



Universiteit
Leiden
The Netherlands

spFRET studies of nucleosome dynamics modulated by histone modifications, histone variants and neighboring nucleosomes

Buning, R.

Citation

Buning, R. (2015, January 15). *spFRET studies of nucleosome dynamics modulated by histone modifications, histone variants and neighboring nucleosomes*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/31477>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/31477>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/31477> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Buning, Ruth

Title: spFRET studies of nucleosome dynamics modulated by histone modifications, histone variants and neighboring nucleosomes

Issue Date: 2015-01-15

Samenvatting

spFRET studies naar de invloed van histonmodificaties, histonvarianten en buur-nucleosomen op nucleosoom-dynamica.

Elk levend organisme gebruikt DNA (deoxyribonucleïnezuur) als drager van genetische informatie. DNA is een molecuul dat bestaat uit lange ketens van baseparen (bp) - A, T, C en G genoemd - in een volgorde uniek voor elk individu. Iedere cel in een levend organisme bevat de gehele DNA code van dat organisme, verdeeld over een of meer DNA moleculen. Bij mensen zijn dat 46 DNA moleculen (chromosomen genoemd) bestaande uit in totaal zes miljard ($6 \cdot 10^9$) bp en met een gezamenlijke lengte van 2 meter. DNA vormt de blauwdruk voor het produceren van eiwitten, die essentieel zijn voor het uitvoeren van alle cellulaire functies. De DNA code is identiek voor alle cellen van een organisme. Toch bestaat er een grote variëteit aan cel-typen en -functies. Ook moet een cel zich voortdurend aanpassen aan veranderingen in de omgeving, wat inhoudt dat het productieniveau van allerlei eiwitten en daarmee de DNA-activiteit moet veranderen.

Het principe van het coderen van erfelijke informatie door middel van DNA moleculen opgebouwd uit slechts 4 verschillende bouwstenen is verbluffend eenvoudig. De vertaalslag van DNA sequentie naar een functionerend organisme is daarentegen uitermate complex en nog verre van doorgrond. Dit proefschrift focust op de kleinste onderdelen van chromatine, de nucleosomen, en hoe de fysische eigenschappen van deze nucleosomen het DNA toegankelijk maken voor de processen in de cel.

Nucleosomen

Aan de basis van de regulatie van de genetische code in eukaryoten¹ ligt de organisatie van DNA in structuren die nucleosomen genoemd worden. Een nucleosoom is een

¹Hiertoe behoren alle mensen, dieren, planten en schimmels.

complex van DNA en eiwitten, met een diameter van ongeveer 10 nm, waarin ~150 bp DNA gewikkeld zijn om een schijfje eiwitten, het histon octameer (figuur 1.1c op pagina 7). Lange kettingen van nucleosomen zijn op hun beurt weer georganiseerd in complexere, vezel-achtige structuren, chromatine genoemd (figuur 1.1b op pagina 7). Uiteindelijk vormt chromatine het bekende chromosoom, dat in zijn meest compacte toestand, tijdens de celdeling, goed zichtbaar is² in een normale lichtmicroscop.

Nucleosomen zorgen voor een enorme compactie van het DNA. Als 2 meter DNA (de hoeveelheid die aanwezig is in iedere menselijke cel) aan zichzelf wordt overgelaten, vormt het een kluwen van ~ 100 μm doorsnede, maar door het vormen van nucleosomen past het in de celkern van slechts ~ 5 μm doorsnede (figuur 1.1a op pagina 7). Naast compactie biedt de organisatie in de vorm van nucleosomen tegelijkertijd de essentiële mogelijkheid voor het reguleren van de beschikbaarheid van DNA. Nucleosomen vormen obstakels voor eiwitten die aan het DNA binden om het bijvoorbeeld af te lezen (transcriptie), te kopiëren (replicatie) of te repareren. Door thermische fluctuaties kan het nucleosomaal DNA tijdelijk vanaf de uiteinden van het nucleosoom loskomen van de histon kern. Deze dynamica maakt nucleosomaal DNA eventjes toegankelijk zodat een eiwit zou kunnen binden (figuur 1.2 op pagina 9). De waarschijnlijkheid waarmee het nucleosomaal DNA loskomt is vermoedelijk belangrijk voor het vervullen van de verschillende functies van het DNA zoals transcriptie en replicatie. Daarom willen we weten hoe het loskomen van nucleosomaal DNA beïnvloed kan worden.

