalisation [Enchev et al., 2014; Mergner and Schwechheimer, 2014]. Welche Auswirkung die Neddylierung auf AXR1 hat ist noch unklar. Der Komplex zwischen AXR1 und ECR1 scheint durch die Modifikation nicht beeinträchtigt zu werden und auch hinsichtlich ihrer Stabilität waren keine Unterschiede zwischen der modifizierten und unmodifizierten Form von AXR1 erkennbar. Ungeachtet dieser noch

offenen Frage ist jedoch offensichtlich, dass die Neddylierung von AXR1 eine negative Auswirkung auf die CRL-Aktivität hat. Alleine ist dieser Effekt zu schwach, um in der *den1* Mutante in Augenschein zu treten. Unter Bedingungen, in denen die NEDD8 E1 Aktivität jedoch bereits beeinträchtigt ist, wie durch die Zugabe des E1 Inhibitors MLN4924 oder in *axr1* Mutanten, führt der Verlust der DEN1 Aktivität zu einem verstärkten Phänotyp. Dies stimmt mit früheren Studien überein, die zeigen konnten, dass eine zunehmende Verminderung der E1 Aktivität mit zunehmend stärkeren Phänotypen einhergeht [del Pozo et al., 2002; Dharmasiri et al., 2007]. *axr1* Mutanten sind zwergwüchsig, haben eine verminderte apikale Dominanz, eingerollte Blätter und sind teilweise steril [Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993]. Eine Kombination des starken *axr1-12* Allels mit einer dominant-negativen Form von ECR1 verstärkt diesen Phänotyp noch weiter und die Mutation der beiden redundanten Gene *AXR1* und *AXL* führt zu einem Entwicklungsstopp im Keimlingsstadium oder zum Teil auch schon während der Embryonalentwicklung [del Pozo et al., 2002; Dharmasiri et al., 2007].

Die meisten Aspekte des *axr1* Phänotyps können durch eine Störung der Auxinantwort erklärt werden [Walker and Estelle, 1998; del Pozo et al., 2002]. Das F-Box Protein TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) und seine Homologe AFB1-5 (AUXIN SIGNALING F-BOX) dienen als Rezeptoren für das Phytohormon Auxin [Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005]. Eine Inhibition der NEDD8 E1 Funktion führt zu einer verminderten Neddylierung der Culline, woraus sich eine Inhibition der CRL SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup> und letztendlich eine Beeinträchtigung der Auxinantwort ergibt [del Pozo et al., 2002; Dharmasiri et al., 2007]. Weitere Aspekte der pleiotropen Phänotypen von Mutanten des NEDD8-Systems sind dadurch erklärbar, dass die gestörte Cullin-Neddylierung alle Klassen von CRLs, SCF, BTB und DWD in ihrer Funktion beeinträchtigt. So sind neben den Phytohormonantworten auch viele weitere Prozesse wie der Zellzyklus oder die Pathogenabwehr von Störungen des NEDD8-Systems betroffen [Dohmann et al., 2005; Dreher and Callis, 2007; Santner and Estelle, 2010].

Für die Theorie, dass die Neddylierung von AXR1 die Cullin-Neddylierung vermindert, spricht auch die Beobachtung, dass der Phänotyp von *axr1* Mutanten durch die Kombination mit dem *den1* Allel verstärkt wird, während für das schwache *csn5a-2* Allel eine leichte Abschwächung des Phänotypes erkennbar war. Für eine normale CRL-Funktion ist die Balance aus Cullin-Neddylierung und Deneddylierung essenziell. Eine verminderte Neddylierungsaktivität hat negative Auswirkungen auf den Phänotyp einer Neddylierungsmutante, während für eine Deneddylierungsmutante ein positiver Effekt möglich ist. Trotz des deutlichen physiologischen Phänotyps war für beide genetischen Kombinationen *axr1-30 den1* und *csn5a-2 den1* auf biochemischer Ebene keine signifikante Veränderung der Cullin-Neddylierung erkennbar. Da bereits kleine Veränderungen im

Gleichgewichtszustand der modifizierten und unmodifizierten Form der Culline ausreichen, um den physiologischen Phänotyp drastisch zu verstärken, wie es bei *csn5a-1*, *csn5a-2* und *csn5a-2 csn5b-1* Mutanten zu sehen ist [Dohmann et al., 2005], sind schwache phänotypische Veränderungen wie in der *den1* Mutante biochemisch wahrscheinlich nur schwer nachweisbar.

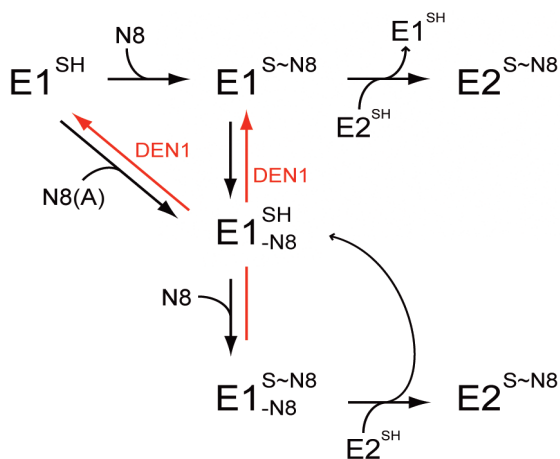
DEN1 hat somit über seine Rolle in den ersten Schritten der NEDD8-Konjugation indirekt doch einen schwachen Einfluss auf die Cullin-Neddylierung und den proteasomalen Proteinabbau. Ob DEN1 auch in anderen Organismen über die Deneddylierung des E1 Enzyms mit dem CRL-System verbunden ist bleibt abzuwarten. Geht man davon aus, dass DEN1 nicht entscheidend für die NEDD8 Prozessierung ist würde ein derartiger Mechanismus jedoch die Beobachtung erklären, dass der *knock-down* von SENP8/NEDP1 in humanen Zelllinien zu einer verminderten Cullin1-Neddylierung führt [Ehrentraut et al., 2013]. Über die Deneddylierung einzelner E3 Ubiquitinligasen wie MDM2 [Xirodimas et al., 2004; Watson et al., 2010], SMURF1 (SMAD UBIQUITINATION REGULATORY FACTOR 1) [Xie et al., 2014], BRAP2 (BRCA1-ASSOCIATED PROTEIN 2) [Takashima et al., 2013], Parkin [Choo et al., 2012; Um et al., 2012] und drICE (INTERLEUCIN-1 $\beta$ -CONVERTING ENZYME) [Broemer et al., 2010] nimmt DEN1 in anderen Organismen aber auch direkt Einfluss auf den Abbau einzelner Proteine. Für die weitere Charakterisierung der Arabidopsis *den1* Mutante und möglicher neuer NEDD8-Substrate und ihrer Funktion wird es daher wichtig sein, zwischen allgemeinen CRL- und substratspezifischen-Effekten zu unterscheiden.

### 3.3.3. Regulation oder Nebenreaktion?

Welche Rolle die Neddylierung von AXR1 und damit die Deneddylaseaktivität von DEN1 für AXR1-NEDD8 innerhalb des NEDD8-Konjugationssystemes spielt, konnte noch nicht schlüssig geklärt werden. Es ist durchaus denkbar, dass es sich bei der Modifikation der E1 Untereinheit um einen regulatorischen Mechanismus handelt. Das NEDD8-System verfügt nur über ein einziges E1 Enzym, so dass eine Regulation an diesem Punkt des Konjugationssystems einen starken Einfluss auf die Neddylierungsaktivität ermöglicht. Die Automodifikation von E1 und E2 Enzymen ist schon früher für den Ubiquitin oder SUMO-Konjugationsweg beschrieben worden [Arnold and Gevers, 1990; Banerjee et al., 1993; Bencsath et al., 2002; Zhou et al., 2004; Hsiao et al., 2009]. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass die Sumoylierung des SUMO E1-aktivierenden Enzyms sowohl einen Einfluss auf seine Lokalisation als auch auf die Interaktion mit dem E2 Enzym und den Thioestertransfer haben kann. In diesem Fall ist es jedoch spezifisch die katalytische Untereinheit des Heterodimers, die sumoyliert wird [Truong et al., 2012a; Truong et al., 2012b]. Ein ähnliches Szenario wäre auch für die NEDD8 E1 aus Arabidopsis möglich. In *den1* Mutanten ist die Menge an nachweisbarem E2-NEDD8 Thioester im Vergleich zum



Wildtyp reduziert. Gleichzeitig war jedoch keine Reduktion für das freie NEDD8 Monomer in *den1* Mutanten offensichtlich. Dies spricht dafür, dass die Reduktion des E2-NEDD8 Thioesters durch eine Störung der E1 Thioesterbildung oder des NEDD8-Transfers von E1 auf E2 zurückzuführen ist und nicht auf eine Reduktion des freien NEDD8-Reservoirs. Die Modifizierung von AXR1 leitet einen Teil des NEDD8 von der E1-E2 Transthoester-Reaktion ab (Abbildung 26). Dies könnte eine Alternative zum Thioestertransfer darstellen, wenn kein E2 Enzym für die Übernahme von NEDD8 zur Verfügung steht. Auf diese Weise würde verhindert, dass der reaktive NEDD8-Thioester ungewollte Addukte mit kleinen zellulären Nukleophilen bildet [Reyes-Turcu et al., 2009]. Je nachdem, ob auch das neddylierte E1 Enzym die Bindung des E2 und eine Transthoester-Reaktion erlaubt, ergeben sich daher zwei möglich Szenarien. Wenn die Neddylierung von AXR1 keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des E1 Enzyms hat, kann die Bildung des E2 Thioesters über die Verfügbarkeit von freiem NEDD8 reguliert werden. Sobald das gesamte E1-Reservoir neddyliert ist, wäre die ursprüngliche Kinetik des E1-E2-Systems wiederhergestellt. Ist die enzymatische Aktivität des E1 Enzyms dagegen beeinträchtigt, durch eine verminderte E1 Thioesterbildung oder eine Störung der Transthoester-Reaktion, so konkurriert die AXR1-Neddylierung mit der Transthoester-Reaktion. Unter diesen Bedingungen könnte eine erhöhte E2-Konzentration das Gleichgewicht zur Transthoester-Reaktion hin verlagern.



**Abbildung 26: Model des E1-E2 Reaktionsschemas.**

Das freie E1 Enzym (SH) bildet einen Thioester mit NEDD8 (S~N8). Der Thioester kann entweder an das E2 Enzym weitergegeben oder über eine Isopeptidbindung an das E1 Enzym gebunden werden (-N8). Alternativ könnte auch das NEDD8-Adenylat (N8(A)) mit dem E1 Enzym reagieren. Die neddylierte Form des E1 Enzyms kann erneut NEDD8 (N8) über einen Thioester binden und auf das E2 Enzym übertragen. DEN1 hydrolysiert NEDD8 wieder vom E1 Enzym.

Für die Enzyme des SUMO-Weges lässt sich eine regulatorische Funktion gut mittels Hitzebehandlung nachweisen, da die globale Sumoylierung als Stressantwort stark ansteigt [Miller and Vierstra, 2011; Truong et al., 2012a]. Im Falle von NEDD8 sind dagegen keine experimentellen Bedingungen bekannt, die zu einer deutlichen Veränderung des Neddylierungsmusters führen, so dass sich der Beweis der regulatorischen Funktion der AXR1-Neddylierung schwierig gestaltet. Es ist ebenso möglich, dass die Autoneddylierung der E1 Untereinheit ein ungewolltes Nebenprodukt der NEDD8-Aktivierung ist und die

Funktion von DEN1 darin besteht, fälschlich gebundenes NEDD8 wieder für den NEDD8-Weg zu regenerieren oder das Reservoir an freiem E1 aufrechtzuerhalten.

Welche biologischen Prozesse die Komponenten des NEDD8-Systemes regulieren ist allgemein noch eine offene Frage [Rabut and Peter, 2008]. Die Expression von NEDP1 kann durch die Behandlung mit DNA-schädigenden Chemikalien induziert werden [Watson et al., 2010]. NEDP1 deneddyliert die Ubiquitin-E3-Ligase MDM2 wodurch das Protein destabilisiert wird. Dies wiederum führt zur Stabilisierung des Substrates von MDM2, des Tumorsuppressors p53 und zur Einleitung des programmierten Zelltodes [Watson et al., 2010]. Expressionslevel des CSN-Komplexes lassen sich ebenfalls durch apoptotische Stimuli induzieren [Hetfeld et al., 2008]. Dies führt zu einer vermehrten Cullin-Deneddylierung und deaktiviert die CRLs. Das potentielle Krebsmedikament MLN4924 nutzt die Blockierung des E1 Enzyms für den gleichen Effekt. Eine weitere Komponente des NEDD8-Systems ist das Protein NUB1 (NEDD8 ULTIMATE BOOSTER 1). NUB1 interagiert mit NEDD8 und NEDD8-Konjugaten und fördert ihren Abbau über das 26S Proteasom [Kamitani et al., 2001; Kito et al., 2001; Tanaka et al., 2003; Liu et al., 2013]. Das Zusammenspiel all dieser Komponenten, Neddylierung, Deneddylierung und Abbau von NEDD8 und seinen Substraten bildet ein komplexes Netzwerk, das eine feine Regulation der Substratneddylierung ermöglicht.

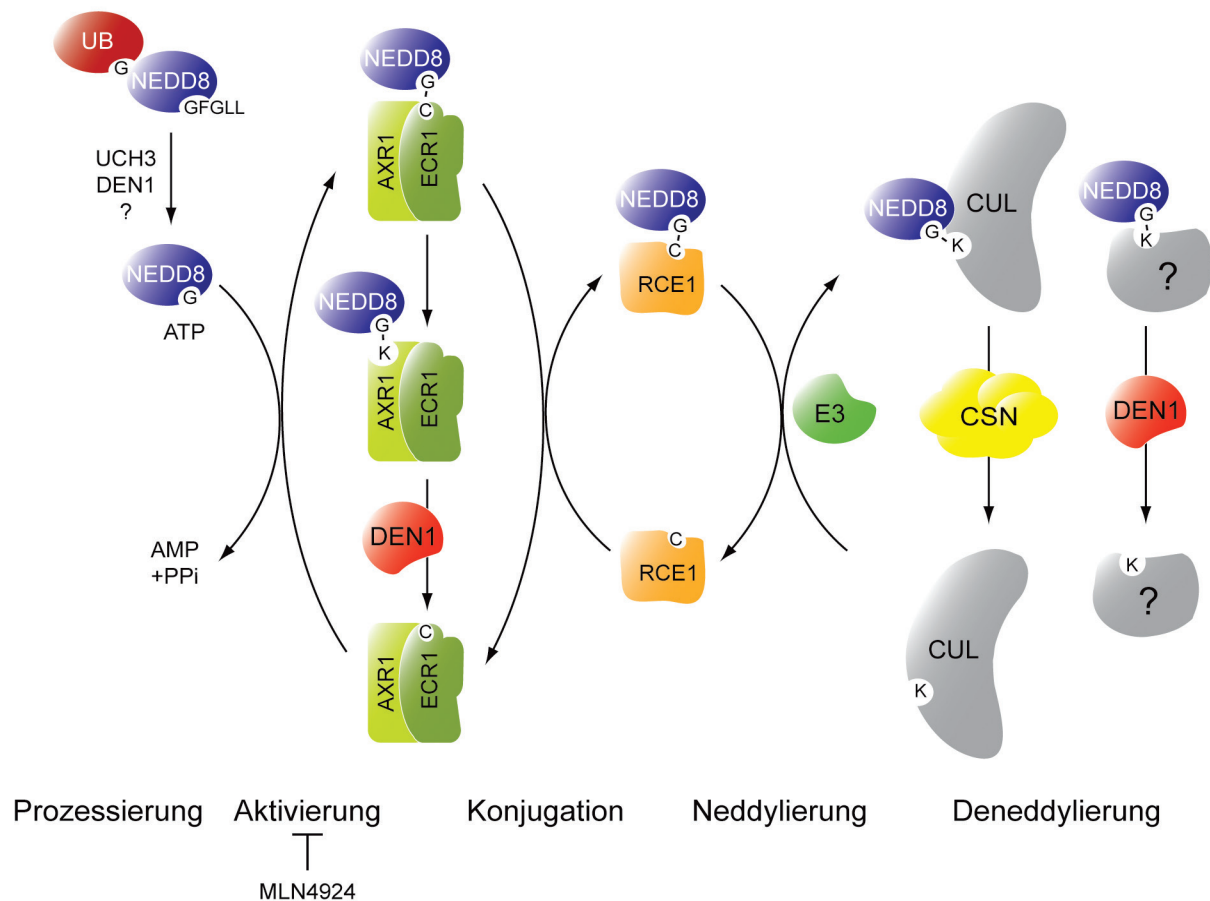
### 3.4. Schlussfolgerung

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Charakterisierung der enzymatischen Funktion des DEN1 Orthologs aus *Arabidopsis thaliana* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und der Identifizierung noch unbekannter NEDD8-Substrate.

Ich konnte bestätigen, dass es sich bei dem Gen AT5G60190 um eine NEDD8-spezifische Cysteinprotease handelt, die in *Arabidopsis* das Ortholog der DEN1 Familie ist. DEN1 zeigt *in vitro* eine Aktivität als NEDD8-prozessierendes und NEDD8-dekonjugierendes Enzym. *In vivo* sind an der Prozessierung von NEDD8 wahrscheinlich mehrere DUBs aus dem Ubiquitin-System wie zum Beispiel UCH3 im Zusammenspiel mit DEN1 beteiligt und DEN1 fungiert als eine Deneddylase für andere NEDD8-Substrate als die Culline (Abbildung 27). Die Substratspezifität von DEN1 wird dabei über die Erkennung von NEDD8 vermittelt, so dass es als eine generelle Deneddylase betrachtet werden kann. Die Deneddylierungsaktivität des CSN-Komplexes ist dagegen substratspezifisch und auf die Culline beschränkt. Die Analyse von *den1* Mutanten hat gezeigt, dass es noch weitere nicht-identifizierte NEDD8-Substrate in *Arabidopsis* gibt. Eines dieser DEN1-abhängigen Substrate konnte ich als AXR1 identifizieren.

Bei AXR1 handelt es sich um das dritte bekannte NEDD8-Substrat in Pflanzen und um das erste, für das eine spezifische Funktion von DEN1 nachgewiesen wurde. Die

Modifizierung von AXR1 erfolgt durch eine Autoneddylierung des E1 Enzyms und wird von DEN1 wieder hydrolysiert (Abbildung 27). AXR1 erfüllt die Kriterien für ein echtes NEDD8-Substrat [Rabut and Peter, 2008; Enchev et al., 2014]. Ich konnte zeigen, dass AXR1 mit NEDD8 eine stabile Isopeptidbindung eingeht und dass die Neddylierung von AXR1 durch MLN4924 inhibiert werden kann. Außerdem ist die Neddylierung unter homöostatischen Bedingungen und mit endogenen Mengen an AXR1 und NEDD8 nachweisbar. Zuletzt konnte ich mit der Beeinträchtigung der NEDD8-E2 Thioesterbildung auch einen biologischen Effekt der AXR1 Neddylierung zeigen. Dies äußert sich in einer schwachen Reduktion der CRL-Aktivität, die wohl durch die veränderte Dynamik der Cullin-Neddylierung verursacht wird. Bei der Modifikation von AXR1 könnte es sich somit um einen Rückkopplungs-Mechanismus zur Regulation des NEDD8-Systems handeln.



**Abbildung 27: Die Funktion von DEN1 innerhalb des NEDD8-Systems.**

Die Deneddylyase DEN1 dekonjugiert NEDD8 von der E1-Untereinheit AXR1 und anderen noch nicht identifizierten Substraten. Cystein (C), Glycin (G), Leucin (L), Lysin (K), Phenylalanin (F), Cullin (CUL), COP9-Signalosom (CSN).

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Bakterienstämme

Für Klonierungen und die Vervielfältigung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm XL1-Blue (*recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F<sup>+</sup>, *proAB*, *lacqZΔM15*, Tn10 Tet<sup>r</sup>]; Agilent Technologies/Stratagene, Santa Clara, USA) verwendet. Gateway-Vektoren wurden in dem *E. coli* Stamm *ccdB Survival*<sup>TM</sup>2 (F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZΔM15* Δ*lacX74* *recA1* *araΔ139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG* *fhuA::IS2*, Lifetechnologies/Invitrogen, Carlsbad, USA) vermehrt. Für die Proteinexpression in *E. coli* wurde der Stamm *rosetta*(DE3)pLysS (F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS<sub>B</sub>*(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub>) *gal* *dcm* λ(DE3 [*lacI* *lacUV5-T7* gene 1 *ind1* *sam7* *nin5*]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>); Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Für die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV3101 pMP90 [Koncz, 1986] und GV3101 pSOUP [Hellens et al., 2000] verwendet.

#### 4.1.2. Pflanzenlinien und Mutanten

Alle Experimente wurden mit dem *Arabidopsis* Ökotyp Columbia-0 (Col) durchgeführt.

##### 4.1.2.1. Transgene Linien

Für die Überexpression von NEDD8 oder Ubiquitin wurden die DEX-induzierbaren Linien HA:STREPII:NEDD8 [Hakenjos et al., 2011] und HA:STREPII:UBIQUITIN [Hakenjos et al., 2011] verwendet. Die Linie zur Expression von myc-getaggetem AXR1, AXR1p:10MYC-AXR1 line1 (myc:AXR1) [Hotton et al., 2011] wurde freundlicherweise von Judy Callis (University of California, Davis, CA) bereitgestellt.

##### 4.1.2.2. T-DNA Insertionslinien

Samen für die *den1-1* (GK381A12) und *den1-2* (SAIL\_588\_H02) Linien wurden über den Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; Loughborough, UK) bezogen. Andere, bereits charakterisierte T-DNA Insertionsmutanten, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind: *csn5a-1* (SALK\_063436; [Dohmann et al., 2005], *csn5a-2* (SALK\_027705; [Dohmann et al., 2005], *csn5b-1* (SALK\_007134; [Dohmann et al., 2005], *rub1* (SALK\_052387C; [Bostick et al., 2004], *rub2-2* (SAIL\_379\_D02; [Bostick et al., 2004] und *axr1-30* (SAIL\_904\_E06; [Gilkerson et al., 2009].

### 4.1.3. Proteinnachweis

#### 4.1.3.1. Antikörper

Folgende primären Antikörper wurden für den Nachweis von Proteinen im Western-Blot verwendet:  $\alpha$ CDC2 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA);  $\alpha$ CSN5 (1:3000; [Kwok et al., 1998]);  $\alpha$ CULLIN1 (1:1000; [Schwechheimer et al., 2002]);  $\alpha$ CULLIN4 (1:1000; [Dohmann et al., 2005]);  $\alpha$ FLAG (1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);  $\alpha$ HA-Peroxidase (1:1000; Roche, Penzberg, Deutschland);  $\alpha$ NEDD8 (1:1000; [Hakenjos et al., 2011]);  $\alpha$ -myc (1:3000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);  $\alpha$ RGA (1:1000; [Willige et al., 2007]);  $\alpha$ Ubiquitin P4D1 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA);  $\alpha$ UGPase (1:2500; Agrisera, Vännäs, Schweden). Zur Herstellung des  $\alpha$ DEN1 Antikörpers wurden zwei Hasen mit aus *E. coli* aufgereinigtem DEN1 Protein immunisiert. Die Antikörperproduktion erfolgte durch die Firma Eurogentec (Liege, Belgien). Zum Nachweis von DEN1 wurde in dieser Arbeit das Serum verwendet.

Als sekundäre Antikörper wurden  $\alpha$ Hase-IgG-Peroxidase (1:1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und  $\alpha$ Maus-IgG-Peroxidase (1:2000; Thermo Scientific/Pierce, Waltham, USA) benutzt.

#### 4.1.3.2. Matrizes zur Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung von Proteinen aus Pflanzenextrakten oder Bakterienlysaten wurden folgende Affinitätsmatrizes verwendet: Strep-Tactin Superflow (1 ml Säulen; IBA, Göttingen, Deutschland);  $\alpha$ FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland); Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA); Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und Talon® Metal Affinity Resin (Takara Bio Europe/ Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich).

#### 4.1.4. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

##### 4.1.4.1. Genotypisierungsprimer

Tabelle 2: Genotypisierungsprimer

Name	Sequenz (5' zu 3')
DEN1 RP	TTACACTGAACGAAATTGGGC
DEN1 LP	GGGAATTGTCAGCTGTTTCATC
CSN5A FW2	GTTTTGGATTAGCATTAGTCCCCAAATC
CSN5A RV2	TTATACATACCTGTTTGCAAATG
CSN5A-2 RP	TCACCTTCTGGATCTCCTTTG
CSN5A-2 LP	ACGATGTAATCATGGGCTCTG
CSN5B FW	AAGATCTCAGCGCTCGCTCTTCTTAAG
CSN5B RV	ATGGCACAACTCCTCAAAGCGAGAC
RUB1 RP	CGTAGCCCAAAAGCTAATTACG
RUB1 LP	AAGAGCTGAGCTGAAAGGAGC
RUB2 RP	TTTATCCCCTCAAACGATTCC
RUB2 LP	TGACGCCATATTCAAGGTCTC
AXR1 RP	TCTGTCCGCAGCTCTAAGAAG
AXR1 LP	TGCAAACCTGCAACTCATTTTG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
GK (8409)	ATATTGACCATCATACTCATTGC

Tabelle 3: Primerkombinationen für die Genotypisierung

PCR	Primer-Kombinationen zur Genotypisierung
DEN1 WT <i>den1-1</i> mut <i>den1-2</i> mut	DEN1 RP + DEN1 LP DEN1 RP + GK (8409) DEN1 RP + LB3
CSN5A-1 WT <i>csn5a-1</i> mut	CSN5A FW2 + CSN5A RV2 CSN5A FW2 + LBb1.3
CSN5A-2 WT <i>csn5a-2</i> mut	CSN5A-2 RP + CSN5A-2 LP CSN5A-2 RP + LBb1.3
CSN5B WT <i>csn5b-1</i> mut	CSN5B FW + CSN5B RV CSN5B FW + LBb1.3
RUB1 WT <i>rub1</i> mut	RUB1 RP + RUB1 LP RUB1 RP + LBb1.3
RUB2 WT <i>rub2</i> mut	RUB2 RP + RUB2 LP RUB2 RP + LB3
AXR1 WT <i>axr1-30</i> mut	AXR1 RP + AXR1 LP AXR1 RP + LB3

##### 4.1.4.2. Klonierungsprimer

Tabelle 4: Klonierungsprimer

Name	Sequenz (5' zu 3')
GTW_DEN1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGGGAAATACTTCTGATGAC
GTW_DEN1 rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTACTCACACTCTCAGAC
GTW_DEN1 rv2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCCTTACTCACACTCTCAGAC
DEN1 K217218R rv	CTCAGACATCAACCTCCTGATCAGCGCCAA
DEN1 BamHI fw	ATGGATCCATGGGAAATACTTCTGATGACGAC
DEN1 NotI rv	ATGCGGCCGCTCACTTACTCACACTCTCAGAC
UCH3 EcoRI fw	ATGAATTCATGGCGACCGCAAGCGAGA
UCH3 NotI rv	ATGCGGCCGCTCAGGTTCTCTTAGAGATGG
DEN1CA fw	AATGGGTACGACGCCGGTGTTCCTT
DEN1CA rv	AAGGAAAACACCGGCGTCGTACCCATT

## Material und Methoden

Name	Sequenz (5' zu 3')
BamHI UBQ fw	ATGGATCCATGCAGATCTTCGTCAAAACC
XhoI RUB1 rv	CTCGAGACCACCCCTAAGGGCAAGAAC
HindIII RUB1 fw	ATAAGCTTATGATTAAGGTGAAGACTCT
XhoI UBQ rv	CTCGAGCCCACCCCTAAGCCTGAATAC
N8UB fw	TGGTATGCAGATCTTCGTC
N8UB rv	AGATCTGCATACCACCCCTAAGG
XhoI His-StrepII fw	ATCTCGAGATGCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGTGGTTTCATGGTCTCATCCTCAA TTTGAAAAA
XhoI His fw	ATCTCGAGATGCATCACCATCACCATCAC
NEDD8 Spel rv	ATACTAGTTCAACCACCCCTAAGGGCAA
pRUB1 fw	ATCTGCAGATCTGTTTGGTTGTGGAAATATGGA
pRUB1 rv	GTGATGGTGTGGTGTGCATGGATCCTTTTTTTTCTTTTCTTCGCTGAAATG
rbcS-3A rv	ATGCGGCCGCTACTGTACTTAACCTTGATTGCA
HAN8 NdeI fw	ATATCATATGTATCCATACGATGTTCCAGATTATGCTGTCGGTGGAGGAGGTGGTACTATGAT TAAGGTG
HAN8 EcoRI rcv	ATGAATTCTTAACCACCCCTAAGGGCAAG
GTW DCAF1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGACGGGCAAGAGCAT
GTW DCAF1 rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGCAGGAAGAACAATGTTGTC
DCAF1 NcoI-L fw	GGTGGAGGAGGTGGTGGAGGACCATGGGAATCGCAGGGATC
DCAF1 XhoI-L rv	TCCTCCACCACCTCCTCCACCCTCGAGTAGCAGCAGACAC
DCAF1 XhoI	AAGAAGCTGCTGTGTCTGCT
DCAF1 NcoI rv2	ACTGACGATCCCTGCGATTC
DCAF1_C3 fw	AGATCATCCAGCCTGCACTAAAT
DCAF1_C3 r	CTTGACGATAAACCTGCTCCAAC

### 4.1.5. Vektoren

Tabelle 5: Für Klonierungen verwendete Vektoren

Vektor	Referenz	Konstrukte	<i>E. coli</i> Stamm	Agrobakterienstamm
pGreen0179	[Hellens et al., 2000]	RUB1 <sub>pro</sub> :His:StrepII:NEDD8	XL1-Blue	GV3101 pMP90 pSOUP
pDONR201	Life technologies/ Invitrogen, Carlsbad, USA	pDONR201-DEN1-STOP pDONR201-DEN1 pDONR201-DEN1KR pDONR201-DCAF1	XL1-Blue	-
pEarleyGate101	[Earley et al., 2006]	35S:DEN1 35S:DEN1:YFP:HA	XL1-Blue	GV3101 pMP90
pEarleyGate202	[Earley et al., 2006]	35S:FLAG:DEN1 35S:FLAG:DEN1K217218R	XL1-Blue	GV3101 pMP90
pGWB417	[Nakagawa et al., 2007]	35S:DCAF1:4MYC	XL1-Blue	GV3101 pMP90
pET28a	Novagen/Merck Darmstadt, Deutschland	His:HA:NEDD8	rosetta(DE3)	-
pET21a	Novagen/Merck Darmstadt, Deutschland	UB:NEDD8:His NEDD8:UB:His	rosetta(DE3)	- -
pGEX 6p-1	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	GST:DEN1 GST:DEN1C166A GST:UCH3	rosetta(DE3)	- - -
pTA7002	[Aoyama and Chua, 1997]	RUB1 <sub>pro</sub> :His:StrepII:NEDD8	XL1-Blue	-
topo2.1	Life technologies/ Invitrogen Carlsbad, USA	RUB1 <sub>pro</sub> :His:StrepII:NEDD8 GST:DEN1	XL1-Blue	- -
pJet1.2	Thermo Scientific Carlsbad, USA	NEDD8:UB:His His:HA:NEDD8 35S:DCAF1:4MYC	XL1-Blue	- - -

Die Vektoren zur Expression von GST:ECR1, pDEST15-ECR1 und His:AXR1, pDEST17-AXR1 wurden freundlicherweise von Judy Callis (University of California, Davis, CA) bereitgestellt [Hotton et al., 2011].



## 4.1.6. Chemikalien und Reagenzien

### 4.1.6.1. Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
6-Benzylaminopurin (6-BA)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar für die Bakteriologie	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ampicilin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Avidin	IBA, Göttingen, Deutschland
Basta	Bayer, Leverkusen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bleomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumhypochlorit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Casein	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<i>cComplete</i> EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cycloheximid (CHX)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Desthiobiotin	IBA, Göttingen, Deutschland
Dexamethason (DEX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gentamycinsulfat	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Glucose	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin-Hydrochlorid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hexylenglycol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Imidazol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kanamycinsulfat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
L-Glutathion	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES) Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
MLN4924	Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, USA
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Murashige &amp; Skoog Medium, including Gamborg B5 vitamins</i>	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdisulfit (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
N-Ethylmaleimid (NEM)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pflanzenagar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PIPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rifampicin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Silwet	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 4.1.6.2. Enzyme und Kits

Tabelle 7: Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>CloneJet PCR Cloning</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Lysozym	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
<i>M-MuLV Reverse Transcriptase</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>NucleoSpin RNA</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</i>	New England BioLabs, Ipswich, USA
<i>PreScission Protease</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase A	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>T4 DNA Ligase</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>TOPO TA Cloning</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega, Fitchburg, USA

### 4.1.6.3. Marker und Substrate

Tabelle 8: Marker und Substrate

Bezeichnung	Hersteller
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) Standard</i>	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
<i>NEDD8-AMC</i>	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
<i>Ubiquitin-AMC</i>	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
<i>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Generelle Pflanzenarbeiten

#### 4.2.1.1. Samensterilisierung und Wachstumsbedingungen

Für die Anzucht von Pflanzen unter sterilen Bedingungen wurden Samen für 15 min mit einer gesättigten Calciumhypochloritlösung und anschließend für 30 s mit 70 %igem Ethanol Oberflächen-sterilisiert. Danach wurden die Samen drei- bis fünfmal mit sterilisiertem Wasser gewaschen und auf GM- (4.3 g/l Murashige & Skoog Medium; 10 g/l Saccharose; 0,5 g/l MES-Monohydrat; 5,5 g/l Agar; pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) oder ½ MS-Wachstumsmedium (2,15 g Murashige & Skoog Medium; 0,5 g/l MES-Monohydrat; 6,5 oder 8 g/l Agar; pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) ausplattiert. Die Samen wurden für 2 d oder 7 d (*csn5* Mutanten) bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend bei 21°C und konstantem Licht (150 µmol/m<sup>2</sup>s) angezogen. Zur Propagation und für Experimente mit adulten Pflanzen wurden 7 d alte Keimlinge auf feuchte Erde transferiert und weiterhin bei 21°C und unter konstantem Licht kultiviert. Für die Transformation von *Arabidopsis* mit der *floral dip*-Methode (Clough and Bent, 1998) wurden die Samen direkt auf feuchte Erde ausgebracht, für 2 d bei 4°C stratifiziert und dann ins Licht transferiert. Nach fünf bis sechs Wochen wurden die blühenden Pflanzen transformiert.

