

Appendix

Summary

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Portfolio

Dankwoord

Summary

The 26S proteasome complex plays a central role in the cell through its major function in the selective degradation of ubiquitinated proteins. Consequently, malfunctioning of this protein complex could result in the development of diseases such as cancer or neurodegenerative disorders. Inhibition of proteasome activity with chemical inhibitors is used for the treatment of multiple myeloma patients, however the biological mechanism behind this type of treatments are not fully understood. In the research described in **chapter 3** we aimed to get more insight in the cellular response at both the proteome and ubiquitinome level upon inactivation of the proteasome in *Drosophila* S2 cells. Chemical inhibition through MG132 and Lactacystin (MG132/Lact) or proteasome subunit knockdown (KD) of Prosalph α 5, Prosbeta6 and RPN11 were used for proteasome inactivation, while the effect on the proteome and ubiquitinome were monitored through the use of a SILAC-based quantitative mass spectrometry approach. Proteome changes ranged between approximately 4% (4hrs MG132/Lact) and 10% (16hrs MG132/Lact, 2 and 4 days KD), which were either the result of protein accumulation or *de novo* protein synthesis of for instance stress responsive proteins. Next, we focused on global ubiquitinome dynamics. Over all SILAC experiments we identified over 14,000 unique diGly peptides (which are derived from ubiquitinated proteins) of which approximately 70% displayed increased abundances upon proteasome inactivation. Data from the different conditions greatly overlapped with increased ubiquitination observed for proteins involved in diverse processes such as cell cycle regulation, (ubiquitin-dependent) protein catabolism, cytoskeleton and mitotic spindle organization, apoptosis, proteolysis and metabolism. Overall, increased protein fold changes were accompanied by increased diGly peptide fold changes, which is also expected when ubiquitinated proteins accumulate due to proteasome inactivation. However, there were also exceptions, of which the basis may be found in other signaling events. In conclusion, we showed that we could mimic chemical proteasome inhibition through the use of dsRNA-mediated knockdown of specific proteasome subunits. Both treatments resulted in a similar extent of proteome and ubiquitinome dynamics, mainly resulting from (ubiquitinated) proteins present with increased fold changes as a result of either protein accumulation or *de novo* protein synthesis. This approach offers possibilities for the investigation of each individual proteasome complex component in detail.

In **chapter 4** we applied a similar strategy as used in chapter 3, now with the aim to acquire more insight in the role and specificity of the three proteasome-bound deubiquitinating enzymes (DUBs) in proteasome-mediated degradation. We performed dsRNA-mediated knockdown of USP14, UCHL5 and RPN11 followed by large scale SILAC proteomics, ubiquitinome analysis and label free quantitative mass spectrometry. Our data suggest that RPN11 is important for the stability and function of the 26S proteasome complex and is essential for the degradation of the large majority of proteasome substrates. In contrast, knockdown of UCHL5, USP14 or

simultaneous knockdown of both did not alter the stability of the proteasome, nor did it have an observable effect on global protein or diGly peptide abundances. Thus, while we observed many targets for deubiquitination via RPN11, no specific substrates for USP14 or UCHL5 were identified. Also, poly-ubiquitin linkage type analysis did not reveal specificity towards a specific linkage type for any of the DUBs. In conclusion, our data imply that RPN11 is the major DUB for proteasome-mediated protein degradation while the role of UCHL5 and USP14 remains unclear.

In **chapter 5** we investigated how the proteasome adapts to different intracellular environments by characterizing its dynamic interactomes under several stress conditions. Applied stress conditions include oxidative stress (H_2O_2), endoplasmic reticulum (ER) stress (Tunicamycin) and cytotoxic stress (proteasome inhibitors MG132/Lact). Proteasomes were purified from *Drosophila* S2 cell lysates using antibodies for Rpn8 and Rpn10 and Label Free quantitative mass spectrometry of triplicate samples was used to characterize interaction partners of the 19S/26S proteasome. Enhanced association of 20S core particles and several proteins, including Hsp23, Hsp68, REG (PA28) and Ref(2)p, as well as a putative novel UBL-domain containing Ub shuttle protein CG7546 (Human Bat3) with the 19S cap were observed upon MG132/Lact treatment. In contrast, Ub shuttle protein Rad23 associated with the 19S/26S proteasome only under non-stress conditions. Finally, deubiquitinating enzyme UCHL5 was an interaction partner of the proteasome under all tested conditions, however it was clearly recruited less under non-stress conditions. Further research is required to elucidate the role of enhanced recruitment of UCHL5 at proteasomes under stress conditions. Together, these data give more insight in the dynamics of proteasome-mediated protein degradation under different intracellular conditions, which might be relevant for the understanding of proteasome functioning and regulation in disease states.

