



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Weighty synthetic ubiquitin tools to shine a light on the enzymes of the ubiquitin pathway

Tol, B.D.M. van

Citation

Tol, B. D. M. van. (2023, May 25). *Weighty synthetic ubiquitin tools to shine a light on the enzymes of the ubiquitin pathway*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3618952>

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/1887/3618952>

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

APPENDICES

Nederlandse Samenvatting

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op de ontwikkeling van onderzoekshulpmiddelen gebaseerd op het eiwit ubiquitine, om de enzymen te kunnen onderzoeken die betrokken zijn bij de zogenaamde ubiquitine route. Ubiquitine is een klein eiwit en een post-translationale modificatie die betrokken is bij bijna alle cellulaire processen en zodra het gekoppeld wordt aan een substraat eiwit, een signaal afgeeft om dit substraat eiwit te laten afbreken, te transporteren in de cel, de interactiepartners te beïnvloeden of om de stabiliteit of activiteit van het eiwit te beïnvloeden. Het koppelen en verwijderen van ubiquitine kan deze signalen of gevolgen versterken of onderdrukken. Wanneer deze processen verstoord zijn kan dat dus ernstige gevolgen hebben voor de organisatie in de cel en diens overlevingskansen. Een verstoring van deze processen heeft vaak invloed op het ontstaan of het verloop van verschillende ziektes, waaronder kanker en neurodegeneratieve ziektes. Het is daarom belangrijk dat de ubiquitine route in kaart wordt gebracht, om zo te begrijpen hoe deze route beïnvloed kan worden.

Naast dat ubiquitine aan een substraat eiwit gekoppeld kan worden, is het ook mogelijk om ubiquitine aan zichzelf te laten koppelen op de N-terminus aan methionine of aan een van de zeven lysine zijketens die aanwezig zijn in het ubiquitine eiwit. Op deze manier kunnen ubiquitine ketens gevormd worden. Er zijn verschillende soorten ubiquitine ketens; de homotypische ketens, heterotypische ketens, vertakte ketens en gemengde ketens. Homotypische ketens zijn ketens waarbij iedere volgende ubiquitine op dezelfde lysine positie van zijn voorganger gebonden wordt zoals de vorige ubiquitine op diens voorganger en gezien er acht bindingsposities mogelijk zijn, kunnen er acht verschillende homotypische ketens gevormd worden (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 en M1). Iedere homotypische keten wordt geassocieerd met verschillende cellulaire processen.

Het onderzoek in dit proefschrift is voornamelijk gericht op de enzymen die ubiquitine koppelen aan ubiquitine en andere eiwitten, de conjugerende enzymen, en de enzymen die ubiquitine weer verwijderen van ubiquitine en andere eiwitten, de deubiquitinerende eiwitten (DUBs). Het onderzoek omvat voornamelijk het vergaren van meer kennis over de selectiviteit en specificiteit van DUBs voor de verschillende soorten ubiquitine ketens. Een groot deel van het onderzoek richt zich op het gedrag van DUBs in de situatie wanneer alle verschillende soorten ubiquitine ketenes tegelijk aanwezig zijn in een mengsel. Daarnaast zijn er onderzoekshulpmiddelen ontwikkeld voor het kwantificeren van de katalytische efficiëntie van DUBs voor het enzymatisch doorknippen van verschillende ubiquitine ketenes en voor het bestuderen van de activiteit van DUBs in cellen. Het onderzoek richt zich verder op het bepalen van de selectiviteit en activiteit van enzymen die ubiquitine koppelingen maken. Alle onderzoekshulpmiddelen in dit proefschrift zijn gebaseerd op gesynthetiseerd ubiquitine wat in de verschillende hulpmiddelen is aangepast door niet-natuurlijke aminozuren of neutro-

nen-verrijkte aminozuren in te bouwen, waarbij het ene aminozuur is vervangen door een ander aminozuur op een specifieke locatie. Aan andere ubiquitine moleculen zijn fluorescente moleculen gekoppeld, waardoor deze ubiquitine moleculen gebruikt konden worden om de enzymen te bestuderen *in vitro*. De enzymatische activiteit en selectiviteit kan kwalitatief uitgelezen worden met SDS-PAGE analyse of kwantitatief uitgelezen worden door het meten van de intensiteit van het fluorescerende signaal en massaspectrometrie.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de ubiquitine route en de eerder ontwikkelde onderzoekshulpmiddelen om deze route te bestuderen. Een uitgebreid overzicht van regelmatig gebruikte hulpmiddelen, methodes en technieken gerelateerd aan massaspectrometrie om deze ubiquitine route te kunnen bestuderen wordt gegeven in dit hoofdstuk.