#### 4.2.1.2. Kreuzungen

Für die Generierung der Doppel- und Trippelmutanten von *csn5* und *den1* wurden homozygote *csn5a-1* (♀) und *csn5b-1 den1-1* (♂) Mutanten verwendet. Die *csn5b-1 den1-1* Doppelmutante war vorher durch die Kreuzung von *csn5a-2 csn5b-1* (♀) mit *den1-1* (♂) erzeugt worden. Das RHSN-Konstrukt wurde über eine Kreuzung von *rub1 RUB2/rub2* RSHN (♀) mit *den1-1* (♂) in den *den1* Hintergrund eingebracht. Doppelmutanten für *axr1-30* und *den1* wurden durch die Kreuzung von *axr1-30 myc:AXR1* line 1 (♀) mit *den1-1* RHSN (♂) erzeugt. Pflanzen mit dem entsprechenden Genotyp wurden jeweils ab der F2 Generation über PCR-basierte Genotypisierung oder mittels Marker-Selektion identifiziert.

#### 4.2.1.3. Pflanzentransformation

*Arabidopsis thaliana* wurde gemäß der *floral dip*-Methode [Clough and Bent, 1998] transformiert. Dazu wurde Plasmid-DNA mittels Elektroporation in den entsprechenden *Agrobacterium tumefaciens* Stamm transformiert. Nach der Selektion auf LB-Platten (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt) mit 15 g/l Agar mit den zugehörigen Antibiotika für 2 d bei 30°C wurde eine Einzelkolonie in 8 ml LB mit Antibiotika überimpft und für weitere 1 bis 2 d bei 30°C im Schüttelinkubator (180 rpm)

inkubiert. Je 1 ml der Vorkultur wurde zu 500 ml LB mit Antibiotika zugegeben und für 1 d bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g und Raumtemperatur für 15 min pelletiert und in 300 ml Transformationsmedium (2,2 g/l Murashige & Skoog Medium; 0,5 g/l MES-Monohydrat; 50 g/l Glucose; 10 µl/l 6-BA; 200 µl/l Silwet) resuspendiert. Die Infloreszenzen von blühenden Arabidopsis wurden für ein bis mehrere Minuten in die Agrobacteriumsuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen horizontal auf eine Pflanzenschale gelegt, mit Plastikfolie bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen mit Wasser abgesprüht, um die Zuckerlösung zu entfernen, und anschließend bis zur Samenreife unter den oben beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert.

#### 4.2.1.4. Selektion transgener Pflanzenlinien

Für die Selektion auf festen Medien wurden Oberflächen-sterilisierte Samen auf ½ MS- oder GM-Medium mit dem passenden Antibiotikum oder Herbizid ausgebracht. Zur Selektion transgener Linien auf Erde wurden Samen direkt auf Erde ausgebracht und die gekeimten Pflanzen mehrfach mit einer *Basta*-Lösung (Wirkstoff Phosphinothricin (PPT)) besprüht.

Tabelle 9: Selektionsmittel

Konstrukte	Selektionsmittel	
	auf Erde	auf festem Medium
35S:DEN1 35S:FLAG:DEN1 35S:DEN1:YFP:HA 35S:FLAG:DEN1K217218R	<i>Basta</i> (1:3000)	PPT (15 µg/ml)
RUB1 <sub>pro</sub> :His:StreptII:NEDD8		Hygromycin (40 µg/ml)
AXR1 <sub>p</sub> :10MYC-AXR1 Linie1 35S:DCAF1:4MYC		Kanamycin ( 50 µg/ml)

#### 4.2.2. Physiologische Experimente

##### 4.2.2.1. Assay zur Auxinantwort

Zur Analyse des Wurzelwachstums in Antwort auf die exogene Zugabe von Auxin wurden Keimlinge auf GM-Medium einzugesetzt. Die Keimlinge wurden für 5 d angezogen und anschließend auf GM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-D und MLN4924 transferiert. Die Position der Wurzelspitze wurde markiert und nach weiteren 5 d wurden die Platten eingescannt und das relative Wurzelwachstum ausgewertet. Dazu wurde die Zunahme der Wurzellänge mit der Software ImageJ [Schneider et al., 2012] gemessen und das Wurzelwachstum ohne die Zugabe von 2,4-D auf 1 gesetzt. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden mit Microsoft Office Excel berechnet und zur Untersuchung der Signifikanz wurde ein t-Test (zweiseitig, gleiche Varianz) durchgeführt.

#### **4.2.2.2. Behandlungen mit Hormonen, Inhibitoren und anderen Substanzen**

Zur Induktion der Transkription von HSN und HSUB mit Dexamethason (DEX) wurden Keimlinge oder Rosettenblätter in eine Lösung aus flüssigem GM mit 30  $\mu\text{M}$  DEX getaucht und über Nacht bei 21°C inkubiert. Für die Behandlung mit MLN4924 wurden Keimlinge für 5 d auf GM-Medium angezogen und anschließend auf GM-Medium mit 10  $\mu\text{M}$  MLN4924 transferiert. Zur Verfolgung des Proteinabbaus wurden 7 d alte Keimlinge für 2 bis 8 h in flüssigem GM mit 50  $\mu\text{M}$  Cycloheximid (CHX) bei 21°C inkubiert. Zum Test auf oxidativen Stress wurden 7 d alte Keimlinge für weitere 5 d in Flüssig-GM mit 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei 21°C und konstantem Licht inkubiert. Für die genotoxische Stress-Analyse wurden Keimlinge auf GM angezogen, nach 5 d auf GM-Medium mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Bleomycin oder 50 ppm MMS transferiert und nach weiteren 8 d hinsichtlich ihres Wurzellängenzuwachses untersucht.

#### **4.2.2.3. Phänotypische Analyse von *axr1* Mutanten**

Für die Analyse adulter Pflanzen wurden Keimlinge für 7 d auf GM-Platten angezogen und anschließend auf Erde transferiert. Die Pflanzen wurden bei 21°C und unter konstantem Licht kultiviert. Für die Messung des Rosettendurchmessers wurden 28 d alte Pflanzen fotografiert. Der Durchmesser wurde mit der Software ImageJ gemessen, indem mit der Ellipsenfunktion der kleinste Kreis gezeichnet wurde, der die gesamte Rosette enthält. Der Durchmesser des Kreises wurde als der breiteste Durchmesser der Rosette betrachtet. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten kombiniert. Die Messung der Blütenstandhöhe erfolgte mit 49 d alten Pflanzen, indem mit einem Lineal der Abstand zwischen Rosette und längster Blütenstandspitze bestimmt wurde. Mittelwerte und Standardfehler wurden mit Microsoft Office Excel berechnet und zur Untersuchung der Signifikanz wurde ein t-Test (zweiseitig, gleiche Varianz) durchgeführt.

### **4.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse [Birnboim and Doly, 1979]. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur bei 7000 g für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Puffer 1 (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Zuerst wurden 100  $\mu\text{l}$  Puffer 2 (0,2 N NaOH; 1 % SDS) und dann 100  $\mu\text{l}$  Puffer 3 (3 M Natriumacetat pH 4,8) zu der Bakteriensuspension gegeben und der Ansatz jeweils durch Invertieren gut gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 20 000 g für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit 700  $\mu\text{l}$  100 %igem Ethanol vermischt

und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0) mit 500 U/ml RNase A aufgenommen.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde das oben beschriebene Protokoll folgendermaßen abgeändert. Zellen aus 3 ml Flüssigkultur wurden pelletiert und in 300 µl Puffer 1 mit 80 000 U/ml Lysozym resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wurden 300 µl Puffer 2 hinzugefügt, der Ansatz weitere 5 min auf Eis inkubiert und dann 300 µl Puffer 3 zugegeben. Nach der Zentrifugation wurden 700 µl des Überstandes mit 700 µl Phenol-Chloroform (1:1) vermischt und für 2 min bei 20 000 g zentrifugiert. 600 µl der oberen Phase wurden mit dem gleichen Volumen an Isopropanol vermischt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen.

### 4.2.3.2. Klassische Klonierung

Für klassische Klonierungen wurden die PCR-Produkte zum Teil mit den Kits *CloneJet PCR Cloning* (Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder *TOPO TA Cloning* (Lifetechnologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben zwischenkloniert. Diese PCR-Produkte wurden im *pJet* oder *topo2.1*-Vektor sequenziert. Einzelne PCR-Produkte wurden nach dem Restriktionsverdau direkt in den Zielvektor ligiert.

Der Restriktionsverdau der Zielvektoren und Insertionsfragmente erfolgte in einem 20 µl-Ansatz mit den passenden Restriktionsenzymen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern bei 37°C für 1 bis 2 h. Anschließend wurde der Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, USA) aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt und für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 bis 2:1 gewählt. Der Ligationsansatz bestehend aus Vektor, Insert, *T4 DNA Ligase Buffer* und 2,5 U der *T4 DNA Ligase* wurde für 3 h bei Raumtemperatur oder alternativ bei 16°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 2 bis 5 µl des Ansatzes in *E. coli* transformiert.

Tabelle 10: Über Restriktionsverdau-generierte Konstrukte

Konstrukt	Fragmente	Primer	Bemerkungen
RUB1 <sub>pro</sub> :His:StreptII:NEDD8	<i>Pst</i> I-RUB1 <sub>pro</sub> - <i>Bam</i> HI	pRUB1 fw pRUB1 rv	RUB1 <sub>pro</sub> = 1978 bp vor RUB1 ATG; Template: gDNA Col-0
	<i>Bam</i> HI-His:StreptII:NEDD8- <i>Spe</i> I	<i>Xho</i> I His-StreptII fw NEDD8 <i>Spe</i> I rv	Kloniert in pTA7002 und ausgeschnitten mit <i>Bam</i> HI + <i>Spe</i> I; enthält bp 6822-7000 von pTA7002 vor ATG; Template: pTA7002-HSN (Hakenjos et al., 2011)
	<i>Spe</i> I-rbcS 3A- <i>Not</i> I	<i>Xho</i> I His fw rbcS-3A rv	poly(A) Sequenz pea rbcS-3A (Fluhr et al., 1986); Template: pTA7002-HSN (Hakenjos et al., 2011)
DCAF1_C	<i>Xho</i> I-DCAF1_C- <i>Nco</i> I	DCAF1 <i>Xho</i> I fw DCAF1 <i>Nco</i> I rv2 DCAF1_C3 fw DCAF1_C3 rv	Fusions-PCR von C1 (DCAF1 <i>Xho</i> I fw + DCAF1_C3 rv) mit C2 (DCAF1_ C3 fw + DCAF1 <i>Nco</i> I rv2); Template: cDNA Col-0
UB:NEDD8:His	<i>Bam</i> HI-RUB1- <i>Xho</i> I	<i>Bam</i> HI UBQ fw <i>Xho</i> I RUB1 rv	Kodiert für Aminosäuren 1-152 von AT1G31340; Template: cDNA Col-0
NEDD8:UB:His	<i>Hind</i> III-N8UB- <i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III RUB1 fw N8UB rv N8UB fw <i>Xho</i> I UBQ rv	Fusions-PCR von NEDD8 ( <i>Hind</i> III RUB1 fw + N8UB rv) mit UB (N8UB fw + <i>Xho</i> I UBQ rv); AT1G31340 Threonin77 ersetzt durch Methionin Template: pET21a-UN
HA:NEDD8	<i>Nde</i> I-HA:NEDD8- <i>Eco</i> RI	HAN8 <i>Nde</i> I fw HAN8 <i>Eco</i> RI rv	Kodiert für Aminosäuren 77-152 von AT1G31340; Threonin 77 ersetzt durch Methionin; Template: pTA7002-HSN (Hakenjos et al., 2011)
DEN1	<i>Bam</i> HI-DEN1- <i>Not</i> I	DEN1 <i>Bam</i> HI fw DEN1 <i>Not</i> I rv	Template: pDONR201-DEN1
UCH3	<i>Eco</i> RI-UCH3- <i>Not</i> I	UCH3 <i>Eco</i> RI fw UCH3 <i>Not</i> I rv	Template: cDNA Col-0

#### 4.2.3.3. Klonierung mittels Gateway-Technologie

Gateway-Klonierungen wurden entsprechend der Herstellerangaben mit den Kits *Gateway® BP Clonase™ Enzyme mix* und *Gateway® LR Clonase™ Enzyme mix* (Lifetechnologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Der Vektor pDONR201 wurde jeweils für die Herstellung der *entry*-Klone genutzt. Für alle Ansätze wurde das halbe Reaktionsvolumen verwendet und anschließend wurden 1 bis 3 µl des Ansatzes in *E. coli* transformiert.

Für die Herstellung von 35S:DEN1 und 35S:FLAG:DEN1 wurde der *entry*-Klon pDONR201-DEN1-STOP verwendet. Die Konstrukte 35S:DEN1:YFP:HA und 35S:FLAG:DEN1K217218R wurden jeweils mit dem *entry*-Klon pDONR201-DEN1 und pDONR201-DEN1KR kloniert. Für das Konstrukt 35S:DCAF1:4MYC wurde der *entry*-Klon pDONR201-DCAF1 verwendet.

Tabelle 11: *Entry-Klone*

Konstrukt	Primer	Bemerkungen
pDONR201-DEN1-STOP	GTW_DEN1 fw GTW_DEN1 rv	AT5G60190 CDS Template: cDNA Col-0
pDONR201-DEN1	GTW_DEN1 fw GTW_DEN1 rv2	AT5G60190 CDS; Mutation STOP zu Alanin Template: cDNA Col-0
pDONR201-DEN1KR	GTW_DEN1 fw DEN1 K217218R rv GTW_DEN1 rv	nested PCR; Mutation K217 und K218 zu R Template: pDONR201-DEN1-STOP
pDONR201-DCAF1	GTW DCAF1 fw DCAF1 XhoI-L rv DCAF1 NcoI-L fw GTW DCAF1 rv	Fusions-PCR von A (GTW DCAF1 fw + DCAF1 XhoI-L rv) mit B (DCAF1 NcoI-L fw + GTW DCAF1 rv); Template: cDNA Col-0 Insertion von C in pDONR201-DCAF1_AB mittels Restriktionsverdau

#### 4.2.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Um genomische DNA aus *Arabidopsis* aufzureinigen, wurde ein Keimling oder ein Teil eines Rosettenblattes in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube gemörsert und 300 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % SDS) zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei 65°C wurden die Proben für 10 min bei 20 000 g zentrifugiert. 200 µl des Extrakts wurden mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt, gevortext und für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in reinem Wasser aufgenommen.

Für gründlichere DNA-Aufreinigungen wurde das oben beschriebene Protokoll durch einen zusätzlichen Schritt ergänzt: Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurden 250 µl des Extraktes mit 250 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gründlich vermischt. Die Proben wurden 1 min bei 20 000 g zentrifugiert und daraufhin 200 µl der oberen wässrigen Phase mit 200 µl Isopropanol versetzt.

#### 4.2.3.5. RNA-Extraktion aus Pflanzen

Für die Isolierung von RNA aus *Arabidopsis* wurde das Kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 100 mg 7 d alte Keimlinge. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurde mittels Nanodrop gemessen. Zusätzlich wurde die Qualität der RNA mit Hilfe eines RNA-Agarosegels überprüft. Dazu wurden 1 bis 2 µl der isolierter RNA das dreifachen Volumen an Probenpuffer (400 µl Formamid; 140 µl Formaldehyd (37%); 80 µl 10x MEN-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt)) und 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 5x Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,15 % Orange G; 60 % Glycerin; 60 mM EDTA pH 8,0) zugegeben und die RNA über ein FA-Agarosegel (1,5 % Agarose in MEN-Puffer, 0,74 % Formaldehyd) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MEN.



#### 4.2.3.6. cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 1 µg RNA in einem 10 µl-Ansatz mit 2 mM Oligo-dT Primern (Sequenz: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, T= Thymin, V= Adenin, Cytosin oder Guanin, N= Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin) für 10 min bei 65°C inkubiert und dann schnell auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 5x Reaktionspuffer, dNTPs (250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM dGTP, 250 µM dTTP) und 40 U *M-MuLV Reverse Transcriptase* wurde der Reaktionsansatz für 72 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 10 min bei 65°C gestoppt und der Ansatz mit 30 µl reinem Wasser verdünnt.

#### 4.2.3.7. PCR Bedingungen

Für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen für Sequenzierungen, die direkte Klonierung von Insertionsfragmenten oder die Zwischenklonierung von Fragmenten in *pJet* wurde die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* verwendet. Ein 20 µl-Ansatz enthielt 1 U *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, *Phusion HF Buffer*, dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 mM der Primer und entweder 5 µl genomische DNA, 2 µl cDNA oder circa 500 ng Plasmid-DNA als Template. Die PCR-Reaktion hatte folgenden Ablauf: 98°C, 30 s – 25x (98°C, 10 s – mittlere Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer, 30s – 72°C, 30s pro kb) - 72°C, 5 min.

Die Amplifizierung von DNA-Sequenzen für die Zwischenklonierung über das *TOPO TA Cloning* Kit erfolgte mit dem *Expand High Fidelity PCR System* entsprechend der Herstellerangaben. Ein 50 µl-Ansatz enthielt als Template 500 ng Plasmid-DNA, 2,6 U *Expand High Fidelity Enzyme mix*, *Expand High Fidelity Buffer*, dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP) und je 150 µM Primer. Die PCR-Reaktion hatte folgenden Ablauf: 72°C, 2 min - 94°C, 2 min – 30x (94°C, 15 s – mittlere Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer, 30s – 72°C, 45s bis 2 min) - 72°C, 7 min.

Für Genotypisierungen und analytische PCR-Reaktionen wurde eine im Labor hergestellte Taq-Polymerase benutzt. Ein 25 µl Ansatz enthielt 0,2 µl Taq-Polymerase, PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl pH8,4; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 mM Primer und als Template entweder 5 µl genomische DNA, 1 µl cDNA oder circa 500 ng Plasmid-DNA. Die PCR-Reaktion hatte folgenden Ablauf: 94°C, 3 min – 30x (94°C, 1 min – mittlere Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer, 1 min – 72°C, 1min pro kb) - 72°C, 4 min. Die Schmelztemperatur der Primer wurde über folgende Formel berechnet:  $T_M = (GC\text{-Gehalt } [\%] * 0,41) - (650 / \text{Primerlänge } [\text{bp}]) + 69,3$ .

Zur Einführung der Punktmutation Cystein166 zu Alanin166 in DEN1 wurde eine Plasmidmutagenese von pGEX-DEN1 durchgeführt. Dazu wurde das gesamte Plasmid mit den Primern DEN1CA fw und DEN1CA rv mit Hilfe der *Phusion High Fidelity DNA*

*Polymerase* amplifiziert [Fisher and Pei, 1997]. Daraufhin wurden 20 µl des Reaktionsansatzes für 1 h mit 10 U *DpnI* bei 37°C inkubiert. Der linearisierte Vektor wurde anschließend mit dem Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgereinigt und in *E. coli* transformiert.

#### 4.2.4. Biochemische Methoden

##### 4.2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie in Laemmli [1970] beschrieben mit Mini Protean II Zellen (Bio-Rad) durchgeführt. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgele und 10-15 %igen Trenngele wurde Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1 eingesetzt.

##### 4.2.4.2. Coomassie- und Silberfärbung

SDS-Gele wurden bei Raumtemperatur für 1 h mit Coomassie-Färbelösung (0,25 % [w/v] Coomassie R-250; 50 % Ethanol; 10 % Essigsäure) auf einem Schüttler inkubiert. Für die Entfärbung wurde Entfärbungslösung (43 % Ethanol; 7 % Essigsäure) verwendet. Die Lösung wurde mehrfach gewechselt und das Gel anschließend in Wasser aufbewahrt.

Die für die Silberfärbung verwendete Methode basiert auf einem publizierten Protokoll [Sammons, 1981]. Ein SDS-Gel wurden für mindestens 1 h in Fixierlösung (40 % [v/v] Ethanol; 7 % [v/v] Essigsäure) fixiert und anschließend für 30 min in Sensitivierungslösung (30 % [v/v] Ethanol; 12 mM Natriumthiosulfat; 0,8 M Natriumacetat; 0,5 % Glutaraldehyd) inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit Wasser wurde Silberlösung (6 mM Silbernitrat; 6 µl Formaldehyd (37%)) für 20 min hinzugegeben. Das Gel wurde dann erneut für 10 s mit Wasser gewaschen und mit Entwicklerlösung (270 mM Natriumcarbonat, 3 µl Formaldehyd (37 %)) gefärbt bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war. Daraufhin wurde die Reaktion mit Stopplösung (40 mM EDTA) beendet und das Gel anschließend in Wasser aufbewahrt.

##### 4.2.4.3. Western-Blot

Proteine aus SDS-Gelen wurden mittels eines Semidry-Blotters auf Nitrocellulosemembran (Hybond ECL™, GE Healthcare) übertragen. Für den Transfer wurde Semidry-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; 1,3 mM SDS; mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt) verwendet.

Für die Entwicklung über das Peroxidasystem wurde die Membran für 30 min mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T (PBS mit 0,1 % Tween-20) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in PBS-T

mit 5 % Magermilchpulver. Die Membran wurde zweimal für 10 min in PBS-T und einmal 10 min in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur oder 4 h bei 4°C in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen und die Peroxidaseaktivität mit Hilfe des *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific) unter dem *Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini series* (Fujifilm) detektiert.

Das alkalische Phosphatase-System wurde für die Entwicklung der Cullin-Western-Blots verwendet. Hier wurde die Membran mit Caseinpuffer (0,2 % [w/v] Casein; 0,1 % Tween-20; 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) geblockt und die primären und sekundären Antikörper ebenfalls in Caseinpuffer gelöst. Die Detektion erfolgt durch die Zugabe von 550 µM 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und 400 µM Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

#### **4.2.4.4. Proteinextraktion aus Pflanzen**

Für die Proteinextraktion aus Pflanzen wurden Keimlinge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Proteinextraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5 % Triton X-100; *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (PIC); 5 µM N-Ethylmaleinimid (NEM)) auf Eis homogenisiert. Das Verhältnis von Extraktionspuffer [µl] zu Pflanzenmaterial [mg] betrug 1,5. Die Extrakte wurde für 10 min bei 4°C und 16 000 g zentrifugiert um die unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Die Quantifizierung des Proteingehaltes in den Extrakten erfolgte mittels der Bradford-Methode [Bradford, 1976]. Anschließend wurden die Proteinextrakte im Verhältnis 1:4 mit 5x Laemmli (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % SDS; 50 % Glycerin; 0,5 % Bromophenolblau; 3,5 % β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Für die SDS-Gel Analyse unter nichtreduzierenden Bedingungen wurden die Proben mit 5x Laemmli Puffer ohne β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 45°C erhitzt.

#### **4.2.4.5. Proteinaufreinigung aus Pflanzen**

##### **4.2.4.5.1. FLAG-Immunopräzipitation**

Keimlinge wurden in der 1,5-fachen Menge [µl/mg] an Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 10 % Glycerin) mit 0,4 % Triton, PIC und 5 µM NEM auf Eis homogenisiert und die Extrakte anschließend für 10 bis 30 min bei 30 000 g und 4°C zentrifugiert. αFLAG® M2 Affinity Gel wurde im Verhältnis 1:100 (Agarose [µl]/Proteinkonzentration [µg]) zu dem Proteinextrakt hinzugefügt und für 90 min bei 4°C rotierend inkubiert. Die αFLAG Agarose wurde zuvor zweimal in Puffer A gewaschen. Nach der Inkubation wurde die Agarose durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und dreimal mit Puffer A gewaschen. Daraufhin wurde die

Agarose auf *Mini Bio Spin<sup>TM</sup>*-Säulen (Bio-Rad) überführt und mit 50 µl 1x Laemmli für 5 min bei 50°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation eluiert.

Bei den Proben für die massenspektrometrische Analyse wurde ein Preclearing-Schritt des Proteinextraktes mit Protein A/G-Agarose (Santa Cruz) durchgeführt. Die Elution der FLAG-getaggten Proteine erfolgte hier durch die Inkubation der Agarose mit 3xFLAG-Peptid (100 µg/ml in Puffer A) für 10 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation

#### **4.2.4.5.2. Streptavidin/Biotin-System**

Zur Proteinaufreinigung über den StrepII-Tag wurden 10 g RHSN-Keimlinge in 12 ml Strep-Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5 % Triton X-100; 10 mM Dithiothreitol (DTT); 5 mM NEM; 100 mg/ml Avidin; PIC) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C für 20 min wurden die Extrakte durch ein Nylongewebe gefiltert und bei 4°C auf eine 1 ml *Strep-Tactin* Affinitätssäule aufgetragen. Die Säule wurde fünfmal mit eiskaltem Waschpuffer mit Triton X-100 (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,5 mM EDTA pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5% Triton X-100) gewaschen und anschließend in Raumtemperatur überführt. Nach fünfmal waschen mit Waschpuffer ohne Triton X-100 wurden die Proteine mit Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTT und 10 mM Desthiobiotin) von der Säule eluiert. Die Hälfte des Eluats wurde mit Hilfe von Vivaspin500 Säulen (10 000 MWCO; Sartorius, Göttingen, Deutschland) auf 10 % des Ausgangsvolumens reduziert, im Verhältnis 1:4 mit 5x Laemmli versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die andere Hälfte des Eluats wurde mit His-Extraktionspuffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 7 M Guanidin-HCl) auf ein Volumen von 5 ml gebracht und die Proteine mittels IMAC (Ni<sup>2+</sup>) weiter aufgereinigt (siehe unten).

#### **4.2.4.5.3. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Keimlinge wurden in der 1,5-fachen Menge [µl/mg] an His-Extraktionspuffer homogenisiert und die Extrakte anschließend für 10 min bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 10 mM Imidazol versetzt. Die *Ni Sepharose High Performance* oder das *Co Talon Metal Affinity Resin* wurden zweimal in His-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend zum Proteinextrakt zugegeben. Dabei wurden jeweils 100 µl IMAC-Matrix pro 1 g Ausgangsmaterial verwendet. Die Inkubation erfolgte rotierend bei 4°C für 5 bis 16 h. Danach wurde die IMAC-Matrix durch Zentrifugation bei 4°C und 1000 g für 5 min pelletiert und anschließend zweimal mit Waschpuffer 1 (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 0,25 % Triton X-100; 6 M Guanidin-HCl) und zweimal mit Waschpuffer 2 (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl pH 7,5;

300 mM NaCl; 8 M Harnstoff) gewaschen. Die Proben wurden mit His-Elutionspuffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM Imidazol; 6 M Harnstoff) für 30 min bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurde die IMAC-Matrix durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand als Eluat abgenommen, im Verhältnis 1:4 mit 5x Laemmli versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

#### **4.2.4.6. Proteinexpression in Bakterien**

Für die Expression von Proteinen in rosetta Zellen wurden 10 ml LB mit Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB mit Antibiotika mit 5 ml der Vorkultur überimpft und die Zellen für 3 bis 5 h bei 37°C angezogen. Nach der Zugabe von 0,5 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wurden die Zellen in 18°C überführt und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 7000 g für 10 min geerntet und umgehend weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.4.7. Proteinaufreinigung aus Bakterien**

Die Zellen wurden einmal in PBS (139 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets für die Konstrukte GST-DEN1, GST-DEN1C166A, GST-UCH3, UB:NEDD8:His und NEDD8:UB:His in 20 bis 40 ml PBS-Lysepuffer (PBS mit 0,5 % Triton X-100 und PIC) resuspendiert und zweimal für 15 min auf Eis sonifiziert (5 x 10 Zyklen, 20 % Leistung). Für die Aufreinigung funktioneller Cysteinproteasen UCH3, DEN1 und DEN1C166A wurde auf den Zusatz von Proteaseinhibitoren im Lysepuffer verzichtet. Nach der Sonifizierung wurde nochmals 0,5 % Triton zugegeben und die Suspension für 15 min bei 4°C gekühlt. Für die Konstrukte GST:ECR1, His:AXR1 und His:HA:NEDD8 wurde TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 % Glycerin) mit 0,5 % Tween 20 und PIC als Lysepuffer verwendet.

Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 4°C wurden die unlöslichen Bestandteile entfernt und der Überstand mit der entsprechenden Aufreinigungsmatrix inkubiert. Nach der Aufreinigung wurden die eluierten Proteine über SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit getestet und die Proteinkonzentration mittels Nandrop-Messung bestimmt.

##### **4.2.4.7.1. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Für die Aufreinigung von His-getaggten Proteinen wurde *Ni Sepharose High Performance* oder das *Co Talon Metal Affinity Resin* zweimal mit PBS oder TBS gewaschen und zu den Bakterienlysaten zugegeben. Dabei wurden je 12 µl der IMAC-Matrizes pro 100 ml

Bakterienkultur verwendet. Die Extrakte wurden bei 4°C für 2 bis 4 h rotierend inkubiert. Die IMAC-Matrix wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 1500 g pelletiert und zweimal mit PBS mit 0,1 % Triton X-100 (UB:NEDD8:His, NEDD8:UB:His) oder TBS mit 0,25 % Tween 20 (His:AXR1, His:HA:NEDD8) gewaschen. Danach folgten zwei Waschschriffe mit PBS beziehungsweise TBS mit je 50 mM Imidazol. Die Elution der Proteine erfolgte durch die rotierende Inkubation der IMAC-Matrizes mit PBS oder TBS mit je 150 mM Imidazol für 30 min bei Raumtemperatur.

#### **4.2.4.7.2. Glutathion-S-Transferase**

Für die Aufreinigung GST-getaggtter Proteine wurde *Glutathion Sepharose 4B* zweimal mit PBS oder TBS gewaschen und im Verhältnis 1:5 (20 µl Sepharose/100 ml Bakterienkultur) zu dem Lysat zugegeben. Die Extrakte wurden bei 4°C für 2 bis 4 h rotierend inkubiert und die Sepharose anschließend durch Zentrifugation bei 4°C und 1500 g für 10 min pelletiert. Nach aufeinanderfolgenden Waschschriffen mit PBS 0,2 % Triton X-100, PBS 0,1 % Triton X-100 und PBS beziehungsweise TBS 0,5 % Triton X-100 und TBS wurde die Sepharose in *Mini Bio Spin<sup>TM</sup>* überführt. Die Elution von GST:ECR1 erfolgte durch die Inkubation mit 25 mM reduziertem Glutathion in TBS bei 4°C für 16 h. Für die Konstrukte GST-UCH3, GST-DEN1 und GST-DEN1C166A wurde die Sepharose über Nacht bei 4°C mit 2U Prescission Protease in PBS rotierend inkubiert und die vom GST-Tag abgespaltenen Proteine anschließend durch Zentrifugation eluiert.

#### **4.2.4.8. Gel-Permeations-Chromatographie**

Für die Auftrennung nativer Proteinkomplexe nach ihrer Größe wurden Proteine mit Puffer A (inklusive PIC, 5 µM NEM) aus 7 d alten Keimlingen extrahiert. Der Extrakt wurde mit Puffer A auf eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml verdünnt und Aggregate mit einem Filter (Ø 0,45 µm) entfernt. Anschließend wurden 2 mg Gesamtprotein auf eine Superose 6 HR Säule (GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland) geladen. Nach dem Leervolumen von 8 ml wurden 25 Fraktionen von je 500 µl aufgefangen, im Verhältnis 1:4 mit 5x Laemmli versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 20 µl der Einzelfraktionen wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt.

#### **4.2.4.9. Massenspektrometrie**

Aufgereinigte Proben für RHSN und 35S:FLAG:DEN1 wurden von Stephanie Heinzlmeir (Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik, Prof. Dr. Bernhard Küster, TU München) wie in Mergner et al. [2015] beschrieben prozessiert und massenspektrometrisch analysiert.

#### **4.2.4.10. Enzymbestimmungen**

##### **4.2.4.10.1. AMC-Assay**

7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) ist ein häufig benutzter Fluorophor, dessen Fluoreszenz durch die Kopplung an Substrate unterbunden werden kann. Durch die enzymatische Spaltung der AMC-Substratbindung wird ein Fluoreszenzsignal generiert, das für die Messung der Enzymaktivität genutzt wird. Ein 300 µl Reaktionsansatz mit 250 nM der Substrate UB-AMC beziehungsweise NEDD8-AMC, 50 nM Enzym und dem Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM DTT) wurde bei 4°C als Triplikat (100 µl) in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 10 min wurde die Substratfluoreszenz (Anregung 360 nm, Emission 460 nm) gemessen.

##### **4.2.4.10.2. Prozessierung und Dekonjugation**

Für die Untersuchung der Prozessierungsaktivität wurden 0,2 µg UB:NEDD8:His oder NEDD8:UB:His in einem 25 µl-Ansatz mit 0,2 µg der aufgereinigten Enzyme für 60 min bei 20°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 10 mM DTT inkubiert.

Zur Bestimmung der Aktivität von UCH3 und DEN1 als Deneddylase oder Deubiquitinase wurden in einem 20 µl-Ansatz Proteinextrakte (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 5 % Glycerin) von 7 d alten DEX-induzierten HSN oder HSUB-Keimlingen mit einem Gesamtproteingehalt von 15 µg (HSN) oder 60 µg (HSUB) mit je 0,5 µg aufgereinigtem Enzym für 30 min bei 20°C inkubiert.

Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 5x Laemmli im Verhältnis 1:4 gestoppt und die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 10 µl der Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt oder mit einem αHA-Western-Blot analysiert.

##### **4.2.4.10.3. Thioester-Reaktion**

Der Nachweis von Thioester-Produkten erfolgte mit je 1 µg der aufgereinigten Proteine in einem 20 µl-Ansatz mit 50 mM ATP, 0,1 mM DTT und 10 mM MgCl<sub>2</sub> in TBS für 50 min bei 23°C und 300 rpm. Der Reaktionsansatz wurde geteilt und zu 4 % SDS, 10 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau in insgesamt 25 µl gebracht. Die eine Hälfte des Reaktionsansatzes wurde zudem mit 100 mM DTT versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min bei 45°C erhitzt. Für den Nachweis mittels αHA-Western-Blot wurden jeweils 15 µl mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

## 4.2.5. Zellbiologische Methoden

### 4.2.5.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für mikroskopische Aufnahmen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop FV100/IX81 mit dem Objektiv UPLSAPA (60x) von Olympus verwendet.

