



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Daysleeper : from genomic parasite to indispensable gene

Knip, M.

Citation

Knip, M. (2012, November 22). *Daysleeper : from genomic parasite to indispensable gene*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20170>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20170>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20170> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Knip, Marijn

Title: Daysleeper : from genomic parasite to indispensable gene

Date: 2012-11-22

Chapter 7

DAYSLEEPER

Van genomische parasiet tot onmisbaar gen.

Nederlandstalige samenvatting

Marijn Knip



DAYSLEEPER

Van genomische parasiet tot onmisbaar gen.

Dit proefschrift beschrijft de studie naar de functie en de evolutie van het gen *DAYSLEEPER* in de modelplant zandraket (*Arabidopsis thaliana*). *DAYSLEEPER* werd geïdentificeerd in 2005 door Bundock en Hooykaas (Bundock and Hooykaas, *Nature*, 2005). Zij vonden dat, wanneer dit gen wordt uitgeschakeld, plantjes zich niet ontwikkelen en jong sterven. *DAYSLEEPER* is dus een essentieel gen in zandraket.

DAYSLEEPER lijkt sterk op zogenaamde “springende genen” of transposons (Bundock and Hooykaas, *Nature*, 2005). Transposons zijn elementen die zich binnen het genoom kunnen verplaatsen en vermeerderen middels een mechanisme dat zich het best laat samenvatten als “knippen en plakken” of “kopiëren en plakken” zoals in een tekstverwerker op de computer. Deze elementen komen voor in vrijwel alle genomen van organismen in de verschillende rijken. Transposons werden lang gezien als kwalijke elementen die middels hun mobiliteit zorgen voor verstoringen van genomische informatie. In de laatste decennia is dit beeld veranderd en worden transposons steeds meer gezien als elementen die door middel van hun spring-gedrag een belangrijke kracht zijn in het creëren van nieuwe en het veranderen van bestaande genen. Ter illustratie van dit feit de volgende analogie: Beeld je een kookboek in (het genoom), waarin ingrediënten (transposons) op een willekeurige plaats in een willekeurig recept worden geplaatst. Vaak zal dit leiden tot recepten die minder lekkere resultaten geven dan het origineel, of ronduit oneetbare baksels opleveren. Echter, een enkele keer zal een recept een waardevolle toevoeging krijgen. Transposons kunnen in het genoom dus bijdragen aan het creëren van nieuwe informatie: door bijvoorbeeld in een gen te springen kunnen ze zorgen dat dit gen verkort, verstoord of veranderd wordt. Transposons worden als scheppers van variabiliteit nu dan ook gezien als belangrijke stuwars van de evolutie.

DAYSLEEPER lijkt in hoge mate op een transposon-gen (een transposase), dat codeert voor een eiwit dat het transposon uitknijpt en elders weer in bouwt (via een knip-en-plak mechanisme dus). *DAYSLEEPER* mist echter de eigenschappen die essentieel zijn voor mobiliteit en kan zelf niet meer springen en zit dus op een vaste plek in het genoom.

Dit proefschrift probeert antwoorden te geven op de volgende vragen:

1. Wanneer in de evolutie is *DAYSLEEPER* ontstaan? Komen op *DAYSLEEPER* lijkende genen (“*SLEEPER*-genen”) ook voor in andere planten, of zelfs in andere organismen zoals gist, of de mens?
 - Als er ook *SLEEPER*-genen bestaan in andere soorten, welke gedeelten van het gen zijn dan het best bewaard in deze genen?
 - Zijn *SLEEPER*-genen ook essentieel voor het overleven in andere soorten? Of, hebben dit soort genen een andere, of geen aantoonbare functie?

2. In welke essentiële processen in de plant is *DAYSLEEPER* actief? Wat zorgt ervoor dat *DAYSLEEPER* onmisbaar is voor het overleven van zandraket plantjes?
 - Waar en wanneer komt *DAYSLEEPER* tot expressie in de plant?
 - Heeft het door het gen *DAYSLEEPER* gecodeerde eiwit *DAYSLEEPER* interacties met DNA-sequenties of met andere eiwitten?
 - Wat gaat er allemaal mis in de cel wanneer je de aanwezigheid van *DAYSLEEPER* sterk vermeerdert, of juist verlaagd?

