

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28466> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Hendriks, Ivo Alexander

Title: Global and site-specific characterization of the SUMO proteome by mass spectrometry

Issue Date: 2014-09-03

NEDERLANDSE SAMENVATTING

SUMO

SUMO (**S**mall **U**biquitin-like **M**odifier; Klein Ubiquitin-achtige Modificatie) is een relatief klein eiwit dat andere eiwitten kan modificeren. Het SUMO eiwit wordt door middel van een enzymatische cascade gekoppeld aan of verwijderd van andere, vaak grotere, eiwitten. Moleculair gezien kan de koppeling van SUMO aan andere eiwitten de functionaliteit van deze eiwitten op talloze manieren beïnvloeden. Bijvoorbeeld door middel van een translocatie van het eiwit van één deel van de cel naar een ander deel, een cascade-reactie die uiteindelijk leidt tot de afbraak van het eiwit, of een structurele verandering van het eiwit waardoor de intrinsieke activiteit verandert.

SUMO is van groot belang voor al het eucaryotische leven, van gist tot de mens. Het verwijderen of blokkeren van SUMO, of het uitschakelen van de enzymen die SUMO aan andere eiwitten koppelen, is over het algemeen dodelijk voor alle vormen van leven. SUMO is ook van klinisch belang, en in recente jaren is uitgevonden dat SUMO vaak betrokken is bij ziekten als Alzheimer's, Parkinson's, en meerdere vormen van kanker.

SUMO heeft een aantal unieke eigenschappen in vergelijking tot andere eiwitmodificaties. Hoewel SUMO als "small" wordt benoemd, is het één van de grootste modificaties die plaats kan vinden op eiwitten. SUMO modificeert voornamelijk eiwitten die zich in de kern van de cel bevinden, in tegenstelling tot vrijwel alle andere modificaties die zich over de gehele cel lokaliseren. Hoewel SUMO maar een beperkte fractie van veel eiwitten modificeert (en er tot voor kort werd gedacht dat SUMO een beperkte set eiwitten modificeert), is SUMO een zeer dynamische modificatie, die regelmatig snel aan eiwitten kan worden gekoppeld en vervolgens ook weer snel kan worden verwijderd. SUMO is daarom vaak betrokken bij dynamische processen binnen de cel, bijvoorbeeld UV-schade van het DNA, of stress veroorzaakt door hitte.

MASSA SPECTROMETRIE

Systeem-brede karakterisering van alle eiwitten binnen de cel (het proteoom) is recentelijk gerevolutioneerd vanwege technische ontwikkelingen in de massa spectrometrie. Deze techniek is in staat om de massa- en ladingseigenschappen van moleculen te bepalen. De massa spectrometrie is ondertussen zo ver ontwikkeld dat deze zeer complexe monsters met een hoge resolutie kan analyseren. Voor de karakterisering van proteomen wordt over het algemeen een enzym gebruikt die het gehele eiwit-monster 'verteerd' tot kleine peptiden. Deze peptiden worden dan via de massa spectrometrie geïdentificeerd en geanalyseerd, om vervolgens een beeld te schetsen van welke eiwitten zich in welke hoeveelheid (en op welk tijdstip) in de cel bevinden. Massa spectrometrie is ook zeer goed toepasbaar om modificaties op eiwitten te detecteren, mits deze modificaties, eventueel na opwerking van

Nederlandse Samenvatting

het monster, klein genoeg zijn.

Systeem-brede studie van het SUMO-gemodificeerde proteoom loopt achter ten opzichte van proteomen van andere modificaties. Dit is voornamelijk het gevolg van de laag gemodificeerde eiwit-fractie, agressieve enzymen die SUMO verwijderen van eiwitten als de celstructuur vernietigd wordt, en inefficiënte zuiverings-technieken om SUMO te verrijken. Een extra probleem is dat na het 'verteren' van SUMO met gebruikelijke enzymen en technieken, het overblijvende fragment te groot is, wat als gevolg analyse met massa spectrometrie vrijwel onmogelijk maakt. Hierdoor is het zeer lastig om de exacte locatie te bepalen waar SUMO een eiwit modificeert; een zeer waardevol gegeven voor wetenschappers die de exacte functie van SUMO op een specifiek eiwit willen bestuderen.

