



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A role of SUMOylation in proteostasis, centromere integrity and the DNA damage response

Liebelt, F.

Citation

Liebelt, F. (2020, January 9). *A role of SUMOylation in proteostasis, centromere integrity and the DNA damage response*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82485>

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/1887/82485>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82485> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Liebelt, F.

Title: A role of SUMOylation in proteostasis, centromere integrity and the DNA damage response

Issue Date: 2020-01-09

APPENDIX &

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Eiwitten zijn de werkers van de cel. Ons DNA codeert voor minimaal 20.000 (geschat tot 100.000) verschillende eiwitten met verschillende functies in de cel. Alle eiwitten bestaan uit een combinatie van 20 verschillende moleculaire bouwstenen, de aminozuren. Door deze verschillende combinaties heeft ieder eiwit een unieke structuur en functie.

De functie van eiwitten is dynamisch en kan afhankelijk van de toestand van de cel, ook na de synthese van het eiwit kortstondig veranderd worden, vaak door een verandering van de structuur. Deze verandering noemt men post-translationele modificaties (PTM). SUMOylering en *ubiquitineren*, twee van vele verschillende PTMs, worden in dit proefschrift nader onderzocht. De mechanismen van deze twee processen lijken op elkaar en bestaan uit het binden van de kleine eiwitten ubiquitine en SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) aan één of meerdere lysines (een aminozuur) die zich in de sequentie van het doeleiwit bevinden. Door structurele veranderingen kan de functie van het doeleiwit beïnvloed worden en deze functieverandering is sterk afhankelijk van het doeleiwit en het modifierende eiwit. Bijvoorbeeld, de ubiquitineren van eiwitten leidt in veel gevallen tot een gereguleerde degradatie. Maar ubiquitineren en SUMOylering kunnen ook andere functionele consequenties hebben, bijvoorbeeld een verandering van bindingsplekken welke de interactie met andere eiwitten kan stimuleren of tegen kan houden. Om te begrijpen waarom eiwitten met SUMO gemarkeerd worden, helpt het om de identiteit van deze eiwitten te kennen. In dit proefschrift is hiervoor een eerder ontwikkelde techniek gebruikt om eerst geSUMOyleerde eiwitten uit de cel te isoleren en deze in vervolg te identificeren met massa spectrometrie. Elk hoofdstuk begint met de identificatie van geSUMOyleerde eiwitten onder bepaalde omstandigheden om vervolgens de functionele consequenties van deze modificaties te achterhalen.

Hoofdstuk 1 biedt een uitgebreide introductie over PTMs en SUMOylering, de betrokkene enzymen en de, voor dit proefschrift, relevante biologische processen. Het biedt een basiskennis die aan de onderzoeksresultaten in hoofdstuk 3, 4 en 5 te gronde liggen. Proteostase is het evenwicht tussen de synthese, het vouwen, het transporteren en de afbraak van eiwitten. **Hoofdstuk 2** biedt een samenvatting van bestaande literatuur over hoe SUMOylering onafhankelijk, of in samenwerking met ubiquitineren betrokken is bij de regulatie van proteostase.

In **hoofdstuk 3** vragen wij waarom de SUMOylering van honderden eiwitten toeneemt als cellen aan hoge temperaturen blootgesteld worden. Verhoogde temperaturen kunnen ertoe leiden dat eiwitten ontvouwen, ook denaturatie genoemd, en daardoor hun functie verliezen. Om dit te voorkomen, en de overlevingskansen van de cel te vergroten, reageert de cel met de hiteschok respons. Dit proces leidt tot de expressie van eiwitten die gedetermineerde eiwitten kunnen beschermen, hervouwen of ervoor zorgen dat beschadigde eiwitten gecontroleerd worden afgebroken. Onze resultaten tonen aan dat de SUMOylering van vele eiwitten langer aanhoudt als de hiteschok respons en het proteostase netwerk niet functioneel zijn. Verder laten we zien dat vele geSUMOyleerde eiwitten ook geubiquitineerd zijn en dat de SUMOylering waarschijnlijk bijdraagt aan de oplosbaarheid en de toegankelijkheid van deze eiwitten. Dit voorkomt dat ontvouwen eiwitten aggregaten vormen die moeilijk op te lossen zijn voor de cel. Zo ondersteunt de SUMOylering van eiwitten na een hiteschok het herstellen van proteostase.