Hoofdstuk 2 beschrijft het ontwikkelen van een nieuwe methode om DUBs te analyseren voor hun specificiteit en selectiviteit voor verschillende type ubiquitine ketens. Hierbij wordt rekening gehouden met het feit dat alle verschillend gekoppelde ubiquitine ketens tegelijkertijd op dezelfde locatie aanwezig (kunnen) zijn in een cel en als gevolg daarvan een effect kunnen hebben op hoe snel en efficiënt zijzelf en andere ketens geknipt kunnen worden door een DUB. Om deze methode te kunnen ontwikkelen zijn acht verschillende ubiquitine ketens ontworpen en gesynthetiseerd, waarbij selectief gebruik is gemaakt van aminozuren met zwaardere, stabiele isotopen. Deze diubiquitine ketens die normaal gesproken dezelfde massa hebben, krijgen hierdoor een unieke massa en kunnen met behulp van vloeistofchromatografie gecombineerd met massaspectrometrie als de afzonderlijke ketens geïdentificeerd worden, ook als ze in een mengsel voorkomen. De set van isotoop-gelabelde ketens is vervolgens gebruikt om de activiteit van verschillende DUBs te monitoren en de competitie tussen de verschillende ketens om geknipt te worden door een DUB te analyseren. Deze nieuwe detectiemethode is heel gevoelig en kan picomolaire hoeveelheden dimeren detecteren en kwantificeren. De resultaten geven een compact en driedimensionaal overzicht van de DUB's selectiviteit over tijd, enzymconcentratie en verschillende ubiquitine ketens. De zodanig verkregen resultaten hebben geleid tot nieuwe inzichten in de selectiviteit van DUBs; zo vertonen USP enzymen selectiviteit bij lage enzymconcentraties. Dit effect was eerder waargenomen voor enzymen van OTU familie, maar van enzymen uit de USP familie werd tot dusverre altijd aangenomen dat ze helemaal niet selectief waren. Verder is er in een aantal gevallen waargenomen dat USP enzymen de ubiquitine ketens in een bepaalde volgorde knipten, wat inhoudt dat het enzym pas start met het knippen van bepaalde ketens als andere ketens al bijna volledig geknipt zijn. Dit effect is alleen waar te nemen als de selectiviteit wordt bestudeerd in een mengsel, en laat het belang van deze nieuwe techniek zien.

De onderzoeksmethode die in **Hoofdstuk 2** beschreven staat is uitgebreid en verder uitgewerkt in **Hoofdstuk 3** om ubiquitine-conjugerende enzymen te bestuderen. Hier zijn de ubiquitine monomeren gelabeld met neutronen-verrijkte aminozuren tijdens de vaste drager synthese van de monomeren. Deze gelabelde monomeren zijn vervolgens gebruikt om de acti-

viteit en selectiviteit van ubiquitine-conjugerende enzymen te bestuderen. De ubiquitine monomeren zijn zodanig gemodificeerd dat er geen polymeren gevormd kunnen worden en dat ze slechts één type ubiquitine dimeer kunnen vormen, zodat elke type ubiquitine keten een eigen karakteristieke massa meekrijgt. Dit maakt het analyseren van de resultaten een stuk minder complex. **Hoofdstuk 3** laat zien dat verschillende koppels conjugerende enzymen verschillende ubiquitine dimeer ketens kunnen bouwen van de gemodificeerde monomeren. Verder laat de data uit het hoofdstuk zien dat een specifiek enzymkoppel zijn selectiviteit behoudt, ook bij hoge enzym concentraties, wat tegengesteld is aan het geobserveerde resultaat voor DUBs. In de toekomst zou deze methode in combinatie met de gemodificeerde substraten gebruikt kunnen worden om nieuwe actieve ubiquitine-conjugerende enzym paren te vinden en direct hun activiteit en keten-selectiviteit te bepalen.

