



**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).

## RESUMEN POPULAR

Las células constituyen los tejidos de nuestro cuerpo y son las encargadas de producir cambios ante diferentes situaciones, como por ejemplo producir saliva cuando vemos comida, aumentar la temperatura cuando combatimos patógenos o taponar las heridas que nos hacemos. Sin embargo, hay acciones que en ocasiones no percibimos, como por ejemplo la reparación del ADN cuando se ha dañado. El ADN se encuentra en el núcleo de las células y puede ser transcrito y traducido a proteínas, las cuales van a participar en la mayoría de los procesos celulares. Muchas proteínas se encuentran en las células mientras que otras se sintetizan cuando es conveniente. No obstante, hay situaciones donde se requiere que una proteína desaparezca o que vaya a un lugar determinado. Es entonces cuando estas proteínas se pueden modificar. En el capítulo 1 hablamos de estas modificaciones, más conocidas como modificaciones post-traduccionales de las proteínas. Entre ellas, nos centramos en la adición de pequeñas proteínas como ubiquitina (Ub) o Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO), resultando en ubiquitinación o SUMOylacion respectivamente. Estas proteínas son conjugadas a una proteína diana mediante la acción de una cascada enzimática que involucra tres enzimas: E1, E2 y E3. Esta última se denomina E3 ligasa y es la responsable de dirigir Ub o SUMO a una proteína diana. El papel más conocido de la ubiquitinación es el de hacer desaparecer una proteína mediante su degradación. Una forma de identificar proteínas es el uso del espectrómetro de masas, el cual se ha desarrollado vertiginosamente en los últimos años.

En el capítulo 2, revisamos trabajos recientes donde las E3s juegan un papel importante en la reparación del ADN. Cuando el ADN no se repara de manera adecuada da lugar a mutaciones, que si ocurren en proteínas encargadas de controlar la proliferación celular, pueden originar enfermedades como el cáncer. Entre estas E3s, nos centramos en BRCA1-BARD1 como uno de los protagonistas principales que coordinan la respuesta a daño en el ADN (DDR). BRCA1 es una proteína multifuncional, y forma un heterodímero con BARD1 que confiere actividad E3 de ubiquitina. Se ha demostrado que esta proteína es esencial para reparar los cortes de doble cadena (DSBs) en el ADN por una vía de reparación que se conoce como Recombinación Homóloga (HR). Sin embargo, el papel de su actividad E3 para reparar estos DSB es controvertido. Mutaciones en estas proteínas resultan en altas probabilidades de desarrollar cáncer de mama y ovario y, después de más de 30 años investigándolas, su actividad E3 para prevenir estas enfermedades es todavía desconocida.

En el capítulo 3, desarrollamos una tecnología basada en espectrometría de masas con la que podemos identificar las proteínas diana de las E3s de ubiquitina. Esta herramienta la hemos llamado Targets for Ubiquitin Ligases Identified by Proteomics 2 (TULIP2). La desregulación de E3s no está asociada solo con cáncer, sino también con otras patologías como enfermedades neurodegenerativas. Utilizando el TULIP2 podemos identificar las proteínas diana de una E3 de interés para conocer mejor su función y el porqué de una

enfermedad. Conociendo estas proteínas podemos desarrollar fármacos para dar nuevas oportunidades terapéuticas.

La tecnología TULIP2 se puede modificar para identificar las proteínas diana de las E3s de SUMO en vez de las de ubiquitina. En el capítulo 4 presentamos las SATTs (SUMO Activated Target Traps), donde hemos cambiado Ub por SUMO en el constructo TULIP2. La tecnología SATT nos ha permitido identificar proteínas SUMOyladas para ocho E3 ligasas diferentes de manera específica (PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, NSMCE2, ZNF451, LAZSUL (ZNF451-3) y ZMIZ2). En total hemos identificado 427 proteínas diana de SUMO1 y 961 de SUMO2/3. Además, hemos diseñado una herramienta web para explorar qué E3 ligasa modifica una proteína diana de interés (Polar Volcano plots ([shinyapps.io](http://shinyapps.io))).

En el capítulo 5 hemos empleado la tecnología TULIP2 para identificar las proteínas diana de BRCA1-BARD1 y poder determinar cuál es su función biológica. A día de hoy los tratamientos contra el cáncer de mama que son BRCA1 deficientes se basan en fármacos que causan cortes de doble cadena (DSB) en el ADN, aprovechando que estas células no tienen la proteína BRCA1 o la tienen mutada, y por tanto, no pueden reparar estos DSBs. Desafortunadamente, surgen variantes de cáncer que restauran la capacidad de reparar los DSBs y confieren resistencia contra estos tratamientos. Algunas de estas variantes vienen de versiones de BRCA1 que no poseen actividad E3, pero si pueden reparar los DSBs. Por este motivo averiguar las proteínas diana de BRCA1-BARD1 puede ayudar a abrir nuevas posibilidades contra estas variantes. El TULIP2 de BARD1, además de identificar la histona H2A como la proteína diana más conocida para este heterodímero, ha permitido detectar otra más, PCNA. Las células proliferan y, si son tumorales, lo hacen de manera más rápida y menos controlada. Para ello, las células tienen que replicar el ADN y PCNA se ubiquitina para controlar este proceso. Si hay problemas en la replicación, esta se para y se protege para evitar daños en el ADN. Nosotros hemos observado que la ubiquitinación de PCNA mediada por BRCA1-BARD1 evita que se acumule ADN de cadena sencilla, cuya acumulación resulta en daño en el ADN. Además, hemos observado que la actividad E3 de BRCA1-BARD1 es importante para la protección de la replicación. Cuando utilizamos fármacos que alteran la replicación, como por ejemplo hydroxyurea, las células con mutaciones en BRCA1 que no tienen actividad E3, resultan más sensibles que las células sanas. Con estas observaciones, nuestro trabajo ofrece nuevas oportunidades terapéuticas contra variantes de cáncer de mama que no disponen de la actividad E3 en BRCA1.

La tecnología TULIP2 también se puede emplear para averiguar las proteínas diana de las E2s. En el capítulo 6, hemos empleado diferentes estrategias basadas en espectrometría de masas para averiguar los procesos celulares en los que la E2 UBE2D3 está involucrada. Entre las diferentes estrategias hemos utilizado SILAC, LFQ-DiGly y el TULIP2. Las tres estrategias han permitido identificar proteínas involucradas en diferentes procesos celulares como el procesamiento del ARNm y en el control de la calidad de las proteínas producidas en los ribosomas (RQC). La identificación de las proteínas diana de

esta E2 ha revelado un nuevo papel de UBE2D3 *in vivo* que hasta entonces era desconocido.

En el último capítulo se discute sobre diferentes métodos que se pueden emplear utilizando espectrometría de masas, el potencial que tiene la tecnología TULIP2 que se ha desarrollado en esta tesis y cómo se podrían implementar los avances que hemos originado en la clínica.