Veranderingen in de bindingsenergie tussen DNA en de histonen kunnen in de cel worden gerealiseerd door modificaties aan de histon eiwitten of door het uitwisselen van histonvarianten. Ook interacties tussen nucleosomen beïnvloeden de mogelijkheden tot het loskomen van nucleosomaal DNA. In dit proefschrift beschrijf ik de resultaten van experimenten die subtiele vormveranderingen van één enkel nucleosoom zichtbaar kunnen maken. Ik heb onderzocht hoe het loskomen van nucleosomaal DNA wordt gemoduleerd door histonmodificaties, histonvarianten en de aanwezigheid van een buur-nucleosoom.

FRET

Met een standaard lichtmicroscop zijn structuren te zien van op z'n kleinst een paar honderd nanometer, gelimiteerd door de golflengte van zichtbaar licht. Een nucleosoom is enkele tientallen malen zo klein en dus niet met een lichtmicroscop waar te nemen, laat staan kleine vormveranderingen binnen het nucleosoom. Om toch een enkel nucleosoom zichtbaar te maken, maken we gebruik van fluorescentie: een klein fluorescent molecuul (een fluorofoor) van ongeveer 1 nm zit vast aan het nucleosomaal DNA en verradt zijn aanwezigheid door licht uit te zenden als het met een laser

²Mits gekleurd.

van de juiste kleur wordt beschonen ('aangeslagen'). Door middel van twee fluoroforen met verschillende kleuren, in dit geval rood en groen, kunnen ook vormveranderingen worden waargenomen. Dit werkt als volgt: de groene fluorofoor (Cy3B) wordt door laserlicht met een golflengte van 515 nm aangeslagen en zendt vervolgens licht uit met een golflengte van 570 nm (groen/geel). In plaats van groen licht uit te zenden, kan deze fluorofoor, de donor, zijn energie ook overdragen aan een andere fluorofoor, de acceptor. De acceptor (ATTO647N) zendt deze overgedragen energie ook uit als licht, maar met een golflengte van 670 nm (rood). De energieoverdracht van donor- naar acceptor-fluorofoor heet Fluorescentie Resonantie Energie Overdracht (in het Engels: Fluorescence Resonance Energy Transfer³, kortweg FRET). De efficiëntie van FRET hangt sterk af van de afstand tussen de fluoroforen, en daalt van 100 % naar 0 % over een afstand van ongeveer 10 nm (figuur 1.3 op pagina 11). Dit maakt FRET een uitermate geschikt gereedschap om afstanden (of afstandsveranderingen) te detecteren binnen structuren met afmetingen rond de 10 nm, zoals nucleosomen. Door een donor en een acceptor fluorofoor op slimme posities aan nucleosomaal DNA en/of histonen te verbinden is een bepaalde vormverandering van het nucleosoom te volgen via de verhouding tussen groen en rood licht dat van het nucleosoom afkomt (figuur 1.4 op pagina 13). FRET is dan ook veelvuldig toegepast in het onderzoek naar nucleosoomdynamica.

Een typische vormverandering die onderzocht wordt is het loskomen van nucleosomaal DNA. Met behulp van FRET kan er onderscheid gemaakt worden tussen een gesloten nucleosoom (hoge FRET, rood licht) en een open nucleosoom (geen FRET, alleen groen licht). Zouden er veel nucleosomen tegelijkertijd gemeten worden, dan zou de gemiddelde FRET efficiëntie van alle nucleosomen samen gemeten worden. Omdat het loskomen van nucleosomaal DNA over het algemeen kort duurt, en dat voor elk nucleosoom op willekeurige tijdstippen gebeurt, zal de gemiddelde waarde niet veel informatie geven over de dynamica. Alleen door één enkel nucleosoom tegelijk te meten kunnen subtiele vormveranderingen aan het licht komen. Dit kan wanneer de concentratie gelabelde nucleosomen zo laag is dat slechts één nucleosoom tegelijkertijd zich in het laserfocus bevindt. We spreken dan van enkel-paar FRET (single-pair, spFRET). Door één nucleosoom te volgen in de tijd kan gezien worden hoe vaak en hoe lang dat nucleosoom open staat. Door van heel veel nucleosomen één voor één te meten of ze op een bepaald moment open of dicht zijn kan de verdeling tussen open en gesloten nucleosomen bepaald worden.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van experimenten die spFRET hebben gebruikt om nucleosoomdynamica in kaart te brengen. Daartoe behoren verschillende experimentele technieken. De confocale fluorescentie microscoop en de daarbij behorende analysetechniek Fluorescentie Correlatie Spectroscopie (FCS) bekijkt nucleosomen die

