



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Transcription regulation in time and space: Engineered cell systems to modulate the epigenetic chromatin structure: The role of Methyl-CpG-binding protein 2

Piebes, D.G.E.

Publication date

2016

Document Version

Final published version

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Piebes, D. G. E. (2016). *Transcription regulation in time and space: Engineered cell systems to modulate the epigenetic chromatin structure: The role of Methyl-CpG-binding protein 2*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Samenvatting

Samenvatting

Transcriptie en de structuur veranderingen van chromatine zijn processen in de celkern die nauw verweven zijn met elkaar. In dit proefschrift richten wij ons op de dynamische interactie en de veelzijdige functies van chromatine zoals genomstabiliteit en transcriptieregulatie. We bestuderen epigenetisch regulatie-eiwit Methyl CpG Protein2 (MeCP2) om chromatine te moduleren en om daarbij de veranderingen in chromatine structuur en de transcriptieregulatie te meten in *real-time*. Dit om meer inzicht te verschaffen in het causale verband tussen de epigenetische staat van het chromatine en transcriptierepressie in tijd en ruimte.

In **de introductie** introduceren we transcriptieregulatie, chromatine en epigenetica. We leggen de aandacht op de dynamische processen die besproken worden in dit proefschrift. We introduceren MeCP2 en neurodegeneratieve ziekten die gerelateerd zijn aan MeCP2. We eindigen met een korte omschrijving van het gebruik van gegenereerde chromatine-reeksen in het genoom van gekweekte cellen, een methode die we in dit proefschrift veelvuldig gebruiken voor het manipuleren van chromatine om vervolgens de oorzaak en het gevolg van veranderingen in chromatinestructuur en transcriptionele activiteit te bepalen.

In **hoofdstuk 1** gebruiken we een experimentele set-up die ons in staat stelt om de chromatinecontext te veranderen (lacO/lacR en tetO/tetR) van een 200x reportergerenreeksen en om de afname van mRNA te meten, met behulp van MS2 gelabelde transcripten in levende cellen. We veranderen de chromatinecontext door Methyl CpG binding protein2 (MeCP2) te sturen naar het reportergerenreeks. Onze data laten zien dat de gemeten transcriptierepressie een bifasisch gedrag vertoont, bestaande uit een vertraging en een daaropvolgende exponentiële afname van het aantal transcripten op de reportergerenreeks, deze afname duurt tamelijk lang vergeleken met de afname van de transcriptieactivator op de reportergerenreeks.

De vertragingstijd voorafgaand aan de exponentiele afname is significant korter wanneer MeCP2 naar de reportergerenarray is gestuurd. We simuleren de diffusie van de transcripten met een 2 dimensionaal diffusie-model gebaseerd op de eindige differentiatiemethode. Deze data laten zien dat de mRNA diffusie van de

reportergenreeks veel sneller is dan de gemeten afname van mRNA van de reeks in onze experimentele set-up. Onze data lijken erop te wijzen dat er nog steeds transcriptieinitiatie plaatsvindt nadat de transcriptieactivator van de reportergerenreeks verdwenen is.

De MeCP2 gemoduleerde chromatinecontext beïnvloedt alleen de vertragingstijd en niet de exponentiële afname van de transcripten. Dit wijst erop dat de chromatinecontext bepaalt of er nieuwe initiatie kan plaats vinden en of de reactietijd verandert.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we het ontwerp en de constructie van een cellijn die een nieuw reportergerencassette bevat. De ontworpen cassette kan worden geïntegreerd in een bekende chromatine-integratieplek in het genoom met behulp van homologe recombinitie. De cassette is zodanig geconstrueerd dat de kinetiek van mRNA transcripten en van eiwitten kan worden gemeten in real-time na modulering van de epigenetische chromatine samenstelling. Met de bacteriofage MS2 haarpinreeks is het mogelijk fluorescent gelabelde MS2 eiwitbinding te meten als maat voor nieuw gesynthetiseerd mRNA. We gebruiken een reportergeren met een signaalcode voor kortlevende eiwitten, dat ons in staat stelt om eiwitafname te meten van het reportereiwit in de tijd. De integratie van een 84x tetO tandemreeks *upstream* van het reportergeren maakt het mogelijk om de chromatinesamenstelling te veranderen door het sturen van eiwitten in een fusieconstruct met tetR.