### 4.2.5.2. Subzelluläre Fraktionierung

Die für die subzelluläre Fraktionierung in eine Cytoplasma- und eine Zellkern-Fraktion verwendete Methode basiert auf dem Protokoll von Folta and Kaufman [2006]. 14 d alte Keimlinge wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einer Rasierklinge bei 4°C zerkleinert. Nach der Zugabe von Extraktionspuffer wurde die Suspension durch *CellTrics<sup>TM</sup>* (20 µm; Partec) gefiltert. Ein Teil der Suspension wurde für den Nachweis des Gesamtproteins (T) abgenommen. Nach der Gradientenzentrifugation mit Percoll wurde ein Teil der oberen Phase als Cytoplasmafraktion (CF) abgenommen. Die Proben für T und CF wurden im Verhältnis 1:4 mit 5x Laemmli versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Zellkerne wurden nach dem Waschen in 1x Laemmli resuspendiert und für 5 min bei 95°C erhitzt.

## 4.2.6. Sequenzanalysen und Alignments

Zur Planung von Klonierungen und für die Analyse von Sequenzierungsdaten wurde die Software *geneious* Version R7 (Biomatters, Auckland, Neuseeland) genutzt. Protein-Alignments wurden mit der Software MEGA5 [Tamura et al., 2011] unter Verwendung des Clustal W Algorithmus (Standard Einstellungen; Gap opening penalty 10; Gap extension penalty 0,2; score matrix BLOSUM) erstellt.

Die Sequenzen von DEN1 homologen Proteinen wurden der Datenbank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) entnommen. Die Zugangsnummern der verwendeten Proteine sind: DEN1 (At) AT5G60190; NEDP1 (Hs) NP\_001165582; Den1 (Dm) NP\_610763; Nep1 (Sp) CAA16851; Nep2 (Sp) CAC37492 und DenA (An) An10456.



## 5. Literaturverzeichnis

- Abida, W.M., Nikolaev, A., Zhao, W., Zhang, W., and Gu, W.** (2007). FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **282**, 1797-1804.
- Aoyama, T., and Chua, N.H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**, 605-612.
- Arnold, J.E., and Gevers, W.** (1990). Auto-ubiquitination of ubiquitin-activating enzymes from chicken breast muscle. *Biochem J* **267**, 751-757.
- Artavanis-Tsakonas, K., Misaghi, S., Comeaux, C.A., Catic, A., Spooner, E., Duraisingh, M.T., and Ploegh, H.L.** (2006). Identification by functional proteomics of a deubiquitinating/deNeddylating enzyme in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **61**, 1187-1195.
- Banerjee, A., Gregori, L., Xu, Y., and Chau, V.** (1993). The bacterially expressed yeast CDC34 gene product can undergo autoubiquitination to form a multiubiquitin chain-linked protein. *J Biol Chem* **268**, 5668-5675.
- Bencsath, K.P., Podgorski, M.S., Pagala, V.R., Slaughter, C.A., and Schulman, B.A.** (2002). Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. *J Biol Chem* **277**, 47938-47945.
- Benjamin, S., and Steller, H.** (2010). Another tier for caspase regulation: IAPs as NEDD8 E3 ligases. *Dev Cell* **19**, 791-792.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., and Hellmann, H.** (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **47**, 591-603.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bostick, M., Lochhead, S.R., Honda, A., Palmer, S., and Callis, J.** (2004). Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2418-2432.
- Bosu, D.R., and Kipreos, E.T.** (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* **3**, 7.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Broemer, M., Tenev, T., Rigbolt, K.T., Hempel, S., Blagoev, B., Silke, J., Ditzel, M., and Meier, P.** (2010). Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. *Mol Cell* **40**, 810-822.
- Brownell, J.E., Sintchak, M.D., Gavin, J.M., Liao, H., Bruzzese, F.J., Bump, N.J., Soucy, T.A., Milhollen, M.A., Yang, X., Burkhardt, A.L., Ma, J., Loke, H.K., Lingaraj, T., Wu, D., Hamman, K.B., Spelman, J.J., Cullis, C.A., Langston, S.P., Vyskocil, S., Sells, T.B., Mallender, W.D., Visiers, I., Li, P., Claiborne, C.F., Rolfe, M., Bolen, J.B., and Dick, L.R.** (2010). Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell* **37**, 102-111.
- Burroughs, A.M., Iyer, L.M., and Aravind, L.** (2012a). Structure and evolution of ubiquitin and ubiquitin-related domains. *Methods Mol Biol* **832**, 15-63.
- Burroughs, A.M., Iyer, L.M., and Aravind, L.** (2012b). The natural history of ubiquitin and ubiquitin-related domains. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 1433-1460.
- Callis, J.** (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book* **12**, e0174.
- Catic, A., Fiebiger, E., Korbelt, G.A., Blom, D., Galardy, P.J., and Ploegh, H.L.** (2007). Screen for ISG15-crossreactive deubiquitinases. *PLoS One* **2**, e679.

- Chamovitz, D.A., Wei, N., Osterlund, M.T., von Arnim, A.G., Staub, J.M., Matsui, M., and Deng, X.W.** (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**, 115-121.
- Chan, Y., Yoon, J., Wu, J.T., Kim, H.J., Pan, K.T., Yim, J., and Chien, C.T.** (2008). DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo. *J Cell Sci* **121**, 3218-3223.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A.** (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O.S., Yanagawa, Y., Zhang, Y., Li, J., Lee, J.H., Zhu, D., and Deng, X.W.** (2010). Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* **22**, 108-123.
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., Zhang, Y., Zhang, H., Feng, S., Strickland, E., Zheng, N., and Deng, X.W.** (2006). Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *Plant Cell* **18**, 1991-2004.
- Chen, J., Ghorai, M.K., Kenney, G., and Stubbe, J.** (2008). Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* **36**, 3781-3790.
- Choo, Y.S., Vogler, G., Wang, D., Kalvakuri, S., Iliuk, A., Tao, W.A., Bodmer, R., and Zhang, Z.** (2012). Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Hum Mol Genet* **21**, 2514-2523.
- Christmann, M., Schmalzer, T., Gordon, C., Huang, X., Bayram, O., Schinke, J., Stumpf, S., Dubiel, W., and Braus, G.H.** (2013). Control of multicellular development by the physically interacting deneddylases DEN1/DenA and COP9 signalosome. *PLoS Genet* **9**, e1003275.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Colby, T., Matthai, A., Boeckelmann, A., and Stuible, H.P.** (2006). SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 318-332.
- Cope, G.A., and Deshaies, R.J.** (2003). COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* **114**, 663-671.
- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., and Deshaies, R.J.** (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* **298**, 608-611.
- del Pozo, J.C., Timpfe, C., Tan, S., Callis, J., and Estelle, M.** (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 1760-1763.
- del Pozo, J.C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W.M., and Estelle, M.** (2002). AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**, 421-433.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Karunarathna, N., Jurgens, G., and Estelle, M.** (2007). AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**, 114-123.
- Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Hellmann, H., and Estelle, M.** (2003). The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. *EMBO J* **22**, 1762-1770.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P.** (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**, 1392-1405.
- Dohmann, E.M., Kuhnle, C., and Schwechheimer, C.** (2005). Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1967-1978.

- Dreher, K., and Callis, J.** (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* **99**, 787-822.
- Duda, D.M., Borg, L.A., Scott, D.C., Hunt, H.W., Hammel, M., and Schulman, B.A.** (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**, 995-1006.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**, 616-629.
- Ehrentraut, S.F., Kominsky, D.J., Glover, L.E., Campbell, E.L., Kelly, C.J., Bowers, B.E., Bayless, A.J., and Colgan, S.P.** (2013). Central role for endothelial human deneddylase-1/SEN8 in fine-tuning the vascular inflammatory response. *J Immunol* **190**, 392-400.
- Eletr, Z.M., and Wilkinson, K.D.** (2014). Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 114-128.
- Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A., and Kuhlman, B.** (2005). E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 933-934.
- Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M.** (2014). Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 30-44.
- Enchev, R.I., Scott, D.C., da Fonseca, P.C., Schreiber, A., Monda, J.K., Schulman, B.A., Peter, M., and Morris, E.P.** (2012). Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell Rep* **2**, 616-627.
- Ferro, A., Carvalho, A.L., Teixeira-Castro, A., Almeida, C., Tome, R.J., Cortes, L., Rodrigues, A.J., Logarinho, E., Sequeiros, J., Macedo-Ribeiro, S., and Maciel, P.** (2007). NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1619-1627.
- Fisher, C.L., and Pei, G.K.** (1997). Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques* **23**, 570-571, 574.
- Folta, K.M., and Kaufman, L.S.** (2006). Isolation of Arabidopsis nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays. *Nat Protoc* **1**, 3094-3100.
- Frickel, E.M., Quesada, V., Muething, L., Gubbels, M.J., Spooner, E., Ploegh, H., and Artavanis-Tsakonas, K.** (2007). Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution. *Cell Microbiol* **9**, 1601-1610.
- Furukawa, M., He, Y.J., Borchers, C., and Xiong, Y.** (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* **5**, 1001-1007.
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z.Q., and Wilkinson, K.D.** (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* **278**, 28892-28900.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956.
- Gilkerson, J., Hu, J., Brown, J., Jones, A., Sun, T.P., and Callis, J.** (2009). Isolation and characterization of cul1-7, a recessive allele of CULLIN1 that disrupts SCF function at the C terminus of CUL1 in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **181**, 945-963.
- Gingerich, D.J., Gagne, J.M., Salter, D.W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., and Vierstra, R.D.** (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *J Biol Chem* **280**, 18810-18821.
- Girdwood, D., Xirodimas, D.P., and Gordon, C.** (2011). The essential functions of NEDD8 are mediated via distinct surface regions, and not by polyneddylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **6**, e20089.
- Gong, L., Kamitani, T., Millas, S., and Yeh, E.T.** (2000). Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins. *J Biol Chem* **275**, 14212-14216.
- Gray, W.M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2002). Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* **14**, 2137-2144.

- Hakenjos, J.P., Richter, R., Dohmann, E.M., Katsiarimpa, A., Isono, E., and Schwechheimer, C.** (2011). MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol* **156**, 527-536.
- Hakenjos, J.P., Bejai, S., Ranftl, Q., Behringer, C., Vlot, A.C., Absmanner, B., Hammes, U., Heinzlmeir, S., Kuster, B., and Schwechheimer, C.** (2013). ML3 is a NEDD8- and ubiquitin-modified protein. *Plant Physiol* **163**, 135-149.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Hemelaar, J., Borodovsky, A., Kessler, B.M., Reverter, D., Cook, J., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K.D., Gill, G., Lima, C.D., Ploegh, H.L., and Ovaa, H.** (2004). Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol* **24**, 84-95.
- Herrmann, J., Lerman, L.O., and Lerman, A.** (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res* **100**, 1276-1291.
- Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hetfeld, B.K., Peth, A., Sun, X.M., Henklein, P., Cohen, G.M., and Dubiel, W.** (2008). The COP9 signalosome-mediated deneddylation is stimulated by caspases during apoptosis. *Apoptosis* **13**, 187-195.
- Hjerpe, R., Thomas, Y., and Kurz, T.** (2012a). NEDD8 overexpression results in neddylation of ubiquitin substrates by the ubiquitin pathway. *J Mol Biol* **421**, 27-29.
- Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., Dick, L.R., and Kurz, T.** (2012b). Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem J* **441**, 927-936.
- Hotton, S.K., Castro, M.F., Eigenheer, R.A., and Callis, J.** (2012). Recovery of DDB1a (damaged DNA binding protein1a) in a screen to identify novel RUB-modified proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**, 1163-1166.
- Hotton, S.K., Eigenheer, R.A., Castro, M.F., Bostick, M., and Callis, J.** (2011). AXR1-ECR1 and AXL1-ECR1 heterodimeric RUB-activating enzymes diverge in function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **75**, 515-526.
- Hsiao, H.H., Meulmeester, E., Frank, B.T., Melchior, F., and Urlaub, H.** (2009). "ChopNSpice," a mass spectrometric approach that allows identification of endogenous small ubiquitin-like modifier-conjugated peptides. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2664-2675.
- Hua, Z., and Vierstra, R.D.** (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 299-334.
- Huang, D.T., Paydar, A., Zhuang, M., Waddell, M.B., Holton, J.M., and Schulman, B.A.** (2005). Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. *Mol Cell* **17**, 341-350.
- Huang, D.T., Hunt, H.W., Zhuang, M., Ohi, M.D., Holton, J.M., and Schulman, B.A.** (2007). Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature* **445**, 394-398.
- Johnston, S.C., Larsen, C.N., Cook, W.J., Wilkinson, K.D., and Hill, C.P.** (1997). Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J* **16**, 3787-3796.
- Jones, D., and Candido, E.P.** (2000). The NED-8 conjugating system in *Caenorhabditis elegans* is required for embryogenesis and terminal differentiation of the hypodermis. *Dev Biol* **226**, 152-165.
- Jones, J., Wu, K., Yang, Y., Guerrero, C., Nillegoda, N., Pan, Z.Q., and Huang, L.** (2008). A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins. *J Proteome Res* **7**, 1274-1287.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., and Yeh, E.T.** (1997). Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* **272**, 28557-28562.

- Kamitani, T., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T.** (2001). Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1. *J Biol Chem* **276**, 46655-46660.
- Kepinski, S., and Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M.** (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159-180.
- Kito, K., Yeh, E.T., and Kamitani, T.** (2001). NUB1, a NEDD8-interacting protein, is induced by interferon and down-regulates the NEDD8 expression. *J Biol Chem* **276**, 20603-20609.
- Komander, D., and Rape, M.** (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbe, S.** (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563.
- Koncz, C.S., J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* **204**, 383-396.
- Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., and Callis, J.** (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 1597-1611.
- Kumar, S., Yoshida, Y., and Noda, M.** (1993). Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 393-399.
- Kurz, T., Pintard, L., Willis, J.H., Hamill, D.R., Gonczyk, P., Peter, M., and Bowerman, B.** (2002). Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science* **295**, 1294-1298.
- Kurz, T., Chou, Y.C., Willems, A.R., Meyer-Schaller, N., Hecht, M.L., Tyers, M., Peter, M., and Sicheri, F.** (2008). Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation. *Mol Cell* **29**, 23-35.
- Kurz, T., Ozlu, N., Rudolf, F., O'Rourke, S.M., Luke, B., Hofmann, K., Hyman, A.A., Bowerman, B., and Peter, M.** (2005). The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature* **435**, 1257-1261.
- Kwok, S.F., Solano, R., Tsuge, T., Chamovitz, D.A., Ecker, J.R., Matsui, M., and Deng, X.W.** (1998). Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell* **10**, 1779-1790.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M., and Estelle, M.** (1998). Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* **12**, 914-926.
- Larsen, C.N., Krantz, B.A., and Wilkinson, K.D.** (1998). Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* **37**, 3358-3368.
- Lau, O.S., and Deng, X.W.** (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* **17**, 584-593.
- Lee, J.H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.B., Yoon, H.J., Chen, H., He, Y.J., Xiong, Y., and Deng, X.W.** (2008). Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**, 152-167.
- Leidecker, O., Matic, I., Mahata, B., Pion, E., and Xirodimas, D.P.** (2012). The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle* **11**, 1142-1150.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M.** (1993). Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**, 161-164.

- Li, T., Santockyte, R., Shen, R.F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C., and Chock, P.B.** (2006). A general approach for investigating enzymatic pathways and substrates for ubiquitin-like modifiers. *Arch Biochem Biophys* **453**, 70-74.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S.** (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* **17**, 2208-2214.
- Lincoln, C., Britton, J.H., and Estelle, M.** (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 1071-1080.
- Linghu, B., Callis, J., and Goebel, M.G.** (2002). Rub1p processing by Yuh1p is required for wild-type levels of Rub1p conjugation to Cdc53p. *Eukaryot Cell* **1**, 491-494.
- Liu, S., Yang, H., Zhao, J., Zhang, Y.H., Song, A.X., and Hu, H.Y.** (2013). NEDD8 ultimate buster-1 long (NUB1L) protein promotes transfer of NEDD8 to proteasome for degradation through the P97UFD1/NPL4 complex. *J Biol Chem* **288**, 31339-31349.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S., and Helleday, T.** (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33**, 3799-3811.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., Shevchenko, A., and Deshaies, R.J.** (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**, 1382-1385.
- Ma, T., Chen, Y., Zhang, F., Yang, C.Y., Wang, S., and Yu, X.** (2013). RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol Cell* **49**, 897-907.
- Maiti, T.K., Permaul, M., Boudreaux, D.A., Mahanic, C., Mauney, S., and Das, C.** (2011). Crystal structure of the catalytic domain of UCHL5, a proteasome-associated human deubiquitinating enzyme, reveals an unproductive form of the enzyme. *FEBS J* **278**, 4917-4926.
- Mendoza, H.M., Shen, L.N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B., and Hay, R.T.** (2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* **278**, 25637-25643.
- Mergner, J., and Schwechheimer, C.** (2014). The NEDD8 modification pathway in plants. *Front Plant Sci* **5**, 103.
- Mergner, J., Heinzlmeir, S., Kuster, B., and Schwechheimer, C.** (2015). DENEDDYLASE1 Deconjugates NEDD8 from Non-Cullin Protein Substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*.
- Meyer-Schaller, N., Chou, Y.C., Sumara, I., Martin, D.D., Kurz, T., Katheder, N., Hofmann, K., Berthiaume, L.G., Sicheri, F., and Peter, M.** (2009). The human Dcn1-like protein DCNL3 promotes Cul3 neddylation at membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12365-12370.
- Miller, M.J., and Vierstra, R.D.** (2011). Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants. *Plant Signal Behav* **6**, 130-133.
- Moon, J., Parry, G., and Estelle, M.** (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* **16**, 3181-3195.
- Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R., and Yasuda, H.** (2000). Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 1093-1096.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Norman, J.A., and Shiekhhattar, R.** (2006). Analysis of Nedd8-associated polypeptides: a model for deciphering the pathway for ubiquitin-like modifications. *Biochemistry* **45**, 3014-3019.
- O'Donoghue, J.E., Bech-Otschir, D., Larsen, I.B., Wallace, M., Hartmann-Petersen, R., and Gordon, C.** (2013). Nedd8 processing enzymes in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Biochem* **14**, 8.

- Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E.A., Kominami, K., Toda, T., Suzuki, T., Chiba, T., Tanaka, K., and Kato, S.** (2000). Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J* **19**, 3475-3484.
- Ou, C.Y., Lin, Y.F., Chen, Y.J., and Chien, C.T.** (2002). Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev* **16**, 2403-2414.
- Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonico, E., Shtiegman, K., Marmor, M.D., Kochupurakkal, B.S., Katz, M., Lavi, S., Cesareni, G., and Yarden, Y.** (2006). Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **281**, 21640-21651.
- Pan, Z.Q., Kentsis, A., Dias, D.C., Yamoah, K., and Wu, K.** (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* **23**, 1985-1997.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J.** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 9-20.
- Pierce, N.W., Lee, J.E., Liu, X., Sweredoski, M.J., Graham, R.L., Larimore, E.A., Rome, M., Zheng, N., Clurman, B.E., Hess, S., Shan, S.O., and Deshaies, R.J.** (2013). Cnd1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* **153**, 206-215.
- Popp, M.W., Artavanis-Tsakonas, K., and Ploegh, H.L.** (2009). Substrate filtering by the active site crossover loop in UCHL3 revealed by sortagging and gain-of-function mutations. *J Biol Chem* **284**, 3593-3602.
- Rabut, G., and Peter, M.** (2008). Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**, 969-976.
- Rao-Naik, C., delaCruz, W., Laplaza, J.M., Tan, S., Callis, J., and Fisher, A.J.** (1998). The rub family of ubiquitin-like proteins. Crystal structure of *Arabidopsis* rub1 and expression of multiple rubs in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **273**, 34976-34982.
- Reverter, D., and Lima, C.D.** (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* **435**, 687-692.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D.** (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* **78**, 363-397.
- Saha, A., and Deshaies, R.J.** (2008). Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Mol Cell* **32**, 21-31.
- Sammons, D.W.A., L.D.; Nishizawa, E.E.** (1981). Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**, 135-141.
- Santner, A., and Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071-1078.
- Santner, A., and Estelle, M.** (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* **61**, 1029-1040.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675.
- Schwechheimer, C., and Deng, X.W.** (2001). COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* **11**, 420-426.
- Schwechheimer, C., and Isono, E.** (2010). The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol* **89**, 157-162.
- Schwechheimer, C., Serino, G., and Deng, X.W.** (2002). Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *Plant Cell* **14**, 2553-2563.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., and Deng, X.W.** (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**, 1379-1382.
- Sharon, M., Mao, H., Boeri Erba, E., Stephens, E., Zheng, N., and Robinson, C.V.** (2009). Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure* **17**, 31-40.
- Shin, Y.C., Tang, S.J., Chen, J.H., Liao, P.H., and Chang, S.C.** (2011). The molecular determinants of NEDD8 specific recognition by human SENP8. *PLoS One* **6**, e27742.

- Singh, R.K., Zerath, S., Kleifeld, O., Scheffner, M., Glickman, M.H., and Fushman, D.** (2012). Recognition and cleavage of related to ubiquitin 1 (Rub1) and Rub1-ubiquitin chains by components of the ubiquitin-proteasome system. *Mol Cell Proteomics* **11**, 1595-1611.
- Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., Cullis, C.A., Doucette, A., Garnsey, J.J., Gaulin, J.L., Gershman, R.E., Lublinsky, A.R., McDonald, A., Mizutani, H., Narayanan, U., Olhava, E.J., Peluso, S., Rezaei, M., Sintchak, M.D., Talreja, T., Thomas, M.P., Traore, T., Vyskocil, S., Weatherhead, G.S., Yu, J., Zhang, J., Dick, L.R., Claiborne, C.F., Rolfe, M., Bolen, J.B., and Langston, S.P.** (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458**, 732-736.
- Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J.** (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**, 13-30.
- Sundqvist, A., Liu, G., Mirsaliotis, A., and Xirodimas, D.P.** (2009). Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep* **10**, 1132-1139.
- Takashima, O., Tsuruta, F., Kigoshi, Y., Nakamura, S., Kim, J., Katoh, M.C., Fukuda, T., Irie, K., and Chiba, T.** (2013). Brap2 regulates temporal control of NF-kappaB localization mediated by inflammatory response. *PLoS One* **8**, e58911.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Tanaka, T., Nakatani, T., and Kamitani, T.** (2012). Negative Regulation of NEDD8 Conjugation Pathway by Novel Molecules and Agents for Anticancer Therapy. *Curr Pharm Des.*
- Tanaka, T., Kawashima, H., Yeh, E.T., and Kamitani, T.** (2003). Regulation of the NEDD8 conjugation system by a splicing variant, NUB1L. *J Biol Chem* **278**, 32905-32913.
- Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K., and Chiba, T.** (2001). The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol* **155**, 571-579.
- Truong, K., Lee, T.D., and Chen, Y.** (2012a). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity. *J Biol Chem* **287**, 15154-15163.
- Truong, K., Lee, T.D., Li, B., and Chen, Y.** (2012b). Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *J Biol Chem* **287**, 42611-42619.
- Um, J.W., Han, K.A., Im, E., Oh, Y., Lee, K., and Chung, K.C.** (2012). Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin. *J Neurosci Res* **90**, 1030-1042.
- Vierstra, R.D.** (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol* **160**, 2-14.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W.** (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068.
- Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Giusti, S.A., Maccarrone, G., Vercelli, C.A., Bauder, C.A., Richter, J.S., Roselli, F., Hafner, A.S., Dedic, N., Wotjak, C.T., Vogt-Weisenhorn, D.M., Choquet, D., Turck, C.W., Stein, V., Deussing, J.M., and Refojo, D.** (2015). Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition. *Nat Neurosci* **18**, 239-251.
- Wada, H., Yeh, E.T., and Kamitani, T.** (1999). Identification of NEDD8-conjugation site in human cullin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 100-105.
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L.S., Yeh, E.T., and Kamitani, T.** (1998). Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 688-692.



- Walden, H., Podgorski, M.S., Huang, D.T., Miller, D.W., Howard, R.J., Minor, D.L., Jr., Holton, J.M., and Schulman, B.A. (2003). The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell* **12**, 1427-1437.
- Walker, L., and Estelle, M. (1998). Molecular mechanisms of auxin action. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 434-439.
- Wang, R., and Brattain, M.G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett* **581**, 3164-3170.
- Watson, I.R., Blanch, A., Lin, D.C., Ohh, M., and Irwin, M.S. (2006). Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem* **281**, 34096-34103.
- Watson, I.R., Li, B.K., Roche, O., Blanch, A., Ohh, M., and Irwin, M.S. (2010). Chemotherapy induces NEDP1-mediated destabilization of MDM2. *Oncogene* **29**, 297-304.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1209-1220.
- Woodward, A.W., Ratzel, S.E., Woodward, E.E., Shamo, Y., and Bartel, B. (2007). Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol* **144**, 976-987.
- Wu, K., Yamoah, K., Dolios, G., Gan-Erdene, T., Tan, P., Chen, A., Lee, C.G., Wei, N., Wilkinson, K.D., Wang, R., and Pan, Z.Q. (2003). DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem* **278**, 28882-28891.
- Wu, S., Zhu, W., Nhan, T., Toth, J.I., Petroski, M.D., and Wolf, D.A. (2013). CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire. *Nat Commun* **4**, 1642.
- Xie, P., Zhang, M., He, S., Lu, K., Chen, Y., Xing, G., Lu, Y., Liu, P., Li, Y., Wang, S., Chai, N., Wu, J., Deng, H., Wang, H.R., Cao, Y., Zhao, F., Cui, Y., Wang, J., He, F., and Zhang, L. (2014). The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nat Commun* **5**, 3733.
- Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T., and Lane, D.P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118**, 83-97.
- Xirodimas, D.P., Sundqvist, A., Nakamura, A., Shen, L., Botting, C., and Hay, R.T. (2008). Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* **9**, 280-286.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.H., Vidal, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**, 316-321.
- Yamoah, K., Wu, K., and Pan, Z.Q. (2005). In vitro cleavage of Nedd8 from cullin 1 by COP9 signalosome and deneddylase 1. *Methods Enzymol* **398**, 509-522.
- Yang, P., Smalle, J., Lee, S., Yan, N., Emborg, T.J., and Vierstra, R.D. (2007). Ubiquitin C-terminal hydrolases 1 and 2 affect shoot architecture in Arabidopsis. *Plant J* **51**, 441-457.
- Yeh, E.T., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* **248**, 1-14.
- Zemla, A., Thomas, Y., Kedziora, S., Knebel, A., Wood, N.T., Rabut, G., and Kurz, T. (2013). CSN- and CAND1-dependent remodelling of the budding yeast SCF complex. *Nat Commun* **4**, 1641.

- Zhang, Y., Feng, S., Chen, F., Chen, H., Wang, J., McCall, C., Xiong, Y., and Deng, X.W.** (2008). Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *Plant Cell* **20**, 1437-1455.
- Zhou, L., and Watts, F.Z.** (2005). Nep1, a Schizosaccharomyces pombe deneddylating enzyme. *Biochem J* **389**, 307-314.
- Zhou, W., Ryan, J.J., and Zhou, H.** (2004). Global analyses of sumoylated proteins in Saccharomyces cerevisiae. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* **279**, 32262-32268.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Schwechheimer für das interessante Projekt und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Seine Unterstützung und die große experimentelle Freiheit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Dresselhaus und Prof. Dr. Bernhard Küster für die gute Zusammenarbeit in der SUMO- und der MS-Kooperation und dafür, dass sie sich bereit erklärt haben die Prüfungskommission zu bilden.

Bei Dr. Erika Isono und den Mitgliedern des AMSH-Labors Marie-Kristin Nagel, Kamila Kalinowska und Franziska Anzenberger bedanke ich mich ganz besonders für ihre fachliche Unterstützung und die vielen wertvollen technischen Ratschläge.

Ich danke Prof. Dr. Judy Callis, Prof. Dr. Mark Estelle, Dr. Ester M. N. Dohmann und Dr. Jana P. Hakenjos dafür, dass sie von ihnen generierte Pflanzenlinien oder Vektoren mit mir geteilt haben.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Zhixiang Wu und Stephanie Heinzlmeir bedanken, deren Arbeit bei den MS-Analysen einen entscheidenden Beitrag für dieses Projekt geleistet hat.

Für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags möchte ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Systembiologie und vor allem meinen Labormitbewohnern Carina und Uli und meiner NEDD8-Mitstreiterin Jana danken.

Ein besonderer Dank gilt auch der Küchen-Clique für die unterhaltsamen Mittagspausen von Montag Teil 1 bis 4 bis Freitag.

Meiner Familie danke ich für ihre große Unterstützung für und vor allem neben meiner Arbeit!

## Appendix

Tabelle 1: Liste der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine nach FLAG-IP von DEN1.

AGI Code	Name	Genbeschreibung	Peptid	Confidence score	Spectral counts		Raw abundance				
					WT	DEN1 IP	WT	DEN1 IP	Quotient	log(2) Quotient	
		<i>NEDD8-Weg</i>									
At2g35635	RUB2	Related to ubiquitin 2	6	284.15	12	33	1.3E+05	3.2E+06	23.6	4.6	
At5g60190	NEDP1	NEDD8-specific protease 1	20	1043.08	7	71	2.4E+05	5.5E+07	229.0	7.8	
		<i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>									
At4g31160	DCAF1	DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1	1	14.68	0	3	0	3.0E+04	-	-	
		<i>Signaltransduktion und Genregulation</i>									
At2g32370	HDG3	Homeobox-leucine zipper protein	1	15.27	0	3	2.7E+02	1.5E+04	53.6	5.7	
At5g10450	GRF6	14-3-3-like protein GF14 lambda	1	125.77	1	2	1.8E+03	1.2E+04	6.9	2.8	
		<i>Proteasen</i>									
At5g42270	FTSH5	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 5	3	420.18	1	7	1.3E+04	5.5E+04	4.3	2.1	
		<i>Metabolische Enzyme</i>									
At2g38380	PER22	Peroxidase 22	2	80.4	0	4	1.9E+03	2.1E+04	11.0	3.5	
At3g27740	CARA	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	4	120.29	5	7	3.0E+04	1.4E+05	4.7	2.2	
At4g39330	CAD9	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	1	48.53	0	2	2.8E+03	1.3E+04	4.5	2.2	
At4g33500	PP2C62	Probable protein phosphatase 2C 62	1	17.22	0	3	1.2E+02	3.6E+04	295.3	8.2	
At5g66190	LFNR1	Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme 1	1	13.28	0	1	9.6E+02	2.2E+04	23.1	4.5	
AtCg00710	psbH	Photosystem II reaction center protein H	1	35.81	0	3	4.8E+03	2.0E+04	4.1	2.0	

Tabelle 2: Liste der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine nach His:StreptII:NEED8-Aufreinigung.

StreptII  
Affinitätsaufreinigung

ACI Code	Name	Genbeschreibung	Peptide	Confidence score	Spectral counts		Raw abundance			log(2) Quotient
					StreptII		StreptII		Quotient	
					WT	RHSN	WT	RHSN		
		<i>NEDD8-Weg</i>								
At1g05180	AXR1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	5	139.85	0	20	56	251027	4509.6	12.1
At4g36800	RCE1	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	3	69.77	0	7	761	149195	196.1	7.6
At5g19180	ECR1	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	3	63.23	0	12	65	207141	3192.4	11.6
		<i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>								
At4g02570	CUL1	Cullin-1	4	75.05	0	11	232	54209	234.1	7.9
		<i>Translation</i>								
At2g37190	RPL12A	60S ribosomal protein L12-1	1	18.07	1	2	2971	4643	1.6	0.6
At2g40010	RPP0A	60S acidic ribosomal protein P0-1	2	34.22	6	6	41659	54317	1.3	0.4
At3g05590	RPL18	60S ribosomal protein L18-2	1	18.24	0	3	4259	9750	2.3	1.2
At3g11510	RPS14B	40S ribosomal protein S14-2	1	17.63	2	3	2546	7258	2.9	1.5
		<i>Genregulation</i>								
At1g07660	H4	Histone H4	2	32.27	4	0	27393	2249	0.1	-3.6
		<i>Metabolische Enzyme</i>								
At1g04410	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	1	16.56	0	4	409	10972	26.9	4.7
At1g36160	ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1	9	175.62	22	30	63744	139044	2.2	1.1
At1g67090	RBCS-1A	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A	1	15.79	3	4	11445	8460	0.7	-0.4
At2g38230	PDX11	Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.1	1	14.95	0	3	55	6575	119.3	6.9
At5g16390	BCCP1	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase 1	2	32.58	4	4	36049	52208	1.4	0.5
At5g35360	CAC2	Biotin carboxylase	1	16.79	0	2	5085	9547	1.9	0.9
At5g54770	THI1	Thiamine thiazole synthase	12	256.38	42	45	772663	1370819	1.8	0.8
At5g55070		Dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex 1	1	16.31	2	3	5283	13032	2.5	1.3
AtCg00490	rbcL	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	1	16.88	3	3	10004	12413	1.2	0.3

## Appendix

### Ni-NTA Affinitätsaufreinigung

ACI Code	Name	Genbeschreibung	Peptide	Confidence score	Spectral counts		Raw abundance			log(2) Quotient
					His		His		Quotient	
					WT	RHSN	WT	RHSN		
<i>NEDD8-Weg</i>										
At1g05180	AXR1	<b>NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit</b>	5	139.85	0	0	18	20053	1134.5	10.1
At4g36800	RCE1	<b>NEDD8-conjugating enzyme Ubc12</b>	3	69.77	0	7	106	174296	1639.0	10.7
At5g19180	ECR1	<b>NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit</b>	3	63.23	0	0	77	1499	19.3	4.3
<i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>										
At4g02570	CUL1	<b>Cullin-1</b>	4	75.05	0	5	27	13708	511.6	9.0
<i>Translation</i>										
At2g37190	RPL12A	60S ribosomal protein L12-1	1	18.07	0	0	0	31	-	-
At2g40010	RPP0A	60S acidic ribosomal protein P0-1	2	34.22	0	0	712	994	1.4	0.5
At3g05590	RPL18	60S ribosomal protein L18-2	1	18.24	0	0	469	272	0.6	-0.8
At3g11510	RPS14B	40S ribosomal protein S14-2	1	17.63	0	0	30	33	1.1	0.1
<i>Genregulation</i>										
At1g07660	H4	Histone H4	2	32.27	0	0	379	33	0.1	-3.5
<i>Metabolische Enzyme</i>										
At1g04410	MDH1	<b>Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1</b>	1	16.56	0	0	0	968	-	-
At1g36160	ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1	9	175.62	0	0	313	499	1.6	0.7
At5g16390	BCCP1	<b>Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase 1</b>	2	32.58	0	0	0	194	-	-
At5g54770	THI1	Thiamine thiazole synthase	12	256.38	0	0	25610	17129	0.7	-0.6
AtCg00490	rbcL	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	1	16.88	0	0	130	0	0.0	-





# The NEDD8 modification pathway in plants

Julia Mergner and Claus Schwechheimer\*

Plant Systems Biology, Technische Universität München, Freising, Germany

**Edited by:**

Pascal Genschik, Centre National de la Recherche Scientifique, France

**Reviewed by:**

Xingyi Guo, Albert Einstein College of Medicine, USA

Gerhard Braus, Georg-August-University, Germany

**\*Correspondence:**

Claus Schwechheimer, Plant Systems Biology, Technische Universität München, Emil-Ramann-Straße 4, 85354 Freising, Germany  
e-mail: claus.schwechheimer@wzw.tum.de

NEDD8, in plants and yeasts also known as RELATED TO UBIQUITIN (RUB), is an evolutionarily conserved 76 amino acid protein highly related to ubiquitin. Like ubiquitin, NEDD8 can be conjugated to and deconjugated from target proteins, but unlike ubiquitin, NEDD8 has not been reported to form chains similar to the different polymeric ubiquitin chains that have a role in a diverse set of cellular processes. NEDD8-modification is best known as a post-translational modification of the cullin subunits of cullin-RING E3 ubiquitin ligases. In this context, structural analyses have revealed that neddylation induces a conformation change of the cullin that brings the ubiquitylation substrates into proximity of the interacting E2 conjugating enzyme. In turn, NEDD8 deconjugation destabilizes the cullin RING ligase complex allowing for the exchange of substrate recognition subunits via the exchange factor CAND1. In plants, components of the neddylation and deneddylation pathway were identified based on mutants with defects in auxin and light responses and the characterization of these mutants has been instrumental for the elucidation of the neddylation pathway. More recently, there has been evidence from animal and plant systems that NEDD8 conjugation may also regulate the behavior or fate of non-cullin substrates in a number of ways. Here, the current knowledge on NEDD8 processing, conjugation and deconjugation is presented, where applicable, in the context of specific signaling pathways from plants.