Mijn doel de afgelopen jaren was het ontwikkelen van methoden om de systeem-brede en onpartijdige studie van SUMO via massa spectrometrie mogelijk te maken. Ook heb ik een aantal van deze methoden toegepast om zowel de hoeveelheid eiwitten als de precieze locaties waar deze eiwitten door SUMO worden gemodificeerd in kaart te brengen.

Hoofdstuk 1 gaat verder in op de achtergrond van SUMO en massa spectrometrie.

SUMO EN DE DNA SCHADE RESPONS

De genetische informatie van ieder organisme ligt opgeslagen op het DNA, en dit complexe molecuul staat vrijwel continu onder stress via interne en externe bronnen. Beschadiging van het DNA en het doorgeven van foutieve genetische informatie kan leiden tot mutaties, en in hogere organismen tot veroudering en het ontstaan van ziekten zoals kanker. Om dit te voorkomen bestaat er een breed scala aan enzymen en processen die op allerlei manieren deze schade kunnen repareren of anderzijds beperken.

SUMO speelt een belangrijke rol in de DNA schade respons, en veel eiwitten die betrokken zijn bij deze respons worden gemodificeerd door SUMO. Om een beter beeld te krijgen van het gevolg van DNA schade op de systeem-brede SUMOylering van eiwitten, hebben wij een methode ontwikkeld waarmee we efficiënt een epitoom-gemarkeerde (FLAG) SUMO konden opzuiveren uit cellen na DNA schade. In combinatie met massa spectrometrie, hebben we ruim 400 eiwitten gevonden die worden geSUMOyleerd, en waarvan de SUMOylering van ongeveer 10 procent dynamisch verandert als gevolg van behandeling van de cellen met de DNA-schadegenererende stof methyl methaansulfonaat (MMS). Opvallend genoeg vonden we een paar histon demethylases, JARID1B en JARID1C, die omgekeerd worden gereguleerd door SUMO in de DNA schade respons. SUMO-gemodificeerde JARID1B wordt gemodificeerd met ubiquitin via het SUMO-gerichte enzym RNF4, waarna JARID1B wordt afgebroken. In tegenstelling tot JARID1B, verplaatst JARID1C zich naar het chromatine, waar de geSUMOyleerde vorm zich vrijwel exclusief bevindt, en waar JARID1C waarschijnlijk de actieve transcriptie van het DNA stil legt (**Hoofdstuk 2**).

RNF4 EN USP11

De SUMO-gerichte ligase RNF4 is een enzym dat SUMO-gemodificeerde eiwitten kan herkennen, en vervolgens deze eiwitten kan modifieren met ubiquitin. Dit leidt vaak tot de afbraak van de SUMO en ubiquitin gemodificeerde eiwitten, door middel van het proteasoom. RNF4 speelt ook een rol in de regulatie van PML lichamen. Deze PML lichamen komen onder andere voor in menselijke cellen, en staan bekend als opslag-depots van belangrijke eiwitten, zoals bijvoorbeeld DNA schade respons enzymen of factoren die kunnen leiden tot 'zelfmoord' van de cel.

Wij hebben een methode gebruikt om epitoom-gemarkeerde (FLAG) RNF4 op te zuiveren, en massa spectrometrie toegepast om potentiële interactie-partners van RNF4 te identificeren. Via dit onderzoek hebben wij gevonden dat USP11, een enzym dat de modificatie ubiquitin van andere eiwitten kan verwijderen, kan interacteren met RNF4. Deze vinding is op zich interessant, gezien de basale functies van RNF4 en USP11 precies tegenovergesteld zijn. Beide eiwitten staan bekend als zeer belangrijk in de DNA schade respons. Wij laten zien dat een depletie van USP11 leidt tot een afname in de SUMO-modificatie van PML, en een afname van de hoeveelheid PML lichamen. Daarentegen leidt een depletie van RNF4 tot een toename in de SUMO-modificatie van PML, en een toename in de hoeveelheid PML

Nederlandse Samenvatting

lichamen. Uiteindelijk kan het tot expressie brengen van een relatief grote hoeveelheid extra USP11 in de cel, de RNF4-gestuurde afbraak van PML lichamen als gevolg van cellulaire behandeling met de DNA-schade-genererende stof MMS voorkomen (**Hoofdstuk 3**).