In **Hoofdstuk 2**, **Hoofdstuk 3**, **Hoofdstuk 5** en **Hoofdstuk 6** van dit proefschrift staat beschreven dat het eerste aminozuur in ubiquitine, methionine-1, altijd vervangen wordt door zijn bioisostere norleucine, Nle. Dit is gedaan om de welbekende oxidatie van de thioether in methionine te voorkomen. Deze oxidatie leidt er namelijk toe dat hetzelfde eiwit verschillende massa's kan hebben (M , $M + 16$ Da en $M + 32$ Da) wat heel nadelig kan zijn tijdens massaspectrometrische analyse. In **Hoofdstuk 4** wordt de synthese van een nieuw gethioleerd aminozuur, γ -thionorleucine beschreven. Deze bouwsteen is ontwikkeld om te fungeren als thiol donor op de ligatie locatie en kan daarna in het native aminozuur, norleucine (Nle), veranderd worden door een ontzwavelingsstap. Het nieuwe aminozuur is gesynthetiseerd in 13 stappen met een overkoepelende opbrengst van $\sim 1\%$. Na de synthese, is het nieuwe aminozuur ingebouwd op de N-terminus van ubiquitine(2-76). Nadat de koppeling heeft plaatsgevonden en het gevormde eiwit ontschermd en gezuiverd was, kon het product als N-terminaal fragment tijdens een native chemische ligatie dienen. Het Ub(1-76, γ -thioNle1) is geligeerd aan een Ub(1-76)-thioester en het product is vervolgens ontzwaveld om een volledige gesynthetiseerd lineair ubiquitine dimeer te krijgen. Na de synthese is getest of het verkregen product nog steeds herkend wordt door DUBs die de lineaire ubiquitine ketens zouden moeten knippen. Hiervoor zijn OTULIN, een DUB die specifiek is voor lineaire ketens, en USP21 en USP16, die onder andere lineaire ubiquitine ketens kunnen knippen, geselecteerd. SDS-PAGE analyse liet zien dat het knippen van uit expressie verkregen lineaire ubiquitine dimeren efficiënter gaat dan het knippen van de gesynthetiseerde dimeren. Dit kan mogelijk verklaard worden door een onzuiverheid. Het minder efficiënt knippen in combinatie met de schouder van de productpiek die te zien was in een analyse met massaspectrometrie, gaf aanleiding om de vraag te stellen of het product wel zuiver was en wat het gevormde bijproduct kon zijn. Het bijproduct had exact dezelfde massa als het gewenste product en volgens een circulair dichroïsme (CD) analyse kon dit niet verklaard worden door een verkeerd gevouwen eiwit. De chirale zuiverheid van het nieuw gesynthetiseerde aminozuur is vervolgens geanalyseerd door de optische rotatie te bepalen. Echter waren er twee chirale

centra aanwezig in het nieuwe aminozuur, S^tBu γ -thio (Boc)-Nle-OH, wat opgelost kon worden door de zwavelgroep te verwijderen via de standaard ontzwavelingscondities die gebruikt maakt radicalen om (Boc)-Nle-OH te verkrijgen. Het product is vergeleken met commercieel verkrijgbaar (Boc)-L-Nle-OH en de conclusie was dat het synthetische aminozuur een mengsel van twee enantiomeren was. De stereoisomeren van het synthetische lineaire ubiquitine dimeer konden met een vlak gradient met RP-HPLC gescheiden worden. De producten werden opnieuw geanalyseerd en het zuivere lineaire ubiquitine dimeer werd net zo efficiënt geknipt door OTU-LIN als het geëxprimeerde materiaal.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van alle zeven isopeptide gekoppelde ubiquitine dimeer FRET paren en het gebruik van deze FRET paren om de specificiteit van DUBs voor bepaalde ubiquitine bindingen te kwantificeren. Op de N-terminus van Ub(1-75, Nle1) werd een *N,N'*-Boc-beschermde Rhodamine molecuul gekoppeld en de C-terminus werd gemodificeerd met een methyl-3-(glycylthio)-propionaat. Het product is de proximale ubiquitine. De distale ubiquitine bevat een γ -thioLys op elke respectievelijke lysine positie en een 5-carboxy-TAMRA groep op de N-terminus. Om de uiteindelijke FRET paren te verkrijgen zijn de proximale en de distale ubiquitine aan elkaar gekoppeld via een natieve chemische ligatie, gevolgd door ontzwaveling van de overgebleven thiol groep. Hierna werd de DUB specificiteit en enzym efficiëntie van de goed-bestudeerde DUBs USP7, USP8 en OTUD2 voor de verschillende FRET paren en ongelabelde ubiquitine dimeren bepaald met SDS-PAGE. Kwalitatief is de DUB specificiteit in overeenstemming met de literatuur. Hierna zijn de FRET paren gebruikt om de specificiteit van negen DUBs, van drie verschillende enzym families, voor ubiquitine ketens te kwantificeren. Door het meten van de toename in donor fluorescentie over tijd konden de Michaelisconstante, K_M , en de katalytische omzettingssnelheid, k_{cat} , bepaald worden met de Michaelis-Mentenvergelijking. De kinetische waarnemingen gaven meer inzicht in het proces wat plaatsvindt bij het verwijderen van ubiquitine (ketens), zoals het verschil in katalytische efficiëntie van verschillende DUBs voor verschillende ubiquitine ketens en de toename van de katalytische efficiëntie van DUBs die gefuseerd waren met hun natuurlijke activator, AMSH met STAM2 en OTUB1 met UBE2D2.

