



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

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG

Proteine sind die Arbeiter der Zelle. Unsere DNA codiert für minimal 20 000 verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der Zelle. Unterschiedliche Kombinationen aus 20 verschiedenen molekularen Bausteinen, den Aminosäuren, geben jedem Protein eine einzigartige Struktur und Funktion.

Proteinfunktionen sind nicht statisch und können je nach Gebrauch, auch nach der Synthese des Proteins, vorübergehend verändert werden, oft durch Veränderungen ihrer Struktur. Diese Alterationen nennt man Posttranslationale Protein Modifikationen. SUMOylierung und Ubiquitinierung, zwei von vielen verschiedenen Posttranslationalen Protein Modifikationen werden in dieser Dissertation näher behandelt. Der Mechanismus dieser zwei Prozesse ähnelt sich und besteht aus der Bindung der kleinen Proteine Ubiquitin oder SUMO (Small-Ubiquitin like Modifier) an ein oder mehrere Lysine (Aminosäuren) die sich in der Sequenz des Zielproteins befinden. Durch diese strukturellen Veränderung kann die Funktion des Zielproteins beeinflusst werden. Das Resultat ist jedoch stark abhängig von dem Zielprotein und dem Modifikationsprotein. Zum Beispiel ist Ubiquitinierung häufig beschrieben im Zusammenhang mit dem geregelten Abbruch von Proteinen. Allerdings kann Ubiquitinierung und SUMOylierung auch andere Konsequenzen haben, wie zum Beispiel die Veränderung von Proteinbindungsstellen zur Förderung oder zur Hemmung von Interaktionen mit anderen Proteinen oder Biomolekülen. Um zu verstehen, warum Proteine von SUMO markiert werden, bedarf es der Identifizierung der Zielproteine. Um dies zu tun, habe ich validierte Techniken benutzt um erst SUMO markierte Proteine aus Zellen zu isolieren und danach mit Hilfe von Massenspektrometrie zu identifizieren. Jedes Kapitel beginnt mit der systemweiten Identifizierung von SUMO Zielproteinen unter bestimmten Konditionen um anschließend herauszufinden, welche Proteinfunktionen dadurch verändert werden.

In **Kapitel 1** meiner Dissertation biete ich dem Leser eine ausführliche Einleitung zu dem Prozess der SUMOylierung, den beteiligten Enzymen und die, für diese Dissertation relevanten, biologischen zellularen Prozesse. Dieses Kapitel bietet eine Wissensgrundlage für die Forschungsergebnisse, die in den Kapiteln 3, 4 und 5 beschrieben sind.

Eine detaillierte Rezension über bestehende Literatur, die den Schnittpunkt zwischen SUMOylierung, Ubiquitinierung und Proteostasis thematisiert, befindet sich in **Kapitel 2** und bietet zusätzliche Hintergrundinformationen für die Forschungsergebnisse in Kapitel 3.

In **Kapitel 3** stellen wir die Frage, warum die SUMOylierung von hunderten Proteinen zunimmt, wenn Zellen hohen Temperaturen ausgesetzt sind. Erhöhte Temperaturen können zu einer Entfaltung, auch Denaturierung genannt, der Proteine führen mit der Konsequenz eines Funktionsverlustes. Um dies zu verhindern und um ihre Überlebenschancen zu vergrößern, reagiert die Zelle mit dem Prozess der Hitzeschutzantwort. Dieser Prozess führt unter anderem zu der Expression von Hitzeschockproteinen, die dazu beitragen die Denaturierung zu verhindern und den geregelte Abbruch geschädigter Proteine zu fördern. Unsere Ergebnisse zeigen, dass viele Proteine anhaltend SUMOyliert bleiben, wenn der Prozess der Hitzeschutzantwort außer Kraft gesetzt wird. Wir zeigen, dass Proteine die gleichzeitig mit SUMO und Ubiquitin markiert sind, effizienter abgebaut werden und implizieren mit weiteren Resultaten, dass SUMOylierung die Löslichkeit und Zugänglichkeit von Proteinen erhöht. Damit unterstützt die globale SUMOylierung nach einem Hitzeschock den Abbruch und die Regulierung denaturierter Proteine, bis Hitzeschockproteine diese Aufgabe übernehmen können.