We hebben een aantal fusieconstructen gegenereerd met regulerende eiwitten MeCP2 en HP1 β om het effect te meten van de geïnduceerde transcriptierepressiecontext op de dynamische hoeveelheid mRNA en de eiwitten in levende cellen in de tijd. Hier laten we zien dat het construct tot expressie komt in de cellijn waarin we het construct beogen te integreren en dat de fusieconstructen binden aan een tetO reeks. In toekomstige studies kan het construct geïntegreerd worden in het humane genoom door middel van homologe recombinitie en kan van een enkel gen, in een enkele levende cel de eiwit en mRNA hoeveelheid in de tijd gemeten worden.

Samenvatting

In **hoofdstuk 3** geven we een overzicht van de talrijke functies van MeCP2 welke bijdragen aan transcriptieregulering en chromatine organisering. De ongeordende eiwit structuur van MeCP2 maakt dat het eiwit verschillende DNA doellocaties en verschillende regulatoire eiwitten kan binden met zijn domeinen: MBD, TRD en C-terminal. Afhankelijk van de bindingspartners en de posttranslationale modificaties op MeCP2, kan MeCP2 tegengestelde functies uitvoeren zoals transcriptionele activering en repressie.

We geven aandacht aan de moleculaire effecten van (mis)regulatie op cel-niveau. Verlies en winst van functies van MeCP2 is catastrofaal voor de identiteit van hersencellen en leidt tot neurologische ontwikkelingsziekten zoals Rett Syndroom en Xq28 duplicatie Syndroom. We geven een modelrepresentatie waarmee we laten zien hoe delicaat de balans is tussen bindingsaffiniteit en concentratie is en hoe veranderingen in deze balans de functionaliteit van MeCP2 kan verstoren. Ons model geeft aan dat de oorzaak van Rett syndroom en Xq28 verschillend zijn, terwijl de phenotypes vele overeenkomsten vertonen.

In **hoofdstuk 4** geven we bewijs dat het sturen van MeCP2 naar een grote geamplificeerde chromosomale lacO reeks een tot nu toe onontdekte grootschalige chromatineontvouwing teweeg brengt. Deze ontvouwing wordt, in kleinere mate, ook geobserveerd wanneer MeCP2 niet specifiek gestuurd in de cellen tot expressie wordt gebracht. We hebben de mate van MeCP2 geïnduceerde chromatineontvouwing gequantificeerd zowel in de situatie waarbij het volledige MeCP2-eiwit tot expressie wordt gebracht alsmede de situatie waarbij gedeeltelijke MeCP2 domeinen tot expressie worden gebracht, te weten MBD, TRD en C-terminus, MeCP2 zonder C-terminus en een Rett-syndroom variant. Voor structuuranalyses van het chromatine werden 3D confocale microscopiebeelden van de grote geamplificeerde chromosomale lacO reeks gemaakt en met behulp van beeld analyses, waarbij de oppervlaktefactor wordt bepaald, die een quantificatie geeft van het verschil tussen de gevonden chromosomale structuur en een perfecte bol met hetzelfde volume.

We observeerden dat geen van de MeCP2 domeinen op zichzelf dezelfde grootschalige ontvouwing kan veroorzaken als het volledige MeCP2 eiwit. Microscopische *Fluorescence*

Loss in Photobleaching (FLIP) analyses laten zien dat MeCP2 binding het verlies van HP1 γ van het chromosomaal domein veroorzaakt. We observeren een verhoogde mobiliteit van HP1 γ in de celkern die niet wordt gemeten bij de andere isoformen HP1 α en β . De MeCP2 geïnduceerde ontvouwing gaat niet gepaard met activering van transcriptie. In relatie met deze observatie laten we in hoofdstuk 2 zien dat MeCP2 inductie van het chromatine naar een reporterreeks de vertragingstijd tot de transcriptierepressie vrijwel teniet doet. Gebaseerd op deze bevindingen stellen wij dat lokale chromatine context bepaalt of nieuwe initiatie evenementen plaats kunnen vinden en dat daarmee de vertragingstijd van repressie bepaald wordt.