Gezien de FRET paren het mogelijk maken om de kinetische parameters van DUBs voor verschillende ubiquitine ketens te kwantificeren, zouden de FRET paren gebruikt kunnen worden om alle DUBs uit **Hoofdstuk 2** te bestuderen en kwantificeren. Hierna zou gekeken kunnen worden of de geobserveerde verschillen van het knippen van verschillende ketens door verschillende DUBs in **Hoofdstuk 2** verklaart zou kunnen worden met de verschillen in kinetische parameters van de DUBs voor de verschillende ketens.

In **Hoofdstuk 6** is het concept uit de literatuur om het covalent labelen van eiwitten te combineren met fluoroforen die 'aan gaan' na een bepaalde trigger of gebeurtenis, verder uitgezocht en uitgebreid naar eiwitten van de ubiquitine route. Er zijn twee verschillende soorten moleculen die gebaseerd zijn op ubiquitine met een activeerbare fluorofoor, ontworpen en gesyntheti-

seerd. Beide moleculen kunnen reageren met de cysteïne in het actieve centrum van het enzym en vormen een covalente binding tussen het ubiquitine molecuul en het enzym. Het eerste molecuul zal 'aan gaan' nadat het molecuul gebonden wordt aan de cysteïne in het actieve centrum omdat de dubbele binding in het molecuul gereduceerd wordt wat leidt tot het verbreken van de kruisconjugatie met het amino-coumarine derivaat en het opheffen van de blokkade van het fluorescente signaal. Drie verschillende moleculen met een verschillende ubiquitine(-achtige) variant als eiwit zijn gesynthetiseerd met dit type activeerbare fluorofoor. Het tweede type moleculen bevat een reactieve groep op de C-terminus van het ubiquitine eiwit waarvan een deel van het molecuul zal afsplitsen nadat het molecuul gereageerd heeft met de cysteïne in het actieve centrum van het enzym. Een fluorescente uitdover, QSY-7 of QSY-9, is gekoppeld aan het gedeelte van de reactieve groep die afsplitst na de reactie met cysteïne waardoor het fluorofoor, 5-carboxy TAMRA of Rhodamine, wat aan de N-terminus van het ubiquitine molecuul geïnstalleerd is, niet meer uitgedoofd wordt na koppeling met het enzym. Vier verschillende versies van dit molecuul zijn gesynthetiseerd, allemaal met verschillende combinaties van de fluoroforen en uitdovers. Het gevormde covalente product van de verschillende moleculen met een actieve DUB of protease kan zichtbaar gemaakt worden met SDS-PAGE analyse en massaspectrometrie. Het activatie-effect na het vormen van een covalent complex werd aangetoond met fluorescentie scans, zowel met een spectrale- als een intensiteitsscan. Er wordt vanuit gegaan dat deze moleculen ook covalente complexen kunnen vormen met actieve DUBs in cellen om actieve DUBs covalent en fluorescent te kunnen labelen *in cellulo*.

Van alle vier moleculen met fluorofoor-uitdover paren, werkte het molecuul met de Rhodamine en QSY-9 het beste als gekeken wordt naar oplosbaarheid in een waterige buffer, de efficiënte waarmee het fluorescent signaal wordt uitgedoofd, en hoeveel het fluorescent signaal toeneemt als de uitdover niet meer werkt. Het molecuul kan verder verbeterd worden door er een celmembraan-doordringend peptide (CPP) aan te koppelen om de eventuele elektroporatie stap over te kunnen slaan tijdens *in cellulo* experimenten. Verder zou er een handvat aan het molecuul gezet kunnen worden, bijvoorbeeld biotine, zodat actieve DUBs na het fluorescent labelen direct ingevangen kunnen worden uit een cel extract. Al moet voor het installeren van dit handvat wel de juiste lengte en type koppeling geselecteerd worden.