Ecdysone is a hormone which plays an important role in insect development. This hormone induces ecdysone-responsive gene expression through interaction with its nuclear receptor (EcR). With the research described in **chapter 6** we aimed to gain more in-depth knowledge about different levels of the ecdysone-signaling pathway. Using a RNA sequencing or a SILAC-based global proteomics approach we monitored and compared global transcriptome resp. global proteome dynamics at different time points after ecdysone stimulation. We identified both known and unknown ecdysone-responsive genes and proteins, however there were clear timing differences between the transcriptional and translational response, which made it difficult to correlate mRNA with proteins at the same time points. We also analyzed the EcR interactome after ecdysone stimulation, and identified proteins with a role in ecdysone signaling, ecdysone biosynthesis, transcription, chromatin remodeling, and other proteins as interaction partners. Novel ecdysone responsive genes, proteins and EcR interaction partners identified in this study would be interesting targets for further detailed (biochemical) studies in cell culture or in the fly.

Nederlandse samenvatting

Het 26S proteasoom complex speelt een centrale rol in de cel door zijn belangrijke functie in de selectieve afbraak van geubiquitineerde eiwitten. Als dit belangrijke eiwit complex niet meer goed functioneert, kan dat resulteren in de ontwikkeling van ziektes zoals kanker of neurodegeneratie. Daarentegen kan het blokkeren van de activiteit van dit complex in sommige gevallen juist gebruikt worden voor de behandeling van patiënten, bijvoorbeeld voor patiënten met de ziekte van Kahler (multipel myeloom). Het biologische mechanisme achter dit type van behandeling is nog niet helemaal bekend. Het doel van ons onderzoek wat beschreven is in **hoofdstuk 3** was om meer inzicht te krijgen in de reactie van de cel na blokkering van het proteasoom. We hebben een analyse gedaan in cellen van een fruitvlieg (S2 cellen) op het niveau van het proteoom (verzameling van alle gemeten eiwitten) en het ubiquitinoom (verzameling van alle gemeten geubiquitineerde eiwitten/diGly peptiden). De kanttekening die we hier willen maken is dat we in deze samenvatting wel spreken over het meten van geubiquitineerde eiwitten omdat dat begrijpelijker klinkt, maar in wezen hebben we diGly peptiden gemeten welke afkomstig zijn van geubiquitineerde eiwitten na digestie met het enzym trypsine. We hebben 2 verschillende manieren gebruikt om het proteasoom te blokkeren. Ten eerste hebben we de veelgebruikte chemische blokkers MG132 en Lactacysteine (MG132/Lact) gebruikt. Ten tweede hebben we dubbelstrengs RNA gebruikt voor 3 onderdelen van het proteasoom (Prosalph5, Prosbeta6 en RPN11), wat zorgt voor het post-transcriptioneel verminderen van genexpressie voor deze specifieke onderdelen. Het effect van deze behandelingen op het proteoom en ubiquitinoom werd gemonitord door gebruik te maken van een op SILAC-gebaseerde methode van kwantitatieve massaspectrometrie. Hiermee kunnen we zien welke eiwitten, respectievelijk geubiquitineerde eiwitten, relatief meer of minder aanwezig waren na een behandeling. Na een korte behandeling (4 uur MG132/Lact) zagen we relatieve veranderingen in ongeveer 4% van het proteoom en na lange behandelingen (16 uur MG132/Lact, 2 en 4 dagen vermindering van genexpressie) zagen we relatieve veranderingen in ongeveer 10% van het proteoom. Dit was het gevolg van eiwit ophoping of van eiwit synthese, bijvoorbeeld van eiwitten die reageren op stress. Daarna hebben we gekeken naar relatieve veranderingen in het ubiquitinoom. Met alle SILAC experimenten bij elkaar hebben we meer dan 14000 unieke diGly peptiden geïdentificeerd, waarvan ongeveer 70% meer aanwezig was na blokkering van het proteasoom. Eiwitten die meer geubiquitineerd waren speelden een rol in verschillende processen zoals de regulatie van de celcyclus, (ubiquitine-afhankelijke) eiwit katabolisme, de organisatie van het cytoskelet en de spoelfiguur, apoptose, proteolyse en metabolisme. Over het algemeen waren eiwitten die relatief meer aanwezig waren na de behandelingen ook meer geubiquitineerd, wat ook de verwachting was als geubiquitineerde eiwitten ophopen als gevolg van de inactivatie van het proteasoom. Er waren echter ook uitzonderingen, waarvan de basis waarschijnlijk gevonden kan worden in andere signaal transductie paden. We kunnen concluderen dat we de chemische proteasoom blokkering konden nabootsen door gebruik te maken van specifieke vermindering van

