



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Nucleosome dynamics resolved with single-pair fluorescence resonance energy transfer spectroscopy

Koopmans, W.J.A.

Citation

Koopmans, W. J. A. (2009, June 18). *Nucleosome dynamics resolved with single-pair fluorescence resonance energy transfer spectroscopy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13856>

Version: Corrected 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/1887/13856>

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

Samenvatting

Nucleosoom Dynamica Ontrafeld met Enkel-Paar Fluorescentie Resonantie Energie Overdracht Spectroscopie

Het nucleosoom is de eerste stap van DNA condensatie in de celkern. Nucleosomen vormen obstakels voor enzymen die het opgevouwen DNA binden, en spelen om die reden een belangrijke rol in genregulatie. Om te begrijpen hoe de toegankelijkheid tot nucleosomaal DNA wordt gecontroleerd, is het noodzakelijk om de moleculaire mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan vormveranderingen van het nucleosoom. Dit proefschrift doet verslag van een experimentele studie over de dynamica van nucleosomen, uitgevoerd met behulp van enkel-paar Fluorescentie Resonantie Energie Overdracht Spectroscopie (single-pair Fluorescence Resonance Energy Transfer, ofwel spFRET). Met spFRET is het mogelijk de structuur van het DNA in een enkel nucleosoom te volgen in de tijd. Elk hoofdstuk van dit proefschrift werd als losstaand onderzoekartikel geschreven en geeft een andere inkijk in nucleosoom dynamica of in de experimentele methodes die we hebben toegepast.

Hoofdstuk 2 beschrijft in detail de procedures die we hebben gebruikt om nucleosomen te maken met een FRET paar op de gewenste locatie, en hoe we deze nucleosomen met ensemble technieken en enkel-molecuul technieken hebben bestudeerd. We genereerden een kunstmatig stuk DNA op basis van de 601 sequentie, die een zeer hoge affiniteit voor de histon octameer heeft en daardoor een nucleosoom op één goed gedefinieerde plek vormt. De donor en de acceptor fluorofoor werden op een specifieke plek in het DNA ingebouwd met behulp van PCR met fluorescente primers. Nucleosomen werden geassembleerd uit dit DNA en losse histon eiwitten met behulp van zout dialyse. De opbrengst van deze reconstitutie reacties was ongeveer 90%, volgens metingen met polyacrylamide gel elektroforese (PAGE). Door middel van Totale Interne Reflectie Fluorescentie (TIRF) microscopie op geïmmobiliseerde moleculen, hebben wij de dynamica van het ontwinden van DNA in nucleosomen waargenomen en gekwantificeerd. Ook hebben we met een confocale fluorescentiemicroscoop de statistische verdeling van de verschillende conformaties van deze nucleosomen in kaart gebracht, terwijl ze vrij diffunderen in het confocaal detectievolumen.

In **Hoofdstuk 3** hebben we spFRET microscopie toegepast om de dynamica van DNA in nucleosomen rechtstreeks te observeren. Mononucleosomen, met een FRET paar bij de dyade en de uitgang van het nucleosoom, werden geïmmobiliseerd door ze met een 30 bp lange streng DNA vast te binden aan een microscoopglasje dat was gefunctionaliseerd met een coating van polyethyleen glycol (PEG). De moleculen werden vervolgens geobserveerd met TIRF microscopie. Het FRET signaal van enkele moleculen als functie van de tijd liet twee soorten dynamica zien: tijdelijke onderbrekingen in de fluorescentie van de acceptor en vormverandering in het nucleosoom. Zowel een Cy5 als ATTO647N acceptor fluorofoor vertoonde "fotoknippen" in een zuurstofarme buffer met 2% β -mercaptoethanol (β ME). Het vervangen van de triplet-afvanger β ME door 1 mM Trolox verhielp dit effect. Na het onderdrukken van fotoknippen werden drie sub-populaties waargenomen: 90% van de moleculen was gedissocieerd DNA-eiwit complex; de resterende 10% had een gemiddelde FRET efficiency die past bij intacte nucleosomen. In 97% van deze intacte nucleosomen vonden we geen significante veranderingen in de FRET efficiency, en dus geen DNA dynamica op een tijdschaal tussen 10 ms en tientallen seconden. Echter, in 3% van de intacte nucleosomen namen we kortstondige intervallen met een verminderde energie overdracht waar. Deze fluctuaties, met een gemiddelde levensduur van 120 ms, waren duidelijk anders dan "fotoknippen" en konden ondubbelzinnig toegeschreven worden aan het "ademen" van nucleosomaal DNA - het tijdelijk loskomen en terugvouwen van DNA van de uiteinden van het nucleosoom. De bevindingen in dit hoofdstuk illustreren de verdiensten van spFRET microscopie, maar ook de valkuilen waar men op beducht moet zijn bij onderzoek aan complexe biologische systemen.