**Keywords:** CAND1, COP9 signalosome (CSN), cullin, E3 ubiquitin ligase, F-BOX PROTEIN (FBP), NEDD8, RELATED TO UBIQUITIN (RUB), ubiquitin

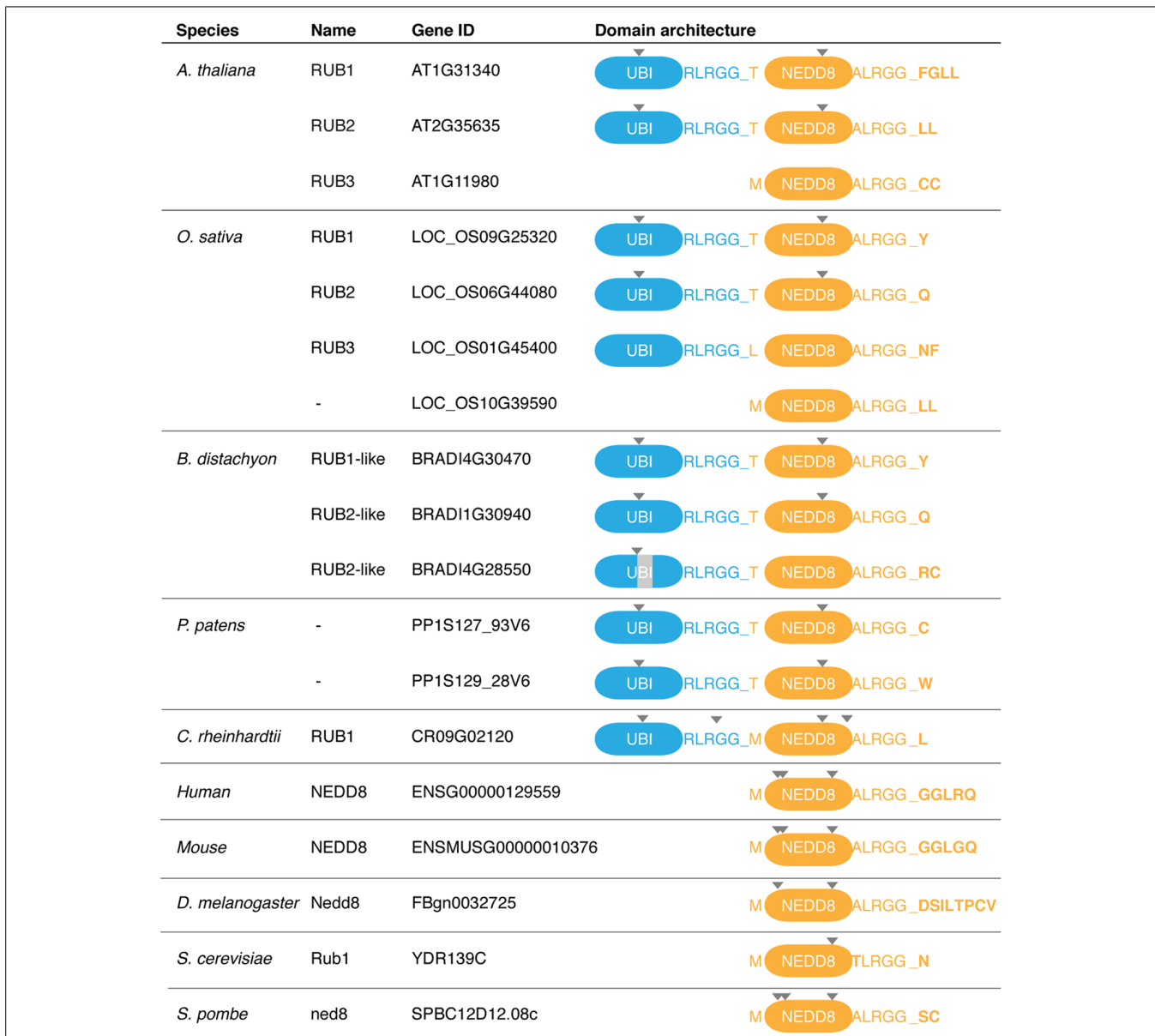
## NEDD8 IS AN EVOLUTIONARILY CONSERVED REGULATOR

NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated8), in plants and yeasts also known as RELATED TO UBIQUITIN (RUB, hitherto referred to as NEDD8), is a 76 amino acid protein that was originally identified as a highly expressed gene from embryonic mouse brains (Kumar et al., 1993). Amongst all ubiquitin-like modifiers (UBLs), NEDD8 and ubiquitin are most closely related to each other and NEDD8 proteins, like other UBLs, display remarkable sequence conservation across species (Vierstra, 2012). Like ubiquitin, NEDD8 is conjugated to its substrate protein through the formation of an isopeptide bond between its C-terminal glycine and a lysine residue of the target protein (neddylation) but there is no known biological function for free NEDD8.

NEDD8 orthologs can be identified in all eukaryotic species that have sequenced genomes. While NEDD8 is a single gene in humans, mouse, and fruit fly, several copies of *NEDD8* are encoded by the genomes of the plant species *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Rao-Naik et al., 1998), rice (*Oryza sativa*), *Brachypodium* (*Brachypodium distachyon*), and the moss *Physcomitrella patens* (Figure 1). All NEDD8 proteins require proteolytic processing of their C-termini to generate mature NEDD8 with a C-terminal glycine required for NEDD8 conjugation (Figure 1). An additional unique feature of plant NEDD8 is the existence of ubiquitin-NEDD8 gene fusions. While gene fusions of ubiquitin to ubiquitin itself or other genes have been reported in other species, *NEDD8* is an unfused gene in animals and yeasts but not in plants. This ubiquitin-NEDD8 fusion structure is found in *Arabidopsis* RUB1

and RUB2 and seems to be conserved among plants, mosses and algae (Figure 1; Rao-Naik et al., 1998; Vierstra and Callis, 1999; Shin et al., 2011). In RUB1 and RUB2, a single ubiquitin is fused head-to-tail to the N-terminus of NEDD8 and both ubiquitin-NEDD8 fusions then require post-translational processing to release monomeric ubiquitin and NEDD8 (Figure 1). Furthermore, plant genomes contain an unfused monomeric form of NEDD8, RUB3 in *Arabidopsis*, that can additionally be distinguished from the other RUB genes because it lacks an intron that is present at a conserved position in other RUBs, e.g., in *Arabidopsis* RUB1 and RUB2 (Figure 1). The absence of an intron suggests that this less complex RUB3 may be more ancient than the intron-containing RUB1 or RUB2 or that RUB3 originated from an mRNA intermediate and a retrotransposition event (Huang et al., 2012).

Similarly to the high sequence conservation observed between human and *Arabidopsis* ubiquitin (96% amino acid sequence identity), also NEDD8 proteins are highly conserved between species (83% identity between human and *Arabidopsis*). This high level conservation is suggestive for an important function of NEDD8 conjugation (neddylation) in eukaryotic cells and a highly conserved neddylation and deneddylation machinery. Indeed, loss-of-*NEDD8* function causes lethality at an early developmental stage in most model organisms and also in plants, with the notable exception of *Saccharomyces cerevisiae* (Lammer et al., 1998; Liakopoulos et al., 1999; Jones and Candido, 2000; Osaka et al., 2000; Tateishi et al., 2001; Ou et al., 2002; Dhar-masiri et al., 2003; Maytal-Kivity et al., 2003; Bostick et al., 2004).



**FIGURE 1 | Protein domain organization of NEDD8 proteins from several representative species.** Gene identification numbers (Gene IDs) are as listed in [www.ensemblgenomes.org](http://www.ensemblgenomes.org). Specifically indicated are the last five amino acids of the respective proteins before the proteolytic cleave sites, the first amino acid of NEDD8 and the proteins' C-terminal amino acids. Proteolytic processing occurs after the C-terminal RGG residues and is indicated by an underscore. Positions of introns in the respective genes are indicated by a

triangle. The light gray area in BRADI4G28550 highlights an apparent 22 amino acid deletion in the ubiquitin part of the protein. *A. thaliana* (*Arabidopsis thaliana*), *O. sativa* (*Oryza sativa*, rice), *B. distachyon* (*Brachypodium distachyon*), *P. patens* (*Physcomitrella patens*, moss), *C. reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*, algae), *D. melanogaster* (*Drosophila melanogaster*, fruit fly), *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*, baker's yeast), *S. pombe* (*Schizosaccharomyces pombe*, fission yeast).

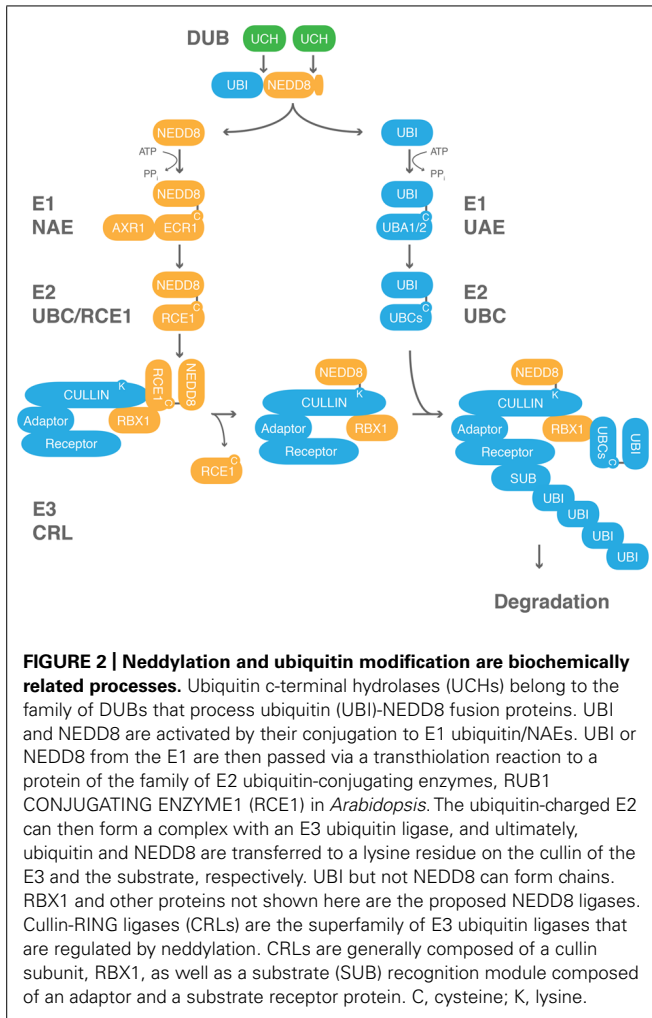
In *Arabidopsis*, not the single but the combined knockout of the genes *RUB1* and *RUB2* leads to a developmental arrest at the embryonic two-cell stage (Bostick et al., 2004). Thus, *NEDD8* genes and neddylation are essential for growth and development in plants. Plants with reduced *NEDD8* gene expression are dwarfed, partially insensitive to root growth inhibitory concentrations of the plant hormone auxin and also partially defective in auxin-induced lateral root formation (Bostick et al., 2004). As will be outlined below, auxin insensitivity phenotypes are reliable and at

the same time the most obvious readouts of neddylation pathway mutants.

## NEDD8 PROCESSING

*NEDD8* is conjugated to the protein substrates via an isopeptide bond between its C-terminal glycine and a lysine of the target protein (Figure 2). *NEDD8*, like ubiquitin and most UBLs, is expressed as an inactive precursor with a short C-terminal extension that consists of one or several amino acids that need to be





cleaved off to allow for NEDD8 conjugation (Figures 1 and 2; Jentsch and Pyrowolakis, 2000). It has been proposed that the C-terminal extension of ubiquitin, NEDD8, and other UBLs serves to prevent unprocessed proteins to enter into the conjugation pathway but there is, in fact, no experimental evidence supporting this hypothesis (Callis et al., 1995; Rao-Naik et al., 1998). The plant ubiquitin-NEDD8 fusion proteins additionally require removal of the N-terminal ubiquitin by proteolytic cleavage.

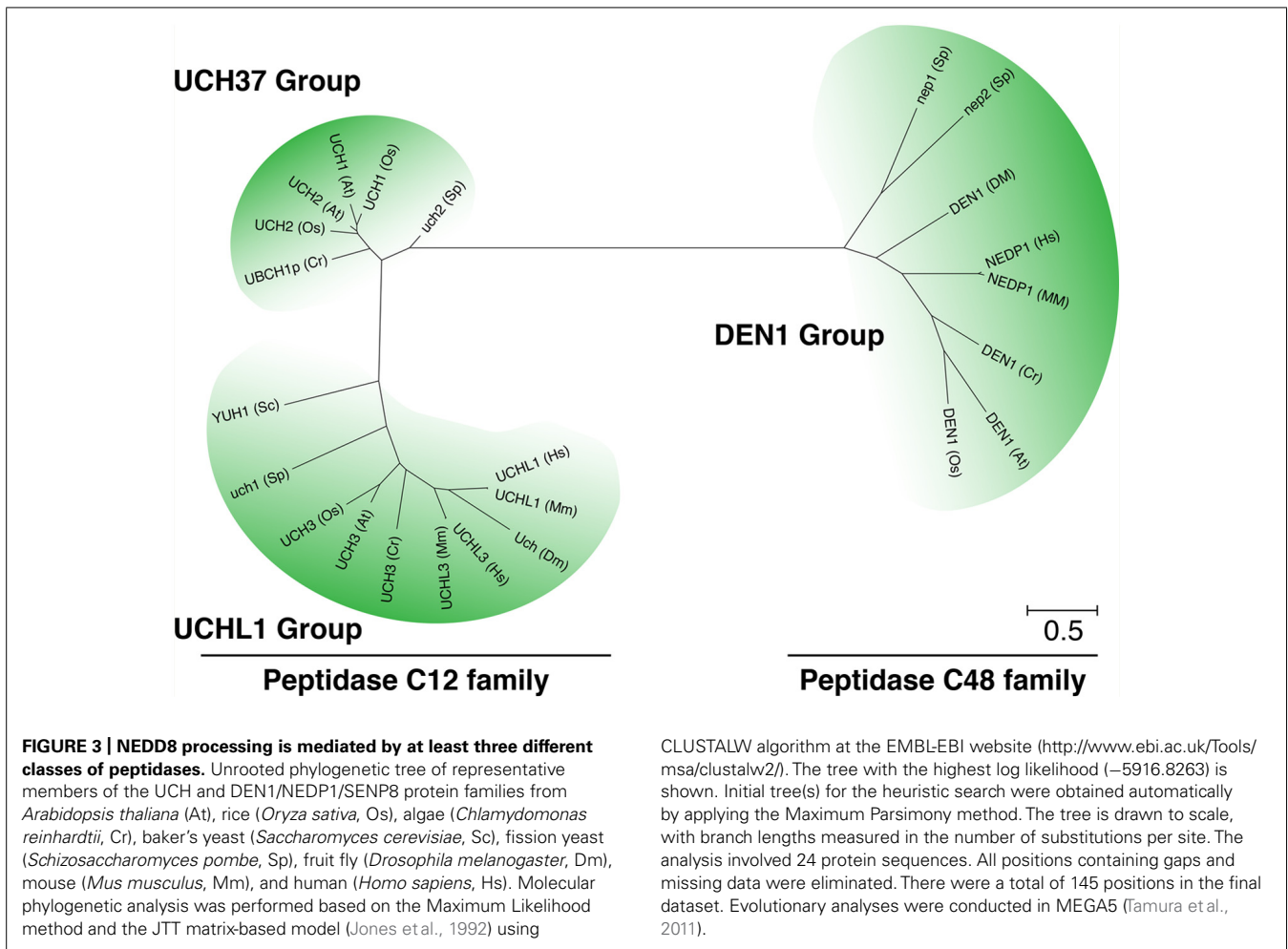
NEDD8 processing is carried out by ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH) from the family of deubiquitinating enzymes (DUBs). In *S. cerevisiae* and humans, NEDD8 precursor C-terminal processing is facilitated by a dual specificity UCH of the C12 family peptidases, Yuh1 (yeast) or UCHL3 (human, mouse), which also processes the C-terminal extensions of ubiquitin (Figure 3; Wada et al., 1998; Johnston et al., 1999; Linghu et al., 2002; Hemelaar et al., 2004; Frickel et al., 2007; Yu et al., 2007). To date, the only isopeptidase known to function exclusively in NEDD8 processing and deconjugation is the C48 family peptidase DEN1/NEDP1/SEN8 from *Drosophila*, and human (Figure 3; Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003; Shen et al., 2005; Chan et al., 2008; Shin et al., 2011). However, mouse knockouts of *UCHL3* or *Drosophila* and *Aspergillus* knockouts of

*DEN1* are viable although NEDD8 and neddylation are essential in the respective organisms (Kurihara et al., 2000; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013). These findings suggest that mutants of these processing enzymes cannot be fully impaired in NEDD8 processing.

In non-plant species where NEDD8 is expressed as an unfused gene, examining NEDD8 precursor processing *in vivo* is not trivial because NEDD8 has only a short C-terminal extension. Therefore, conjugation of processed NEDD8 to cullins is used as an indirect indication for proper processing. Since cullin neddylation was not impaired in any of the *UCH* gene mutants examined to date, it can be inferred that also NEDD8 processing and conjugation are at least partially functional in these mutants (Kurihara et al., 2000; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013). In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, even a  $\Delta nep1 \Delta nep2 \Delta uch1 \Delta uch2$  quadruple mutant lacking the two C48 peptidases orthologous to DEN1 (*NEP1* and *NEP2*) as well as the two C12 peptidases orthologous to yeast Yuh1 (*UCH1* and *UCH2*) shows efficient cullin neddylation (O'Donoghue et al., 2013). Only the additional knockout of the cullin deneddylating enzyme COP9 SIGNALOSOME SUB-UNIT5 (*CSN5*) hinted to a reduced efficiency of NEDD8 precursor processing in this complex mutant because it revealed the absence of cullin hyperneddylation that can be observed in the  $\Delta csn5$  deletion strain (O'Donoghue et al., 2013). Taken together, these various findings suggest that there is a functionally redundant family of NEDD8 processing enzymes and that there may be other as yet unknown peptidases that also participate in NEDD8 processing. Furthermore, it is possible that there is no strict specificity among the ubiquitin and NEDD8 processing enzymes *in vivo*.

### NEDD8 PROCESSING IN PLANTS

NEDD8 processing hydrolases from plants remain to be identified. In *Arabidopsis*, several peptidases can be classified as C12 and C48 family peptidases based on their homology to UCHs from other species (Figure 3). To date, only the C12 peptidases UCH1 and UCH2 have been analyzed at the biological level (Yang et al., 2007). Based on their homology to C12 peptidases, these UCHs would be predicted to have a role in ubiquitin processing. However, although both UCH proteins showed the predicted ubiquitin processing activity *in vitro*, neither the *uch1 uch2* double mutant nor *UCH1* overexpressing lines had apparent changes in the pattern of ubiquitin conjugate formation or in the abundance of free monomeric ubiquitin. At the phenotypic level, mutants or overexpression lines display impaired shoot and flower development and changes in the rate of leaf formation. Altering the abundance of the two *UCH* genes also affects auxin and cytokinin responsiveness. These phenotypes may be explained by defects in selective rather than general protein degradation and this hypothesis is supported by the observation that the degradation of the auxin-labile AUX/IAA AUXIN RESISTANT3 (*AXR3*) but not that of the light-labile phytochrome A or ELONGATED HYPOCOTYL5 (*HY5*) proteins appeared to be affected in the *uch* mutants. In summary, these findings suggest that UCH1 and UCH2 may not only act at the level of ubiquitin processing but may also act by selectively regulating the proteasomal degradation of proteins by antagonizing substrate ubiquitylation. Whether UCH1 and UCH2 have a



role in NEDD8 processing remains to be examined but the comparatively weak morphological phenotype as well as the absence of an apparent cullin neddylation phenotype already suggests that the two UCH proteins may not have a major function in this process.

## NEDDYLATION

NEDD8 is conjugated to target proteins in a manner that is highly similar to ubiquitin conjugation (Figure 2). NEDD8 is activated by an E1 NEDD8 activating enzyme (NAE) and then passed on to an E2 NEDD8 conjugating enzyme of the ubiquitin-conjugating (UBC) enzyme family from where the protein is ultimately transferred to its substrate protein. The best-studied NEDD8 conjugates are the cullin subunits of cullin-RING-type E3 ubiquitin ligases (CRLs; Hua and Vierstra, 2011). CRLs are a family of evolutionarily conserved E3 ligases that are composed of a core complex, comprised of a cullin subunit and the RING BOX PROTEIN1 (RBX1), as well as a ubiquitylation substrate recognition module. In plants, three different types of CRL complexes can be distinguished based on the identity of the cullin subunits CULLIN1, CULLIN3, or CULLIN4 and the identity of their respective substrate recognition module (Lammer et al., 1998; Ruegger et al., 1998; Dieterle et al., 2005; Figueroa et al., 2005; Gingerich et al.,

2005; Bernhardt et al., 2006; Chen et al., 2006). The CRL subunit RBX1 is common to all CRLs and serves to promote NEDD8 conjugation.

Structural analyses of cullin neddylation revealed that NEDD8 conjugation causes a conformational change in subdomains of the cullin and RBX1 subunits (Duda et al., 2008; Boh et al., 2011). Neddylation also eliminates the binding of the exchange factor CULLIN-ASSOCIATED-NEDD8-DISSOCIATED1 (CAND1) and locks the CRL in an active state. Thus, neddylation controls CRL activity by promoting conformational changes that favor substrate ubiquitylation. CRL neddylation can then also lead to the recruitment of additional regulatory factors (den Besten et al., 2012).

## THE NEDDYLATION PATHWAY AND AUXIN INSENSITIVITY

As will be discussed in more detail below, loss of cullin neddylation or cullin deneddylation affect CRL function by promoting or, respectively, preventing interactions with the substrate receptor exchange factor CAND1. In the plant and neddylation biology context, the *Arabidopsis* CULLIN1-containing E3 ligase SCF<sup>TIR1</sup> with the substrate recognition module composed of the F-box protein (FBP) TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1 (TIR1) and its adaptor subunit *ARABIDOPSIS* SKP1 (ASK) is highly

relevant (Ruegger et al., 1998; del Pozo and Estelle, 1999). TIR1, functioning at the same time also as an auxin receptor, binds AUX/IAA transcriptional repressors in an auxin-dependent manner and targets AUX/IAAs for ubiquitylation and degradation by the 26S proteasome (Gray et al., 2001; Tan et al., 2007). AUX/IAAs and auxin-induced AUX/IAA degradation regulate a number of important developmental and morphological processes throughout plant development: *bodenlos* (*bdl*) mutants expressing a stabilized (non-degradable) variant of the AUX/IAA protein *bodenlos/iaa14* (*bdl/iaa14*) are deficient in embryonic root differentiation and are consequently rootless (Hamann et al., 1999; Weijers et al., 2005). *axr3* mutants express the stabilized *axr3/iaa17* protein and this mutation allows for root elongation in the presence of root growth-inhibiting auxin concentrations (Gray et al., 2001). The link between auxin insensitivity (auxin resistance), AUX/IAA degradation and CULLIN1 could be established because the CULLIN1 alleles *axr6-1* and *axr6-2* were identified based on their auxin insensitivity (Hobbie et al., 2000; Shen et al., 2002; Hellmann et al., 2003; Quint et al., 2005; Esteve-Bruna et al., 2013). While homozygous *axr6-1* and *axr6-2* loss-of-function mutants arrest development during embryogenesis, the heterozygous mutants display the auxin-insensitive root growth elongation phenotype. Furthermore, double mutants of *axr6-1* or *axr6-2* with other mutants of the auxin and neddylation pathway are defective in root differentiation and thereby mimic the characteristic phenotype of the *bdl* mutant (Hobbie et al., 2000; Hellmann et al., 2003; Quint et al., 2005; Esteve-Bruna et al., 2013).

### NEDD8 ACTIVATION

Both, defects in root differentiation as well as auxin-insensitive root elongation have been used extensively as phenotypes for the identification and characterization of *Arabidopsis* neddylation mutants. *auxin resistant1* (*axr1*) is a mutant of the NAE enzyme AXR1 and was identified due to its defects in auxin response that could later be explained by impairment in the degradation of the AUX/IAA protein AXR3 (Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993; del Pozo et al., 1998). In *Arabidopsis*, *axr1* mutants display an auxin-insensitive root growth phenotype but do not fully impair NEDD8 conjugation the function of the AXR1-paralog *AXR1-LIKE* (*AXL*) also needs to be deleted (Dharmasiri et al., 2007). *axr1 axl1* double mutants have a more severe phenotype than *axr1* mutants in that they are defective in embryonic root differentiation and mimic the *bdl* mutant phenotype (Dharmasiri et al., 2007). *Arabidopsis* AXR1 and AXL proteins appear to be equivalent at the biochemical level but interestingly have a differential ability to complement the *axr1* mutant phenotype when expressed from the *AXR1* promoter (Dharmasiri et al., 2007; Hotton et al., 2011). While NEDD8 activation is carried out by a single protein in animals and yeasts, NAE is a heterodimer in plants of AXR1/AXL and E1 C-TERMINAL RELATED1 (*ECR1*) corresponding to the protein's N- and C-termini, respectively (Figure 2; del Pozo et al., 1998; Hotton et al., 2011). An *ecr1-1* mutant was identified in a screen for mutants with differential auxin sensitivity and *axr1/axl* mutants as well as *ecr1* mutants are defective in cullin neddylation (Woodward et al., 2007).

### NEDD8 CONJUGATION

RUB1 CONJUGATING ENZYME1 (*RCE1*) was identified in *Arabidopsis* based on its homology to human UBC12 (del Pozo and Estelle, 1999). An *rce1-1* insertion mutant with significantly reduced *RCE1* expression levels was subsequently isolated and found to be strongly impaired in cullin neddylation (Dharmasiri et al., 2003). *rce1-1* mutants display auxin insensitive root growth phenotypes and fail to differentiate a primary root when combined with *axr1*. Two additional *rce1* alleles were recently found in a suppressor screen of the auxin overproducing *sur2* mutant (Pacurar et al., 2012). Interestingly, both of these *rce1* alleles would be expected to interfere significantly with the biochemical activity of *RCE1* since they carry a nonsense and splice site mutation in exon 4, respectively. Analyzing the extent to which *RCE1* function is affected in these alleles is certainly interesting because the unexpectedly weak phenotype of these supposedly strong alleles could be considered indicative for the existence of functionally redundant NEDD8 conjugating enzymes.

### NEDD8 LIGATION

The CRL core subunit RING BOX1 (*RBX1*) is one candidate for an E3 NEDD8 ligase (Morimoto et al., 2003). *RBX1* is encoded by two genes in *Arabidopsis* and its function as CRL subunit and as NEDD8 ligase was addressed in mutants, antisense and overexpression lines (Gray et al., 2002; Lechner et al., 2002; Schwechheimer et al., 2002). *RBX1* interacts with *RCE1* and while cullin neddylation is decreased in the absence of *RBX1* it is increased when *RBX1* is overexpressed (Gray et al., 2002).

The protein DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION1 (*DCN1*) has also been described as an E3 NEDD8 ligase (Kurz et al., 2005; Kurz et al., 2008; Meyer-Schaller et al., 2009). Based on yeast studies, it has recently been proposed that *DCN1* increases the substrate specificity of *RBX1* by directing the *RBX1*-bound NEDD8-E2 toward the cullin (Scott et al., 2010). Additionally, it was shown that the interaction between *DCN1* and *UBC12* is regulated by the N-terminal acetylation of the *UBC12* E2 enzyme (Scott et al., 2011). The analysis of *DCN1-LIKE* proteins, of which there are five in humans, has also revealed that at least one member of the protein family, *DCNL3*, is bound to the plasma membrane (Meyer-Schaller et al., 2009). Studies of a mammalian CULLIN2-containing CRL further revealed that *DCN1-LIKE1* can engage in interactions between the cullin and the respective substrate receptor subunit, and more importantly, that this interaction is strengthened when the substrate receptor is loaded with cargo (Heir et al., 2013). At least in this case, *DCN1-LIKE1* may function as a sensor for degradation substrate availability and consequently promote neddylation. Thus, *DCN1* proteins may contribute to the regulation of E3 ligase activity by targeting E3 ligases to or by activating them in specific subcellular locations.

As yet, *DCN1* or *DCN1-LIKE* proteins have not been analyzed in plants but *AT3G12760* is a candidate for a direct *DCN1* ortholog from *Arabidopsis*. A second *DCN1-LIKE* protein, less closely related to *DCN1* than *AT3G12760*, was identified as *anti-auxin resistant3* (*AAR3*) in a screen for mutants that showed resistance to the anti-auxin *p*-chlorophenoxyisobutylic acid. The same screen also identified mutant alleles of *TIR1* and *CULLIN1* and, based on the shared phenotype of these mutants,

AAR3/DNC1-LIKE would qualify as a candidate regulator of NEDD8 ligation and SCF<sup>TIR1</sup> function (Biswas et al., 2007). Unfortunately, the biochemical function of AAR3/DNC1-LIKE in the context of cullin neddylation has not been examined as yet. There is also one further *Arabidopsis* gene that may encode for an additional DNC1-LIKE protein. Thus, the biochemical and biological functions of *DNC1-LIKE* genes from *Arabidopsis* remain to be investigated.

In yeast, also TFB3, a RING domain subunit of the general transcription factor TFIIH was found to promote neddylation in addition to RBX1 and DNC1 (Rabut et al., 2011). The identification of TFB3 was based on initial observations that CULLIN4 neddylation in yeast was independent from RBX1 and DNC1. The analysis of RING domain protein mutants from yeast then led to the subsequent discovery of Tfb3 as a RING domain protein responsible for the neddylation of CULLIN3 and CULLIN4. A clear homolog of TFB3 is not easily discernable in the plant genomes but the identification of TFB3 from yeast *per se* indicates that it cannot be ruled out that besides RBX1 and DNC1 also other NEDD8 ligases exist in plants.