³Of Förster Resonance Energy Transfer, naar de ontdekker van FRET, Theodor Förster (1946).

vrij door het laserfocus diffunderen. Op deze manier kunnen duizenden nucleosomen één voor één enkele milliseconden (ms) lang gemeten worden. Totale Interne Reflectie Fluorescentie (TIRF) microscopie bekijkt geïmmobiliseerde nucleosomen, die vast zitten aan het microscoop glaasje. Op deze manier kan één nucleosoom voor honderden seconden gevolgd worden. Een schematisch overzicht van de opstellingen die hiervoor gebruikt kunnen worden is te zien in figuur 1.5 (pagina 17). Deze experimenten hebben gezamenlijk een beeld geschetst van een zeer dynamisch nucleosoom, dat over het algemeen open is gedurende tientallen ms, voor ongeveer 10 % van de tijd. Ook hebben ze laten zien dat nucleosoomdynamica wordt gemoduleerd door histonmodificaties en DNA sequentie.

Metten aan enkele nucleosomendynamica

Wij hebben spFRET aan nucleosomen gemeten met confocale fluorescentie microscopie. We maken onderscheid tussen open en gesloten nucleosomen door de donor- en de acceptor-fluorofor zodanig op het nucleosomaal DNA te plaatsen dat er maximale FRET is als het nucleosoom gesloten is, en geen FRET als het nucleosoom open is (figuur 2.2 op pagina 34). Om te zorgen dat het nucleosoom zich exact op die locatie op het DNA vormt waar de fluoroforen zitten, gebruiken we een DNA sequentie met een zeer hoge affiniteit voor het histon octameer, de zogenoemde 601-sequentie. Door de fluoroforen op een andere locatie op het DNA in te bouwen, verder naar binnen of aan het andere uiteinde, kan onderzocht worden hoe ver het nucleosoom opent en of dat aan beide uiteinden gebeurt (figuur 4.2 op pagina 79 en 4.9 op pagina 93).

Als nucleosomen met FRET labels gevormd zijn, en hun concentratie laag genoeg is om er één tegelijk in het laserfocus te hebben, worden er afzonderlijke pieken van rode en groene fluorescentie gemeten zoals weergegeven in figuur 2.7b (pagina 43). Iedere piek correspondeert met één nucleosoom dat door het laserfocus beweegt. Voor ieder nucleosoom kunnen we uit de intensiteit van de groene en de rode piek de FRET efficiëntie bepalen. Dit leidt tot een histogram zoals in figuur 2.1 (pagina 33), dat weergeeft hoe vaak elke FRET efficiëntie voorkomt. Door de verdeling tussen lage en hoge FRET efficiënties te vergelijken onder verschillende omstandigheden kan de invloed van deze omstandigheden op de verdeling tussen open en gesloten nucleosomen onderzocht worden.

Het uitvoeren van de hierboven beschreven experimenten en het interpreteren van de meetgegevens brengt heel wat uitdagingen met zich mee. Nucleosomen blijken nogal instabiel te zijn bij lage concentraties - die juist nodig zijn voor spFRET experimenten - en in de aanwezigheid van oppervlaktes zoals microscoop glaasjes, pipetpuntjes en buisjes om ze in te bewaren. Dit alles hangt ook nog sterk af van de specifieke histoncompositie en buffercondities (concentratie van zouten e.d.). Het bewaren van nucleosomen, het prepareren van een monster voor op de microscoop en zelfs

het controleren of nucleosomen succesvol gevormd zijn door middel van gel electrophorese kan ertoe leiden dat nucleosomen uit elkaar vallen in los DNA en histonen (te zien in figuren 2.3 (pagina 38), 2.4 (pagina 39), 2.5 (pagina 41) en 2.6 (pagina 41) aan de verhoogde piek met lage FRET efficiëntie). Ook is de analyse van spFRET data niet triviaal. Dit kan leiden tot artefacten of de onderliggende nucleosoomdynamica verdoezelen. De uitdagingen waar we mee te maken kregen tijdens onze spFRET experimenten aan nucleosomen beschrijf ik in **hoofdstuk 2**, samen met suggesties hoe deze aan te pakken.

