



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Probing proteasome activity and function : cancer diagnostics and mechanism of antigen processing

Berkers, C.R.

Citation

Berkers, C. R. (2010, October 5). *Probing proteasome activity and function : cancer diagnostics and mechanism of antigen processing*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16011>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16011>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Nederlandse samenvatting

Proteasoom activiteit in de breedste zin van het woord is het onderwerp van dit proefschrift. In de cel worden voortduren eiwitten gevormd en weer afgebroken om processen die van belang zijn voor het normaal functioneren van de cel te sturen. De afbraak van eiwitten in een cel wordt strak gereguleerd door het ubiquitine proteasoom systeem, waarbij de daadwerkelijke eiwitafbraak plaatsvindt in en door het proteasoom. Het proteasoom is een groot eiwitcomplex, dat verantwoordelijk is voor het overgrote deel van de eiwitafbraak in een cel. In het proteasoom worden eiwitten afgebroken tot kleinere stukjes, genaamd peptides, die vervolgens door andere proteases afgebroken worden tot aminozuren, de bouwstenen van eiwitten. De precieze activiteit van het proteasoom wordt bepaald door de activiteit van zes verschillende actieve 'subunits' die ieder na andere aminozuursequenties knippen. Naast gewoon (constitutief) proteasoom bestaat er ook een vorm die vooral aanwezig is in weefsels die een rol spelen in het immuunsysteem: het immuno-proteasoom.

Het proteasoom is niet alleen verantwoordelijk voor de afbraak van eiwitten die een sleutelrol spelen in processen als de cel cyclus, cel differentiatie, signaal transductie en apoptose, het proteasoom speelt ook een rol in immuniteit. Een breed repertoire aan antigene peptiden wordt gepresenteerd op het celoppervlak aan het immuunsysteem door Major Histocompatibility Complex (MHC) klasse I eiwit complexen. Deze peptiden worden gegenereerd door het pro-

teasoom en kunnen afkomstig zijn van zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde eiwitten. Zo wordt als het ware een blauwdruk van de celinhoud getoond aan het immuunsysteem. Dit stelt CD8+ cytotoxische T cellen in staat veranderingen in de cel als gevolg van bijvoorbeeld maligne transformatie of een virale infectie op te merken. De herkenning van een lichaamsvreemd of abnormaal peptide door CD8+ cellen leidt uiteindelijk tot de eliminatie van een maligne of geïnfecteerde cel.

Het remmen van het proteasoom verstoort vele regulatoire processen in de cel, wat uiteindelijk tot celdood kan leiden. Dit maakt het proteasoom tot een aantrekkelijk farmacologisch target. De observatie dat kanker cellen gevoeliger zijn voor proteasoomremming dan normale cellen heeft geleid tot de ontwikkeling van verscheidene proteasoomremmers voor de behandeling van kanker. Het medicijn velcade®, waarin de proteasoomremmer bortezomib het actieve ingrediënt is, wordt gebruikt voor de behandeling van de ziekte van Kahler (multipel myeloom) en van mantelcel lymfoom, een agressieve en ongewone vorm van non-Hodgkin lymfoom. Behandeling met bortezomib kan echter leiden tot substantiële bijwerkingen en ook treedt resistentie tegen bortezomib regelmatig op. Daarom is het belangrijk te zoeken naar nieuwe proteasoomremmers die beter getolereerd worden en/of werkzaam zijn in cellen die resistent zijn tegen bortezomib. Verscheidene tweede-generatie proteasoomremmers, die onder andere verschillen in hun remmingsmechanisme en subunit specificiteit, worden momenteel getest

in klinische trials. Voorbeelden van deze remmers zijn marizomib en CEP-18770. Nu verschillende proteasoomremmers beschikbaar komen voor klinisch gebruik, is het van groot belang om optimale behandelmethodes te definiëren en de meest geschikte remmer voor een bepaalde patiënt te bepalen. Hiervoor zijn accurate methodes nodig die gebruikt kunnen worden om de specificiteit en effectiviteit van deze verschillende remmers in patiënten te monitoren. Voor de meest gangbare methode die momenteel wordt gebruikt om proteasoomactiviteit te meten is het echter noodzakelijk om cellen te lyseren (open te breken) voordat activiteitsmetingen uitgevoerd kunnen worden. Het lyseren van cellen leidt ertoe dat het proteasoom uit zijn regulatoire omgeving gehaald wordt, wat de proteasoomactiviteit kan beïnvloeden. Andere methodes kunnen alleen gebruikt worden in genetisch gemodificeerde cellen of organismen, wat het monitoren van patiënten die behandeld worden met proteasoomremmers uitsluit.