genexpressie met behulp van dubbelstrengs RNA voor specifieke onderdelen van het proteasoom. Beide behandelingen resulteerden in vergelijkbare mate van proteoom en ubiquitinoom dynamiek, wat vooral het gevolg was van (geubiquitineerde) eiwitten die meer aanwezig waren als gevolg van eiwit ophoping of synthese. Deze methode biedt mogelijkheden voor het in detail onderzoeken van de individuele onderdelen van het proteasoom.

In **hoofdstuk 4** hebben we dezelfde strategie toegepast als in hoofdstuk 3, nu met het doel om meer inzicht te krijgen in de rol en de specificiteit van de drie proteasoom-gebonden deubiquitinerings enzymen in proteasoom-afhankelijke eiwit afbraak. We hebben dubbelstrengs RNA gebruikt voor vermindering van genexpressie voor USP14, UCHL5 en RPN11. We hebben daarna gekeken naar relatieve veranderingen in het proteoom en ubiquitinoom door gebruik te maken van kwantitatieve massaspectrometrie met behulp van SILAC. Daarnaast hebben we ook biochemische technieken gebruikt. Onze data laat zien dat RPN11 belangrijk is voor de stabiliteit en de functie van het 26S proteasoom complex en dat het essentieel is voor de afbraak van het merendeel van de eiwitten. Daarentegen had vermindering van genexpressie van UCHL5 en/of USP14 geen effect op de stabiliteit van het proteasoom en ook niet op relatieve veranderingen van het proteoom of ubiquitinoom. We hebben dus heel veel eiwitten geïdentificeerd die RPN11 nodig hebben om afgebroken te worden door de proteasoom, terwijl we geen eiwitten hebben gevonden die UCHL5 en/of USP14 nodig hebben. Eiwitten worden vaak door middel van ubiquitine ketens naar het proteasoom gestuurd. We hebben gekeken naar de verbindingen tussen de ubiquitine moleculen in ketens maar we konden geen voorkeur voor specifieke verbindingstypen voor deze DUBs vinden. Samenvattend suggereert onze data dat RPN11 de belangrijkste DUB is voor proteasoom afhankelijke eiwit afbraak terwijl de rol van UCHL5 en USP14 in dit proces nog onduidelijk blijft.

Het milieu binnen cellen is dynamisch en kan bijvoorbeeld veranderen tijdens ziekte of stress. In **hoofdstuk 5** onderzochten we hoe het proteasoom zich aanpast als het milieu binnen de cel verandert. Eiwitten werken nooit alleen, ze werken altijd samen met andere eiwitten. We hebben hier gekeken of er andere eiwitten aan het proteasoom binden onder verschillende stress condities. De toegepaste stress condities waren oxidatieve stress (H_2O_2), endoplasmatisch reticulum (ER) stress (Tunicamycine) en cytotoxische stress (proteasoom blokkers MG132/Lact). We hebben proteasomen gezuiverd uit *Drosophila* S2 cellysaten door gebruik te maken van antilichamen tegen Rpn8 en Rpn10. Kwantitatieve massaspectrometrie zonder labels is gebruikt voor de karakterisatie van interactie partners van het 19S/26S proteasoom. Deze metingen zijn in drievoud uitgevoerd. Na de behandeling met MG132/Lact vonden we een verbeterde binding van eiwitten behorende tot de 20S kern van het proteasoom en daarnaast zagen we ook een verbeterde interactie met andere eiwitten, waaronder Hsp23, Hsp68, REG (PA28) en Ref(2)p, alsmede een mogelijk nieuw UBL-domein bevattend ubiquitine shuttle eiwit CG7546 (humaan Bat3). Ub shuttle eiwit Rad23 interacteerde daarentegen alleen onder stress condities met het 19S/26S proteasoom. Als laatste benoemen we hier de DUB UCHL5, welke