DE EERSTE METHODE VOOR HET LOKALISEREN VAN SUMO

Hoewel massa spectrometrie recentelijk in meerdere studies is toegepast om uit te vinden welke eiwitten door SUMO worden gemodificeerd, zijn er vrijwel geen studies die er in slagen om te bepalen op welke locatie SUMO precies aan een eiwit wordt gekoppeld (zogenaamde “SUMO sites”). Als gevolg hiervan zijn wetenschappers genoodzaakt om handmatig, vaak één voor één, mutaties te maken in een eiwit totdat ze erachter komen waar SUMO zich precies bevindt, om vervolgens de rol van SUMO op het eiwit te kunnen bestuderen. Dit proces is langdradig, erg inefficiënt, en soms kunnen wetenschappers foutief aannemen dat ze een SUMO-deficiënt eiwit in handen hebben vanwege een mutatie die andere eigenschappen van het eiwit beïnvloed, zoals de driedimensionale vouwing of de lokalisering van het eiwit binnen de cel.

Wij hebben een methode ontwikkeld die onpartijdig de exacte locatie van SUMO-modificatie binnen eiwitten kan opsporen. Deze methode werkt met behulp van een lysine-deficiënte SUMO mutant, met een extra C-terminale mutatie (analoog aan de SUMO uit gist), waardoor na ‘verteren’ van eiwit-monsters het overblijvende SUMO-fragment klein genoeg is voor analyse met massa spectrometrie. Via deze methode zijn wij er in geslaagd om 103 SUMO sites te identificeren in menselijke cellen. Analyse van de omliggende aminozuur-context biedt nieuw inzicht in het zogenaamde SUMO consensus motief; een bepaald patroon van aminozuren die modificatie door SUMO efficiënter maakt. Hoewel een basaal SUMO consensus motief al bekend was, hebben wij het omgekeerde SUMO consensus motief en het hydrofobe-cluster SUMO consensus motief ontdekt, en meer inzicht geboden in fosforylerings-afhankelijke modificatie door SUMO (**Hoofdstuk 4**).

SUMO EN DE CELCYCLUS

Menselijke, en andere eucaryotische cellen, bevinden zich in een cyclisch proces waarbij de cellen groeien, hun DNA vermenigvuldigen, en uiteindelijk delen. Dit proces staat bekend als de celcyclus. Dit proces is in vrijwel alle gevallen van kanker op een bepaalde manier verstoord, waardoor alle controle op de celcyclus verloren raakt en de cel zich onophoudelijk gaat delen. SUMO is betrokken bij de celcyclus, en het is bekend dat SUMO veel celcyclus-gerelateerde eiwitten kan modifieren. Het verstoren van het SUMO systeem binnen een actief delende menselijke cel leidt tot vele aberraties in de celcyclus, en heeft uiteindelijk de dood van de cel als gevolg. In andere studies is aangetoond dat het verstoren van het SUMO systeem in bepaalde vormen van kanker verdere groei van tumoren kan tegengaan.

Wij hebben de methoden uit Hoofdstukken 2 en 4 gecombineerd, en

toegepast op menselijke cellen die zich op verschillende punten van de celcyclus bevinden. Uiteindelijk hebben we ruim 500 SUMO-gemodificeerde eiwitten geïdentificeerd, waarvan er 100 dynamisch en celcyclus-afhankelijk worden geSUMOyleerd. Ook hebben we 202 SUMO sites kunnen identificeren. In dit onderzoek is dynamische SUMOylering van het eiwit FoxM1 gevonden, waarbij de SUMOylering hoger is tijdens de mitose. Als gevolg van de SUMO-modificatie van FoxM1 gaat de activiteit van dit eiwit omhoog (**Hoofdstuk 5**).

SYSTEEM-BREDE IDENTIFICATIE VAN DUIZENDEN SUMO SITES

Om uiteindelijk een globaal beeld te krijgen van de exacte locatie waarop alle eiwitten binnen de menselijke cel door SUMO worden gemodificeerd, hebben wij de lysine-deficiënte SUMO opzuivering methode uit Hoofdstuk 4 verder ontwikkeld en uiterst efficiënt gemaakt. Een aantal van deze optimalisaties zijn het genereren van een stabiele cellijn die de benodigde gemuteerde SUMO op een vrijwel endogeen niveau tot expressie brengt, het verlengen van het epitoom waarmee SUMO aanvankelijk wordt verrijkt, een dubbele opzuivering-strategie, filtratie-stappen waarbij niet-gekoppelde SUMO wordt verwijderd, en toepassing van hypermoderne hoge-resolutie massa spectrometers.

