



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Proteomics and Functional Investigation of SUMO and Ubiquitin E3 ligases

Salas Lloret, D.

Citation

Salas Lloret, D. (2023, October 10). *Proteomics and Functional Investigation of SUMO and Ubiquitin E3 ligases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3643201>

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/1887/3643201>

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



APPENDIX

&

SAMENVATTING

In dit proefschrift focussen we op de post-translationele modificatie van eiwitten (PTM) met speciale aandacht voor Ubiquitinatie en SUMOylatie. We beschrijven zowel de Ubiquitine- als de SUMO E3-ligase families en laten niet alleen de verschillende mechanismen zien om respectievelijk Ubiquitine of SUMO aan een substraateiwit te conjugereren, maar ook de signaalroutes waarbij ze betrokken zijn. Naast monomeren kunnen E3's ook polymeren van ubiquitine of SUMO koppelen aan een substraateiwit waardoor polymeren ontstaan. Afhankelijk van het ketentype en de polymeermorfologie zal dit tot verschillende cellulaire uitkomsten leiden. Aan het einde van hoofdstuk 1 analyseren we de voordelen en beperkingen van huidige massaspectrometrie (MS)-benaderingen om zowel Ubiquitine- als SUMO-conjugaten te identificeren.

In hoofdstuk 2 bespreken we recente literatuur over DNA-schadeherstel (DDR) en hoe dit wordt georkestreerd door verschillende E3-ligasen. Van deze E3's richten we ons op BRCA1-BARD1 als een van de belangrijkste coördinatoren van de DDR en de implicaties ervan voor borst- en eierstokkanker. De BRCA1-BARD1 heterodimeer wordt gevormd door de interactie van BRCA1 en BARD1 via hun RING-domeinen (Really Interesting New Gene). De vorming van dit heterodimeer is essentieel voor de enig bekende enzymatische activiteit, met slechts één goed gedefinieerd ubiquitine substraat, het histon H2A. Na meer dan 30 jaar onderzoek naar BRCA1, blijft de biologische relevantie van de E3-ligase-activiteit onduidelijk en is de rol in het repareren van DNA schade via homologe recombinatie (HR) en de rol bij het onderdrukken van tumoren nog steeds niet opgelost. We bespreken de controverse over dit heterodimeer en de huidige richtingen in het veld. Om dit hoofdstuk af te ronden, onthullen we verschillende manieren om de ubiquitine machinerie aan te pakken en de DDR te beheersen om kanker te overwinnen.

In hoofdstuk 3 hebben we een massaspectrometrie-techniek ontwikkeld die we Target of Ubiquitin Ligases Identified by Proteomics 2 (TULIP2) noemen. Er zijn veel ziektes, waaronder neurodegeneratieve aandoeningen en types kanker, die het gevolg zijn van ontregeling van E3-ligasen. TULIP2 maakt de identificatie mogelijk van specifieke substraten van deze E3-ligasen met behulp van MS en biedt daardoor nieuwe mogelijkheden om een bepaalde ziekte aan te pakken. In vergelijking met eerdere methodologieën verhoogt TULIP2 meer dan 50 keer de opbrengst van ubiquitinatie conjugaten en acht keer het signaal van de E3-ligase die wordt bestudeerd. Over het algemeen biedt dit hoofdstuk een duidelijke en gedetailleerde methodologie die kan worden geïmplementeerd in elk laboratorium dat geïnteresseerd is in de identificatie van substraten van een E3-ligase.

De TULIP2-methodologie kan worden aangepast om SUMO-conjugaten te vangen door de gefuseerde ubiquitine te vervangen met een SUMO-groep. In hoofdstuk 4 hebben we SUMO Activated Target Traps (SATTs) ontwikkeld, die volgens de TULIP2-methodologie de identificatie van een E3-specifiek SUMO-proteoom mogelijk maakten. Met behulp van

acht verschillende SUMO E3-ligasen (PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, NSMCE2, ZNF451, LAZSUL (ZNF451-3) en ZMIZ2) identificeerden we 427 potentiële SUMO1 en 961 potentiële SUMO2/3 substraten op een E3-specifieke manier. Hoewel we overlap vonden tussen E3-ligasen, vonden we ook een hoge specificiteit, zelfs op het substraat-isoformniveau. Om op een gebruiksvriendelijke manier door de dataset te kunnen bladeren, hebben we de online webapp Polar Volcano plots ontwikkeld, die vrij toegankelijk is (Polar Volcano plots (shinyapps.io)).