onder alle condities interacteerde met het 19S/26S proteasoom, hoewel deze duidelijk minder vaak associeerde wanneer geen stress was geïnduceerd. Verder onderzoek is nodig om de rol van de verbeterde associatie van UCHL5 en het proteasoom onder stress condities te achterhalen. Samengenomen geven deze data meer inzicht in de dynamiek van proteasoom-afhankelijke eiwit afbraak onder verschillende cellulaire milieus, wat weer relevant kan zijn voor het begrijpen van het functioneren en de regulatie van het proteasoom tijdens ziektes.

Ecdysone is een hormoon welke een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van insecten. Dit hormoon induceert genen die reageren op ecdysone via interactie met de ecdysone receptor (EcR) in de celkern. Het onderzoek dat beschreven is in **hoofdstuk 6** is gedaan met het doel om meer inzicht te krijgen in verschillende niveaus van het ecdysone signaal netwerk. Door gebruik te maken van een RNA sequentie analyse en een eiwit expressie analyse hebben we globale transcriptoom en globale proteoom dynamieken op verschillende tijdstippen met elkaar vergeleken. We hebben bekende en nog onbekende genen en eiwitten die op ecdysone reageren geïdentificeerd. We zagen wel verschillen in de timing tussen de transcriptionele en translationele reactie, wat het moeilijk maakte om mRNA en eiwitten met elkaar te vergelijken op dezelfde tijdstippen. We hebben ook het EcR interactoom na ecdysone stimulatie geanalyseerd, en we identificeerden eiwitten met een rol in ecdysone signaaltransductie, ecdysone synthese, transcriptie, chromatine remodelering, en nog andere eiwitten als interactie partners van de receptor. De nieuwe genen, eiwitten en interactie partners die reageren op ecdysone en geïdentificeerd zijn in deze studie kunnen interessant zijn voor gedetailleerde (biochemische) vervolgstudies in cel culturen of in de vlieg.

Curriculum Vitae

Personal details

Name: Karen Alexandra Sap
Gender: Female
Date of birth: 11th of March 1983
Nationality: Dutch
email: k.a.sap@amc.uva.nl

Work experience

2015-current **Postdoc**
Lab of Prof.dr. Eric Reits, Protein aggregation and degradation, department of Medical Biology, Amsterdam University Medical Center, Amsterdam, NL

2010 -2014
(4.5 years) **PhD student**
Lab of Dr. Jeroen Demmers (co-promotor), Proteomics Center, department of Biochemistry. Promotor: Prof.dr. C.P. Verrijzer. Erasmus University Medical Center, Rotterdam, NL

2008 -2009
(7 months) **Intern, MSc research project**
Lab of Prof.dr. C.P. Verrijzer. Supervisor: Dr. Yuri Moshkin, department of Biochemistry, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, NL

2008
(6 months) **Intern, MSc research project**
Lab of Dr. Hans van Dam, department of Cell Biology
Leiden University Medical Center, Leiden, NL

2006 – 2007
(9 months) **Technician**
Lab of Dr. Andre van Marle, Contract Production team (CPU)
Biofocus DPI – a Galapagos Company (now Charles River), Leiden, NL

2006
(5 months) **Intern, BSc research project**
Lab of Prof.dr. Remko Offringa, Leiden University, Leiden, NL

2004
(5 months) **Intern, BSc research project**
Lab of Prof.dr. Corina Brussaard, NIOZ, Texel, NL

Education

2007 - 2010 Master of Science, Biomolecular Sciences – Cell Biology, Vrije Universiteit Amsterdam

2002 - 2006 Bachelor of Applied Science, Biochemistry, Hogeschool Rotterdam, NL

2000 - 2001 Bachelor of Applied Science, Civil Engineering, propedeuse, Hogeschool Rotterdam, NL

List of publications

van der Wal L, Bezstarosti K, **Sap KA**, Dekkers DHW, Rijkers E, Mientjes E, Elgersma Y, Demmers JAA. Improvement of ubiquitylation site detection by Orbitrap mass spectrometry. *J Proteomics* (2018) Nov 6. pii: S1874-3919(17)30371-8.

