



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Exploring the Ub/UBL landscape with activity-based probes

Witting, K.F.

### Citation

Witting, K. F. (2020, May 20). *Exploring the Ub/UBL landscape with activity-based probes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/90130>

Version: 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/1887/90130>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/90130> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Witting, K.F.

**Title:** Exploring the Ub/UBL landscape with activity-based probes

**Issue Date:** 2020-05-20

# Appendix

**Discussion and Future Perspectives**

## Nederlandse Samenvatting

In dit proefschrift presenteer ik de ontwikkeling van innovatieve chemische hulpmiddelen om verschillende aspecten van de conjugerende en deconjugerende enzymen van Ubiquitine te bestuderen. Ook is er geprobeerd om Ubiquitine conjugerende enzymen genetisch te modificeren om het covalent vangen van hun substraten mogelijk te maken. Ubiquitine is een eiwit van 76 aminozuren dat eiwitsubstraten post-translatieel modificeert en een overvloed aan cellulaire processen moduleert. Ontregeling van de normale functie van Ubiquitine leidt tot een verscheidenheid aan ziekten zoals kanker, neurodegeneratieve- en infectieziekten. De covalente koppeling van Ubiquitine aan de lysine aminozuren van eiwit substraten wordt georkestreerd door de opeenvolgende werking van een enzymatische cascade. Ubiquitinatie is omkeerbaar, en Ubiquitine kan van substraten worden verwijderd door een familie van specifieke proteases genaamd deubiquitinerende enzymen. Inzicht in dit ingewikkelde netwerk, dat 2 E1-enzymen, 40 E2-enzymen, meer dan 600 E3-ligasen en 100 deubiquitinerende enzymen omvat, kan de sleutel zijn tot het identificeren en ontwikkelen van krachtige therapeutische strategieën. Om het repertoire van de reeds bekende op activiteit gebaseerde probes uit te breiden zijn er praktische peptide synthese methodes ontwikkeld om de op Ubiquitine lijkende eiwitten SUMO1, SUMO2, SUMO3, en UFM1 volledig synthetisch te genereren. Over de rol van UFM1 in de cel is weinig bekend. Daarom is de UFM1 probe gebruikt om in combinatie met MS/MS de substraten van UFM1 te identificeren. Hierdoor kon de biologische rol van deze post-translatieele modificatie worden onderzocht.

Hoewel de studie van deze enzymatische Ubiquitinylatie cascade van groot belang is, ontbreken geschikte (bio)chemische hulpmiddelen. Om dit aan te pakken, is in eerste instantie geprobeerd om E2-enzymen genetisch te modificeren. Met behulp van amber codon onderdrukking zijn onnatuurlijke aminozuren in deze enzymen ingebouwd met als doel om het covalent vangen van substraten mogelijk te maken (**hoofdstuk 2**).

Omdat deze poging niet succesvol bleek, is er een op natief Ubiquitine gebaseerd reagens ontwikkeld dat wordt doorgegeven door de Ubiquitinylatie cascade (**hoofdstuk 3**). Met behulp van dit op activiteit gebaseerde reagens is het mogelijk om de biochemische, structurele en celbiologische aspecten van de enzymatische cascade te bestuderen.

Aangezien het feit dat andere aan Ubiquitine verwante modificaties ook cellulaire processen moduleren, is deze aanpak uitgebreid naar de signaaleiwitten SUMO (**hoofdstuk 4**) en UFM1 (**hoofdstuk 5**). Hiervoor is een algemeen toepasbare peptide synthese methode ontwikkeld waarmee verschillende chemische hulpmiddelen en reagentia kunnen worden gesynthetiseerd. Om de substraten van UFM1 te identificeren is er gebruik gemaakt van een aangepaste op massa spectrometrie gebaseerde proteomics methode die het mogeli-

jk maakt om specifieke locaties op een eiwit te identificeren die gemodificeerd zijn met UFM1. op. Met behulp van deze methode is het primaire doelwit van UFM1 geïdentificeerd — het ribosomale eiwit RPL26. Validatie en verdere experimenten suggereren een centrale rol voor UFMylatie in het bevorderen van de interactie van het ribosoom met de signaal herkennings-deeltjes receptor tijdens de translatie van eiwitten bestemd voor het endoplasmatisch reticulum (ER).

Bovendien is er ontdekt dat UFMylatie optreedt als reactie op verstoring van eiwittranslatie. De mechanistische details zijn echter nog niet geheel duidelijk en worden momenteel onderzocht (**hoofdstuk 6**). De in dit proefschrift beschreven combinatie van praktische synthese strategieën, innovatieve op activiteit gebaseerde gereedschappen en geavanceerde proteomics methoden heeft nieuwe wegen geopend voor het bestuderen van de biologie van ubiquitinylatie maar ook van SUMOylatie en UFMylatie.