Vervolgens hebben we TULIP2-technologie gebruikt om borst- en eierstokkanker te bestuderen. In hoofdstuk 5 hebben we zowel BRCA1-TULIP2 als BARD1-TULIP2 gegenereerd om BRCA1-BARD1-specifieke ubiquitine substraten te identificeren. BRCA1 en BARD1 erfelijke mutaties worden in verband gebracht met een hoog risico op het ontwikkelen van borst- en eierstokkanker. Het vinden van BRCA1-BARD1-ubiquitine substraten is cruciaal om de E3-activiteit ervan te begrijpen en daarmee nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van kanker. Door TULIP2 methodologie te gebruiken, ontdekten we dat BARD1 bij voorkeur substraten ubiquitineert die verschillen van BRCA1. Naast het bekende doelwit H2A, ontdekten we dat de macro H2A (m2HA)-variant een specifiek doelwit is, en PCNA lijkt het belangrijkste ubiquitine substraat te zijn tijdens normale groeiomstandigheden. We rapporteren dat BARD1-gemedieerde PCNA-ubiquitinatie betrokken is bij het voorkomen van accumulatie van enkelstrengs DNA (ssDNA), in tegenstelling tot RAD18-gemedieerde PCNA-ubiquitinatie, die betrokken is bij het repareren van UV-geïnduceerde DNA schade. Bovendien ontdekten we dat de katalytische dode mutant van BRCA1 niet wordt gefosforyleerd op S114, wat leidt tot een gecompromitteerde bescherming van de replicatievork. Over het algemeen concluderen we dat BRCA1-BARD1 E3-activiteit belangrijk is voor genetische stabiliteit door de homeostase van de replicatievork te reguleren in plaats van betrokken te zijn bij het HR-pad, wat nieuwe therapeutische mogelijkheden opent.

In hoofdstuk 6 zochten we specifieke substraateiwitten voor een E2-conjugerend enzym, UBE2D3. Uit eerder onderzoek blijkt dat deze E2 interacteert met BRCA1-BARD1 op plaatsen met DNA-schade en met RNF8 voor PCNA-ubiquitinatie. UBE2D3 wordt doorgaans gebruikt als E2 voor in vitro ubiquitinatie, de rol in vivo is echter nog niet gedefinieerd. In hoofdstuk 6 hebben we op SILAC gebaseerde en labelvrije kwantitatieve ubiquitine diGly proteomics uitgevoerd, samen met TULIP2-technologie, om globale proteoom- en ubiquitinome-veranderingen na UBE2D3 depletie te onderzoeken. Het ubiquitine-proteoom verandert volledig na UBE2D3-depletie, wat een prominent effect heeft op moleculaire routes die verband houden met mRNA-translatie. Met de UBE2D3-TULIP2-methodiek waren we in staat om, naast PCNA als reeds bekend substraat, twee ribosomale eiwitten (RPS10 en RPS20) als specifieke substraten te detecteren, die cruciaal zijn voor ribosoom-geassocieerde eiwitkwaliteitscontrole (RQC). Ubiquitinatie van RPS10 en RPS20 was ook UBE2D3-afhankelijk in SILAC en diGly proteomics, wat een nieuwe in vivo rol voor UBE2D3 onthulde.

In het laatste hoofdstuk geven we enkele inzichten over de keuzemogelijkheden voor MS-experimenten, afhankelijk van het onderzoeksdoel, en bespreken we het TULIP2-technologiepotentieel, dat in dit proefschrift is ontwikkeld. Vervolgens bespreken we verschillende MS-benaderingen en nieuwe trends om E3-ligase doeleiwitten te identificeren. We bespreken onze bevindingen op het gebied van SUMO in de context van de gepubliceerde literatuur om te laten zien hoe een voorheen verondersteld klein post-translationeel modificatienetwerk zeer complex en geavanceerd blijkt te zijn. Daarnaast bespreken en tonen we het potentieel van MS voor het monitoren van borst- en eierstokkanker, waarbij we verschillen in het ubiquitine-proteoom observeren. Ten slotte bespreken we hoe al onze bevindingen van potentieel nut kunnen zijn in de kliniek.