In **hoofdstuk 1** beschrijf ik de ontwikkeling en karakterisatie van verschillende proteasoom probes, synthetische verbindingen die covalent binden aan actieve proteasoomsubunits en een label bevatten waardoor ze gevisualiseerd kunnen worden. Deze probes kunnen gebruikt worden om proteasoomactiviteit te bestuderen in vele soorten weefsels en met een breed scala aan technieken.

Hoofdstuk 1.2 beschrijft de ontwikkeling van een gedansyleerde proteasoom probe die in combinatie met op SDS-PAGE gebaseerde assays gebruikt kan worden om proteasoomactiviteit te monitoren. Deze probe is de eerste in zijn soort die gebruikt kon worden om de activiteit van bortezomib in intacte cellen te bestuderen zonder de noodzaak om bewerkelijke radiolabeling procedures uit te voeren. De gelabelde subunits kunnen een-

voudig zichtbaar gemaakt worden door te immunoblotten met een antilichaam tegen de dansyl groep. We vonden substantiële verschillen tussen de specificiteit van bortezomib in intacte cellen en die in gelyseerde cellen. Dit benadrukt de noodzaak om bioassays te ontwikkelen die uitgevoerd kunnen worden in levende cellen om de accuraatheid van zulke metingen te kunnen waarborgen.

In **hoofdstuk 1.3** beschrijf ik de verdere optimalisatie van deze gedansyleerde proteasoom probe, door vervanging van de dansyl groep door fluorophoren met een hogere quantum yield. Hierdoor kan de resulterende SDS-PAGE gel direct gescand worden om fluorescente emissie van de gelabelde proteasoomsubunits te meten. Om effectieve proteasoom probes met goede biochemische en biofysische eigenschappen te kunnen selecteren, hebben we een serie probes met verschillende fluorescente groepen gesynthetiseerd. Twee verschillende probes bleken geschikt om proteasoomactiviteit te bestuderen in celextracten, intacte cellen en weefsels afkomstig van muisen. Bovendien kunnen deze probes ook gebruikt worden in confocale microscopy assays en flow cytometrie assays om proteasoomactiviteit direct in cellen te kunnen detecteren.

Hoofdstuk 2 concentreert zich op de toepassing van deze fluorescente proteasoom probes. We hebben de effecten van verschillende proteasoom remmers in preklinische studies en klinische trials bestudeerd. Daarnaast hebben we deze probes gebruikt om proteasoom te zuiveren en proteasoom activiteit en compositie te analyseren in verschillende weefsels.

In **hoofdstuk 2.1** vergelijken we de effecten van bortezomib en de nieuwe proteasoom remmer CEP-18770 in een aantal *in vitro* en preklinische *ex vivo* modellen. CEP-18770 doet hetzelfde als en lijkt zelfs op bortezomib.

In een panel van cellysaten en cellijnen waren beide proteasoomremmers equipotent in het remmen van verschillende proteasoomactiviteiten. In een preklinisch model van de ziekte van Kahler werd proteasoomactiviteit in normale, gezonde weefsels door beide remmers evenveel geremd. Echter, de remming van tumor proteasoomactiviteit door CEP-18770 was significant hoger dan de remming die bortezomib bewerkstelligde. Daarnaast laten we zien dat CEP-18770 behandeling in staat is om proteasoom te remmen in een bortezomib resistente multiple myeloom cellijn. Deze resistentie is verworven door langdurige blootstelling aan bortezomib *in vitro* en wordt veroorzaakt door een specifieke mutatie in een van de actieve subunits van het proteasoom. CEP-18770 kon bovendien apoptose veroorzaken in deze cellen.