#### MLN4924 – A NEDDYATION INHIBITOR

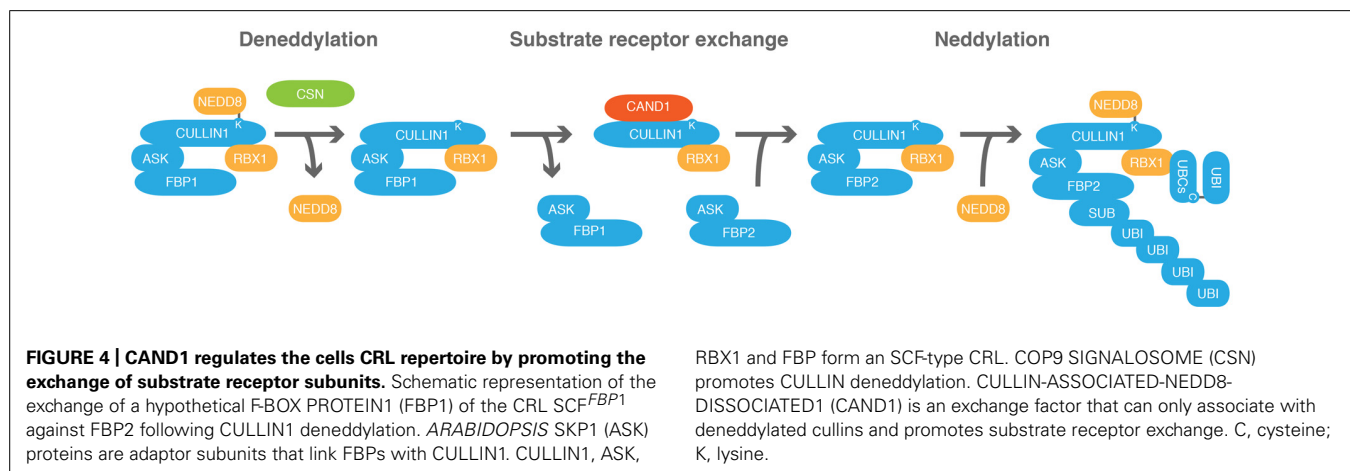
The importance of the NEDD8-modification pathway in the control of plant development has recently been elucidated in a study with the neddylation inhibitor MLN4924 (Hakenjos et al., 2011). MLN4924 was initially described as an inhibitor of the human NAE E1 enzyme but was subsequently found to also inhibit the NAE E1 subunit ECR1 from predictably all plant species (Soucy et al., 2009; Brownell et al., 2010; Hakenjos et al., 2011). MLN4924 inhibits neddylation in plants and the impairment of CRL function results in the degradation of a number of CRL substrates such as the AUX/IAAs of the auxin pathway, DELLA proteins of the gibberellin pathway and the cell cycle regulator KRP1 (Hakenjos et al., 2011). While the severe phenotypes of strong NEDD8 pathway mutants in *Arabidopsis* and the absence of neddylation mutants in other plant species has as yet hampered studying the role of neddylation in all stages of plant development or in non-*Arabidopsis* species, the availability of MLN4924 now overcomes this limitation (Hakenjos et al., 2011).

#### NEDDYATION MUTANTS ARE IMPAIRED IN MANY DIFFERENT CRL FUNCTIONS

As outlined above, AUX/IAA degradation is partially or fully impaired in all mutants of the NEDD8 conjugation pathway and auxin responses are partially or fully blocked in these mutant backgrounds. However, the phenotype of the NEDD8 conjugation mutants is much more complex and not only the consequence of defects in the auxin response pathway. In this regard, it is important to realize that plants predictably have many hundreds of CRLs and that all these CRLs should be impaired in neddylation mutants (Xu et al., 2009). Among these CRLs, SCF<sup>TIR1</sup> and closely related complexes implicated in auxin responses have a very prominent role because defects in the auxin-regulatory CRLs lead to morphological defects that can easily be examined (Dharmasiri et al., 2005a,b). However, while malfunction of SCF<sup>TIR1</sup> and closely related complexes is the most visible phenotype of neddylation mutants, all CRL functions should be affected in *axr1* mutants in a manner similar to the defects observed in the auxin pathway. This fact is sometimes overlooked and particularly *axr1* mutants that were amongst the first auxin response mutants to be identified (Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993) are often being used as auxin pathway-specific mutants. The knowledge about the existence of many other CRL-dependent pathways, also CRL pathways that affect plant growth and morphology clearly argue against using *axr1* mutants or other neddylation mutants as auxin pathway-specific mutations for morphological analyses or genetic interaction studies (Dill et al., 2004; Shen et al., 2007; Stirnberg et al., 2007; Nelson et al., 2011; Waters and Smith, 2013).

#### CSN PROMOTES CULLIN DENEDDYATION

NEDD8 can be deconjugated from CRLs through the activity of the COP9 signalosome (CSN; **Figure 4**). CSN is evolutionarily conserved and in most species including plant and mammalian species composed of eight subunits (Chamovitz et al., 1996; Seeger et al., 1998; Wei and Deng, 1998). CSN was originally identified in plants based on mutants that display a constitutively photomorphogenic (cop) phenotype and named following the identification of the causative mutation in the *cop9* mutant (Wei and Deng, 1992; Wei et al., 1994). Similarly to





light-grown seedlings, *cop* mutants have a short hypocotyl, open cotyledons, and express light-regulated genes when grown in the dark.

### CSN REPRESSES PHOTOMORPHOGENESIS IN *ARABIDOPSIS*

In *Arabidopsis*, loss-of-function of the eight CSN subunits results in most cases in the destabilization of the entire CSN complex and in a phenotypically indistinguishable *cop* phenotype, marking constitutive photomorphogenesis as a hallmark phenotype for loss of CSN function (Serino et al., 1999, 2003; Dohmann et al., 2005; Gusmaroli et al., 2007). The *cop* phenotype of *csn* mutants can be explained by their inability to degrade photomorphogenesis regulatory transcription factors such as HY5 in dark-grown seedlings through the activity of the E3 ligase COP1 (Osterlund et al., 2000; Chen et al., 2006; Lau and Deng, 2012). COP1 function is impaired in *csn* mutants leading to a stabilization of the COP1 targets also in the dark. In the wildtype, photomorphogenic development during germination is seemingly controlled by the light-controlled nucleocytoplasmic shuttling of COP1 (von Arnim and Deng, 1994; Osterlund et al., 2000; Pacin et al., 2013). In contrast to the strong photomorphogenesis phenotype of *csn* loss-of-function mutants, mutants with partially impaired CSN function display a number of phenotypes, also including auxin insensitive root elongation (Schwechheimer et al., 2001, 2002; Dohmann et al., 2005, 2008b; Stuttmann et al., 2009; Huang et al., 2013b). This phenotypic similarity was indicative for a connection between CSN, the neddylation pathway, and SCF<sup>TIR1</sup>-dependent plant growth regulation when knowledge about the biochemical interplay of these components was still unclear (Schwechheimer et al., 2001).

### CULLIN DENEDDYLATION IS A FUNCTION OF THE MPN+ DOMAIN SUBUNIT CSN5

COP9 signalosome is closely related to the “lid” of the 26S proteasome. In plants and animals, both protein complexes are composed of six so-called PCI domain subunits and two MPN-domain subunits and they share a set of subunit–subunit interactions within the respective complexes (Glickman et al., 1998; Wei et al., 1998; Fu et al., 2001; Enchev et al., 2010; Kotiguda et al., 2012). The relatedness of the two complexes and their in part shared biochemical function are nicely reflected by the fact that a proteasomal “lid” subunit functionally replaces a “missing” CSN subunit in *Saccharomyces cerevisiae* (Yu et al., 2011). CSN as well as the “lid” have two MPN-domain proteins, which can be further subdivided into an MPN+ domain protein with a catalytically active metalloprotease site, and a catalytically inactive MPN-domain protein that must be derived from the MPN+-domain counterpart (Maytal-Kivity et al., 2002). The MPN+ domain subunits CSN5 and RPN11 confer deneddylation and deubiquitylation activity to the CSN and proteasome “lid” complexes, respectively (Cope et al., 2002; Ambroggio et al., 2004). *csn* mutants from *Arabidopsis* are fully impaired in cullin deneddylation and only traces of, presumably *de novo* synthesized, unneddylated cullin can be detected in *csn* mutants. Interestingly, CSN5 is only functional as a cullin deneddylation when associated with CSN. CSN physically interacts with the cullin and RBX1 subunits of CRLs through its subunits CSN2 and CSN6 and it is thought that these interactions provide CSN with the affinity for its CRL targets (Schwechheimer et al., 2001).

Interesting is also the recently identified *csn3-3* allele, which carries a missense mutation in the CSN3 gene. This mutation strongly impairs auxin responses in the mutant but does neither obviously affect cullin deneddylation nor CSN protein complex integrity (Huang et al., 2013a). Thus, the affected domain of CSN3 may be required for an as yet unknown essential CSN function such as CRL subunit interactions or for the ability of the protein or protein complex to engage in other interactions required for normal auxin responses. This is supported by biochemical analyses combined with structural electron microscopy that suggest that CSN2 and CSN5 interact with the cullin E3 ligase subunit whereas F-box substrate receptors interact with CSN1 and CSN3 (Enchev et al., 2012).

Since *csn* mutants are impaired in the function of presumably hundreds of E3 ligases, it is not surprising that additional physiological defects have been identified in these mutants that can be explained by defects in other CRLs and include defects in SCF<sup>COI1</sup>-mediated jasmonate signaling (Schwechheimer et al., 2002; Hind et al., 2011), SCF<sup>SLY1</sup>-mediated gibberellin signaling (Dohmann et al., 2010) as well as defects in cold response (Schwechheimer et al., 2002), cell cycle progression (Dohmann et al., 2008a), and the control of ascorbic acid synthesis (Wang et al., 2013).

### CSN REGULATION AND CSN REGULATORS

In view of the large number of CRLs that exist in eukaryotic cells and the importance of CSN-dependent cullin deneddylation for CRL function, it has to be asked how CRL neddylation and CSN-dependent deneddylation are regulated. In this context, it was shown for different CRLs that the availability of ubiquitylation substrate receptor and ubiquitylation substrate promotes CRL formation and cullin neddylation (Bornstein et al., 2006; Emberley et al., 2012). The association of FBP-SKP1 dimers can inhibit CSN function on selected SCF-complexes several fold (Emberley et al., 2012). Thus, in the case of SCF-complexes cullin neddylation and deneddylation are regulated by the presence of FBP-SKP1 dimers and particularly by the presence of a given FBP, assuming that there is no regulation on the level of the SKP1 adaptor subunit, which does not confer substrate specificity to the SCF complexes. CSN is even more strongly inhibited in the presence of degradation substrate and thus degradation substrate and degradation substrate receptor availability negatively regulate CSN activity (Emberley et al., 2012). Furthermore, CSN associates tightly with deneddylated SCF and CSN thereby keeps the CRL complex in a state of low activity after substrate degradation (Emberley et al., 2012). Through this interaction, CSN also prevents cullin neddylation, unless binding of a ubiquitylation substrate triggers its dissociation and allows for cullin neddylation (Enchev et al., 2012).

In addition to the regulation of CSN by CRLs, their subunits and their substrates, there are also other candidate regulators whose function remains to be determined. The 7 kDa protein SMALL ACIDIC PROTEIN1 (SMAP1) is an interesting CSN-interaction partner (Nakasone et al., 2012). *smap1* mutants were identified as *anti-auxin resistant1* (*aar1*) in a mutant screen that also identified mutants of *TIR1*, *CULLIN1*, and *DCN1-LIKE*. Thus the *aar1/smapi* phenotype may well be explained by a defect

in the E3 ligase SCF<sup>TIR1</sup> or its neddylation or deneddylation. Importantly, immunoprecipitates of SMAP1 are very strongly enriched in at least six CSN subunits, indicating that SMAP1 is a CSN interactor and may regulate CSN function. As yet, the analysis of CULLIN neddylation patterns did not reveal any apparent defects in its neddylation or deneddylation but the *aar3/smapi* mutant phenotype together with the SMAP1-CSN interaction strongly suggests that SMAP1 is linked to CSN function. Since there is not apparent homolog of SMAP1 outside of the plant kingdom, this function should be plant specific.

The analysis of the CSN-interacting Rig-G protein, a protein related to the *Arabidopsis* protein SPINDLY, provided some insights into how interaction partners could interfere with CSN activity. In the case of Rig-G it is proposed that the protein recruits CSN subunits to the cytoplasm and thereby interferes with CSN assembly in the nucleus (Xu et al., 2013).

### CAND1 – A SUBSTRATE RECEPTOR EXCHANGE FACTOR FOR CRLs

Important progress has been achieved in the understanding of the role of neddylation and deneddylation of cullins in the context of CRL assembly and function through analysis of the protein Cullin-associated-Nedd8-dissociated-1 (CAND1). As its name already reveals, CAND1 was identified as an interactor of non-neddylated cullins (Liu et al., 2002; Zheng et al., 2002; Oshikawa et al., 2003). Through a series of elegant experiments from at least three independent laboratories it was recently shown that CAND1 functions as a novel type of exchange factor for CRLs (Pierce et al., 2013; Wu et al., 2013; Zemla et al., 2013). In a highly quantitative and not only therefore remarkable analysis of the diverse protein–protein interactions that can take place between the subunits of SCF-type CRL complexes and CAND1, it could be shown that CAND1 can promote the disassembly of SCF complexes and that FBPs can remove CAND1 from CULLIN1 (Pierce et al., 2013; **Figure 4**). When testing 21 different FBPs it was found that 20 of these could be exchanged using CAND1 as an exchange factor. Thus, in the case of SCF-type CRLs and most likely also in the case of CRLs that are formed with the other cullins, CAND1 can modulate the CRL-complex repertoire of the cell.

CAND1 is unable to interact with neddylated cullins and cullin neddylation stabilizes specific CRLs to prevent substrate receptor exchange (Emberley et al., 2012). Upon cullin deneddylation, CAND1 can become active and modulate the CRL repertoire to optimally match substrate receptor demand. Thus, there must be mechanisms to control CRL deneddylation. Indeed, cullin neddylation and deneddylation are controlled by the presence and absence of degradation substrates or their interactions with substrate receptors (Bornstein et al., 2006; Chew and Hagen, 2007; Emberley et al., 2012). Furthermore, CSN binds preferentially to neddylated CRLs, which may also recruit CSN-associated proteins important for CRL regulation (den Besten et al., 2012). CSN can bind deneddylated cullins but is dissociated in the presence of degradation substrate receptors and degradation substrates (Choo et al., 2011). Consequently, it can be inferred that *csn* as well as *cand1* mutants are deficient in releasing specific substrate receptors. This hypothesis could be experimentally confirmed and it

could be shown that substrate receptor activation and substrate degradation are delayed in such mutant backgrounds (Zemla et al., 2013).

### CAND1 IN PLANTS

In plants, *cand1* mutants were identified and analyzed in reverse and forward genetic screens. Mutants deficient in CAND1 were isolated as auxin-resistant mutants and the mutant spectrum of *cand1* mutants was recognized as being highly similar to, but also to exceed that of *axr1* mutants (Cheng et al., 2004; Chuang et al., 2004; Feng et al., 2004). Three further *cand1* alleles were identified based on mutants with severe defects in leaf vein patterning (Alonso-Peral et al., 2006). In rice, CAND1 is required for the formation of crown roots and defects in crown root formation are associated with a cessation in the G2/M phase progression in these mutants (Wang et al., 2011). In this context it is interesting to note that also *Arabidopsis csn* mutants are defective in G2/M phase progression (Dohmann et al., 2008a).

*Arabidopsis* CAND1 also preferentially binds to non-neddylated cullins (Feng et al., 2004). Importantly, two sets of weak *Arabidopsis* mutants exist, the semi-dominant *axr6-1* and *axr6-2* on the one side and the recessive *cull-6* on the other, carrying missense mutations in almost adjacent positions of CULLIN1. Interestingly, the respective mutant proteins interact differentially with CAND1. While the *cull-6* protein is deficient in CAND1 interaction, *axr6-1* and *axr6-2* bind more strongly to CAND1 (Feng et al., 2004; Moon et al., 2007). The availability of mutants with weak and strong defects in cullin function, cullin deneddylation, and CAND1 interaction has already permitted to assay the biochemical interactions of the various components at the genetic level (Zhang et al., 2008).

### NEDDYLATION SUBSTRATES

#### EVIDENCE FOR NON-CULLIN NEDDYLATION SUBSTRATES

Despite extensive research, the role and importance of neddylation in cellular processes besides the regulation of CRL activity remains poorly understood. Contrary to the expanding knowledge about ubiquitylated proteins in eukaryotes including plants (Kim et al., 2013) similar studies for NEDD8 have so far not succeeded in consistently identifying non-cullin neddylated proteins (Li et al., 2006; Norman and Shiekhhattar, 2006; Jones et al., 2008; Xirodimas, 2008; Bennett et al., 2010; Hakenjos et al., 2011; Hottton et al., 2012). However, there is evidence for the existence of a broad range of neddylated proteins and several non-cullin neddylated proteins have already been identified as summarized in **Table 1**. Loss of function mutants of DEN1/NEDP1/SEN8 from three different species, namely fruit fly, *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans* accumulate neddylated proteins over a broad range of molecular weights. At the same time, these mutants do generally not accumulate neddylated cullins suggesting that DEN1/NEDP1/SEN8 is an important deneddyating enzyme of these non-cullin neddylation substrates (Zhou and Watts, 2005; Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013). Also overexpression of NEDD8 leads to the apparent enrichment of many neddylated proteins and this neddylation can be blocked with the inhibitor

**Table 1 | Neddylation substrates.**

Neddylated protein	Proposed function of neddylation	Species	Reference
<b>E3 ubiquitin ligases</b>			
Cullins, Cul7, and PARC	Increases activity	Eukaryotes	Hori et al. (1999), Sarikas et al. (2011), Calabrese et al. (2011)
Mdm2	Decreases activity	Human	Xirodimas et al. (2004)
Parkin	increases activity	Human	Um et al. (2012), Choo et al. (2012)
BRAP2	–	Human	Takashima et al. (2013)
pVHL	Changes pVHL protein interaction	Human	Stickle et al. (2004), Russell and Ohh (2008)
DIAP1/XIAP	-	Fruit fly/human	Broemer et al. (2010)
DDB1	-	<i>Arabidopsis</i>	Hotton et al. (2012)
<b>Transcription factors</b>			
p53	Inhibits transcriptional activity	Human	Xirodimas et al. (2004), Abida et al. (2007)
p73	Inhibits transcriptional activity by sequestering Tap73 to the cytoplasm	Human	Watson et al. (2006)
AICD	Inhibits transcriptional activity	Human	Lee et al. (2008)
E2F1	Inhibits transcriptional activity by blocking protein interaction	Human	Aoki et al. (2012), Loftus et al. (2012)
HIF1 $\alpha$	Stabilizes protein	Human	Ryu et al. (2011)
<b>Transcriptional inhibitors</b>			
BCA3	Activates by promoting protein interaction	Human	Gao et al. (2006)
RCAN1	Stabilizes by inhibiting proteasomal degradation	Human	Noh et al. (2012)
<b>Receptors</b>			
EGFR	Promotes receptor ubiquitylation and ligand induced degradation	Mammals	(Oved et al., 2006)
T $\beta$ RII	Stabilizes protein	Human	(Zuo et al., 2013)
<b>Kinases</b>			
PINK1	Stabilizes the cytosolic protein form	Human	Choo et al. (2012)
CK1 $\alpha$	–	Human	Huart et al. (2012)
<b>Other</b>			
L11, S14, and other ribosomal proteins	Stabilizes the protein	Human	Xirodimas et al. (2008), Zhang et al. (2012)
SHC	–	Human	Jin et al. (2013)
HUR	Stabilizes the protein	Human	Embade et al. (2012)
Histone H4	Induces complex formation and amplifies Ubi cascade	Human	Ma et al. (2013)
driCE/caspase 7	Reduces catalytic activity	Fruit fly/human	Broemer et al. (2010)
Lag2	–	Yeast	Siergiejuk et al. (2009)
ML3	–	<i>Arabidopsis</i>	Hakenjos et al. (2013)

*PARK*, Parkin-like cytoplasmic protein; *Mdm2*, murine double minute 2; *Parkin*, Parkinson juvenile disease protein 2; *BRAP2*, BRCA1-associated protein; *DIAP1*, *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1; *XIAP*, X-linked inhibitor of apoptosis protein; *DDB1*, damaged DNA binding protein1; *VHL*, Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor; *p53*, cellular tumor antigen p53; *p73*, tumor protein p73; *AICD*, amyloid beta A4 protein; *E2F1*, transcription factor E2F1; *HIF1 $\alpha$* , hypoxia-inducible factor 3- $\alpha$ ; *BCA3*, breast cancer-associated gene 3; *RCAN1*, regulator of calcineurin 1; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *T $\beta$ RII*, transforming growth factor- $\beta$  receptor type II; *PINK1*, PTEN-induced putative kinase protein 1; *CK1 $\alpha$* , casein kinase 1 alpha; *L11*, ribosomal protein L11; *S14*, ribosomal protein S14; *SHC*, Src homology 2 domain-containing-transforming protein C1; *HUR*, Hu-antigen R; *driCE*, *Drosophila* interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme; *Lag2*, longevity-assurance protein 2; *ML3*, myeloid differentiation factor-2-related lipid-recognition domain protein 3.

MLN4924 (Hakenjos et al., 2011). Thus, there is evidence that NEDD8-modified proteins other than the cullins can exist but may be low in abundance or only transiently modified under normal conditions.

At the functional level, genetic experiments in *Schizosaccharomyces pombe* showed that the introduction of a specific *cullin1* mutant, which constitutively activates CRLs and therefore renders these CRLs independent from the neddylation machinery, was unable to rescue the phenotype of NEDD8 conjugation mutant *uba3-10* (Girdwood et al., 2011, 2012). This finding may suggest additional biological functions for neddylation that are impaired in *uba3-10* besides the neddylation defect of cullins.

#### IDENTIFICATION OF NEDDYLATION SUBSTRATES - A DIFFICULT ISSUE

A major problem for the identification of new neddylation substrates is the high sequence similarity between NEDD8 and ubiquitin. Both proteins are sequence identical at their C-termini just downstream of a trypsin cleavage site resulting in an identical di-glycine footprint on a modified protein after trypsin digestion for proteomic analyses (Figure 1). Therefore, a di-glycine modification on a lysine of a given peptide cannot unanimously be attributed to either ubiquitin or NEDD8 conjugation.

Ubiquitin and NEDD8 also show a remarkable similarity in their three-dimensional structure and key residues are conserved between the two proteins, most prominently three amino acids (L8, I44, and V70) in the hydrophobic patch that are involved in mediating ubiquitin-protein interactions (Rao-Naik et al., 1998; Whitby et al., 1998; Choi et al., 2009; Girdwood et al., 2011). Thus, a high substrate specificity is required to avoid leakage of ubiquitin or NEDD8 into the respective other modification pathway. Indeed, it has become apparent in the last years that there is a crosstalk between the NEDD8 and ubiquitin conjugation machineries (Hjerpe et al., 2012b; Leidecker et al., 2012; Singh et al., 2012). NEDD8 can be activated by the ubiquitin E1 UBA1 and once activated is conjugated to substrates in a manner similar to ubiquitin (Singh et al., 2012). Inversely, however, NAE specifically activates NEDD8 and does not use ubiquitin as a substrate (Singh et al., 2012). NEDD8 is incorporated in the ubiquitin pathway by UBA1 when the ratio of free NEDD8 to free ubiquitin, which under normal conditions is close to one, shifts toward NEDD8 (Hjerpe et al., 2012a; Leidecker et al., 2012). The leakage of NEDD8 into the ubiquitin pathway leads to the formation of mixed chains with NEDD8 possibly functioning as chain terminator. This mechanism is likely the explanation for the identification of NEDD8 chains in a proteomic study by Jones et al. (2008) using overexpression of a tagged NEDD8 construct. The ability of NEDD8 to form chain linkages is not essential *in vivo* as demonstrated by the viability of a *Schizosaccharomyces pombe* strain carrying a Ned8p mutant construct where all lysine residues that could potentially engage in chain formation were mutated to alanine (Girdwood et al., 2011). Depletion of cellular ubiquitin levels can be caused by knockdown or inhibition of the 26S proteasome but can also have physiological causes such as temperature or oxidative stress (Hjerpe et al., 2012a; Leidecker et al., 2012). While this atypical neddylation has been proposed to act as a stress response to ubiquitin depletion, it is still unclear whether this type of atypical neddylation is

biologically relevant *in vivo* (Hjerpe et al., 2012a; Leidecker et al., 2012).

#### NOVEL NEDDYLATION SUBSTRATES

As outlined above, various studies have led to the identification of novel NEDD8-modified proteins. At the biochemical level, these proteins belong to different protein families including E3 ubiquitin ligases or transcription factors and neddylation has been shown to positively or negatively interfere with their activity (Table 1). Neddylation changes the biochemical properties of its target proteins by inducing conformational changes as well as allowing or precluding protein-protein interactions. Apart from its pleiotropic effects on protein degradation through CRL neddylation, neddylation has a prominent role in cell cycle regulation and cellular stress response pathways in human cells and has also been linked to Alzheimer and Parkinson disease (Table 1). In plants, the only known non-cullin neddylation substrates are DAMAGED DNA BINDING PROTEIN1 (DDB1) and ML3 from *Arabidopsis*. DDB1 is a subunit of a cullin4 E3 ubiquitin ligase and therefore biochemically close to the cells neddylation machinery (Hotton et al., 2012). ML3 is a protein with intriguing cell biological features that plays a role in pathogen responses (Hakenjos et al., 2013). Interestingly, there is also evidence that ML3 has the ability to bind neddylated proteins in a non-covalent manner. Since the precise biochemical function of ML3 remains to be determined, it is at present unclear what role neddylation has in the control of ML3 function.

Given the very recently acquired understanding of the close interplay between ubiquitylation and neddylation, new and old neddylation targets should undergo close scrutiny to ensure that they are genuine targets for NEDD8 modification (Hjerpe et al., 2012b). A catalog of appropriate characterization criteria has been published (Rabut and Peter, 2008).

#### CONCLUSION

In this review, we have summarized the current knowledge of the neddylation pathway in eukaryotes with an emphasis on the role of neddylation in plants. While the enzyme pathway for the conjugation and deconjugation of NEDD8 has been elucidated in plants, findings from other eukaryotic model organisms suggest that there are more, unknown players in this pathway that need to be identified to gain a full understanding of the process and its regulation. Particularly the areas of NEDD8 processing, NEDD8 ligases and the identification of non-cullin NEDD8 substrates will require further detailed investigations in the future. Also the presence of ubiquitin-NEDD8 fusion proteins is unique to plants. The analysis of their processing could bear information that may allow understanding how the highly homologous ubiquitin and NEDD8 proteins were derived from each other during evolution.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors have contributed in equal parts to the preparation of this manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENT

Work on NEDD8 in the authors' laboratory is funded by the Priority Program SPP 1365 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.



## REFERENCES

- Abida, W. M., Nikolaev, A., Zhao, W., Zhang, W., and Gu, W. (2007). FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 282, 1797–1804. doi: 10.1074/jbc.M609001200
- Alonso-Peral, M. M., Candela, H., Del Pozo, J. C., Martinez-Laborda, A., Ponce, M. R., and Micol, J. L. (2006). The HVE/CAND1 gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* 133, 3755–3766. doi: 10.1242/dev.02554
- Ambroggio, X. I., Rees, D. C., and Deshaies, R. J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* 2:e2. doi: 10.1371/journal.pbio.0020002
- Aoki, I., Higuchi, M., and Gotoh, Y. (2012). NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* 32, 3954–3964. doi: 10.1038/onc.2012.428
- Bennett, E. J., Rush, J., Gygi, S. P., and Harper, J. W. (2010). Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell* 143, 951–965. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.017
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., et al. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47, 591–603. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02810.x
- Biswas, K. K., Ooura, C., Higuchi, K., Miyazaki, Y., Van Nguyen, V., Rahman, A., et al. (2007). Genetic characterization of mutants resistant to the antiauxin p-chlorophenoxyisobutyric acid reveals that AAR3, a gene encoding a DCN1-like protein, regulates responses to the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 145, 773–785. doi: 10.1104/pp.107.104844
- Boh, B. K., Smith, P. G., and Hagen, T. (2011). Neddylation-induced conformational control regulates cullin RING ligase activity in vivo. *J. Mol. Biol.* 409, 136–145. doi: 10.1016/j.jmb.2011.03.023
- Bornstein, G., Ganoth, D., and Hershko, A. (2006). Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11515–11520. doi: 10.1073/pnas.0603921103
- Bostick, M., Lochhead, S. R., Honda, A., Palmer, S., and Callis, J. (2004). Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2418–2432. doi: 10.1105/tpc.104.024943
- Broemer, M., Tenev, T., Rigbolt, K. T., Hempel, S., Blagoev, B., Silke, J., et al. (2010). Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. *Mol. Cell.* 40, 810–822. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.011
- Brownell, J. E., Sintchak, M. D., Gavin, J. M., Liao, H., Bruzzese, F. J., Bump, N. J., et al. (2010). Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol. Cell.* 37, 102–111. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.024
- Calabrese, M. F., Scott, D. C., Duda, D. M., Grace, C. R., Kurinov, I., Kriwacki, R. W., et al. (2011). A RING E3-substrate complex poised for ubiquitin-like protein transfer: structural insights into cullin-RING ligases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 947–949. doi: 10.1038/nsmb.2086
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C. W., and Vierstra, R. D. (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139, 921–939.
- Chamovitz, D. A., Wei, N., Osterlund, M. T., Von Arnim, A. G., Staub, J. M., Matsui, M., et al. (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 86, 115–121. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80082-3
- Chan, Y., Yoon, J., Wu, J. T., Kim, H. J., Pan, K. T., Yim, J., et al. (2008). DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo. *J. Cell Sci.* 121, 3218–3223. doi: 10.1242/jcs.030445
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., et al. (2006). *Arabidopsis* CULLIN4 forms an E3 ubiquitin ligase with RBX1 and the CDD complex in mediating light control of development. *Plant Cell* 18, 1991–2004. doi: 10.1105/tpc.106.043224
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2004). AtCAND1, a HEAT-repeat protein that participates in auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 1020–1026. doi: 10.1104/pp.104.044495
- Chew, E. H., and Hagen, T. (2007). Substrate-mediated regulation of cullin neddylation. *J. Biol. Chem.* 282, 17032–17040. doi: 10.1074/jbc.M701153200
- Choi, Y. S., Jeon, Y. H., Ryu, K. S., and Cheong, C. (2009). 60th residues of ubiquitin and Nedd8 are located out of E2-binding surfaces, but are important for K48 ubiquitin-linkage. *FEBS Lett.* 583, 3323–3328. doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.034
- Choo, Y. S., Vogler, G., Wang, D., Kalvakuri, S., Iliuk, A., Tao, W. A., et al. (2012). Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2514–2523. doi: 10.1093/hmg/dds070
- Choo, Y. Y., Boh, B. K., Lou, J. J., Eng, J., Leck, Y. C., Anders, B., et al. (2011). Characterization of the role of COP9 signalosome in regulating cullin E3 ubiquitin ligase activity. *Mol. Biol. Cell* 22, 4706–4715. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0251
- Christmann, M., Schmalzer, T., Gordon, C., Huang, X., Bayram, O., Schinke, J., et al. (2013). Control of multicellular development by the physically interacting deneddylases DEN1/DenA and COP9 signalosome. *PLoS Genet.* 9:e1003275. doi: 10.1371/journal.pgen.1003275
- Chuang, H. W., Zhang, W., and Gray, W. M. (2004). *Arabidopsis* ETA2, an apparent ortholog of the human cullin-interacting protein CAND1, is required for auxin responses mediated by the SCF(TIR1) ubiquitin ligase. *Plant Cell* 16, 1883–1897. doi: 10.1105/tpc.021923
- Cope, G. A., Suh, G. S., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V., et al. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* 298, 608–611. doi: 10.1126/science.1075901
- del Pozo, J. C., and Estelle, M. (1999). The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15342–15347. doi: 10.1073/pnas.96.26.15342
- del Pozo, J. C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J., and Estelle, M. (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* 280, 1760–1763. doi: 10.1126/science.280.5370.1760
- den Besten, W., Verma, R., Kleiger, G., Oania, R. S., and Deshaies, R. J. (2012). NEDD8 links cullin-RING ubiquitin ligase function to the p97 pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 511–516. doi: 10.1038/nsmb.2269
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441–445. doi: 10.1038/nature03543
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., et al. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell* 9, 109–119. doi: 10.1016/j.devcel.2005.05.014
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Karunarathna, N., Jurgens, G., and Estelle, M. (2007). AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52, 114–123. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03211.x
- Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Hellmann, H., and Estelle, M. (2003). The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 1762–1770. doi: 10.1093/emboj/cdg190
- Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J. P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., et al. (2005). Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant J.* 41, 386–399. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02302.x
- Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., and Sun, T. P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392–1405.
- Dohmann, E. M., Kuhnle, C., and Schwechheimer, C. (2005). Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1967–1978. doi: 10.1105/tpc.105.032870
- Dohmann, E. M., Levesque, M. P., De Veylder, L., Reichardt, I., Jurgens, G., Schmid, M., et al. (2008a). The *Arabidopsis* COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* 135, 2013–2022. doi: 10.1242/dev.020743
- Dohmann, E. M., Levesque, M. P., Isono, E., Schmid, M., and Schwechheimer, C. (2008b). Auxin responses in mutants of the *Arabidopsis* CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome. *Plant Physiol.* 147, 1369–1379. doi: 10.1104/pp.108.121061
- Dohmann, E. M., Nill, C., and Schwechheimer, C. (2010). DELLA proteins restrain germination and elongation growth in *Arabidopsis thaliana* COP9 signalosome mutants. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 163–168. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.12.001
- Duda, D. M., Borg, L. A., Scott, D. C., Hunt, H. W., Hammel, M., and Schulman, B. A. (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* 134, 995–1006. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.022