Met behulp van deze methode hebben wij 3,246 SUMO sites kunnen detecteren (*zoals opgenomen in dit proefschrift; op het moment van schrijven van deze samenvatting zijn het er 4,361*). Deze SUMO sites bevinden zich in 1,364 unieke eiwitten (*op dit moment 1,606*), een aanzienlijk deel van de naar schatting 10,000 eiwitten die zich bevinden in de HeLa cellijn, en het totaal van 20,000 menselijke eiwitten. Met dit onderzoek leveren wij de eerste globale analyse van het geSUMOyleerde proteoom, en via bio-informatische analyse van alle SUMO sites hebben wij het inzicht in SUMO aanzienlijk kunnen vergroten. Grote functioneel gerelateerde groepen eiwitten en groepen interacterende eiwitten worden systematisch door SUMO gemodificeerd, en SUMO is betrokken bij een samenspel met andere belangrijke eiwitmodificaties zoals ubiquitineren, acetylering, methylering en fosforylering (**Hoofdstuk 6**).

DE EERSTE STAP RICHTING IDENTIFICATIE VAN ENDOGENE SUMO MODIFICATIE

De identificatie van SUMO sites wordt vrijwel uitsluitend gedaan met behulp van gemuteerde SUMO (Hoofdstukken 4, 5, 6, en externe studies). Hoewel deze aanpak efficiënt is en over het algemeen een onpartijdig beeld geeft, is het niet mogelijk om te bepalen waar een eiwit wordt gemodificeerd door SUMO die van nature aanwezig is in de cel. Om de eerste stap te zetten richting dit doel, hebben wij de PRISM methode ontwikkeld (Protease-Reliant Identification of SUMO Modification; Protease-Afhankelijke Identificatie van SUMO Modificatie). Bij deze methode worden alle lysines in een eiwit-monster chemisch geblokkeerd, waarna een SUMO-specifieke protease wordt gebruikt om SUMO te verwijderen van de eiwitten. De vrijgemaakte lysines, waar SUMO zich bevond voor proteolytische verwijdering, zijn als gevolg de enige niet-gemodificeerde lysines in het monster. Het 'verteren' van deze monsters leidt tot specifieke peptiden, die met massa spectrometrie kunnen worden gedetecteerd.

Met de PRISM methode zijn wij er in geslaagd om 389 SUMO sites te identificeren, onder standaard kweek-condities, en met toepassing van een epitoom-gemarkeerde maar voor de rest compleet wildtype SUMO. Deze SUMO-ylering bevindt zich op ongeveer 200 eiwitten, en bio-informatische analyse van de SUMO sites laat zien dat ze vergelijkbaar en vrijwel even betrouwbaar zijn als SUMO sites die via andere methoden worden gekarakteriseerd. Verdere optimalisatie van de PRISM methode zou kunnen leiden tot een methode die SUMO sites op een geheel endogene manier kan detecteren, en uiteindelijk in complexe weefsels en patiëntmateriaal (**Hoofdstuk 7**).

EEN COMPLETER BEELD VAN SUMO DAN OOI TEVOREN

Hoofdstuk 8 is een uitgebreide discussie, waarbij ik alle vindingen in dit proefschrift samenvat en bespreek, en een vergelijking uitvoer tussen onze SUMO studies en alle externe SUMO studies.

Uiteindelijk beschrijf ik in dit proefschrift een totaal van 3,538 unieke SUMO sites, een factor 100 boven de cumulatieve hoeveelheid sites die ooit buiten ons lab zijn beschreven. De methodologie, en lijsten met alle geïdentificeerde SUMO-eiwitten en SUMO sites, vormen een uiterst waardevolle bron van informatie voor alle wetenschappers die aan SUMO werken. Verdere toepassing en ontwikkeling van de methoden beschreven in dit proefschrift kunnen leiden tot een nog duidelijker beeld van SUMO, en tot methoden waarmee endogene SUMO efficiënt kan worden gedetecteerd en bestudeerd. Hierdoor zal uiteindelijk een beter beeld geschetst kunnen worden van de bijdrage van SUMO aan kanker en andere ziekten.

S