Afsluitende opmerkingen

Het ubiquitineren van eiwitten is een van de meest bestudeerde modificaties die plaatsvindt na de translatie van een eiwit. Ondanks dat er vele moleculen, onderzoekshulpmiddelen en technieken bedacht en getest zijn en veelvuldig gebruikt worden om de ubiquitine route te bestuderen, willen we deze route nog beter begrijpen en voornamelijk wat het resultaat is van bepaalde input op het verloop in de route. Om de ubiquitine route beter te bestuderen, kunnen oude onderzoekshulpmiddelen en technieken gecombineerd worden, maar het ontwikkelen van nieu-

we hulpmiddelen en technieken is ook van belang. Samengevat, beschrijft het onderzoek in dit proefschrift niet alleen de syntheseroute van zes verschillende nieuwe moleculen, die allemaal op ubiquitine gebaseerd zijn, maar wordt ook de ontwikkeling van nieuwe testen om de enzymen van de ubiquitine route te bestuderen beschreven. Deze enzymen kunnen hiermee bestudeerd worden onder verschillende condities, die iets meer lijken op de fysiologische omgeving van de enzymen in cellen en organismen. Het onderzoek in dit proefschrift focust voornamelijk op de enzymen die ubiquitine op eiwitten installeren en weer verwijderen.

Het ontwikkelen van het eerste volledig synthetische lineaire ubiquitine dimeer (**Hoofdstuk 4**), welke direct is toegepast om de complete set van acht verschillende gekoppelde neutronen-verrijkte ubiquitine dimeren te maken, die weer kunnen dienen als substraat voor competitie experimenten waar de selectiviteit van DUBs in de aanwezigheid van alle diubiquitine ketens wordt ge-(her)evalueerd (**Hoofdstuk 2**). Deze test biedt nieuwe inzichten in de selectiviteit voor en volgorde waarin ubiquitine ketens geknipt worden door DUBs. Deze gemultiplexte test werd vertaald naar het gedeelte waar de ubiquitine route die ketens bouwt om de selectiviteit en activiteit van de keten-bouwende enzymen te bestuderen (**Hoofdstuk 3**). Met deze test is het mogelijk om snel de activiteit van E2 enzymen en actieve E2/E3 enzymen te detecteren, terwijl tegelijkertijd direct kan worden gekeken welke ketens ze bouwen in dezelfde uitleesstap. Verder zijn er drie verschillende moleculen gesynthetiseerd op basis van ubiquitine die fluorescente (**Hoofdstuk 5**) of fluorogene kleurlabels (**Hoofdstuk 6**) bevatten. Deze moleculen zijn toegepast om de katalytische activiteit van DUBs te kwantificeren en om actieve DUBs fluorescent te labelen zonder achtergrond signaal.

De nieuwe ontwikkelde moleculen en testen hebben geleid tot nieuwe inzichten in de selectiviteit, specificiteit en activiteit van DUBs en keten-bouwende enzymen. Nieuwe inzichten in de mechanismes van de enzymen zijn verkregen en met deze testen wordt het screenen van de selectiviteit en activiteit van nieuw te ontdekken DUBs en keten-bouwende enzymen makkelijk en sneller. Gezien alle ontworpen en gesynthetiseerde moleculen gemaakt zijn via vaste drager eiwit synthese, kunnen niet alleen op ubiquitine-gebaseerde moleculen, maar ook ubiquitine-achtige eiwitten (zoals bijvoorbeeld SUMO, NEDD8, ISG15) gemaakt worden. Het onderzoek wat wordt beschreven in dit proefschrift kan daarom makkelijk uitgebreid worden naar ubiquitine-achtige eiwit routes of gebruikt worden om te kijken hoe de ubiquitine route en de ubiquitine-achtige eiwit routes met elkaar praten en interactie aangaan.

Ondanks dat de uitdagingen om de ubiquitine route van binnen en buiten te bestuderen nog lang niet allemaal opgelost zijn, heeft dit proefschrift wel de weg vrij gemaakt om nieuwe en unieke inzichten in het bouwen en verwijderen van ubiquitine ketens en de enzymen die daar verantwoordelijk voor zijn te geven en is de weg naar een compleet begrip van de ubiquitine route een stukje verder bewandelt.