Dit proefschrift bevat, na een inleidend hoofdstuk, vier experimentele hoofdstukken en een concluderend hoofdstuk. In het eerste experimentele hoofdstuk wordt de evolutionaire achtergrond van *DAYSLEEPER* onderzocht. *DAYSLEEPER* blijkt ook een verwant gen te hebben in zandraket: *CYTOSLEEPER*. Dit gen is redelijk homoloog aan *DAYSLEEPER*, maar wanneer dit gen verstoord is, leidt dit niet tot zichtbare afwijkingen. *DAYSLEEPER* bevindt zich hoofdzakelijk in de celkern, terwijl *CYTOSLEEPER* zich in het cytoplasma bevindt. *DAYSLEEPER* blijkt verder alleen voor te komen bij hogere planten (angiospermen) en dus niet in algen, varens, coniferen, of andere organismen van niet-plantaardige afkomst. Aan *DAYSLEEPER* verwante genen in andere soorten worden *SLEEPER*-genen genoemd. In een vergelijking van de verschillende *SLEEPER*-genen kunnen drie regio's worden aangewezen die in sterke mate overeenkomen in alle *SLEEPER*-genen. Deze regio's noemen worden *SLEEPER*motifs genoemd. *SLEEPER*-genen zijn waarschijnlijk ontstaan doordat het transcript van een transposase door een reverse transcriptase, gecodeerd door een zogenaamd retro-transposon, is overgeschreven naar cDNA, dat vervolgens weer terecht gekomen is in het genoom. Het is aannemelijk is dat een soortgelijk proces ook heeft geleid tot latere duplicaties van *SLEEPER*-genen

in het rijst genoom.

In het tweede experimentele hoofdstuk wordt beschreven waar *DAYSLEEPER* tot expressie komt en waar het *DAYSLEEPER* eiwit zich bevindt in de cel. *DAYSLEEPER* komt hoofdzakelijk tot expressie in prolifererende weefsels, zoals wortelpunten en zich ontwikkelende bloemen. We toonden dit enerzijds aan door middel van QPCR, een techniek die in staat stelt gen-transcripten (mRNA) te kwantificeren, en anderzijds door het β -glucuronidase gen (*GUS*) tot expressie te brengen in planten onder controle van de *DAYSLEEPER* promotor. *GUS* expressie kan worden bestudeerd doordat expressie van dit gen kan worden gevisualiseerd middels een blauwkleuring. De localisatie van *DAYSLEEPER* in de cel is bestudeerd door gebruik te maken van een versie van *DAYSLEEPER* gefuseerd aan het geel fluorescerende eiwit (Yellow Florescent Protein; YFP). De lokalisatie van dit fusie-eiwit is bestudeerd in planten en in zogenaamde protoplasten (planten cellen zonder celwand). We vonden dat de fluorescente *DAYSLEEPER* versies zich hoofdzakelijk in de celkern bevonden, maar ook in vesikels in het cytoplasma. We zagen dikwijls kleine blaasjes (vesikels) waarin meerdere blaasjes aanwezig waren (waarschijnlijk zogenaamde “multivesicular bodies”; MVB’s), maar ook kleine vesikels waren zichtbaar. We hebben verschillende typen vesikels aangekleurd met fluorescente constructen om er achter te komen of *DAYSLEEPER* zich in dezelfde vesikels bevindt. We vonden dat *DAYSLEEPER* geen grote overlap vertoont met de door ons gebruikte fluorescente constructen. We concluderen dat *DAYSLEEPER* zich in multi vesiculaire-structuren bevindt, die waarschijnlijk MVB’s zijn.