Omdat wij waarnamen dat veel geïmmobiliseerde nucleosomen waren gedissocieerd, hebben we het onderwerp van nucleosoom immobilisatie verder uitgediept in **Hoofdstuk 4**. Immobilisatie heeft een aantal voordelen: het staat het verlengen van observatietijden toe tot aan een limiet die slechts door photobleken wordt bepaald. Dit opent de mogelijkheid om processen te bestuderen die plaatsvinden met een tijdschaal tussen milliseconden en minuten. Het is wel essentieel dat immobilisatie zelf de dynamica of structuur van het nucleosoom niet beïnvloedt. Daarom hebben wij diverse strategieën voor het immobiliseren van nucleosomen getest, zoals specifieke verankering aan een oppervlak met een coating van polymeren (PEG) of eiwitten (BSA), en het opsluiten van nucleosomen in de waterige poriën van agarose of polyacrylamidegels. Voor elk van deze strategieën vergeleken we hoe specifiek de immobilisatie was, en hoeveel geïmmobiliseerde nucleosomen intact bleven. Een coating van stervormige PEG ketens die een netwerk vormen presteerde het best op deze twee aspecten. Deze coating stelde ons in het staat om kinetiek, zoals die was geobserveerd in een ensemble van nucleosomen, te reproduceren op het niveau van een enkel molecuul, terwijl we immobilisatieartefacten uit konden sluiten.

In **Hoofdstuk 5** hebben we gekozen voor een andere wijze om immobilisatieartefacten te

verhinderen. Wij pasten spFRET spectroscopie toe met Alternierende Laser Excitatie (ALEX) op nucleosomen in vrije oplossing, of opgesloten in een gel na zuivering met poly acrylamide gel elektroforese (PAGE). Daarnaast hebben we ALEX-spFRET gecombineerd met een Fluorescentie Correlatie Spectroscopie (FCS) analyse op geselecteerde reeksen van fluorescentie, waardoor we een verscheidenheid aan ontvouwde nucleosomen wisten te ontrafelen. Op die manier hebben we laten zien hoe het opvouwen van DNA voortschrijdt vanaf beide uiteinden van het nucleosoom. De experimenten laten zien dat het DNA kortstondig losvout van de eiwitkern, met een evenwichtsconstante van $\sim 0.2 - 0.6$ bij de uiteinden en ~ 0.1 op een plek 27 bp van het uiteinde in het nucleosoom, terwijl DNA en histonen toch op de lange termijn stabiel aan elkaar verbonden blijven. Onze bevindingen, die we hebben verkregen met een krachtige synthese tussen enkel-molecuul fluorescentie technieken en gelelektroforese, benadrukken de subtiele wisselwerking tussen toegankelijkheid en condensatie van DNA in chromatine.

Samenvattend, wij hebben nucleosoom dynamica bestudeerd door spFRET spectroscopie zorgvuldig toe te passen. We hebben laten zien dat DNA frequent loskomt van de histon kern, waardoor nucleosomen intrinsiek toegankelijk zijn voor enzymen op biologische relevante tijdschalen. De veelzijdige technieken die in dit proefschrift worden beschreven kunnen verder worden benut om de dynamica te bestuderen van andere heterogene DNA-eiwitcomplexen dan het nucleosoom alleen.