Kapitel 4 beschreibt die Identifizierung von SUMOylierten Proteinen, die von der SUMO protease SENP6 reguliert sind. Das SUMO Protein kann sich selbst modifizieren und bildet sogenannte SUMO-Ketten mit denen Zielproteine markiert werden können. Die Funktion dieser SUMO-Ketten ist im Vergleich zu Ubiquitin-Ketten wenig erforscht. Bisher werden SUMO-Ketten hauptsächlich als indirektes Signal zum Proteinabbau betrachtet. Ein wichtiges Protein in diesem Prozess ist die Ubiquitin-Ligase RNF4. RNF4 hat drei nebeneinanderliegende Bindungsstellen für SUMO und konjugiert deshalb Ubiquitin gezielt an mit SUMO-Ketten markierten Proteinen. SUMO-Proteasen können SUMO von markierten Proteinen abspalten und zwei dieser SUMO-Proteasen, SENP6 und SENP7, spalten gezielt SUMO-Ketten von Proteinen und können dadurch deren Abbau verhindern. Die SUMOylierung von SENP6- und SENP7-regulierten Proteinen ist kurzlebig und schwer zu identifizieren. Um diese kurzlebigen SUMOylierten Proteine erforschen zu können, haben wir die Expression von SENP6 in der Zelle stark reduziert. Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnten wir ungefähr 180 Proteine identifizieren die von SUMO-Ketten und von SENP6 reguliert werden. Darunter befanden sich mehrere Mitglieder des Constitutive-Centromer-Associated Netzwerkes (CCAN), einem Protein Komplex der eine wichtige Rolle für die Integrität von Centromeren spielt. Unsere Resultate implizieren, dass die Akkumulation von SUMO-Ketten an den CCAN Proteinen ihre korrekte Lokalisation verhindert, allerdings nicht zu einem Abbau der Proteine führt. Wir spekulieren, dass die SUMO-Ketten nicht durch RNF4 erkannt werden sondern sterisch die Formation des CCAN Komplexes verhindert. SENP6 wird benötigt, um die Bildung des Komplexes zu ermöglichen, die Integrität der Centromere zu sichern und einen fehlerfreien Zellzyklus zu fördern.

SUMOylierung ist wichtig in vielen zellularen Prozessen und spielt unter anderem eine wichtige Rolle in DNA-Reparaturmechanismen. DNA, die sich in jeder unserer Zellen befindet, ist ständig in Gefahr beschädigt zu werden z.B. durch Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung). UV-Strahlung verursacht DNA-Schäden die durch den Nukleotidexzisionsreparatur Mechanismus rückgängig gemacht werden kann. In **Kapitel 5** beschreiben wir die SUMOylierung von Cockayne-Syndrome B (CSB), die durch UV-Strahlung induziert wird. CSB ist ein wichtiges Protein für die Nukleotidexzisionsreparatur. Wir zeigen, dass die SUMOylierung von CSB keine essenzielle Rolle spielt, allerdings die Effizienz der Nukleotidexzisionsreparatur beeinflussen kann. Des Weiteren zeigen wir, dass Cockayne Syndrome A (CSA), ein zweites Protein, welches an der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden beteiligt ist, die Stabilität von SUMOylierten CSB indirekt beeinflusst. Wir spekulieren, dass CSA die Degradierung von RNA-polymerase 2, einem dritten essenziellen Protein für die Nukleotidexzisionsreparatur, direkt oder indirekt fördert und dadurch auch die Stabilität des SUMOylierten CSBs beeinflusst.

Das **Kapitel 6** setzt sich kritisch mit den experimentellen Resultaten auseinander und bietet eine Einordnung der Resultate in die bestehende Literatur. Auch bietet dieses Kapitel, auf den in dieser Dissertation besprochenen Observationen aufgebaute, hypothetische Modelle, die in der Zukunft durch das Forschungsfeld experimentell untersucht werden können.