Marizomib is een proteasoomremmer die momenteel geëvalueerd wordt in fase I klinische trials. Daardoor is het mogelijk om de respons van patiënten op behandeling met marizomib gedetailleerd te bestuderen. In **hoofdstuk 2.2** laten we zien dat fluorescente proteasoom probes gebruikt kunnen worden om de proteasoom remming te meten in zowel 'packed whole blood' (PWB, bloed zonder plasma dat voornamelijk uit rode bloedcellen bestaat) als in 'peripheral blood mononuclear cells' (PBMCs, witte bloedcellen), afkomstig van ratten die behandeld zijn met bortezomib of marizomib. Daarnaast hebben we een methode ontwikkeld waarmee fluorescente probes gebruikt kunnen worden om bloed samples van patiënten die behandeld worden met marizomib te bestuderen. We laten zien dat PWB, dat voor meer dan 98% uit rode bloed cellen bestaat, anders reageert op proteasoomremmers en minder snel herstelt van proteasoomremming in vergelijking met PBMCs. Deze data waarschuwen tegen het gebruik van PWB als een model-systeem om de effecten van proteasoomrem-

mers in proefdieren of patiënten te monitoren, zoals nu routinematig gedaan wordt. Daarnaast hebben we fluorescente proteasoom probes gebruikt om aan te tonen dat de initiële proteasoomactiviteit in patiënten voor de start van de behandeling een factor is die de gevoeligheid van patiënten voor proteasoomremmers bepaalt. Daarnaast bepaalt het vermogen van cellen om hun proteasoom activiteitsprofiel te veranderen in reactie op behandeling met marizomib de gevoeligheid van cellen voor marizomib. Proteasoomremmers die intraveneus worden toegediend verzadigen waarschijnlijk eerst het constitutieve proteasoom in rode bloedcellen voordat tumorcellen bereikt worden. Specifieke immunoproteasoomremmers verzadigen rode bloedcellen waarschijnlijk bij relatief lage concentraties en zouden daarom in de toekomst een goed alternatief kunnen bieden voor de behandeling van tumoren met een hoge intrinsieke immunoproteasoomactiviteit.

In **hoofdstuk 2.3** ten slotte beschrijf ik hoe fluorescente proteasoom probes gebruikt kunnen worden om tijdens het isoleren van proteasoom uit runderlever en -milt, de zuiverheid van dit proteasoom te kunnen monitoren. Met behulp van massaspectrometrie hebben we vervolgens laten zien dat zuiver constitutief of immunoproteasoom via deze methode verkregen kan worden. Daarnaast hebben we de relatieve subunitsamenstelling van gepurificeerd runderlever en -milt proteasoom met massaspectrometrie bepaald.

De vindingen beschreven in **hoofdstuk 2** laten zien dat chemische proteasoom probes gebruikt kunnen worden om proteasoomactiviteit op een betrouwbare manier te meten in een grote variëteit aan samples, zowel in preklinische diermodellen als in patiënten tijdens klinische trials. Daarnaast kunnen deze probes mogelijk de respons van patiënten op verschillende proteasoomremmers voor-

spellen, wat kan bijdragen aan therapie op maat om het therapeutische potentieel van dit type medicijn te verbeteren en betere behandelresultaten voor patiënten te bewerkstelligen.

In **hoofdstuk 3** wordt proteasoomactiviteit op moleculair niveau bestudeerd en wordt gekeken naar de rol van het proteasoom in het immuunsysteem. Recente studies hebben nieuwe epitopen geïdentificeerd die bestaan uit twee aparte delen van een eiwit die eerst losgeknipt zijn en vervolgens weer aan elkaar geplakt *gespliced* om een nieuw peptide te vormen. De ligatiereactie die deze verknippte *gespliced* epitopen produceert vindt plaats in en wordt gekatalyseerd door het proteasoom via een zogeheten transpeptidatiemechanisme. Dat mechanisme maakt het aannemelijk dat peptide *splicing* geen willekeurig proces is, maar gedicteerd wordt door specifieke regels. Het ophelderen van deze regels zal het voorspellen en identificeren van *gespliced* antigenen vergemakkelijken. Pas als de identiteit van meer *gespliced* epitopen bekend is, kan hun rol in immuniteit nauwkeurig bestudeerd worden.