- Embade, N., Fernandez-Ramos, D., Varela-Rey, M., Beraza, N., Sini, M., Gutierrez De Juan, V., et al. (2012). Murine double minute 2 regulates Hu antigen R stability in human liver and colon cancer through NEDDylation. *Hepatology* 55, 1237–1248. doi: 10.1002/hep.24795
- Emberley, E. D., Mosadeghi, R., and Deshaies, R. J. (2012). Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylation of SCF by a noncatalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 287, 29679–29689. doi: 10.1074/jbc.M112.352484
- Enchev, R. I., Schreiber, A., Beuron, F., and Morris, E. P. (2010). Structural insights into the COP9 signalosome and its common architecture with the 26S proteasome lid and eIF3. *Structure* 18, 518–527. doi: 10.1016/j.str.2010.02.008
- Enchev, R. I., Scott, D. C., Da Fonseca, P. C., Schreiber, A., Monda, J. K., Schulman, B. A., et al. (2012). Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell Rep.* 2, 616–627. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.019
- Esteve-Bruna, D., Perez-Perez, J. M., Ponce, M. R., and Micol, J. L. (2013). incurvata13, a novel allele of AUXIN RESISTANT6, reveals a specific role for auxin and the SCF complex in *Arabidopsis* embryogenesis, vascular specification, and leaf flatness. *Plant Physiol.* 161, 1303–1320. doi: 10.1104/pp.112.207779
- Feng, S., Shen, Y., Sullivan, J. A., Rubio, V., Xiong, Y., Sun, T. P., et al. (2004). *Arabidopsis* CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein degradation. *Plant Cell* 16, 1870–1882. doi: 10.1105/tpc.021949
- Figueroa, P., Gusmaroli, G., Serino, G., Habashi, J., Ma, L., Shen, Y., et al. (2005). *Arabidopsis* has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multi-subunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *Plant Cell* 17, 1180–1195. doi: 10.1105/tpc.105.031989
- Frickel, E. M., Quesada, V., Muething, L., Gubbels, M. J., Spooner, E., Ploegh, H., et al. (2007). Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution. *Cell Microbiol.* 9, 1601–1610. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00896.x
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M. H., and Vierstra, R. D. (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* 20, 7096–7107. doi: 10.1093/emboj/20.24.7096
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z. Q., and Wilkinson, K. D. (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddyase of the ULP family. *J. Biol. Chem.* 278, 28892–28900. doi: 10.1074/jbc.M302890200
- Gao, F., Cheng, J., Shi, T., and Yeh, E. T. (2006). Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFκB-dependent transcription. *Nat. Cell Biol.* 8, 1171–1177. doi: 10.1038/ncb1483
- Gingerich, D. J., Gagne, J. M., Salter, D. W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., et al. (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 280, 18810–18821. doi: 10.1074/jbc.M413247200
- Girdwood, D., Robertson, M., and Gordon, C. (2012). Constitutively active Cullin-RING-Ligases fail to rescue loss of NEDD8 conjugation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 586, 1522–1528. doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.011
- Girdwood, D., Xirodimas, D. P., and Gordon, C. (2011). The essential functions of NEDD8 are mediated via distinct surface regions, and not by polyneddylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* 6:e20089. doi: 10.1371/journal.pone.0020089
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., et al. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615–623. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81603-7
- Gray, W. M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2002). Role of the *Arabidopsis* RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* 14, 2137–2144. doi: 10.1105/tpc.003178
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271–276. doi: 10.1038/35104500
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino, G., and Deng, X. W. (2007). Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with *Arabidopsis* Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell* 19, 564–581. doi: 10.1105/tpc.106.047571
- Hakenjos, J. P., Bejai, S., Ranftl, Q., Behringer, C., Vlot, A. C., Absmanner, B., et al. (2013). ML3 is a NEDD8- and ubiquitin-modified protein. *Plant Physiol.* 163, 135–149. doi: 10.1104/pp.113.221341
- Hakenjos, J. P., Richter, R., Dohmann, E. M., Katsiarimpa, A., Isono, E., and Schwechheimer, C. (2011). MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol.* 156, 527–536. doi: 10.1104/pp.111.176677
- Hamann, T., Mayer, U., and Jurgens, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 126, 1387–1395.
- Heir, P., Sufan, R. I., Greer, S. N., Poon, B. P., Lee, J. E., and Ohh, M. (2013). DCNL1 functions as a substrate sensor and activator of cullin 2-RING ligase. *Mol. Cell Biol.* 33, 1621–1631. doi: 10.1128/MCB.01342-12
- Hellmann, H., Hobbie, L., Chapman, A., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Del Pozo, C., et al. (2003). *Arabidopsis* AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO J.* 22, 3314–3325. doi: 10.1093/emboj/cdg335
- Hemelaar, J., Borodovsky, A., Kessler, B. M., Reverter, D., Cook, J., Kolli, N., et al. (2004). Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol. Cell Biol.* 24, 84–95. doi: 10.1128/MCB.24.1.84-95.2004
- Hind, S. R., Pulliam, S. E., Veronese, P., Shantharaj, D., Nazir, A., Jacobs, N. S., et al. (2011). The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens. *Plant J.* 65, 480–491. doi: 10.1111/j.1365-3113.2010.04437.x
- Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., et al. (2012a). Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem. J.* 441, 927–936. doi: 10.1042/BJ20111671
- Hjerpe, R., Thomas, Y., and Kurz, T. (2012b). NEDD8 overexpression results in neddylation of ubiquitin substrates by the ubiquitin pathway. *J. Mol. Biol.* 421, 27–29. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.013
- Hobbie, L., Mcgovern, M., Hurwitz, L. R., Pierro, A., Liu, N. Y., Bandyopadhyay, A., et al. (2000). The axr6 mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* 127, 23–32.
- Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., et al. (1999). Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 18, 6829–6834. doi: 10.1038/sj.onc.1203093
- Hotton, S. K., Castro, M. F., Eigenheer, R. A., and Callis, J. (2012). Recovery of DDB1a (damaged DNA binding protein1a) in a screen to identify novel RUB-modified proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 5, 1163–1166. doi: 10.1093/mp/sss077
- Hotton, S. K., Eigenheer, R. A., Castro, M. F., Bostick, M., and Callis, J. (2011). AXR1-ECR1 and AXL1-ECR1 heterodimeric RUB-activating enzymes diverge in function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 75, 515–526. doi: 10.1007/s11103-011-9750-8
- Hua, Z., and Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 299–334. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112256
- Huang, C. R., Burns, K. H., and Boeke, J. D. (2012). Active transposition in genomes. *Annu. Rev. Genet.* 46, 651–675. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155616
- Huang, H., Quint, M., and Gray, W. M. (2013a). The eta7/csn3-3 auxin response mutant of *Arabidopsis* defines a novel function for the CSN3 subunit of the COP9 signalosome. *PLoS ONE* 8:e66578. doi: 10.1371/journal.pone.0066578
- Huang, X., Ouyang, X., Yang, P., Lau, O. S., Chen, L., Wei, N., et al. (2013b). Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16669–16674. doi: 10.1073/pnas.1316622110
- Huart, A. S., MacLaine, N. J., Narayan, V., and Hupp, T. R. (2012). Exploiting the MDM2-CK1α protein-protein interface to develop novel biologics that induce UBL-kinase-modification and inhibit cell growth. *PLoS ONE* 7:e43391. doi: 10.1371/journal.pone.0043391
- Jentsch, S., and Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* 10, 335–342. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01785-2
- Jin, H. S., Liao, L., Park, Y., and Liu, Y. C. (2013). Neddylation pathway regulates T-cell function by targeting an adaptor protein Shc and a protein kinase Erk signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 624–629. doi: 10.1073/pnas.1213819110
- Johnston, S. C., Riddle, S. M., Cohen, R. E., and Hill, C. P. (1999). Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J.* 18, 3877–3887. doi: 10.1093/emboj/18.14.3877

- Jones, D., and Candido, E. P. (2000). The NED-8 conjugating system in *Caenorhabditis elegans* is required for embryogenesis and terminal differentiation of the hypodermis. *Dev. Biol.* 226, 152–165. doi: 10.1006/dbio.2000.9847
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.* 8, 275–282.
- Jones, J., Wu, K., Yang, Y., Guerrero, C., Nillegoda, N., Pan, Z. Q., et al. (2008). A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins. *J. Proteome Res.* 7, 1274–1287. doi: 10.1021/pr700749v
- Kim, D. Y., Scalfi, M., Smith, L. M., and Vierstra, R. D. (2013). Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 1523–1540. doi: 10.1105/tpc.112.108613
- Kotiguda, G. G., Weinberg, D., Dessau, M., Salvi, C., Serino, G., Chamovitz, D. A., et al. (2012). The organization of a CSN5-containing subcomplex of the COP9 signalosome. *J. Biol. Chem.* 287, 42031–42041. doi: 10.1074/jbc.M112.387977
- Kumar, S., Yoshida, Y., and Noda, M. (1993). Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 393–399. doi: 10.1006/bbrc.1993.2056
- Kurihara, L. J., Semenova, E., LeVorse, J. M., and Tilghman, S. M. (2000). Expression and functional analysis of Uch-L3 during mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2498–2504. doi: 10.1128/MCB.20.7.2498-2504.2000
- Kurz, T., Chou, Y. C., Willems, A. R., Meyer-Schaller, N., Hecht, M. L., Tyers, M., et al. (2008). Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation. *Mol. Cell.* 29, 23–35. doi: 10.1016/j.molcel.2007.12.012
- Kurz, T., Ozlu, N., Rudolf, F., O'Rourke, S. M., Luke, B., Hofmann, K., et al. (2005). The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature* 435, 1257–1261. doi: 10.1038/nature03662
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J. M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., et al. (1998). Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.* 12, 914–926. doi: 10.1101/gad.12.7.914
- Lau, O. S., and Deng, X. W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* 17, 584–593. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.004
- Lechner, E., Xie, D., Grava, S., Pigaglio, E., Planchais, S., Murray, J. A., et al. (2002). The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J. Biol. Chem.* 277, 50069–50080. doi: 10.1074/jbc.M204254200
- Lee, M. R., Lee, D., Shin, S. K., Kim, Y. H., and Choi, C. Y. (2008). Inhibition of AP1 intracellular domain (AICD) transcriptional activity via covalent conjugation with Nedd8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 976–981. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.066
- Leidecker, O., Matic, I., Mahata, B., Pion, E., and Xirodimas, D. P. (2012). The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle* 11, 1142–1150. doi: 10.4161/cc.11.6.19559
- Leyser, H. M., Lincoln, C. A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M. (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 364, 161–164. doi: 10.1038/364161a0
- Li, T., Santockyte, R., Shen, R. F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D. C., et al. (2006). A general approach for investigating enzymatic pathways and substrates for ubiquitin-like modifiers. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 70–74. doi: 10.1016/j.abb.2006.03.002
- Liakopoulos, D., Busgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S., and Pause, A. (1999). Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5510–5515. doi: 10.1073/pnas.96.10.5510
- Lincoln, C. R., Britton, J. H., and Estelle, M. (1990). Growth and development of the axr1 mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 1071–1080. doi: 10.1105/tpc.2.11.1071
- Linghu, B., Callis, J., and Goebel, M. G. (2002). Rub1p processing by Yuh1p is required for wild-type levels of Rub1p conjugation to Cdc53p. *Eukaryot. Cell* 1, 491–494. doi: 10.1128/EC.1.3.491-494.2002
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., and Xiong, Y. (2002). NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Mol. Cell.* 10, 1511–1518. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00783-9
- Loftus, S. J., Liu, G., Carr, S. M., Munro, S., and La Thangue, N. B. (2012). NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO Rep.* 13, 811–818. doi: 10.1038/embor.2012.113
- Ma, T., Chen, Y., Zhang, F., Yang, C. Y., Wang, S., and Yu, X. (2013). RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol. Cell.* 49, 897–907. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.006
- Maytal-Kivity, V., Pick, E., Piran, R., Hofmann, K., and Glickman, M. H. (2003). The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 706–715. doi: 10.1016/S1357-2725(02)00378-3
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., and Glickman, M. H. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem.* 3:28. doi: 10.1186/1471-2091-3-28
- Mendoza, H. M., Shen, L. N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B., et al. (2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J. Biol. Chem.* 278, 25637–25643. doi: 10.1074/jbc.M212948200
- Meyer-Schaller, N., Chou, Y. C., Sumara, I., Martin, D. D., Kurz, T., Katheder, N., et al. (2009). The human Dcn1-like protein DCNL3 promotes Cul3 neddylation at membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12365–12370. doi: 10.1073/pnas.0812528106
- Moon, J., Zhao, Y., Dai, X., Zhang, W., Gray, W. M., Huq, E., et al. (2007). A new CULLIN 1 mutant has altered responses to hormones and light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 684–696. doi: 10.1104/pp.106.091439
- Morimoto, M., Nishida, T., Nagayama, Y., and Yasuda, H. (2003). Nedd8-modification of Cull1 is promoted by Roc1 as a Nedd8-E3 ligase and regulates its stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 392–398. doi: 10.1016/S0006-291X(02)03051-6
- Nakasone, A., Fujiwara, M., Fukao, Y., Biswas, K. K., Rahman, A., Kawai-Yamada, M., et al. (2012). SMALL ACIDIC PROTEIN1 acts with RUB modification components, the COP9 signalosome, and AXR1 to regulate growth and development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 93–105. doi: 10.1104/pp.111.188409
- Nelson, D. C., Scaffidi, A., Dun, E. A., Waters, M. T., Flematti, G. R., Dixon, K. W., et al. (2011). F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8897–8902. doi: 10.1073/pnas.1100987108
- Noh, E. H., Hwang, H. S., Hwang, H. S., Min, B., Im, E., and Chung, K. C. (2012). Covalent NEDD8 conjugation increases RCAN1 protein stability and potentiates its inhibitory action on calcineurin. *PLoS ONE* 7:e48315. doi: 10.1371/journal.pone.0048315
- Norman, J. A., and Shiekhhattar, R. (2006). Analysis of Nedd8-associated polypeptides: a model for deciphering the pathway for ubiquitin-like modifications. *Biochemistry* 45, 3014–3019. doi: 10.1021/bi052435a
- O'Donoghue, J. E., Bech-Otschir, D., Larsen, I. B., Wallace, M., Hartmann-Petersen, R., and Gordon, C. (2013). Nedd8 processing enzymes in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Biochem.* 14:8. doi: 10.1186/1471-2091-14-8
- Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E. A., Kominami, K., et al. (2000). Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.* 19, 3475–3484. doi: 10.1093/emboj/19.13.3475
- Oshikawa, K., Matsumoto, M., Yada, M., Kamura, T., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. I. (2003). Preferential interaction of TIP120A with Cull1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1209–1216. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00501-1
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N., and Deng, X. W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405, 462–466. doi: 10.1038/35013076
- Ou, C. Y., Lin, Y. F., Chen, Y. J., and Chien, C. T. (2002). Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cull1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev.* 16, 2403–2414. doi: 10.1101/gad.1011402
- Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonic, E., Shtiegman, K., Marmor, M. D., et al. (2006). Conjugation to Nedd8 investigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 281, 21640–21651. doi: 10.1074/jbc.M513034200
- Pacin, M., Legris, M., and Casal, J. J. (2013). COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *Plant J.* 75, 631–641. doi: 10.1111/tpj.12226
- Pacurar, D. I., Pacurar, M. L., Street, N., Bussell, J. D., Pop, T. I., Gutierrez, L., et al. (2012). A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. *J. Exp. Bot.* 63, 2491–2501. doi: 10.1093/jxb/err422
- Pierce, N. W., Lee, J. E., Liu, X., Sweredoski, M. J., Graham, R. L., Larimore, E. A., et al. (2013). Cand1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* 153, 206–215. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.024

- Quint, M., Ito, H., Zhang, W., and Gray, W. M. (2005). Characterization of a novel temperature-sensitive allele of the CUL1/AXR6 subunit of SCF ubiquitin-ligases. *Plant J.* 43, 371–383. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02449.x
- Rabut, G., Le Dez, G., Verma, R., Makhnevych, T., Knebel, A., Kurz, T., et al. (2011). The TFIH subunit Tfb3 regulates cullin neddylation. *Mol. Cell.* 43, 488–495. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.032
- Rabut, G., and Peter, M. (2008). Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 9, 969–976. doi: 10.1038/embor.2008.183
- Rao-Naik, C., Delacruz, W., Laplaza, J. M., Tan, S., Callis, J., and Fisher, A. J. (1998). The rub family of ubiquitin-like proteins. Crystal structure of Arabidopsis rub1 and expression of multiple rubs in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 273, 34976–34982. doi: 10.1074/jbc.273.52.34976
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W. M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* 12, 198–207. doi: 10.1101/gad.12.2.198
- Russell, R. C., and Ohh, M. (2008). NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep.* 9, 486–491. doi: 10.1038/embor.2008.19
- Ryu, J. H., Li, S. H., Park, H. S., Park, J. W., Lee, B., and Chun, Y. S. (2011). Hypoxia-inducible factor alpha subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J. Biol. Chem.* 286, 6963–6970. doi: 10.1074/jbc.M110.188706
- Sarikas, A., Hartmann, T., and Pan, Z. Q. (2011). The cullin protein family. *Genome Biol.* 12, 220. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-220
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W. L., Lyapina, S., Deshaies, R. J., et al. (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292, 1379–1382. doi: 10.1126/science.1059776
- Schwechheimer, C., Serino, G., and Deng, X. W. (2002). Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *Plant Cell* 14, 2553–2563. doi: 10.1105/tpc.003434
- Scott, D. C., Monda, J. K., Bennett, E. J., Harper, J. W., and Schulman, B. A. (2011). N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 334, 674–678. doi: 10.1126/science.1209307
- Scott, D. C., Monda, J. K., Grace, C. R., Duda, D. M., Kriwacki, R. W., Kurz, T., et al. (2010). A dual E3 mechanism for Rub1 ligation to Cdc53. *Mol. Cell.* 39, 784–796. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.030
- Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., et al. (1998). A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 12, 469–478.
- Serino, G., Su, H., Peng, Z., Tsuge, T., Wei, N., Gu, H., et al. (2003). Characterization of the last subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex. *Plant Cell* 15, 719–731. doi: 10.1105/tpc.009092
- Serino, G., Tsuge, T., Kwok, S., Matsui, M., Wei, N., and Deng, X. W. (1999). Arabidopsis cop8 and fus4 mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* 11, 1967–1980.
- Shen, H., Luong, P., and Huq, E. (2007). The F-box protein MAX2 functions as a positive regulator of photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145, 1471–1483. doi: 10.1104/pp.107.107227
- Shen, L. N., Liu, H., Dong, C., Xirodimas, D., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2005). Structural basis of NEDD8 ubiquitin discrimination by the deNEDDylating enzyme NEDP1. *EMBO J.* 24, 1341–1351. doi: 10.1038/sj.emboj.7600628
- Shen, W. H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., et al. (2002). Null mutation of AtCUL1 causes arrest in early embryogenesis in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* 13, 1916–1928. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0077
- Shin, Y. C., Tang, S. J., Chen, J. H., Liao, P. H., and Chang, S. C. (2011). The molecular determinants of NEDD8 specific recognition by human SENP8. *PLoS ONE* 6:e27742. doi: 10.1371/journal.pone.0027742
- Siergiejuk, E., Scott, D. C., Schulman, B. A., Hofmann, K., Kurz, T., and Peter, M. (2009). Cullin neddylation and substrate-adaptors counteract SCF inhibition by the CAND1-like protein Lag2 in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J.* 28, 3845–3856. doi: 10.1038/emboj.2009.354
- Singh, R. K., Zerath, S., Kleifeld, O., Scheffner, M., Glickman, M. H., and Fushman, D. (2012). Recognition and cleavage of related to ubiquitin 1 (Rub1) and Rub1-ubiquitin chains by components of the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1595–1611. doi: 10.1074/mcp.M112.022467
- Soucy, T. A., Smith, P. G., Milhollen, M. A., Berger, A. J., Gavin, J. M., Adhikari, S., et al. (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458, 732–736. doi: 10.1038/nature07884
- Stickle, N. H., Chung, J., Klco, J. M., Hill, R. P., Kaelin, W. G. Jr., and Ohn, M. (2004). pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3251–3261. doi: 10.1128/MCB.24.8.3251-3261.2004
- Stirnberg, P., Furner, I. J., and Ottoline Leyser, H. M. (2007). MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* 50, 80–94. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03032.x
- Stuttman, J., Lechner, E., Guerois, R., Parker, J. E., Nussaume, L., Genschik, P., et al. (2009). COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 284, 7920–7930. doi: 10.1074/jbc.M809069200
- Takashima, O., Tsuruta, F., Kigoshi, Y., Nakamura, S., Kim, J., Katoh, M. C., et al. (2013). Brap2 regulates temporal control of NF-kappaB localization mediated by inflammatory response. *PLoS ONE* 8:e58911. doi: 10.1371/journal.pone.0058911
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., et al. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640–645. doi: 10.1038/nature05731
- Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K., and Chiba, T. (2001). The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J. Cell Biol.* 155, 571–579. doi: 10.1083/jcb.200104035
- Um, J. W., Han, K. A., Im, E., Oh, Y., Lee, K., and Chung, K. C. (2012). Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin. *J. Neurosci. Res.* 90, 1030–1042. doi: 10.1002/jnr.22828
- Vierstra, R. D. (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol.* 160, 2–14. doi: 10.1104/pp.112.200667
- Vierstra, R. D., and Callis, J. (1999). Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol. Biol.* 41, 435–442. doi: 10.1023/A:1006323317890
- von Arnim, A. G., and Deng, X. W. (1994). Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79, 1035–1045. doi: 10.1016/0092-8674(94)90034-5
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L. S., Yeh, E. T., and Kamitani, T. (1998). Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 688–692. doi: 10.1006/bbrc.1998.9532
- Wang, J., Yu, Y., Zhang, Z., Quan, R., Zhang, H., Ma, L., et al. (2013). Arabidopsis CSN5B interacts with VTC1 and modulates ascorbic acid synthesis. *Plant Cell* 25, 625–636. doi: 10.1105/tpc.112.106880
- Wang, X. F., He, F. F., Ma, X. X., Mao, C. Z., Hodgman, C., Lu, C. G., et al. (2011). OsCAND1 is required for crown root emergence in rice. *Mol. Plant* 4, 289–299. doi: 10.1093/mp/ssp068
- Waters, M. T., and Smith, S. M. (2013). KAI2- and MAX2-mediated responses to karrikins and strigolactones are largely independent of HY5 in Arabidopsis seedlings. *Mol. Plant* 6, 63–75. doi: 10.1093/mp/sss127
- Watson, I. R., Blanch, A., Lin, D. C., Ohh, M., and Irwin, M. S. (2006). Mdm2-mediated NEDD8 modification of Tap73 regulates its transactivation function. *J. Biol. Chem.* 281, 34096–34103. doi: 10.1074/jbc.M603654200
- Wei, N., Chamovitz, D. A., and Deng, X. W. (1994). Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 78, 117–124. doi: 10.1016/0092-8674(94)90578-9
- Wei, N., and Deng, X. W. (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 4, 1507–1518. doi: 10.1105/tpc.4.12.1507
- Wei, N., and Deng, X. W. (1998). Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants. *Photochem. Photobiol.* 68, 237–241. doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb02495.x

- Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M., et al. (1998). The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr. Biol.* 8, 919–922. doi: 10.1016/S0960-9822(07)00372-7
- Weijers, D., Benkova, E., Jager, K. E., Schlereth, A., Hamann, T., Kientz, M., et al. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J.* 24, 1874–1885. doi: 10.1038/sj.emboj.7600659
- Whitby, F. G., Xia, G., Pickart, C. M., and Hill, C. P. (1998). Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *J. Biol. Chem.* 273, 34983–34991.
- Woodward, A. W., Ratzel, S. E., Woodward, E. E., Shamooy, Y., and Bartel, B. (2007). Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol.* 144, 976–987. doi: 10.1104/pp.107.100404
- Wu, K., Yamoah, K., Dolios, G., Gan-Erdene, T., Tan, P., Chen, A., et al. (2003). DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J. Biol. Chem.* 278, 28882–28891. doi: 10.1074/jbc.M302888200
- Wu, S., Zhu, W., Nhan, T., Toth, J. I., Petroski, M. D., and Wolf, D. A. (2013). CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire. *Nat. Commun.* 4, 1642. doi: 10.1038/ncomms2636
- Xirodimas, D. P. (2008). Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 802–806. doi: 10.1042/BST0360802
- Xirodimas, D. P., Saville, M. K., Bourdon, J. C., Hay, R. T., and Lane, D. P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118, 83–97. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.016
- Xirodimas, D. P., Sundqvist, A., Nakamura, A., Shen, L., Botting, C., and Hay, R. T. (2008). Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep.* 9, 280–286. doi: 10.1038/embor.2008.10
- Xu, G., Ma, H., Nei, M., and Kong, H. (2009). Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 835–840. doi: 10.1073/pnas.0812043106
- Xu, G. P., Zhang, Z. L., Xiao, S., Zhuang, L. K., Xia, D., Zou, Q. P., et al. (2013). Rig-G negatively regulates SCF-E3 ligase activities by disrupting the assembly of COP9 signalosome complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432, 425–430. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.132
- Yang, P., Smalle, J., Lee, S., Yan, N., Emborg, T. J., and Vierstra, R. D. (2007). Ubiquitin C-terminal hydrolases 1 and 2 affect shoot architecture in *Arabidopsis*. *Plant J.* 51, 441–457. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03154.x
- Yu, H. A., Kim, S. G., Kim, E. J., Lee, W. J., Kim, D. O., Park, K., et al. (2007). Characterization of ubiquitin C-terminal hydrolase 1 (YUH1) from *Saccharomyces cerevisiae* expressed in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 56, 20–26. doi: 10.1016/j.pep.2007.07.005
- Yu, Z., Kleifeld, O., Lande-Atir, A., Bsoul, M., Kleiman, M., Krutauz, D., et al. (2011). Dual function of Rpn5 in two PCI complexes, the 26S proteasome and COP9 signalosome. *Mol. Biol. Cell* 22, 911–920. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0655
- Zemla, A., Thomas, Y., Kedziora, S., Knebel, A., Wood, N. T., Rabut, G., et al. (2013). CSN- and CAND1-dependent remodelling of the budding yeast SCF complex. *Nat. Commun.* 4, 1641. doi: 10.1038/ncomms2628
- Zhang, J., Bai, D., Ma, X., Guan, J., and Zheng, X. (2012). hCINAP is a novel regulator of ribosomal protein-HDM2-p53 pathway by controlling NEDDylation of ribosomal protein S14. *Oncogene* 33, 246–254. doi: 10.1038/nc.2012.560
- Zhang, W., Ito, H., Quint, M., Huang, H., Noel, L. D., and Gray, W. M. (2008). Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in *Arabidopsis* supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8470–8475. doi: 10.1073/pnas.0804144105
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E. H., Lykke-Andersen, K., et al. (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol. Cell.* 10, 1519–1526. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00784-0
- Zhou, L., and Watts, F. Z. (2005). Nep1, a *Schizosaccharomyces pombe* deneddylating enzyme. *Biochem. J.* 389, 307–314. doi: 10.1042/BJ20041991
- Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y. J., Li, M., Du, J., Ding, Y., et al. (2013). c-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF-beta type II receptor. *Mol. Cell* 49, 499–510. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.002

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 18 January 2014; paper pending published: 17 February 2014; accepted: 03 March 2014; published online: 21 March 2014.

Citation: Mergner J and Schwechheimer C (2014) The NEDD8 modification pathway in plants. *Front. Plant Sci.* 5:103. doi: 10.3389/fpls.2014.00103

This article was submitted to *Plant Genetics and Genomics*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2014 Mergner and Schwechheimer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# DENEDDYLASE1 Deconjugates NEDD8 from Non-Cullin Protein Substrates in *Arabidopsis thaliana*

Julia Mergner,<sup>1</sup> Stephanie Heinzlmeir,<sup>b</sup> Bernhard Kuster,<sup>b</sup> and Claus Schwechheimer<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Plant Systems Biology, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

<sup>b</sup> Proteomics and Bioanalytics, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

The evolutionarily conserved 8-kD protein NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED8) belongs to the family of ubiquitin-like modifiers. Like ubiquitin, NEDD8 is conjugated to and deconjugated from target proteins. Many targets and functions of ubiquitylation have been described; by contrast, few targets of NEDD8 have been identified. In plants as well as in non-plant organisms, the cullin subunits of cullin-RING E3 ligases are NEDD8 conjugates with a demonstrated functional role for the NEDD8 modification. The existence of other non-cullin NEDD8 targets has generally been questioned. NEDD8 is translated as a precursor protein and proteolytic processing exposes a C-terminal glycine required for NEDD8 conjugation. In animals and yeast, DENEDDYLASE1 (DEN1) processes NEDD8. Here, we show that mutants of a *DEN1* homolog from *Arabidopsis thaliana* have no detectable defects in NEDD8 processing but do accumulate a broad range of NEDD8 conjugates; this provides direct evidence for the existence of non-cullin NEDD8 conjugates. We further identify AUXIN RESISTANT1 (AXR1), a subunit of the heterodimeric NEDD8 E1 activating enzyme, as a NEDD8-modified protein in *den1* mutants and wild type and provide evidence that AXR1 function may be compromised in the absence of DEN1 activity. Thus, in plants, neddylation may serve as a regulatory mechanism for cullin and non-cullin proteins.

## INTRODUCTION

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED8), in *Arabidopsis thaliana* also known as RUB (RELATED TO UBIQUITIN), is an evolutionarily conserved 8-kD protein closely related to ubiquitin (Rao-Naik et al., 1998; Hochstrasser, 2009). Like ubiquitin, NEDD8 is conjugated to substrate proteins through an enzymatic cascade that includes the E1 NEDD8 activating enzyme (NAE); in *Arabidopsis*, NAE is a heterodimer of AXR1 (AUXIN RESISTANT1) or AXL (AXR1-LIKE) and ECR1 (E1 C-TERMINAL RELATED1). The NEDD8-conjugating cascade also includes an E2 conjugating enzyme; in *Arabidopsis*, this is RUB1 CONJUGATING ENZYME1 (RCE1; Pozo et al., 1998; del Pozo and Estelle, 1999; del Pozo et al., 2002; Dharmasiri et al., 2007; Woodward et al., 2007). NEDD8 is ultimately conjugated to its protein substrate with the help of E3 NEDD8 ligases like RBX1 (RING BOX1), a constitutive subunit of cullin-RING E3 ubiquitin ligases (CRLs), and DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLLATION (DCN; Gray et al., 2002; Duda et al., 2008; Kurz et al., 2008).

The cullin subunits of CRLs are the best-characterized substrates for NEDD8 conjugation (neddylation) (Duda et al., 2008; Huang et al., 2008). Cullin neddylation is promoted by the CRL core subunit RBX1 and required for the assembly of functional CRL complexes that ubiquitylate their cognate substrate proteins to target them for degradation by the 26S proteasome (Gray et al., 2002; Duda et al., 2008). CRL function and protein

complex assembly are antagonized by cullin deneddylation through the COP9 signalosome (CSN) (Schwechheimer et al., 2001; Wei et al., 2008; Schwechheimer and Isono, 2010; Lingaraju et al., 2014). *Arabidopsis* mutants for all eight CSN subunits have been described, including mutants for the paralogous proteins CSN5A and CSN5B, which are the deneddyating subunits of CSN (Gusmaroli et al., 2004, 2007; Dohmann et al., 2005). Whereas *csn* loss-of-function mutants display the strong characteristic constitutively photomorphogenic (*cop*) phenotype and accumulate cullins in their NEDD8-modified form, mutants partially impaired in CSN function, such as *csn5a* and *csn5b*, have comparatively mild phenotypes and are only partially defective in cullin deneddylation (Gusmaroli et al., 2004, 2007; Dohmann et al., 2005).

Proper neddylation is essential for plant development. *Arabidopsis* mutants lacking two of the three *RUB* genes (Bostick et al., 2004) or mutants defective in both paralogous subunits of the NAE, *AXR1* and *AXL*, have severe developmental defects beginning during embryogenesis (Leyser et al., 1993; Dharmasiri et al., 2007; Hotton et al., 2011). Weaker mutants, such as *axr1* single mutants, undergo largely normal embryo differentiation but have substantial growth defects, including a strong insensitivity to the phytohormone auxin when grown on medium containing auxin concentrations that inhibit root growth in the wild type (Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993; Schwechheimer et al., 2002). The auxin insensitivity of the *axr1* mutants can be explained by impaired functionality of their cognate E3 ligase SCF<sup>TIR1</sup> and related CRLs and, consequently, an inability to degrade the auxin-labile AUX/IAA repressor proteins such as AXR2 and AXR3 (Gray et al., 2001). This auxin insensitivity can also be observed when wild-type seedlings are treated with the NAE inhibitor MLN4924, which blocks NEDD8 conjugation in an MLN4924 concentration-dependent manner (Brownell et al., 2010; Hakenjos et al., 2011). Auxin-insensitive root growth is thus an indicator for defects in

<sup>1</sup> Address correspondence to claus.schwechheimer@wzw.tum.de. The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)) is: Claus Schwechheimer (claus.schwechheimer@wzw.tum.de). [www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.135996](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.135996)

neddylation and SCF<sup>TIR1</sup> function. Importantly, weak mutants of CSN such as *csn5a* and *csn5b* mutants also display this phenotype, suggesting that an adequate balance of neddylation and deneddylation is required for proper CRL and SCF<sup>TIR1</sup> function (Schwechheimer et al., 2001; Gusmaroli et al., 2004, 2007; Dohmann et al., 2005).

Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers such as SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) modify hundreds of distinct target proteins and thereby affect protein activity or fate (Miller and Vierstra, 2011; Vierstra, 2012; Kim et al., 2013). Therefore, it is surprising that, to date, only cullins have been recognized as bona fide NEDD8 modification substrates. For NEDD8, a number of non-cullin NEDD8-modified proteins have previously been identified, mainly in animal systems (Xirodimas, 2008; Mergner and Schwechheimer, 2014; Enchev et al., 2015), but recent observations of nonspecific crosstalk between the ubiquitin and the NEDD8 conjugation machineries suggests that at least some of these neddylation substrates may in fact be ubiquitylation substrates that have become neddylated rather than ubiquitylated as a consequence of NEDD8 overexpression (Hjerpe et al., 2012a, 2012b). It has thus been questioned whether other biologically relevant non-cullin neddylation substrates exist in eukaryotes (Enchev et al., 2015). In plants, to date, only one non-cullin substrate, ML3, has been biochemically validated, although the existence of others has been proposed (Hakenjos et al., 2011, 2013; Hotton et al., 2012). However, the biological significance of ML3 neddylation remains to be elucidated since the function of ML3 itself is unknown (Hakenjos et al., 2013).

The Arabidopsis genome encodes three distinct NEDD8-encoding *RUB* genes belonging to two structurally distinct families (Rao-Naik et al., 1998). Whereas Arabidopsis *RUB3* encodes a NEDD8 precursor with a C-terminal extension, *RUB1* and *RUB2* additionally bear an N-terminal extension with full-length ubiquitin (Rao-Naik et al., 1998). Mature NEDD8 is derived from these precursors through the N- and C-terminal processing of these extensions. DEN1/NEDP1/SEN8 (DENEDDYLAZE1/NEDD8-SPECIFIC PROTEASE1/SENTRIN-SPECIFIC PROTEASE8; hitherto DEN1) was originally described from *Drosophila melanogaster* and mammals as a NEDD8-specific processing enzyme (Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003; Shen et al., 2005; Chan et al., 2008; Shin et al., 2011). In addition, several ubiquitin C-terminal hydrolases from animals and yeasts were shown to possess a dual specificity for ubiquitin and NEDD8 processing (Wada et al., 1998; Johnston et al., 1999; Linghu et al., 2002; Hemelaar et al., 2004; Frickel et al., 2007; Yu et al., 2007). Although NEDD8 and neddylation are essential in many organisms, none of the mutants described to date from any organism for these NEDD8 processing enzymes are inviable or have an apparent defect in NEDD8 processing. It has therefore been suggested that the different enzymes may act in a functionally redundant manner (Enchev et al., 2015).