Hoofdstuk 4 beschrijft de identificatie van geSUMOylerde eiwitten, die door de SUMO-protease SENP6 gereguleerd zijn. Het SUMO-eiwit kan zichzelf SUMOyleren en daardoor ontstaan SUMO-kettingen die doeleiwitten kunnen markeren. De functie van SUMO-kettingen is in tegenstelling tot ubiquitine-kettingen weinig onderzocht. Tot nu toe zijn SUMO-kettingen voornamelijk bekend als indirect signaal voor de degradatie van het doeleiwit. Een belangrijk eiwit in dit proces is de ubiquitine ligase RNF4. RNF4 heeft drie naast-elkaar liggende bindingplekken voor SUMO, en conjugiert daardoor ubiquitine gericht op eiwitten die met SUMO-kettingen gemarkeerd zijn. SUMO-proteasen kunnen SUMO van gemarkeerde eiwitten verwijderen en de twee SUMO-proteasen SENP6 en SENP7 doen dit specifiek voor SUMO-kettingen. De SUMOylering van SENP6- en SENP7-gereguleerde eiwitten is kortstondig en zijn daardoor onder normale omstandigheden moeilijk te detecteren. Om deze eiwitten alsnog te kunnen identificeren hebben we de expressie van SENP6 in de cel gereduceerd. Dit leidde tot een accumulatie van met SUMO-kettingen gemodificeerde eiwitten die we met behulp van massa spectrometrie konden identificeren. Wij ontdekten dat meerdere leden van het Constitutive-Centromer-Associated Network (CCAN), een belangrijk centromeer eiwitcomplex, door SUMO-kettingen gemodificeerd zijn en deze door SENP6 gereguleerd worden. Niet verwijderde SUMO-kettingen voorkomen een correcte lokalisatie van de CCAN-eiwitten, maar leiden niet tot een RNF4-afhankelijke degradatie. Wij stellen voor dat geSUMOyleerde CCAN-eiwitten door sterische hinder niet in staat zijn om een correct eiwitcomplex op het centromeer te vormen. SENP6 zorgt ervoor dat het complex kan ontstaan, de integriteit van het centromeer gewaarborgd is en bevordert daardoor een correcte celdeling.

SUMOylering is belangrijk in vele cellulaire processen, zo ook bij het repareren van DNA schade. Ons DNA, dat in elke cel te vinden is, is altijd in gevaar om beschadigd te worden. De cel heeft meerdere mechanismen om DNA schade te repareren. Bijvoorbeeld kan DNA schade geïnduceerd door ultraviolet licht (UV) door nucleotide-excision repair (NER) herstelt worden. In **hoofdstuk 5** gaan wij op zoek naar eiwitten die geSUMOyleerd worden nadat DNA schade is toegebracht, door cellen te behandeld met UV straling of ioniserende straling (IR). Meerdere eiwitten werden geïdentificeerd en één eiwit vertoonde de hoogste SUMOylering na UV straling en werd gekozen voor vervolg onderzoek: cockayne syndrome B (CSB). CSB is een belangrijk eiwit in NER en mutaties in CSB die het verlies van CSB-functie als gevolg hebben, zijn verantwoordelijk voor de verouderingsziekte Cockayne Syndroom. Wij tonen aan dat SUMOylering van CSB geen essentiële rol speelt tijdens NER, maar wel bijdraagt aan de efficiëntie van het mechanisme. Ook laten wij zien dat CSA, een ander belangrijk eiwit in NER, de stabiliteit van geSUMOyleerd CSB kan beïnvloeden. Deze invloed is indirect, en is mogelijk een consequentie van de invloed van CSA op RNA polymerase 2, ook een belangrijk eiwit in NER. Vervolg experimenten zijn nodig om dit proces beter te kunnen begrijpen, de rol van CSB-SUMOylering te achterhalen en het samenspel van CSB en de andere betrokkenen eiwitten te analyseren.

Hoofdstuk 6 neemt een kritische kijk op de experimentele data en bespreekt hoe de data in de overige literatuur past. Hypothetische modellen, die op basis van de experimentele data in dit proefschrift opgebouwd zijn, worden behandeld en bediscussieerd. Verder onderzoek moet aantonen of deze modellen de werkelijkheid weerspiegelen.