In **hoofdstuk 3.2** wordt het moleculaire mechanisme van proteasomale antigen *splicing* bestudeerd, en worden regels opgesteld die deze antigen *splicing* kunnen voorspellen. Door kleine peptide bibliotheken met mogelijke *splicing* partners te incuberen met proteasoom, en deze reactiemengsels vervolgens te analyseren, hebben we laten zien dat *splicing* motieven bestaan. Specifieke aminozuursequenties bevorderden *splicing*, terwijl andere juist verhinderden dat *splicing* reacties plaatsvonden. Daarna hebben we deze *splicing* motieven bevestigd en verfijnd door de regels toe te passen op een polypeptide afgeleid van een viraal eiwit van het Influenza A/PR/8/34 virus (een H1N1 griepvirus, net als de Mexicaanse griep). Daarnaast hebben we laten

zien dat *splicing* reacties in het proteasoom heel efficiënt kunnen verlopen, met efficiënties tot 30% *in vitro*, als aan de structurele eisen voor proteasoom *splicing* voldaan wordt door beide *splicing* partners. Ook hebben we aangetoond dat een groot aantal *gespliced* epitopen gevormd kan worden uit een enkel eiwit. Tot slot hebben we het mechanisme van *splicing* reacties bestudeerd en hebben laten zien dat *splicing* bij voorkeur gebeurt met twee peptiden die afkomstig zijn van hetzelfde eiwit. Willekeurige recombinatie van peptiden die afkomstig zijn van verschillende eiwitten vindt dus waarschijnlijk nauwelijks plaats *in vivo*.

In **hoofdstuk 3.3** laten we zien dat als een lysine residu betrokken is bij de ligatiereactie, proteasoom *splicing* een nieuw type antigeen, dat een isopeptide binding bevat, kan creëren. Lysine heeft twee amino groepen (een α - en een ϵ -amino groep) die theoretisch allebei kunnen participeren in ligatiereacties. Dit impliceert dat het proteasoom naast normale peptide bindingen, waarin de α -amino groep betrokken is bij ligatie, ook antigenen kan vormen met een isopeptide binding (als de ϵ -amino groep participeert in de ligatiereactie). Met behulp van NMR hebben we laten zien dat zowel de α - als de ϵ -amino groep van lysine betrokken kan zijn bij ligatiereacties in het proteasoom. Ook konden we bepalen dat isopeptide vorming geprefereerd wordt over α -ligatie in 10% van alle *splicing* reacties waarin een lysine betrokken was op de plek van ligatie. Dit suggereert dat het proteasoom een nieuw type antigeen vormt dat een rol zou kunnen spelen in immuniteit. Daarnaast hebben we laten zien dat epitopen die een isopeptide binding bevatten unieke eigenschappen hebben, die hen onderscheidt van normale epitopen. Zo kunnen isopeptiden met verschillende lengtes met hoge affiniteit binden aan MHC klasse I. Ook worden isopeptiden minder snel afgebroken door het

proteasoom in vergelijking met normale peptiden. De combinatie van deze eigenschappen suggereert dat een groot deel van de isopeptide epitopen die gevormd worden ook het celoppervlak kan bereiken om daar een immuunrespons op te wekken.

Gezamenlijk geven de data die beschreven worden in **hoofdstuk 3.2** en **3.3**, aan dat verschillende typen ligatiereacties in het proteasoom kunnen plaatsvinden *in vitro*. De efficiënties van deze reacties zijn hoog (tot 30%) vergeleken bij de geschatte efficiënties voor de formatie van de *gesplicete* epitopen die tot nu toe beschreven zijn (0.0002-0.01%). Dit suggereert dat proteasomale *splicing* reacties veel vaker plaatsvinden dan tot nu toe werd aangenomen en dus een significante bijdrage zouden kunnen leveren aan immuniteit *in vivo*. Tot nu toe zijn pas drie *gesplicete* epitopen beschreven *in vivo*. Dit is niet verwonderlijk als je bedenkt dat identificatie van deze epitopen niet mogelijk is met de huidige methodes die gebruikt worden om nieuwe antigenen te identificeren. Nieuwe epitopen kunnen worden geïdentificeerd door elutie van het celoppervlak, gevolgd door analyse met massaspectrometrie, waarbij peptides gematcht worden tegen databases met eiwitsequenties. Een alternatieve methode is het voorspellen van epitopen uitgaande van sequenties van bijvoorbeeld virale eiwitten. Vervolgens wordt dan getest of reactieve CD8+ T cellen tegen deze epitopen gevonden kunnen worden in muizen die gevaccineerd zijn met het desbetreffende virale eiwit. In het geval van *gesplicete* epitopen echter, bestaan de gevormde antigenen niet uit een aaneengesloten stuk eiwit, maar is een post-translationele *splicing* reactie noodzakelijk om deze epitopen te vormen. Daardoor kunnen deze peptiden niet gematcht worden tegen databases die alleen aaneengesloten eiwitsequenties bevatten. Bovendien kunnen ze niet