Karen A. Sap, Karel Bezstarosti, Dick H. W. Dekkers, Olaf Voets, Jeroen A. A. Demmers. Quantitative proteomics reveals extensive changes in the ubiquitinome after perturbation of the proteasome by targeted dsRNA mediated subunit knockdown in *Drosophila*. *Journal of Proteome Research* (2017), 16, 2848-2862.

Karen A. Sap, Karel Bezstarosti, Dick H.W. Dekkers, Mirjam van den Hout, Wilfred van Ijcken, Erikjan Rijkers and Jeroen A.A. Demmers. Global quantitative proteomics reveals novel factors in the ecdysone signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Proteomics* (2015), 15, 725-738

Yuri M. Moshkin, Cecile M. Doyen, Tsung-Wai Kan, Gillian E. Chalkley, **Karen Sap**, Karel Bezstarosti, Jeroen A. Demmers, Zeliha Ozgur, Wilfred F. J. van Ijcken, C. Peter Verrijzer. Histone Chaperone NAP1 Mediates Sister Chromatid Resolution by Counteracting Protein Phosphatase 2A. *PLoS Genetics* (2013) 9(9): e1003719. doi:10.1371/journal.pgen.1003719

Karen A. Sap and Jeroen A.A. Demmers. *Labeling Methods in Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics*. Integrative Proteomics (2012), ISBN 978-953-51-0070-6, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), InTech

Portfolio

Courses

2014	Biomedical English Writing and Communication, Erasmus MC, R'dam, NL
2013	R programming (basics), Erasmus MC, Rotterdam, NL
2011	Project management for PhDs, Erasmus MC, Rotterdam, NL
2011	MaxQuant Summerschool, Max Planck, Martinsried, DE
2010	Safely working in the lab, Leiden UMC, Leiden, NL
2010	Biomolecular Mass Spectrometry, Utrecht University, NL
2010	Cell and Developmental Biology, Erasmus MC, Rotterdam, NL
2010	Biochemistry and Biophysics, Erasmus MC, Rotterdam, NL
2010	Genetics, Erasmus MC, Rotterdam, NL

Conferences, workshops and presentations

2018	Proteostasis in health and disease (poster), COST, Athens, GR
2017	Dutch Huntington Disease Research Network (oral presentation), LUMC, Leiden
2017	Keystone Omics approaches to study the proteome (poster), Breckenridge, USA
2016	EMBO ubiquitin workshop (oral and poster presentation), Alghero, Sardinia, IT
2016	Cost Proteostasis meeting (poster presentation), Clermont-Ferrand, FR
2015 - 2018	Dutch Huntingtin Disease Research Network, (poster), Maastricht/Groningen, NL
2015 – 2018	Master student course – Biological research approaches (oral), AMC, A'dam, NL
2015 – 2017	Bachelor student course – practical advisor, AMC, Amsterdam, NL
2014	Lab retreat (oral presentation), Natural History Museum, Rotterdam, NL
2013	19th MGC PhD student workshop (oral presentation), Dusseldorf, DE
2013 - 2014	Course Biomedical Research Techniques (oral), Erasmus MC, Rotterdam, NL
2012 – 2013	Netherlands Proteomics Center PhD day, University Utrecht, Utrecht, NL
2012	Proteomics Platform Nederland (oral presentation), Vrije Universiteit, A'dam, NL
2012	18th MGC PhD student workshop (poster presentation), Maastricht, NL
2011	17th MGC PhD student workshop, Colonge, DE
2011	MaxQuant Summerschool 2011 (poster), Martinsried, Max Planck Institute, DE
2011	Proteomic Forum 2011 (poster presentation), Berlin, DE
2011 – 2016	Netherlands Proteomics Center progress meeting (poster presentation), Utrecht, NL
2010 – 2014	Work discussion (oral presentation), Erasmus MC, Rotterdam, NL
2009	Winterschool Transcriptional control of developmental processes (oral pres.), AT

Teaching

2013	supervision of master student (Anika Kötemann)
------	--