Het derde experimentele hoofdstuk beschrijft een experiment waarin wordt bestudeerd hoe artificieel verhoogde niveaus van *DAYSLEEPER* expressie van de andere genen in zandraket beïnvloeden. Er zijn planten gebruikt waarin een construct in het genomisch DNA was ingebouwd dat ervoor zorgde dat, onder invloed van Tamoxifen-inductie, *DAYSLEEPER* veel hoger tot expressie komt. Een vergelijking is gemaakt tussen planten met en zonder dit construct en planten met en zonder tamoxifen behandeling. Uit deze planten zijn transcripten geïsoleerd en deze geanalyseerd en gekwantificeerd middels sequencing technologie (GAII sequencing, Illumina®). Veel genen die zijn mis-gereguleerd in planten waar *DAYSLEEPER* verhoogd tot expressie komt zijn betrokken bij ubiquitine gereguleerde eiwit-afbraak, RNA metabolisme, RNA-gemedieerde gen-silencing en plant-verdedigingsmechanismen, maar ook bij de timing van de bloei, het circadiaans ritme, licht/donker responsen en zogenaamde “chromatin modifiers” die betrokken zijn bij het moduleren van de structuur van chromatine. *DAYSLEEPER* verstoort

, mogelijk via interactie met het COP9-signalosome complex, de de-ubiquitynering van eiwitten, hetgeen zou verklaren waarom *DAYSLEEPER* overexpressie tot gevolg heeft dat veel processen in de cel verstoord raken.

In het vierde experimentele hoofdstuk zijn eiwitten onderzocht die kunnen binden aan *DAYSLEEPER*. Middels een eerste screen, waarbij *DAYSLEEPER* met mogelijke interactoren tot expressie wordt gebracht in gist (*Saccharomyces cerevisiae*), werden kandidaat-interacterende eiwitten geïdentificeerd. Deze kandidaten werden vervolgens getest voor binding aan *DAYSLEEPER* *in vivo* in protoplasten. Een deel van het eerdergenoemde Yellow Fluorescent Protein werd gefuseerd aan *DAYSLEEPER* en het andere deel aan een kandidaat-interactor. Als *DAYSLEEPER* bindt aan een van deze eiwitten in de protoplasten, wordt er een fluorescent signaal zichtbaar, dankzij de vorming van het complete YFP. Dit type experiment heet Bi-Molecular Fluorescence Complementation (BiFC). *DAYSLEEPER* eiwitten kunnen aan andere *DAYSLEEPER* eiwitten binden (homodimeriseren), aan NRL8 (NPH3-familie eiwit), aan CSN5A (een subunit van het COP9 signalosome), aan RRP6A (een subunit van het RNA-exosome) en aan drie homologen van het eiwit VPS2, namelijk VPS2.1, VPS2.2 en VPS2.3. VPS2 is onderdeel van het ESCRT-III dat betrokken is bij vesikel vorming uit membranen en celdeling. We vonden tevens dat de vorming van cellagen in de wortelpunt in *daysleeper* mutanten afwijkend is en dat het plantenhormoon auxine daar verkeerd is gedistribueerd. Tevens vonden we aanwijzingen dat *daysleeper* net als mutanten voor genen in het COP9-signalosome (*csn*-mutanten), DNA-schade accumuleren.

Dit proefschrift besluit met een discussie hoofdstuk waarin de ontdekkingen beschreven in de experimentele hoofdstukken in een overkoepelende visie worden geplaatst die het functioneren van *DAYSLEEPER* beschrijft. *DAYSLEEPER* is een eiwit dat zich overwegend in de celkern bevindt, maar ook in vesikels in het cytoplasma. *DAYSLEEPER* kan aan verscheidene eiwitten binden, die actief zijn in verschillende processen. Gezien het feit dat verhoogde aanwezigheid van *DAYSLEEPER* leidt tot de misregulatie van vele en diverse genen, met een overrepresentatie van genen betrokken bij ubiquitine gemedieerde eiwit afbraak, en het feit dat *DAYSLEEPER* bindt aan COP9-signalosome (dat de ubiquitine gemedieerde eiwit afbraak reguleert) subunit CSN5A en dat de *daysleeper* mutant gelijkenissen vertoont met *csn* mutanten, concludeer ik dat *DAYSLEEPER* waarschijnlijk een belangrijke rol speelt in het reguleren van ubiquitine-gemedieerd eiwit afbraak.