H3 K56 Ac

De kern van het nucleosoom wordt gevormd door een combinatie van acht histonen, twee exemplaren van H2A, H2B, H3 en H4. Histonen zijn eiwitten en bestaan uit ketens van aminozuren. Deze aminozuren kunnen gemodificeerd worden, wat betekent dat er een bepaalde chemische groep aan wordt gekoppeld. Een voorbeeld hiervan is acetylactie⁴. Daarbij wordt er een acetylgroep aan een aminozuur gekoppeld, waardoor een positieve lading wordt geneutraliseerd. Modificaties van de histon-eiwitten komen op grote schaal voor in levende cellen en spelen een essentiële rol bij de regulatie van allerlei DNA-gerelateerde processen. Dat kunnen ze doen door de electrostatistische interactie tussen histonen en DNA te veranderen, of door een signaal te vormen voor nucleosoom-bindende eiwitten.

Hoofdstuk 3 behandelt het effect op het gedrag van nucleosomen van een specifieke acetylactie, namelijk van een lysine in histon H3 (H3 K56). Dit aminozuur bevindt zich precies op een plek waar histon H3 contact maakt met het nucleosomaal DNA en wordt gecorreleerd met verhoogde transcriptie-activiteit. Het was eerder niet mogelijk om het effect van deze specifieke modificatie nauwkeurig vast te stellen door een gebrek aan homogeen geacetylerde histonen. In hoofdstuk 3 wordt een nieuwe methode beschreven voor de productie van homogeen, op een specifiek gedefinieerde locatie, geacetylerde histonen. De truc hierbij is om acetyl-lysine genetisch te coderen, iets wat normaliter niet gebeurt. Door gebruik te maken van nucleosomen met op deze manier geproduceerde histonen met een acetylactie op H3 K56 konden wij het effect bepalen van H3 K56 acetylactie op het loskomen van nucleosomaal DNA. Terwijl H3 K56 acetylactie weinig tot geen direct effect laat zien op de hogere orde structuur (chromatine-compactie en nucleosoom mobiliteit), tonen onze spFRET experimenten een 7-voudige toename in het loskomen van nucleosomaal DNA (figuur 3.4 op pagina 63).

⁴ Andere voorbeelden zijn methylytie, fosforylytie en ubiquitylytie.

H2A.Z

Het vervangen van een van de histonen in een nucleosoom door een histonvariant is een andere manier waarmee eukaryote cellen hun DNA activiteit reguleren. Een histonvariant die van gist tot de mens (met kleine verschillen) betrokken is bij meerdere vitale processen in de cel is H2A.Z. Bij *Arabidopsis Thaliana* (AT, het plantje zandruis) speelt H2A.Z een essentiële rol bij het waarnemen van de omgevingstemperatuur. Het groeien en bloeien van *Arabidopsis* hangt sterk af van temperatuursveranderingen tussen de 12 en 27 °C. Dit is gecorreleerd met de aanwezigheid van H2A.Z in nucleosomen. Planten zonder H2A.Z blijken zich niet op de juiste manier aan de omgevingstemperatuur te kunnen aanpassen. Het mechanisme waarmee H2A.Z zijn rol vervult bij de perceptie van temperatuur is tot nog toe echter onduidelijk gebleven. Zowel verhoogde als verminderde nucleosoom stabiliteit zijn gerapporteerd.

Hoofdstuk 4 focust op het effect van het vervangen van H2A voor H2A.Z op nucleosoomstabiliteit en -dynamica. Ik laat zien dat H2A.Z-nucleosomen stabiel zijn dan H2A-nucleosomen. In spFRET experimenten zagen wij dat H2A.Z-nucleosomen een lagere waarschijnlijkheid hebben voor het loskomen van nucleosomaal DNA en minder vatbaar zijn voor dissociatie tijdens gel-electroforese, bij lage concentraties, of in de nabijheid van oppervlaktes. Variaties in de omgevingstemperatuur tussen 7 en 37 °C hebben geen waarneembaar effect op de dynamica van H2A.Z-nucleosomen. Onze resultaten suggereren dat H2A.Z-nucleosomen niet direct op temperatuurswisselingen reageren, maar dat het uitwisselen van H2A en H2A.Z wel gebruikt zou kunnen worden als mechanisme om de stabiliteit en daarmee de toegankelijkheid van nucleosomaal DNA te reguleren.