voorspeld worden op basis van aaneengesloten sequenties alleen. De *splicing* regels die beschreven staan in hoofdstuk 3.2 maken het voorspellen van *gesplicete* epitopen mogelijk. Dit zou de identificatie van meer *gesplicete* epitopen moeten vergemakkelijken. Ik verwacht dat de studies die beschreven staan in dit proefschrift zullen bijdragen aan de ontdekking van nieuwe *gesplicete* epitopen en aan het ontrafelen van mogelijke functies van *gesplicete* epitopen en isopeptide antigenen *in vivo*.

Curriculum Vitae

Celia Rosita Berkers werd geboren op 1 mei 1980 te Amsterdam. In 1998 behaalde zij haar VWO diploma aan het Vossius Gymnasium in Amsterdam. In datzelfde jaar begon zij aan de studie scheikunde aan de Universiteit Utrecht. Tijdens haar studie liep zij stage bij de vakgroep biochemie van membranen aan de Universiteit Utrecht, waar zij de interactie tussen lipid II en het lantibioticum nisine bestudeerde. Een tweede stage liep zij bij de vakgroep Bio-organische chemie aan de Universiteit Utrecht. Hier deed zij onderzoek naar de rol van lipoxxygenase in neurodegeneratie en neuroprotectie. In november 2003 behaalde zij *cum laude* het doctoraal examen scheikunde. In januari 2004 startte zij haar promotieonderzoek in de groep van Prof. dr. Hidde Ploegh aan de Harvard Medical School te Boston onder leiding van Dr. Huib Ovaa. Voor dit onderzoek ontving zij onderzoeksbeurzen van de Koninklijke Hollandse Maatschappij der Wetenschappen en de Stichting Fonds Doctor Catharine van Tussenbroek. Vanaf juli 2004 zette zij dit promotieonderzoek voort in de groep van Dr. Huib Ovaa aan het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam. Zij presenteerde de resultaten van haar promotieonderzoek op verschillende nationale en internationale congressen. Voor haar lezing op het jaarlijkse congres van de NWO-CW studiegroep eiwitonderzoek won zij in 2006 de *PhD-Student Lecture Prize*. Ook won zij in 2006 de *Best Lecture Prize Fundamental Science* voor haar lezing tijdens de jaarlijkse PhD retraite van de Oncology Graduate School Amsterdam.

List of publications

C.R. Berkers, K.G. Schuurman, Y. Leestemaker, B. Ruggeri, S. Jones-Bolin, M. Williams & H. Ovaa. Comparison of the specificity and activity profiles of the proteasome inhibitors bortezomib and CEP-18770. *Manuscript in preparation*.

C.R. Berkers, K.G. Schuurman, S.K.C. Neuteboom, D. Chauhan, K.C. Anderson, M.A. Palladino & H. Ovaa. Profiling patient response to marizomib therapy. *Manuscript in preparation*.

C.R. Berkers, A. de Jong, K.G. Schuurman, J.A.J. Geenevasen, B. Rodenko & H. Ovaa. Proteasomal splicing creates a novel type of antigen containing an isopeptide linkage. *Manuscript in preparation*.

C.R. Berkers, A. de Jong, K.G. Schuurman, C. Linnemann, H.D. Meiring, T.N. Schumacher, B. Rodenko & H. Ovaa. How the proteasome cleaves and religates peptides to expand the antigen repertoire. *Manuscript in preparation*.

A. de Jong, K.G. Schuurman, B. Rodenko, H. Ovaa & **C.R. Berkers**. Fluorescent-based proteasome activity profiling. *Methods in Molecular Biology*. *Accepted for publication*.

S. Pelletier, K.G. Schuurman, **C.R. Berkers**, H. Ovaa, A.J. Heck & R. Raijmakers. Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry. *Molecular BioSystems*. 2010, DOI: 10.1039/c004989a.

C.R. Berkers & H. Ovaa. Drug discovery and assay development in the ubiquitin-proteasome system. *Biochemical Society Transactions*. 2010, 38 (Part 1): 14-20.