Based on sequence similarities, we and others have recently identified four proteins as candidates for NEDD8 processing enzymes from Arabidopsis: a DEN1 homologous protein belonging to the C48 peptidase family (Colby et al., 2006; Mergner and Schwechheimer, 2014) as well as three C12 family peptidases UCH1 (UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE1), UCH2, and UCH3 (Yang et al., 2007). Here, we examine the DEN1 homologous protein as well as *den1* mutants from Arabidopsis. We

show that DEN1 is not essential for NEDD8 processing but required for protein deneddylation since *den1* mutants accumulate a broad range of NEDD8 conjugates. Furthermore, we show that AXR1 is one abundant NEDD8 conjugate in *den1* mutant plants and provide evidence that AXR1 function may be compromised in these mutants. We thus conclude that many non-cullin NEDD8-modified proteins exist in plants and that neddylation and deneddylation may function as regulatory mechanisms of non-cullin proteins in plant development.

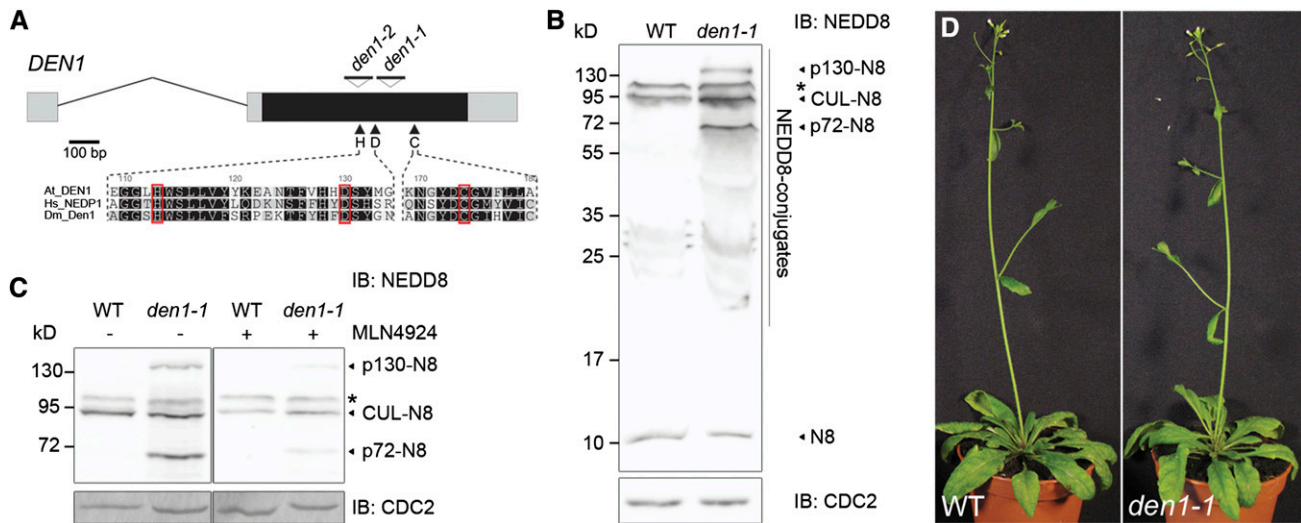
## RESULTS

### Arabidopsis *den1* Mutants Accumulate NEDD8 Conjugates

Human DEN1 was originally identified as a protein capable of processing the C terminus of NEDD8 propeptides. To understand NEDD8 precursor processing in Arabidopsis, we analyzed AT5G60190, the closest homolog of human and *Drosophila* DEN1 from Arabidopsis (Supplemental Figure 1). DEN1 belongs to the family of cysteine proteases, and Arabidopsis AT5G60190 is a predicted active protease based on the conservation of the residues critical for this biochemical activity (Figure 1A). Due to the overall sequence conservation, the conservation of the active site as well as the biochemical activities of AT5G60190 described in due course, we designated this protein DEN1. We further isolated two *den1* mutant alleles, *den1-1* and *den1-2*, from the GABI-Kat (Rosso et al., 2003) and the SAIL (Sessions et al., 2002) T-DNA insertion mutant collections, respectively (Figure 1A). Both mutant alleles carry insertions in close proximity to the catalytic center of the cysteine protease, and the insertions would therefore be predicted to strongly impair protein function.

In Arabidopsis, mature NEDD8 is the product of the proteolytic processing of the precursors derived from *RUB1*, *RUB2*, and *RUB3* (Rao-Naik et al., 1998). Whereas *RUB3* encodes an unfused NEDD8 that only requires C-terminal processing, *RUB1* and *RUB2* encode UB (ubiquitin)-NEDD8 chains that are processed at the UB and NEDD8 C termini, respectively. When we probed total protein extracts of the wild type and *den1* mutants with an anti-NEDD8 antibody that recognizes all three Arabidopsis NEDD8 isoforms (Hakenjos et al., 2011), we observed that NEDD8 processing was not detectably defective in the *den1* mutants since the levels of mature unconjugated NEDD8 and NEDD8-conjugated cullins were indistinguishable between the mutant and the wild type (Figure 1B; Supplemental Figure 2). Surprisingly, however, *den1* mutants accumulated NEDD8-modified proteins of a broad molecular mass range (Figure 1B; Supplemental Figure 2). Particularly prominent were two abundant NEDD8-modified proteins with an apparent molecular mass of 72 and 130 kD, which we designated p72 and p130 (Figure 1B; Supplemental Figure 2). Since the accumulation of the non-cullin as well as the cullin NEDD8 conjugates was reduced in the *den1* mutant following treatment with the NAE inhibitor MLN4924, we concluded that not only the cullins but also the other non-cullin NEDD8-modified proteins were substrates downstream of NAE (Figure 1C). Despite the fact that the *den1* mutants had a prominent molecular phenotype, we did not observe any apparent growth defects when examining the mutants in standard growth conditions or following





**Figure 1.** *den1* Mutants Accumulate NEDD8 Conjugates.

**(A)** Scheme of the *DEN1* gene and positions of the respective T-DNA insertions in *den1-1* and *den1-2* mutants. The open reading frame is shown as a block box, untranslated regions as gray boxes, and the single intron as a line. Arrowheads mark the position of the histidine (H), aspartic acid (D), and cysteine (C) codons of the catalytic triad. The amino acids surrounding the catalytic triad are highly conserved among eukaryotes as shown by the alignment of the corresponding protein sequences from Arabidopsis DEN1 (At\_DEN1), human DEN1 (Hs\_NEDP1), and Drosophila DEN1 (Dm\_Den1). **(B)** Immunoblot (IB) with an anti-NEDD8 antibody of total protein extracts (150  $\mu$ g) from 7-d-old light-grown seedlings. NEDD8 (N8) and N8 conjugates are marked on the right; an asterisk indicates a background cross-reactive band unrelated to N8. For a phenotypic analysis of the *den1-2* mutant allele, see Supplemental Figure 2.

**(C)** Immunoblot with anti-NEDD8 antibody of total protein extracts (60  $\mu$ g) from 7-d-old seedlings grown on GM or GM supplemented with 10  $\mu$ M MLN4924. The two parts of the immunoblot come from the same experiment and same exposure but were spliced together. An immunoblot with an anti-CDC2 antibody serves as loading control. Based on its insensitivity to MLN4924 treatment, we consider the band at  $\sim$ 100 kD, marked with an asterisk, as a cross-reaction of the NEDD8 antibody.

**(D)** Phenotype of 4-week-old wild-type and *den1-1* mutant plants grown under constant light. The *den1-1* mutants have no apparent phenotypes.

a diverse set of treatments (Figure 1D). In summary, we concluded that the loss of *DEN1* as a candidate C-terminal NEDD8 hydrolase was not sufficient to detectably impair NEDD8 processing in planta but resulted in the accumulation of a broad range of NEDD8 conjugates, presumably *DEN1* deneddylation targets. Since the two available *den1* mutant alleles had identical molecular phenotypes, we performed all subsequent analyses with *den1-1*.

### DEN1 Does Not Deneddylate Cullins in Planta

The CSN subunit CSN5 deneddylates the cullin subunits of cullin-RING ligases, such as CULLIN1 and CULLIN4. At the molecular level, *csn5a* single as well as *csn5a csn5b* double mutants accumulate NEDD8-conjugated cullins but not other NEDD8-modified proteins (Figure 2A) (Dohmann et al., 2005). In other systems, DEN1 homologs were reported to also deneddylate cullins (Mendoza et al., 2003). In contrast, we found that the pattern of neddylated protein accumulation in the *den1* mutant was distinct from the pattern detected in the *csn5a* mutant, suggesting that DEN1 and CSN5 may have distinct protein substrate ranges (Figure 2A). Since we occasionally observed slight variations in cullin neddylation between different protein samples when we detected cullin neddylation with the NEDD8 antibody, we also compared the cullin neddylation patterns with anti-CULLIN1 and anti-CULLIN4 antibodies (Figure 2B). However,

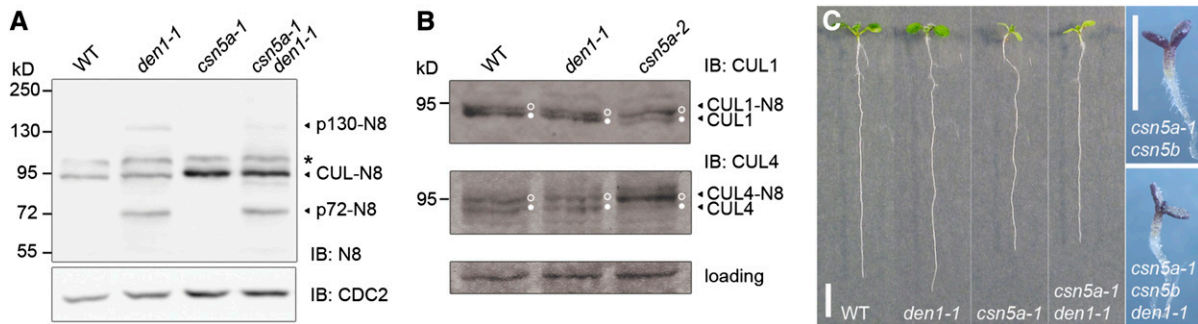
these analyses also led us to the conclusion that DEN1 does not deneddylate cullins in planta.

While the loss of both CSN5 isoforms in the *csn5a csn5b* mutant resulted in seedling growth arrest, single mutants of CSN5A or CSN5B are viable and only *csn5a* mutants have clearly apparent growth phenotypes (Gusmaroli et al., 2004; Dohmann et al., 2005). To examine the possibility of a genetic interaction between *DEN1* and CSN5, we introduced the *den1* mutation into *csn5* single and double mutants. However, the phenotypic analyses indicated that the *csn5a den1* double mutants, as well as the *csn5a csn5b den1* triple mutants, had the phenotypes of the respective *csn5* mutants (Figure 2C). Furthermore, at the molecular level, *csn5a den1* double mutants had the combined deneddylation defects of the respective single mutants (Figure 2A). We thus concluded that DEN1 and CSN5 interact in an additive manner in Arabidopsis and may have a differential set of deneddylation substrates in planta.

### DEN1 Is a Deneddylating Enzyme

We next tested the ability of recombinant DEN1 to deneddylate NEDD8 conjugates. To this end, we added purified glutathione S-transferase (GST)-tagged wild-type DEN1 and DEN1C166A, a predicted inactive DEN1 variant with an alanine replacement mutation of the catalytically important Cys-166, to total protein extracts from *csn5a den1* double mutants. In these experiments,





**Figure 2.** DEN1 and CSN5 Have Different Deneddylation Substrates in Vivo.

**(A)** Immunoblot (IB) with an anti-NEDD8 antibody of total protein extracts (60  $\mu$ g) from 7-d-old seedlings. NEDD8 (N8) conjugates are indicated on the right. An asterisk denotes a background cross-reactive band unrelated to N8.

**(B)** Immunoblot analyses of total protein extracts (30  $\mu$ g) prepared from 7-d-old seedlings and probed with anti-CULLIN1 (CUL1) and anti-CULLIN4 (CUL4) antibodies. Open circles mark the NEDD8 (N8)-conjugated and filled circles the unconjugated forms of the cullins. A cross-reacting band of the anti-CUL1 blot serves as loading control.

**(C)** Representative photographs of 7-d-old light-grown seedlings of the wild-type and homozygous mutant seedlings as specified in the figure. Bars = 5 mm.

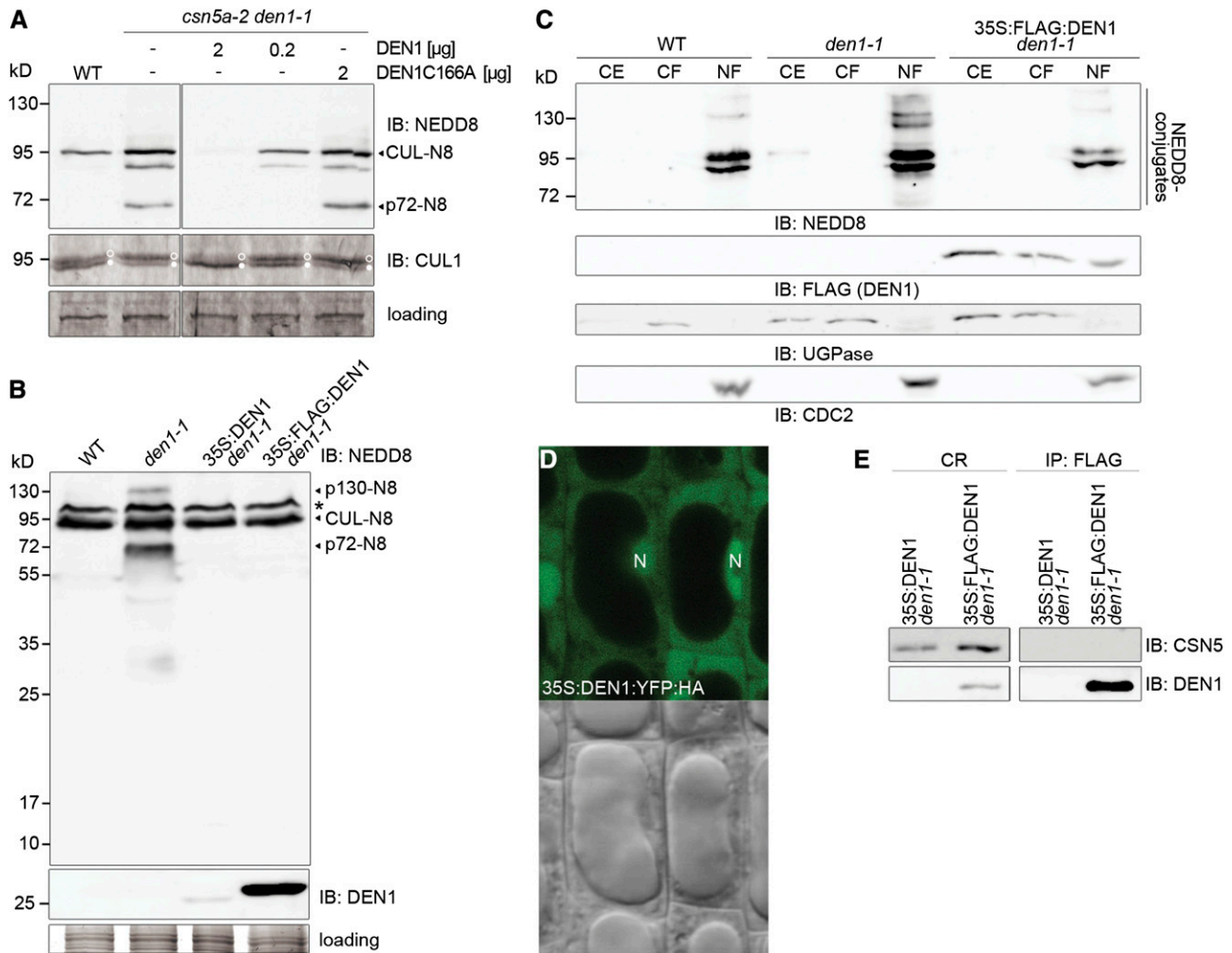
we observed that non-cullin but also cullin NEDD8 conjugates were hydrolyzed by catalytically active but not by catalytically inactive DEN1 (Figure 3A). We thus concluded that DEN1 has the ability to deconjugate cullin and non-cullin NEDD8 conjugates in vitro. Since our analyses of *den1* mutants had suggested that DEN1 cannot deconjugate cullins in planta, we introduced transgenes for the overexpression of untagged and FLAG epitope-tagged DEN1 into the *den1* mutant. In line with our previous results, the expression of DEN1 in the *den1* background did not affect cullin (de)neddylation, even when DEN1 was strongly overexpressed from the 35S:FLAG:DEN1 transgene, but did result in the disappearance of the non-cullin NEDD8 conjugates (Figure 3B). We thus confirmed our previous observations that DEN1 does not hydrolyze neddylated cullins in planta.

The differences between the in vivo and in vitro deneddylation activity of DEN1 may be explained by the differential protein localization of DEN1 and the predominantly nuclear cullins (Figures 3A and 3B) (del Pozo et al., 2002). We therefore examined the nucleo-cytoplasmic partitioning of DEN1 by differential centrifugation of total protein extracts prepared from the 35S:FLAG:DEN1 transgenic line. Here, we found that DEN1 accumulated in the cytoplasmic and in the nuclear fraction, whereas the vast majority of NEDD8 conjugates accumulated in the nuclear fraction (Figure 3C). This nucleo-cytoplasmic partitioning of the DEN1 protein was also confirmed when we examined the cellular distribution of a YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP)-tagged DEN1:YFP:HA using confocal microscopy in a stably transformed line expressing a 35S:DEN1:YFP:HA transgene (Figure 3D). Like the other transgenes used in this study, 35S:DEN1:YFP:HA fully complemented the molecular phenotype of *den1* mutants (Supplemental Figure 3). Unfortunately, the sensitivity of the anti-DEN1 antibody only allowed detection of the protein in the overexpression lines, and it can therefore not be stated with absolute certainty that the distribution of the DEN1 protein as observed in the overexpression lines correctly reflects the intracellular distribution of endogenous DEN1 in planta.

Since at least one report has so far described a physical interaction between DEN1 and CSN5 or the CSN complex (Christmann et al., 2013), we also examined a possible interaction between DEN1 and CSN5 in Arabidopsis. However, following immunoprecipitation of FLAG:DEN1 from plants, we did not detect CSN5 after probing DEN1 immunoprecipitates with a CSN5 antibody (Figure 3E). Along the same lines, our analysis of DEN1 and CSN5 distribution by size exclusion chromatography indicated that DEN1 was a predominantly monomeric protein that elutes with a profile that is distinct from that of CSN5, which elutes as a subunit of the CSN protein complex and as a CSN5 monomer (Supplemental Figure 4). From these experiments, we concluded that DEN1 may be present in the cytoplasm and in the nucleus, that it deneddylates nuclear non-cullin NEDD8 conjugates, and that it acts independently from CSN5 in vivo.

### DEN1 Can Process RUB1 in Vitro

DEN1 was originally identified as an enzyme required for NEDD8 precursor processing (Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wuetal, 2003; Shen et al., 2005; Chan et al., 2008; Shin et al., 2011). Since the processing of the Arabidopsis NEDD8 RUB precursors was not detectably affected in the *den1* mutant, we tested the enzymatic activity of DEN1 toward an artificial recombinant substrate, UB:NEDD8:His. UB:NEDD8:His encodes a His-tagged variant of the endogenous UB (ubiquitin)-NEDD8 fusion protein as found in Arabidopsis RUB1 and RUB2. Incubation with purified wild-type DEN1 but not with the catalytically inactive DEN1C166A led to the release of a cleaved protein corresponding to the C-terminally processed UB-NEDD8 (Figure 4A). This indicated that Arabidopsis DEN1, just like its mammalian counterparts, was able to process the C terminus of NEDD8 but not the C terminus of ubiquitin in vitro. We then exchanged the UB and NEDD8 moieties to generate NEDD8:UB:His to examine whether DEN1 was able to process NEDD8 also in the context of a longer C-terminal extension and, conversely, whether DEN1



**Figure 3.** DEN1 Deneddylates Nuclear Non-Cullin NEDD8 Conjugates in Planta.

**(A)** Immunoblots (IB) of total protein extracts (52  $\mu$ g) prepared from 7-d-old seedlings probed with anti-NEDD8 and anti-CULLIN1 (CUL1) antibodies. Prior to gel loading, the protein extracts were incubated with purified recombinant DEN1 or the enzymatically inactive DEN1C166A as specified in the figure. Filled and open circles indicate free CUL1 and CUL1-N8 conjugates, respectively. A cross-reacting band of the CUL1 antibody serves as loading control.

**(B)** Immunoblot analysis of crude protein (60  $\mu$ g) extracts prepared from 7-d-old seedlings. Blots were probed with antibodies against NEDD8 (N8) and DEN1. N8 conjugates are marked on the right; an asterisk indicates a background cross-reactive band unrelated to N8.

**(C)** Immunoblots of total protein extracts (CE), cytoplasm (CF), and nuclear fractions (NF) obtained from protein extracts prepared from 14-d-old seedlings. Blots were probed with anti-NEDD8, anti-flag (DEN1), anti-UGPase, and anti-CDC2 antibodies.

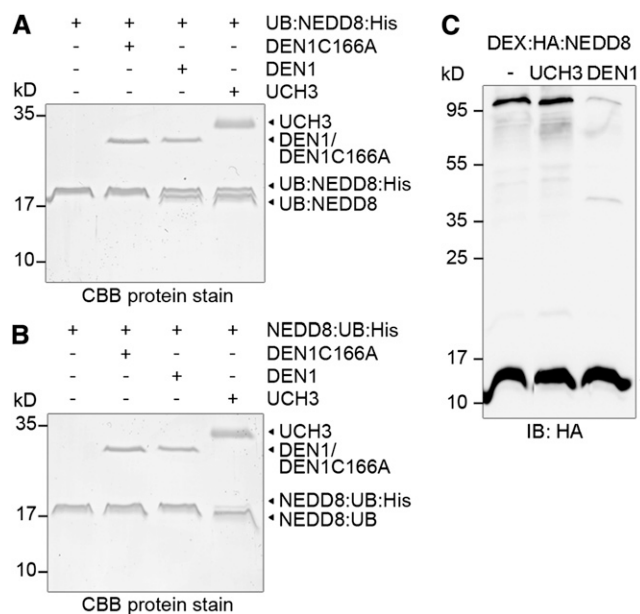
**(D)** Confocal microscopy image of root epidermis cells from 6-d-old seedlings expressing DEN1:YFP:HA.

**(E)** Immunoprecipitation (IP) of FLAG: DEN1 from 7-d-old seedlings with anti-flag agarose. Blots were probed with anti-CSN5 and anti-DEN1. CR, crude input control.

was able to process ubiquitin with a shorter C-terminal extension. However, DEN1 could neither cleave NEDD8 when present in the NEDD8:UB arrangement nor process the ubiquitin C terminus of NEDD8:UB:His, indicating that it was specific for the C-terminal processing of the NEDD8 moiety of the Arabidopsis RUB propeptides (Figure 4B).

At the same time, we also examined the processing activity of the related cysteine protease UCH3, whose counterpart from the mammalian system has a dual specificity for ubiquitin and NEDD8 processing (Wada et al., 1998; Mergner and Schwechheimer,

2014). In our experiments, UCH3 efficiently cleaved the His C terminus of UB:NEDD8:His as well as the NEDD8:UB:His substrate, indicating that Arabidopsis UCH3 also possessed, at least in vitro, a dual specificity for NEDD8 and ubiquitin C-terminal processing (Figures 4A and 4B). However, just like DEN1, UCH3 was also unable to cleave after NEDD8 or UB when these proteins represented the N-terminal moieties of the fusion proteins. To further examine the DEN1 and UCH3 enzyme activities, we incubated recombinant DEN1 and UCH3 with total protein extracts from plants expressing an N-terminally HA-tagged NEDD8, HA:



**Figure 4.** In Vitro Activity of DEN1.

**(A)** and **(B)** Processing of UB:NEDD8:His **(A)** or NEDD8:UB:His **(B)** with purified DEN1, DEN1C166A, and UCH3 and analyses by SDS-PAGE using Coomassie blue (CBB) staining. Purified enzymes and the unprocessed and processed form of UB:NEDD8:His or NEDD8:UB:His are marked by arrowheads.

**(C)** Immunoblot with anti-HA antibody of crude protein extract from 7-d-old HSN seedlings following induction with dexamethasone and incubation with purified DEN1 or UCH3. The HA:NEDD8 monomer is indicated by an arrowhead.

NEDD8, expressed from a dexamethasone-inducible vector system and examined NEDD8 conjugate abundance by immunoblotting. Already after 30 min, DEN1 had almost completely deneddylated all NEDD8 conjugates from these extracts, whereas UCH3 did not affect NEDD8 conjugate abundance (Figure 4C). Thus, whereas UCH3 can process C-terminal extensions from NEDD8 as well as ubiquitin, it is unable to process NEDD8-protein conjugates. Conversely, DEN1 is specific for the C-terminal processing of NEDD8 precursors, at least in vitro, but can also hydrolyze NEDD8 protein conjugates.

#### DEN1 Is a Ubiquitin-Modified Protein

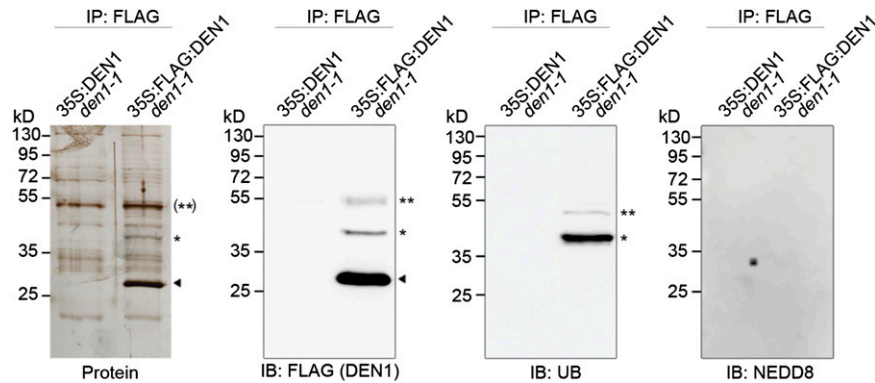
To gain an understanding of possible molecular associations of DEN1 with other proteins, we also analyzed immunoprecipitates of FLAG:DN1 by mass spectrometry. In line with our findings that DEN1 was seemingly a monomeric protein (Supplemental Figure 4), we did not detect any stoichiometric protein interactors when analyzing FLAG:DN1 immunoprecipitates (Figure 5; Supplemental Data Set 1). Interestingly, however, we obtained an indication that DEN1 was modified by either ubiquitin or NEDD8 (Supplemental Figures 5A, 5B, and 6). Since, following trypsin digestion, both modifiers, ubiquitin or NEDD8, leave an identical mass footprint corresponding to two glycines on their substrate proteins, it is not possible to distinguish between

these two modifications solely based on these mass spectrometry results. We therefore probed the FLAG:DN1 immunoprecipitates with antibodies directed against NEDD8 and ubiquitin. Whereas we did not obtain a signal with the NEDD8 antibody, we detected at least two high molecular mass forms of DEN1 with the ubiquitin antibody (Figure 5). Since the mass spectrometric analysis suggested that the ubiquitin modification resided at one of two adjacent lysine residues, Lys-217 and Lys-218, at the DEN1 C terminus (Supplemental Figures 5A and 5B), we also generated transgenic lines for the expression of DEN1 mutant variants where both lysines were replaced by arginine (Supplemental Figure 5C). Indeed, mutagenesis of these residues abolished the ubiquitylation of DEN1, suggesting that one of these two lysines or both lysine residues are ubiquitylation sites in DEN1 in planta (Supplemental Figure 5C).

We also tested whether the ubiquitin conjugation of DEN1 was required for its biochemical activity as a deneddylase and to this end examined the neddylation patterns of *den1* mutants in the absence and presence of wild-type and mutant *DEN1* transgenes. However, we found that the activity of DEN1 was not compromised by the mutation of the ubiquitylation site (Supplemental Figure 5D). Finally, since ubiquitin conjugation may target the protein for proteasomal degradation, we also examined the stability of DEN1 following treatment of plants for up to 8 h with the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide (Supplemental Figure 5E). Since the protein abundance of DEN1 was unaltered when we compared the wild type and the mutant DEN1 protein, we concluded that DEN1 ubiquitylation affected neither its deneddylase function nor its protein stability.

#### AXR1 Corresponds to the NEDD8-Modified Protein p72

In order to identify NEDD8 conjugates that accumulated in the *den1* mutant, we performed a two-step purification of a His- and StreptII-tagged NEDD8 expressed from a 2-kb *RUB1* promoter fragment. Samples were analyzed by mass spectrometry after the first native purification step using the StreptII-tag and after a second denaturing purification step using the His-tag (Supplemental Figure 7 and Supplemental Data Set 2). One of the proteins that attracted our attention was the AXR1 subunit of the NAE. AXR1 was strongly enriched after both purification steps, and AXR1 was thereby distinguishable from its interaction partner ECR1, which was only enriched after the first nondenaturing purification step (Figure 6A). We took this as an indication that AXR1 itself might be a neddylated protein and introduced the *axr1* mutant and a previously published AXR1<sub>pro</sub>:10myc:AXR1 (myc:AXR1) transgene into the *den1* mutant background (Hotton et al., 2011). When we analyzed NEDD8 conjugate formation in the *den1 axr1* background, we detected a decrease in the intensity of the p72 band specific for *den1* in line with the hypothesis that p72 corresponded to a NEDD8-modified form of AXR1 (Figure 6C). Although the p72 band was not completely abolished in the *den1 axr1* mutant, we reasoned that AXL, the functional ortholog of AXR1, might be responsible for the residual staining at the molecular mass corresponding of p72. In further support of AXR1 being a NEDD8-modified protein in *den1* mutants, we detected a novel high molecular mass form of AXR1 that was present in the *den1* mutant but not in the wild-type background when probing



**Figure 5.** DEN1 Is Ubiquitinated.

Immunoprecipitation of FLAG: DEN1 from 7-d-old 35S: DEN1 and 35S: FLAG: DEN1 seedlings with anti-flag agarose. Left panel, silver stain of total protein. The three blots on the right were probed with anti-flag, anti-ubiquitin, and anti-NEDD8 antibodies. Triangles indicate FLAG: DEN1, and asterisks indicate FLAG: DEN1 carrying mono- and diubiquitin modification. In the silver-stained gel (left panel), the diubiquitin-modified DEN1 is obscured by a background band and can therefore only be presumed at the indicated position based on its migration in the immunoblot. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblot.

extracts of *myc:AXR1* plants with an anti-*myc* antibody (Figures 6B and 6C). Since this putatively neddylated form of *myc:AXR1* comigrated with the neddylated forms of the cullins, we could not confirm the neddylation of *myc:AXR1* using the NEDD8 antibody (Figure 6B). Instead, we tested the sensitivity of this protein to deneddylation by recombinant DEN1 and confirmed in this way the accumulation of *myc:AXR1* as a neddylated protein in *den1* mutants (Figure 6C). We also tested using immunoprecipitations of *myc:AXR1* from *axr1-30* mutant seedlings complemented with the *myc:AXR1* transgene whether neddylated AXR1 was also detectable in the absence of the *den1* mutation. Indeed, we were able to readily detect neddylated AXR1 from this background, indicating that AXR1 neddylation is a common posttranslational modification of this NAE protein (Figure 6D). We thus concluded that p72 corresponds to neddylated AXR1, and possibly also to a neddylated form of the closely related AXL, that AXR1 is neddylated in planta also in the presence of DEN1, and that DEN1 is required for the removal of this posttranslational AXR1 modification. Unfortunately, the mass spectrometric results did not reveal a good candidate for the second strongly accumulated neddylated protein in *den1* mutants, p130, and neither could we gain insights from this analysis into the identity of the NEDD8-conjugated lysine in AXR1 (Supplemental Data Set 2).