Dinucleosomen

Nucleosomen komen *in vivo* nooit alleen voor, ze maken altijd onderdeel uit van chromatine. Chromatine bestaat uit lange kettingen van nucleosomen, verbonden door 10-90 bp linker DNA. Interacties tussen nucleosomen bepalen de hogere orde structuur. Deze interacties en de aanwezigheid van linker DNA beperken de bewegingsmogelijkheden van nucleosomaal DNA en we verwachten dan ook een effect op het loskomen van nucleosomaal DNA.

Hoofdstuk 5 behandelt nucleosomen die verbonden zijn aan een lang stuk linker DNA of aan een buur-nucleosoom. Daartoe hebben wij ons nucleosoom-construct uitgebreid met een stuk DNA van 300 bp of met een tweede nucleosoom, waarbij de twee nucleosomen verbonden zijn met 20, 50 of 55 bp linker DNA (figuur 5.2 op pagina 105). We hebben gevonden dat zowel electrostatische interacties tussen het flankerend DNA aan beide zijden van het nucleosoom, als de aanwezigheid van een buur-nucleosoom het loskomen van nucleosomaal DNA bevordert.

Interacties tussen buur-nucleosomen kunnen alleen plaatsvinden als het linker DNA sterk gebogen wordt. Ter compensatie voor de energie die nodig is om het linker DNA te buigen, zouden nucleosoom-nucleosoom interacties samen kunnen gaan met het loskomen van nucleosomaal DNA, wat te zien zou zijn als een verminderde FRET. Dat is inderdaad wat we zien bij dinucleosomen met 55 bp linker DNA. Bij dinucleosomen met 50 bp linker DNA zien we daarentegen geen verschil in FRET met enkele nucleosomen. Het lengteverschil van 5 bp is klein, maar door de helix vorm van het DNA molecuul met een periodiciteit van 10 bp leidt deze 5 bp tot een oriëntatieverandering tussen de buur-nucleosomen van 180° . Interacties tussen buur-nucleosomen blijken meer waarschijnlijk bij dinucleosomen met 55 bp linker DNA dan bij dinucleosomen met 50 bp linker DNA.

De toegankelijkheid van nucleosomaal DNA in chromatine vezels kan zelfs *groter* zijn dan in 'losse' nucleosomen, door een verhoging in het loskomen van nucleosomaal DNA onder invloed van buur-nucleosomen. Daarnaast bepaalt de lengte van linker DNA de structuur van chromatine door interacties tussen buur-nucleosomen alleen toe te staan voor specifieke linker lengtes. Deze resultaten laten zien dat de toegankelijkheid van nucleosomaal DNA afhangt van de structuur van chromatine.

Conclusie

De resultaten van de experimenten gepresenteerd in dit proefschrift belichten de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de toegankelijkheid van DNA in chromatine, wat op zijn beurt een rol speelt bij de regulatie van processen als transcriptie, replicatie en reparatie van DNA. We hebben laten zien dat spFRET in staat is om subtiele vormveranderingen van nucleosomen te onthullen, die het gevolg zijn van histonmodificaties, histonvariaties, of beperkingen opgelegd door linker DNA en buur-nucleosomen. De spFRET experimenten die hier beschreven zijn kunnen worden uitgebreid om nucleosoomdynamica te onderzoeken in een chromatine vezel. Ook zou direct de interactie tussen buur-nucleosomen onderzocht kunnen worden door op beide nucleosomen één van de FRET fluoroforen te plaatsen. Bovendien zouden spFRET experimenten kunnen worden uitgebreid met meerdere kleuren, zodat naast vormveranderingen van het nucleosoom ook interacties tussen nucleosomen en andere eiwitten kunnen worden gedetecteerd. Zo groeit het inzicht in de moleculaire mechanismen die ons genoom reguleren.