J. Middeldorp, W. Kamphuis, J.A. Sluijs, D. Achoui, C.H. Leenaars, M.G. Feenstra, P. van Tijn, D.F. Fischer, **C.R. Berkers**, H. Ovaa, R.A. Quinlan & E.M. Hol. Intermediate filament transcription in astrocytes is repressed by proteasome inhibition. *FASEB Journal*. 2009, 23 (8): 2710-2726.

C.R. Berkers, A. de Jong, H. Ovaa & B. Rodenko. Transpeptidation and reverse proteolysis and their consequences for immunity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009, 41 (1): 66-71.

continued on the next page...

R. Oerlemans, N.E. Franke, Y.G. Assaraf, J. Cloos, I. van Zantwijk, **C.R. Berkers**, G.L. Scheffer, K. Debipersad, K. Vojtekova, C. Lemos, J.W. van der Heijden, B. Ylstra, G.J. Peters, G.L. Kaspers, B.A. Dijkmans, R.J. Scheper & G. Jansen. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*. 2008, 112 (6): 2489-2499

R. Raijmakers, **C.R. Berkers**, A. de Jong, H. Ovaa, A.J. Heck & S. Mohammed. Automated online sequential isotope labeling for protein quantitation applied to proteasome tissue-specific diversity. *Molecular & Cellular proteomics*. 2008, 7 (9): 1755-1762.

A.H. Bakker, R. Hoppes, C. Linnemann, M. Toebes, B. Rodenko, **C.R. Berkers**, S.R. Hadrup, W.J. van Esch, M.H. Heemskerk, H. Ovaa & T.N. Schumacher. Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105 (10): 3825-3830.

R. Piva, B. Ruggeri, M. Williams, G. Costa, I. Tamagno, D. Ferrero, V. Giai, M. Coscia, S. Peola, M. Massaia, G. Pezzoni, C. Allievi, N. Pescalli, M. Cassin, S. di Giovine, P. Nicoli, P. de Feudis, I. Streponi, I. Roato, R. Ferracini, B. Bussolati, G. Camussi, S. Jones-Bolin, K. Hunter, H. Zhao, A. Neri, A. Palumbo, **C.R. Berkers**, H. Ovaa, A. Bernareggi & G. Inghirami. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*. 2008, 111 (5): 2765-2775.

C.R. Berkers, F.W. van Leeuwen, T.A. Groothuis, V. Peperzak, E.W. van Tilburg, J. Borst, J.J. Neefjes & H. Ovaa. Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Molecular Pharmaceutics*. 2007, 4 (5): 739-748.

M. Kraus, T. Rückrich, M. Reich, J. Gogel, A. Beck, W. Kammer, **C.R. Berkers**, D. Burg, H. Overkleeft, H. Ovaa & C. Driessen. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia*. 2007, 21 (1): 84-92.

M. Verdoes, B.I. Florea, V. Menendez-Benito, C.J. Maynard, M.D. Witte, W.A. van der Linden, A.M. van den Nieuwendijk, T. Hofmann, **C.R. Berkers**, F.W. van Leeuwen, T.A. Groothuis, M.A. Leeuwenburgh, H. Ovaa, J.J. Neefjes, D.V. Filippov, G.A. van der Marel, N.P. Dantuma & H.S. Overkleeft. A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo. *Chemistry & Biology*. 2006, 13 (11): 1217-1226.

MDP Risseeuw, **C.R. Berkers**, H.L. Ploegh & H. Ovaa. Synthesis of tritium labeled KRN7000. *Tetrahedron Letters*. 2006, 47 (22): 3677-3679.

M. Groll, **C.R. Berkers**, H.L. Ploegh & H. Ovaa. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure*. 2006, 14 (3): 451-456.

M. Verdoes, **C.R. Berkers**, B.I. Florea, P.F. van Swieten, H.S. Overkleeft & H. Ovaa. Chemical proteomics profiling of proteasome activity. *Methods in Molecular Biology*. 2006, 328: 51-69.

D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ovaa, **C.R. Berkers**, B. Nicholson, T.H. Chao, S.T. Neuteboom, P. Richardson, M.A. Palladino & K.C. Anderson. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*. 2005, 8 (5): 407-419

C.R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebigler, B.M. Kessler, K.C. Anderson, H.L. Ploegh, H. Ovaa & P.J. Galardy. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nature Methods*. 2005, 2 (5): 357-362

C.R. Berkers & H. Ovaa. Immunotherapeutic potential for ceramide-based activators of iNKT cells. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005, 26 (5): 252-257