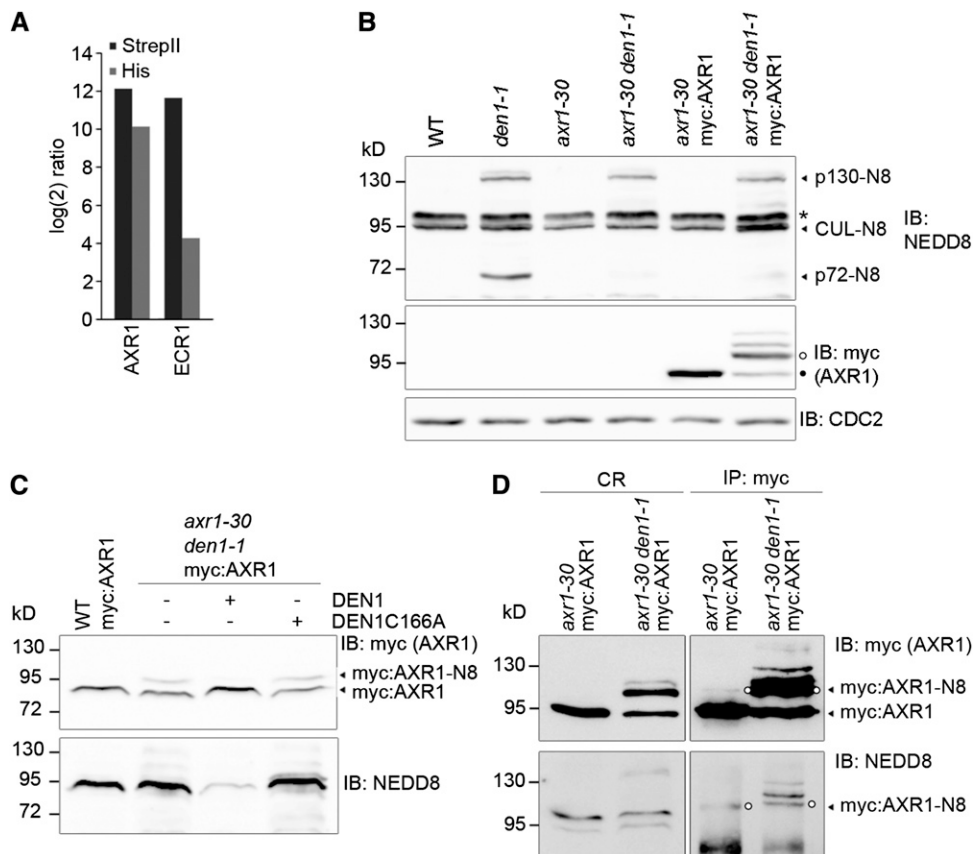
#### Neddylated AXR1 May Be Functionally Impaired in *den1* Mutants

Auxin insensitive root growth is a hallmark phenotype of *axr1* mutants (Lincoln et al., 1990). Since AXR1 was neddylated in *den1* mutants, we wanted to examine whether AXR1 neddylation had an influence on the auxin sensitivity in roots of *den1* mutants as readout for AXR1 functionality. Whereas we did not detect significant differences in the response to root growth inhibitory concentrations of the synthetic auxin 2,4-D when comparing the wild type and the *den1* mutant, we found that *den1* mutant roots were less sensitive to 2,4-D than the wild type when the seedlings were treated with the neddylation inhibitor MLN4924 (Figures 7A

and 7B). MLN4924 inhibits ECR1, which forms the NEDD8 E1 together with AXR1. Consequently, MLN4924 treatments lead to a misregulation of cullin neddylation and, thus, the slight but statistically significant increase in 2,4-D insensitivity as observed in the MLN4924-treated *den1* mutant. This finding would thus be in line with a further reduction in E1 activity in addition to the partial impairment of E1 function through AXR1 neddylation in *den1*. A further indication for an impairment of AXR1 function in the *den1* mutant background came from our observation that *den1 axr1* double mutants expressing *myc:AXR1* were less sensitive to 2,4-D than the *axr1* single mutant expressing *myc:AXR1* (Figures 7C and 7D). Since it had previously been noted that this particular *myc:AXR1* transgene cannot fully complement the *axr1* mutant defect (Hotton et al., 2011), expression of *myc:AXR1* may be seen as a sensitized mutant background for such analyses. In summary, our data provide evidence for a partial impairment of E1 function in the *den1* mutants due to the accumulation of neddylated AXR1.

#### DISCUSSION

We genetically and biochemically analyzed DEN1 from Arabidopsis. The founding members of the DEN1 protein family were originally described as enzymes specific for the processing of NEDD8 precursors in mammalian systems, and subsequent studies had implicated DEN1 from animals, yeasts, and fungi also in the deneddylation of, e.g., cullins as bona fide NEDD8-conjugated proteins (Gan-Erdene et al., 2003; Wu et al., 2003; Reverter et al., 2005; Christmann et al., 2013). Our analysis of Arabidopsis DEN1 revealed that DEN1, although capable of processing the Arabidopsis NEDD8 precursors in vitro, is not solely responsible for precursor processing in planta since *den1* loss-of-function mutants do not have any detectable defects in processing the Arabidopsis RUB precursors. This is in agreement with observations from other non-plant systems where the loss of any hitherto described NEDD8 processing enzyme including the NEDD8-specific enzyme DEN1 but also hydrolases with dual specificity for NEDD8 and ubiquitin



**Figure 6.** AXR1 Is a Neddylated Protein.

**(A)** Graph of the  $\log_2$  ratio of relative (sample/control) raw abundance of peptides for AXR1 and ECR1 after mass spectrometric analysis following two consecutive purification steps using nondenaturing (StrepII) and denaturing (His) conditions to purify His:StrepII:NEDD8 conjugates.

**(B)** Immunoblots (IB) of crude protein extracts from 7-d-old seedlings probed with anti-NEDD8, anti-myc, and anti-CDC2 antibodies. Filled and open circles mark the position of the unmodified and modified form of myc:AXR1 in the anti-myc blot.

**(C)** Immunoblots with anti-myc and anti-NEDD8 antibodies of crude protein extracts from 7-d-old *axr1-30 den1-1* myc:AXR1 seedlings incubated with purified DEN1 or DEN1C166A. Crude protein extract from myc:AXR1 expressed in the wild-type background serves as a negative control. The arrowheads indicate free myc:AXR1 and myc:AXR1-NEDD8 conjugates, respectively.

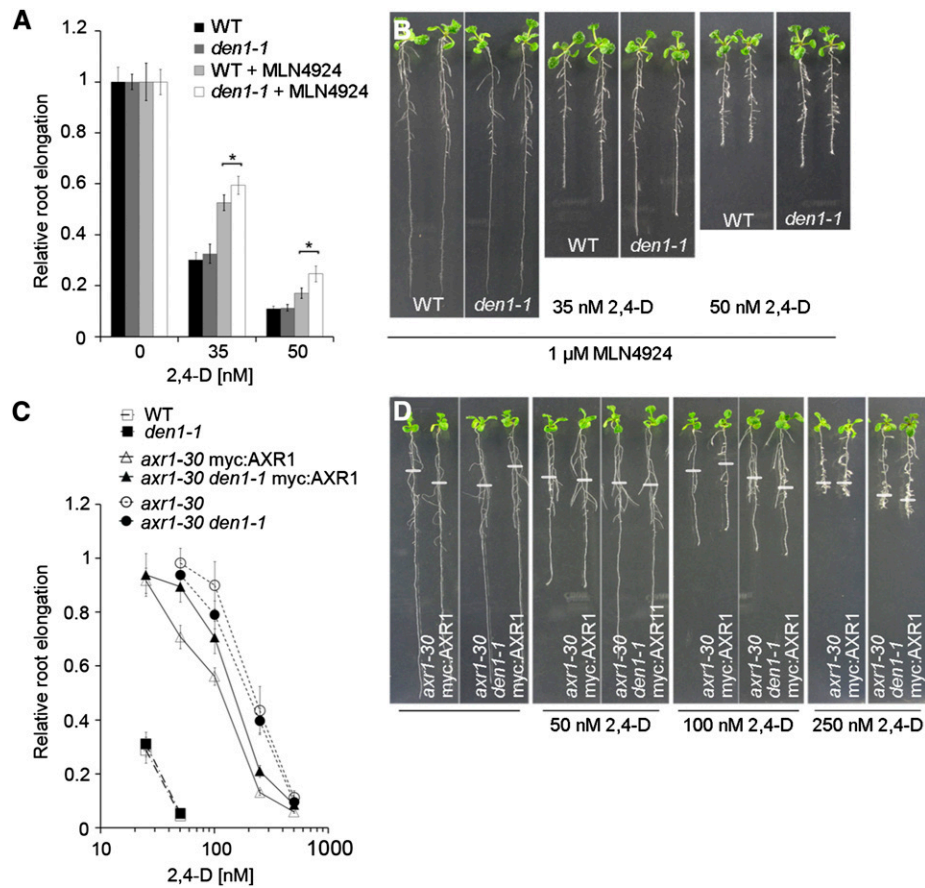
**(D)** Immunoblots of crude extracts (CR) and immunoprecipitations (IP) with anti-myc probed with anti-myc and anti-NEDD8 from the genotypes indicated in the figure. The position of myc:AXR1-N8 is indicated by open circles.

does not lead to biochemically detectable processing defects or developmental defects indicative for defects in NEDD8 precursor processing (Mergner and Schwechheimer, 2014; Enchev et al., 2015). Besides DEN1, the Arabidopsis genome encodes three further candidate NEDD8 processing enzymes that have also an additional predicted or tested specificity for ubiquitin processing, UCH1, UCH2, and UCH3 (Mergner and Schwechheimer, 2014). Previous work had shown that the defects in the related *UCH1* and *UCH2* genes would not lead to biochemically discernable ubiquitin-processing defects, again arguing for a functional redundancy among the different processing enzymes (Yang et al., 2007). Here, we show that UCH3 has the predicted dual ubiquitin- and NEDD8-processing activity when tested in vitro and we thus propose that DEN1, UCH3, and possibly also UCH1 and UCH2, which we and others have been unable to recover as biochemically active recombinant proteins when purified from bacteria (Yang et al., 2007),

act in a functionally redundant manner in NEDD8 precursor processing.

Our data show that DEN1 is essential for the deconjugation of NEDD8 from a broad range of neddylated proteins that accumulate in the Arabidopsis *den1* mutants. Previous studies on DEN1 had indicated that this protein may also deneddylate cullins (Wu et al., 2003; Christmann et al., 2013). In contrast, our *den1* mutant and DEN1 protein analysis reveal that DEN1, although possessing cullin deneddylating activity in vitro, is not required for cullin deneddylation in planta, also not in the absence of the cullin deneddylating CSN subunit CSN5. The differential substrate range of the deneddylating subunit CSN5 of CSN and DEN1 had previously been attributed to the inaccessibility of the cullin NEDD8 modification in the CRL E3 ligases (Reverter et al., 2005; Duda et al., 2008). A similar argument may also be used to explain the differences between the in vitro and in vivo activities of Arabidopsis DEN1, under





**Figure 7.** AXR1 Neddylation Impairs 2,4-D-Responsive Growth.

(A) and (B) Quantitative analysis of root growth of 5-d-old wild-type seedlings and *den1-1* mutants transferred from unsupplemented GM to GM containing MLN4924 and 2,4-D for an additional 5 d.

(A) The relative root elongation was measured using ImageJ and normalized to the growth of the untreated roots. Average and SE are shown ( $n \geq 12$ ), and asterisks indicate a significant difference (Student's *t* test).

(B) Representative photographs of 10-d-old wild-type and *den1-1* seedlings.

(C) and (D) Root growth assay with wild-type, *den1-1*, and different *axr1* mutant lines. Five-day-old GM-grown seedlings were transferred to GM containing 2,4-D (25, 50, 100, 250, and 500 nM) for 5 d.

(C) Root length was measured using ImageJ and is shown as relative to the growth of the untreated roots. Average and SE values are shown ( $n \geq 10$ ).

(D) Representative photographs of 10-d-old seedlings transferred to media containing 50, 100, and 250 nM, respectively.

the premise that CRLs become instable and consequently neddylation accessible to DEN1 in the protein extracts prepared for the respective deneddylation experiments.

Regardless of the functional interplay between DEN1 and CSN5, which may be different between *Arabidopsis*, where we did not detect an interaction, and *Aspergillus nidulans* or mammalian cells, where such an interaction had been reported (Christmann et al., 2013), our data clearly indicate the presence of NEDD8-modified proteins other than cullins in planta. Although previous reports about a nonspecificity of the NEDD8 and ubiquitin conjugation machineries in certain experimental conditions had put into question the existence of non-cullin NEDD8 conjugates, our observation of an accumulation of such non-cullin NEDD8 conjugates in the *den1* mutant clearly proves their existence. In that regard, our observation is comparable to similar observations with *den1* mutants from *A. nidulans* and *Drosophila* where NEDD8 conjugate

accumulations had also been reported but have remained biochemically unexplored (Chan et al., 2008; Christmann et al., 2013). Taken together, these observations clearly demonstrate that protein neddylation is a common posttranslational modification of many substrate proteins in the respective organisms.

Furthermore, our results identify AXR1 as a novel NEDD8-modified protein that can be detected in this posttranslationally modified form in a genotype comparable to the wild type (an *axr1* mutant complemented with an myc:AXR1 transgene under control of the *AXR1* promoter), and this form accumulates in the *den1* mutant. Our observation that AXR1 in the absence of the deneddylation activity of DEN1 seems partially impaired in protein function suggests that AXR1 neddylation serves to negatively control protein activity and thus indicates that also other as yet unidentified neddylation proteins may be regulated by NEDD8 modification in plants.

The uncertainty about the biological validity of previously reported protein neddylation events as a consequence of the above mentioned risk of them being an artifact of specific biochemical conditions has recently resulted in the compilation of a set of criteria that must be fulfilled for a given protein to be considered a bona fide NEDD8-modified protein (Enchev et al., 2015). According to these criteria, the neddylation target should be conjugated via a C-terminal glycine residue to its protein target. The DEN1 sensitivity of the NEDD8 modification of AXR1 and the stability of the modification under reducing conditions indirectly demonstrate that AXR1 is modified in this manner. Second, genuine NEDD8-modified proteins should be detectable as such under homeostatic conditions in the presence of normal NEDD8 and substrate protein availability. Since we can detect AXR1 in its neddylation form from *axr1-30 myc:AXR1* where *myc:AXR1* is expressed from the *AXR1* promoter, we also see this criterion as being fulfilled. Third, neddylation should be sensitive to treatments with the NAE inhibitor MLN4924, and in agreement with this, we found AXR1 neddylation to be reduced after MLN4924 treatment. Additionally, we suggest that AXR1 neddylation impairs NAE function as concluded from genetic and physiological analyses, and thereby we fulfill the further criterion that protein neddylation has a consequence for the function of the neddylation target. In conclusion, we judge that AXR1 is a bona fide NEDD8-modified protein from Arabidopsis. Future research will have to elucidate the identity and control of further NEDD8 conjugates, on the one side, and the mechanisms and signals that control neddylation and its substrate specificity, on the other.

## METHODS

### Biological Material

All experiments were performed in the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *den1-1* (GK381A12) and *den1-2* (SAIL\_588\_H02) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre and selected for homozygosity by PCR-based genotyping. Other previously reported mutant lines were *csn5a-1* (SALK\_063436), *csn5a-2* (SALK\_027705), *csn5b-1* (SALK\_077134), and *axr1-30* (SAIL\_904\_E06). *den1-1* was crossed into the *csn5a-2*, *csn5a-1 csn5b* double mutant, and *myc:AXR1 axr1-30* mutant background, and homozygous double and triple mutants were identified by PCR-based genotyping. Primer sequences for genotyping are listed in Supplemental Table 1. The transgenic AXR1<sub>pro</sub>:myc:AXR1 (*myc:AXR1*) line was generously provided by Judy Callis (University of California, Davis, CA). The transgenic line for the dexamethasone-inducible expression of HA:STREP:NEDD8 was previously described (Hakenjos et al., 2011).

### Cloning Procedures

To generate the *DEN1* overexpression constructs 35S:FLAG:DEN1, 35S:DEN1, and 35S:DEN1:YFP:HA, the *DEN1* coding region was PCR amplified from cDNA with primers 14 and 15 or 14 and 16 and cloned using Gateway technology (Invitrogen) into pEarleyGate202 and pEarleyGate101, respectively. Mutagenesis for DEN1K217218R was performed using a nested PCR reaction with the primers 14 and 17 as well as 14 and 15 and subsequent cloning of the fragment into pEarleyGate202. These transgenes were introduced into the *den1-1* mutant by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated floral dip method (Clough and Bent, 1998).

To generate GST-tagged versions of DEN1 and UCH3, the respective open reading frames were PCR amplified from cDNA using primer pairs with additional *Bam*HI (*DEN1*) or *Eco*RI (*UCH3*) restriction sites before and

*Not*I restriction sites after the translational start and stop codons, respectively. After digestion, the PCR fragments were ligated into the pGEX6p-1 vector (GE Healthcare). Mutagenesis of GST:DEN1 to obtain GST:DEN1C166A was performed using *Dpn*I digestion-based site-directed mutagenesis with the primers 22 and 23. UB:NEDD8:His was obtained by generating a PCR fragment of AtRUB1 from Arabidopsis cDNA with primers 24 and 25 and ligating the PCR fragment into pET21a (Novagen). The NEDD8:UB:His construct was obtained by overlap extension PCR with the primers 26 to 29, and the fusion product was cloned into pET21a. To generate a NEDD8 construct with an N-terminal His:StrepII tag expressed under control of the *AtRUB1* promoter, RUB1<sub>pro</sub>:His:StrepII:NEDD8, we first used primers 30 and 31 to substitute the HA-tag by a His-tag in the previously described HSN construct (Hakenjos et al., 2011). The construct was subcloned into pTA7002 (Aoyama and Chua, 1997). To obtain the *RUB1* promoter sequence, we used the primers 32 and 33 to amplify a 2-kb region upstream of the start codon of Arabidopsis *RUB1* using genomic DNA as a template. The fragments were digested with restriction enzymes and cloned into pGreen0179 (Hellens et al., 2000). Primer sequences are listed in Supplemental Table 1.

### Chemical Treatments

To examine the effect of MLN4924 (Millenium Pharmaceuticals) on protein neddylation, wild-type and mutant seeds were grown for 4 d on standard growth medium (GM) and then transferred to GM containing 10 μM MLN4924 for additional 4 d. For the induction of HSN expression, HSN transgenic seedlings were grown on GM for 7 d and then incubated in liquid GM supplemented with 30 mM dexamethasone for 16 h. For 2,4-D response assays, seedlings were grown 5 d on GM and subsequently transferred to MLN4924- and 2,4-D-containing media for 5 d.

### Immunobiological Analyses and Size Exclusion Chromatography

For immunoblots and gel filtration analysis, total protein extracts were prepared from 7-d-old Arabidopsis seedlings in protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5 μM *N*-ethylmaleimide, and plant protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]) or buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5 μM *N*-ethylmaleimide, and protease inhibitor cocktail). Subcellular fractionation was performed as previously published (Folta and Kaufman, 2006). Immunoblots were performed according to standard protocols. The following antibodies were used for protein detection: anti-NEDD8 (1:1000; Hakenjos et al., 2011), anti-CULLIN1 (1:1000; Schwechheimer et al., 2002), anti-CULLIN4 (1:1000; Dohmann et al., 2005), anti-CSN5 (1:1000; Kwok et al., 1998), anti-CDC2 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology), anti-HA-peroxidase (1:1000; Roche), anti-flag (1:2000; Sigma-Aldrich), anti-c-Myc (1:3000; Sigma-Aldrich), anti-RGA (1:1000; Willige et al., 2007), anti-UGPase (1:2500; Agrisera), and anti-Ubiquitin P4D1 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology). The anti-DEN1 (1:1000) antibody was raised in rabbits against purified recombinant full-length DEN1 at Eurogentec. Anti-flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and anti-c-Myc agarose (Sigma-Aldrich) were used for immunoprecipitations using protein extracts prepared from 0.5 mg (fresh weight) 7-d-old seedlings. Size exclusion chromatography of 1 mg of total plant protein extract was performed using a Superose 6 column (GE Healthcare) as described previously (Schwechheimer et al., 2002).

### Mass Spectrometry

For mass spectrometry, proteins were purified from 10 g of 7-d-old RUB1<sub>pro</sub>:His:StrepII:NEDD8 seedlings using a StrepTactin affinity column (Sigma-Aldrich) as described previously (Hakenjos et al., 2011). Part of the sample (sample I) was supplemented with Laemmli buffer and boiled for 5 min. The other part (sample II) was subjected to a second purification step under denaturing conditions using the Ni-NTA system (Thermo Scientific) as described previously (Miller et al., 2010). For tryptic digestions,

samples I and II were reduced and alkylated by 50 mM DTT and 10 mg/mL chloroacetamide, respectively. Tryptic in-gel digestion was performed according to standard procedures. Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry was performed by coupling an Eksigent nanoLC-Ultra 1D+ (Eksigent) to a LTQ-Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). Peptides were delivered to a trap column (100  $\mu\text{m}$   $\times$  2 cm, packed in house with Reprosil-Pur C<sub>18</sub>-AQ 5  $\mu\text{m}$  resin; Dr. Maisch) at a flow rate of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  in 100% solvent A (0.1% formic acid in HPLC-grade water). After 10 min of loading and washing, peptides were transferred to an analytical column (75  $\mu\text{m}$   $\times$  40 cm, packed in house with Reprosil-Pur C<sub>18</sub>-GOLD, 3  $\mu\text{m}$  resin; Dr. Maisch) and separated using a 225-min gradient from 4 to 32% of solvent B (0.1% formic acid and 5% DMSO in acetonitrile; solvent A: 0.1% formic acid and 5% DMSO in water) at 300 nL/min flow rate. The LTQ Orbitrap XL was operated in data-dependent mode, automatically switching between MS and MS2. Full-scan mass spectra were acquired in the Orbitrap at 60,000 ( $m/z$  400) resolution after accumulation to a target value of 1,000,000. Tandem mass spectra were generated for up to eight peptide precursors in the linear ion trap using collision-induced dissociation at a normalized collision energy of 35% after accumulation to a target value of 5000 for max 100 ms. Intensity-based label-free quantification was performed using Progenesis (version 4.2; Nonlinear Dynamics). The generated peak list was then searched using Mascot (version 2.4.1) against the NCBI protein sequence databases (download October 26, 2011, 15.8 Mio sequences) and SwissProt (version 57, 0.5 Mio sequences) for protein identification. The variable modification of K (GlyGly) was considered in the database search in order to identify NEDD8- or ubiquitin-modified peptides.

### Enzyme Activity Assay

Processing of UB:NEDD8:His and NEDD8:UB:His was performed with DEN1, DEN1C166A, and UCH3 proteins that were cleaved from the purified GST fusion proteins using PreScission Protease (GE Healthcare). Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) and Talon Metal Affinity resin (Clontech) were used for protein purification from *Escherichia coli* [rosetta (DE3)pLysS]. For processing reactions, 0.2  $\mu\text{g}$  UB:NEDD8:His or NEDD8:UB:His was incubated with 0.2  $\mu\text{g}$  purified DEN1, DEN1C166A, or UCH3 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 10 mM DTT at 20°C for 60 min. The deconjugation assay was performed with protein extract from 7-d-old HSN seedlings containing 15  $\mu\text{g}$  total protein incubated with 0.5  $\mu\text{g}$  purified DEN1 or UCH3 in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8, 5% glycerol, and 10 mM DTT at 20°C for 30 min. For the in vitro deneddylation assays, crude protein extracts from 7-d-old seedlings containing 350  $\mu\text{g}$  (cullin deneddylation) and 500  $\mu\text{g}$  (myc:AXR1 deneddylation) total protein were incubated with 0.2 or 2  $\mu\text{g}$  purified DEN1 or DEN1C166A in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.5% Triton X-100 at 20°C for 25 min.

### Phylogenetic Analysis

Protein sequences for DEN1 orthologous proteins from human (NEDP1, ENSG00000166192) and *Drosophila melanogaster* (Den1; FBgn0033716) were retrieved from the ensemble genome browser database (<http://www.ensembl.org>). Alignments were generated using the ClustalW software (BLOSUM, gap open penalty 10 and gap extension penalty 0.1).

### Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: *RUB1* (AT1G31340), *AXR1* (AT1G05180), *CSN5A* (AT1G22920), *CSN5B* (AT1G71230), *CULLIN1* (AT4G02570), *CULLIN4* (AT5G46210), *UCH3* (AT4G17510), and *DEN1* (AT5G60190). GenBank accession numbers of human and fruitfly genes mentioned in this work are *NEDD8* (NP\_006147), *NEDP1* (AAG21828), and *Den1* (NM\_136919).

### Supplemental Data

**Supplemental Figure 1.** DEN1 alignment.

**Supplemental Figure 2.** *den1-1* and *den1-2* have indistinguishable molecular phenotypes.

**Supplemental Figure 3.** 35S:DEN1:YFP:HA complements the *den1-1* phenotype.

**Supplemental Figure 4.** FLAG:DEN1 elutes largely as a monomer after gel filtration.

**Supplemental Figure 5.** DEN1 is a ubiquitin-modified but stable protein.

**Supplemental Figure 6.** Result of the mass spectrometric analysis of DEN1.

**Supplemental Figure 7.** Two-step purification of neddylated proteins.

**Supplemental Table 1.** List of primers used in this study.

**Supplemental Data Set 1.** Results of the mass spectrometric analysis following DEN1 immunoprecipitation.

**Supplemental Data Set 2.** Results of the mass spectrometric analysis following two-step purification of neddylated proteins.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pascal Genschik (Strasbourg, France) and Judy Callis (University of California, Davis, CA) for providing the anti-CUL4 antibody and the myc:AXR1 transgenic line, respectively. We also thank Johannes Weigl and Christine Plenge for generating GST:DEN1C166A and GST:UCH3 as part of their Bachelor's theses. This work is supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to Claus Schwechheimer (SCHW751/11-1) as part of the Schwerpunktprogramm SPP1365 "Ubiquitin family proteins."

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.M., B.K., and C.S. designed the experiments. J.M. performed all experiments apart from mass spectrometry. S.H. performed mass spectrometry. S.H., J.M., and B.K. analyzed the mass spectrometric data. J.M. and C.S. wrote the article.

Received December 31, 2014; revised February 5, 2015; accepted February 26, 2015; published March 17, 2015.

### REFERENCES

- Aoyama, T., and Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**: 605–612.
- Bostick, M., Lochhead, S.R., Honda, A., Palmer, S., and Callis, J. (2004). Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2418–2432.
- Brownell, J.E., et al. (2010). Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol. Cell* **37**: 102–111.
- Chan, Y., Yoon, J., Wu, J.T., Kim, H.J., Pan, K.T., Yim, J., and Chien, C.T. (2008). DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo. *J. Cell Sci.* **121**: 3218–3223.
- Christmann, M., Schmalzer, T., Gordon, C., Huang, X., Bayram, O., Schinke, J., Stumpf, S., Dubiel, W., and Braus, G.H. (2013). Control of



- multicellular development by the physically interacting deneddylases DEN1/DenA and COP9 signalosome. *PLoS Genet.* **9**: e1003275.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Colby, T., Matthäi, A., Boeckelmann, A., and Stuible, H.P.** (2006). SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**: 318–332.
- del Pozo, J.C., and Estelle, M.** (1999). The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 15342–15347.
- del Pozo, J.C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W.M., and Estelle, M.** (2002). AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**: 421–433.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Karunarathna, N., Jurgens, G., and Estelle, M.** (2007). AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **52**: 114–123.
- Dohmann, E.M., Kuhnle, C., and Schwechheimer, C.** (2005). Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the *cop/det/fus* mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 1967–1978.
- Duda, D.M., Borg, L.A., Scott, D.C., Hunt, H.W., Hammel, M., and Schulman, B.A.** (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**: 995–1006.
- Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M.** (2015). Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 30–44.
- Folta, K.M., and Kaufman, L.S.** (2006). Isolation of *Arabidopsis* nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays. *Nat. Protoc.* **1**: 3094–3100.
- Frickel, E.M., Quesada, V., Muething, L., Gubbels, M.J., Spooner, E., Ploegh, H., and Artavanis-Tsakonas, K.** (2007). Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution. *Cell. Microbiol.* **9**: 1601–1610.
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z.Q., and Wilkinson, K.D.** (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J. Biol. Chem.* **278**: 28892–28900.
- Gray, W.M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2002). Role of the *Arabidopsis* RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* **14**: 2137–2144.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276.
- Gusmaroli, G., Feng, S., and Deng, X.W.** (2004). The *Arabidopsis* CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. *Plant Cell* **16**: 2984–3001.
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino, G., and Deng, X.W.** (2007). Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with *Arabidopsis* Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell* **19**: 564–581.
- Hakenjos, J.P., Bejai, S., Ranftl, Q., Behringer, C., Vlot, A.C., Absmanner, B., Hammes, U., Heinzlmeir, S., Kuster, B., and Schwechheimer, C.** (2013). ML3 is a NEDD8- and ubiquitin-modified protein. *Plant Physiol.* **163**: 135–149.
- Hakenjos, J.P., Richter, R., Dohmann, E.M., Katsiarimpa, A., Isono, E., and Schwechheimer, C.** (2011). MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol.* **156**: 527–536.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819–832.
- Hemelaar, J., Borodovsky, A., Kessler, B.M., Reverter, D., Cook, J., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K.D., Gill, G., Lima, C.D., Ploegh, H.L., and Ovaa, H.** (2004). Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 84–95.
- Hjerpe, R., Thomas, Y., and Kurz, T.** (2012a). NEDD8 overexpression results in neddylation of ubiquitin substrates by the ubiquitin pathway. *J. Mol. Biol.* **421**: 27–29.
- Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., Dick, L.R., and Kurz, T.** (2012b). Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem. J.* **441**: 927–936.
- Hochstrasser, M.** (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**: 422–429.
- Hotton, S.K., Castro, M.F., Eigenheer, R.A., and Callis, J.** (2012). Recovery of DDB1a (damaged DNA binding protein1a) in a screen to identify novel RUB-modified proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **5**: 1163–1166.
- Hotton, S.K., Eigenheer, R.A., Castro, M.F., Bostick, M., and Callis, J.** (2011). AXR1-ECR1 and AXL1-ECR1 heterodimeric RUB-activating enzymes diverge in function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **75**: 515–526.
- Huang, D.T., Zhuang, M., Ayraut, O., and Schulman, B.A.** (2008). Identification of conjugation specificity determinants unmasks vestigial preference for ubiquitin within the NEDD8 E2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 280–287.
- Johnston, S.C., Riddle, S.M., Cohen, R.E., and Hill, C.P.** (1999). Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J.* **18**: 3877–3887.
- Kim, D.Y., Scalf, M., Smith, L.M., and Vierstra, R.D.** (2013). Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1523–1540.
- Kurz, T., Chou, Y.C., Willems, A.R., Meyer-Schaller, N., Hecht, M.L., Tyers, M., Peter, M., and Sicheri, F.** (2008). Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation. *Mol. Cell* **29**: 23–35.
- Kwok, S.F., Solano, R., Tsuge, T., Chamovitz, D.A., Ecker, J.R., Matsui, M., and Deng, X.W.** (1998). *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations. *Plant Cell* **10**: 1779–1790.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M.** (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161–164.
- Lincoln, C., Britton, J.H., and Estelle, M.** (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071–1080.
- Lingaraju, G.M., Bunker, R.D., Cavadini, S., Hess, D., Hassiepen, U., Renatus, M., Fischer, E.S., and Thomä, N.H.** (2014). Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature* **512**: 161–165.
- Linghu, B., Callis, J., and Goebel, M.G.** (2002). Rub1p processing by Yuh1p is required for wild-type levels of Rub1p conjugation to Cdc53p. *Eukaryot. Cell* **1**: 491–494.
- Mendoza, H.M., Shen, L.N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B., and Hay, R.T.** (2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J. Biol. Chem.* **278**: 25637–25643.
- Mergner, J., and Schwechheimer, C.** (2014). The NEDD8 modification pathway in plants. *Front. Plant Sci.* **5**: 103.
- Miller, M.J., and Vierstra, R.D.** (2011). Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**: 130–133.
- Miller, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Hua, Z., and Vierstra, R.D.** (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 16512–16517.

- Pozo, J.C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J., and Estelle, M.** (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science* **280**: 1760–1763.
- Rao-Naik, C., delaCruz, W., Laplaza, J.M., Tan, S., Callis, J., and Fisher, A.J.** (1998). The rub family of ubiquitin-like proteins. Crystal structure of Arabidopsis rub1 and expression of multiple rubs in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **273**: 34976–34982.
- Reverter, D., Wu, K., Erdene, T.G., Pan, Z.Q., Wilkinson, K.D., and Lima, C.D.** (2005). Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1. *J. Mol. Biol.* **345**: 141–151.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**: 247–259.
- Schwechheimer, C., and Isono, E.** (2010). The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur. J. Cell Biol.* **89**: 157–162.
- Schwechheimer, C., Serino, G., and Deng, X.W.** (2002). Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *Plant Cell* **14**: 2553–2563.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., and Deng, X.W.** (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**: 1379–1382.
- Sessions, A., et al.** (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–2994.
- Shen, L.N., Liu, H., Dong, C., Xirodimas, D., Naismith, J.H., and Hay, R.T.** (2005). Structural basis of NEDD8 ubiquitin discrimination by the deNEDDylating enzyme NEDP1. *EMBO J.* **24**: 1341–1351.
- Shin, Y.C., Tang, S.J., Chen, J.H., Liao, P.H., and Chang, S.C.** (2011). The molecular determinants of NEDD8 specific recognition by human SENP8. *PLoS ONE* **6**: e27742.
- Vierstra, R.D.** (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol.* **160**: 2–14.
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L.S., Yeh, E.T., and Kamitani, T.** (1998). Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**: 688–692.
- Wei, N., Serino, G., and Deng, X.W.** (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem. Sci.* **33**: 592–600.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1209–1220.
- Woodward, A.W., Ratzel, S.E., Woodward, E.E., Shamo, Y., and Bartel, B.** (2007). Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol.* **144**: 976–987.
- Wu, K., Yamoah, K., Dolios, G., Gan-Erdene, T., Tan, P., Chen, A., Lee, C.G., Wei, N., Wilkinson, K.D., Wang, R., and Pan, Z.Q.** (2003). DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J. Biol. Chem.* **278**: 28882–28891.
- Xirodimas, D.P.** (2008). Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 802–806.
- Yang, P., Smalle, J., Lee, S., Yan, N., Emborg, T.J., and Vierstra, R. D.** (2007). Ubiquitin C-terminal hydrolases 1 and 2 affect shoot architecture in Arabidopsis. *Plant J.* **51**: 441–457.
- Yu, H.A., Kim, S.G., Kim, E.J., Lee, W.J., Kim, D.O., Park, K., Park, Y.C., and Seo, J.H.** (2007). Characterization of ubiquitin C-terminal hydrolase 1 (YUH1) from *Saccharomyces cerevisiae* expressed in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **56**: 20–26.

**DENEDDYLEASE1 Deconjugates NEDD8 from Non-Cullin Protein Substrates in *Arabidopsis thaliana***

Julia Mergner, Stephanie Heinzlmeir, Bernhard Kuster and Claus Schwechheimer  
*Plant Cell*; originally published online March 17, 2015;  
DOI 10.1105/tpc.114.135996

This information is current as of March 23, 2015

<b>Supplemental Data</b>	<a href="http://www.plantcell.org/content/suppl/2015/03/10/tpc.114.135996.DC1.html">http://www.plantcell.org/content/suppl/2015/03/10/tpc.114.135996.DC1.html</a>
<b>Permissions</b>	<a href="https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&amp;issn=1532298X&amp;WT.mc_id=pd_hw1532298X">https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&amp;issn=1532298X&amp;WT.mc_id=pd_hw1532298X</a>
<b>eTOCs</b>	Sign up for eTOCs at: <a href="http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain">http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain</a>
<b>CiteTrack Alerts</b>	Sign up for CiteTrack Alerts at: <a href="http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain">http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain</a>
<b>Subscription Information</b>	Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at: <a href="http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm">http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm</a>