Onze bevindingen in hoofdstuk 4 geven de suggestie dat MeCP2 geïnduceerde chromatine ontvouwing het chromatine voorbereidt op veranderingen in genactiviteit en daarmee als het ware een switch in genactiviteit faciliteert.

Het causale verband tussen de moleculaire interacties die ten grondslag liggen van eiwitkinetiek, veranderingen van chromatinestructuur en transcriptieactiviteit is een belangrijke uitdaging in het onderzoeksveld en biochemisch ingewikkeld te ontrafelen. Het gebruik van geconstrueerde celsystemen levert de mogelijkheid om ons te richten op een vooraf gedefinieerde set van moleculaire factoren binnen de context van een levende cel en de mogelijkheid om deze te manipuleren in zowel tijd als in de ruimtelijke dimensies van de celkern. Zo een *cell engineered* aanpak biedt ons de mogelijkheid om complexe temporale regulatie op het niveau van een enkel molecuul zowel in een enkele cel, alsook genoomwijd te testen en te demonstreren en vergroot ons begrip van de gecoördineerde stappen van transcriptie *in vivo*. In dit proefschrift is het ontwerp en de constructie beschreven van een dergelijke celsysteem die in het genoom worden geïntegreerd door middel van homologe recombinatie. Tegenwoordig biedt het CRISPR/Cas9 *moleculair bioengineering* systeem veel mogelijkheden om genomische aanpassingen te genereren en om moleculaire interacties van transcriptie regulatie te volgen van endogene genen en in een gemodificeerde epigenetische context. CRISPR/Cas9 engineering opent een geheel nieuw veld met oneindige veel mogelijkheden om veranderingen in cellen aan te brengen. Een andere recente

Samenvatting

voortgang in het veld is de biochemische bepaling van genactiviteit regulatie in een enkele cel met de resolutie van de DNA sequentie. Zulke genomwijde enkele cel analyses bieden de mogelijkheid om een robuust profiel te maken van het aantal transcripten, DNA methylering en chromatine vouwing, maar geeft geen inzicht in de tijd of de ruimtelijke ordening van deze processen in de celkern. Ondanks de enorme vooruitgang van deze biochemische ‘celpopulatie aanpak’, samengevoegd met microscopiedata van enkele levende cellen is het mechanisme van de moleculair verweven processen welke transcriptie reguleren in tijd en ruimte toch nog grotendeels onontgonnen.

Voor dit proefschrift leggen wij de aandacht op MeCP2, een epigenetisch regulatie-eiwit, vooral bekend vanwege 2 neurodegeneratieve ziekten veroorzaakt door mutaties in de MeCP2 coderende genregio. We bespreken de verschillende functies die MeCP2 kan uitvoeren, zoals de tweezijdige functie van MeCP2 als zowel transcriptie activator als transcriptie repressor. We concluderen dat het belangrijk is om alle functies van MeCP2 goed in kaart te brengen, inclusief de dynamiek, om tot methodes te komen om MeCP2 gerelateerde ziektes te kunnen onderzoeken en behandelen. In onze studies waar we gebruik maken van reportergerenreksen laten we zien dat MeCP2 in staat is om chromatine structuur te veranderen en de timing van transcriptierepressie te beïnvloeden. Deze data wijzen erop dat MeCP2 functioneert als een ‘facilitator’ van zowel transcriptie activering als van transcriptie repressie, afhankelijk van de door MeCP2 veroorzaakte gefaciliteerde volgorde van gebeurtenissen. Deze facilitatorfunctie kan een algemeen concept zijn waarmee regulatie-eiwitten transcriptie patronen vastleggen en behouden