



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spatial and dynamic organization of molecular structures in the cell nucleus

Brouwer, A.K.

Citation

Brouwer, A. K. (2010, September 8). *Spatial and dynamic organization of molecular structures in the cell nucleus*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15930>

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/1887/15930>

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

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Eukaryotische cellen bevatten een celkern welke in hoge mate georganiseerd is. De celkern bevat naast genetische informatie, in de vorm van chromatine, verschillende kernlichaampjes die in grootte, aantal, samenstelling en functie van elkaar verschillen. De ruimtelijke organisatie van chromatine en eiwitten in de celkern is van groot belang voor de regulatie en coördinatie van de verschillende processen die in de celkern plaatsvinden. Naast genexpressie gaat het hierbij om DNA replicatie, DNA schadeherstel, RNA processing en RNA transport. Chromatine, een complex van DNA en eiwitten, is in meerdere (heterochromatine) of mindere (euchromatine) mate opgevouwen in de celkern. Opmerkelijk is dat ieder chromatinemolecuul (chromosoom) een concrete plek in de celkern inneemt en dat deze chromosoomdomeinen elkaar niet of slechts in geringe mate overlappen. Het is vooral in de ruimte tussen de chromosoomdomeinen waar zich de verschillende kernlichaampjes bevinden en waar transport van grote complexen plaats kan vinden. Men denkt dat door compartimentalisatie van celkerncomponenten vooral de efficiëntie van processen die in de kern plaatsvinden verhoogd wordt. Om tijdig in te kunnen springen op veranderende omstandigheden waarin een cel zich bevindt, is de organisatie van de celkern dynamisch.

Voorbeelden van kernlichaampjes zijn Cajal lichaampjes, speckles, PML lichaampjes en nucleoli. Deze kernlichaampjes zijn gepositioneerd tussen chromatinedomeinen. In tegenstelling tot de organellen in het cytoplasma van de cel zijn kernlichaampjes, ook wel kernorganellen genoemd, niet omgeven door een celmembraan. Hoe deze kernlichaampjes in de celkern gevormd worden, in stand gehouden worden en zich verplaatsen, is grotendeels onduidelijk. Verschillende onderzoeken laten een verband zien tussen een afwijkende kernorganisatie en ziekten. Een duidelijk voorbeeld hiervan is progeria, een vervroegd verouderingsyndroom, waarbij een mutatie in het lamine A/C gen leidt tot een verstoorde kernarchitectuur wat de expressie van genen beïnvloedt. Veranderingen in kernorganisatie zijn ook gekoppeld aan verschillende vormen van kanker en aan veroudering. Dit proefschrift is gewijd aan de dynamiek van verschillende structuren in de celkern.

In **hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling van het computerprogramma “STACKS” beschreven. Dit programma is ontworpen om de beweging van objecten in een 2-dimensionaal vlak of in een 3-dimensionale ruimte in de tijd te analyseren en te kwantificeren. De effectiviteit van het programma wordt gedemonstreerd door de beweging van telomeren, structuren welke de uiteinden van chromosomen vormen, in verschillende fasen van de celcyclus te meten. Een belangrijk aspect hierbij is dat de metingen verricht worden aan beelden die opgenomen zijn van levende cellen, die gedurende de tijd bewegen en mogelijk van vorm veranderen. In het computerprogramma zijn mogelijkheden opgenomen om te corrigeren voor bewegingen die de cel gedurende de gehele opnameperiode maakt. Voor het zichtbaar maken van de telomeren in een levende cel is een DNA construct gemaakt dat codeert voor een fusie-eiwit dat bestaat uit een telomeer-bindend eiwit (TRF) en een fluorescerend eiwit (green fluorescent protein, GFP, en varianten daarvan). Dit DNA construct is door middel van transfectie in humane tumorcellen (U2OS) en in embryonale fibroblasten van de muis gebracht om tot expressie te komen. Om cellen in ver-

schillende fasen van de celcyclus te herkennen en om de kerncontouren duidelijk zichtbaar te maken is tevens een fusie-eiwit bestaande uit een proliferatiemarker (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) en een fluorescerend eiwit in dezelfde cellen tot expressie gebracht. De telomeren van cellen die zich in de S- of G2-fase van de celcyclus bevinden blijken een zeer beperkte bewegingsvrijheid te vertonen. Zij veranderen nauwelijks van positie gedurende de periode dat er beelden met de fluorescentiemicroscoop zijn opgenomen. Veel dynamischer zijn telomeren in cellen die zich in de G1-fase bevinden, de fase die direct volgt op de celdeling en waarin chromatine zich positioneert. Dit verschil in dynamiek werd zowel in tumorcellen als in embryonale fibroblasten van de muis gemeten, waarbij de metingen in hoge mate reproduceerbaar bleken te zijn. Het ontwikkelde beeldbewerkingprogramma blijkt dus goed te werken, waarbij opgemerkt moet worden dat het programma gebruik maakt van snelle grafische processors (GPU) om snelle beeldbewerking te bewerkstelligen. Naast snelheid zijn de belangrijke kenmerken van het programma dat alle beeldbewerkingen en metingen binnen hetzelfde programma uitgevoerd kunnen worden, wat veel tijd bespaart, en dat op ieder gewenst moment visueel beoordeeld kan worden wat het effect van een bewerking is op een te meten object (bijvoorbeeld een telomeer). Door het toekennen van een kleur aan ieder individueel object kunnen zij eenvoudig in de tijd gevolgd worden.

In **hoofdstuk 3** wordt een onderzoek beschreven naar de mogelijke rol van een nucleaire matrix bij de positionering van telomeren in de celkern. In het verleden is vastgesteld dat telomeer DNA in de celkern achterblijft wanneer eiwitten, RNA en DNA uit kernen geëxtraheerd worden. Als verklaring hiervoor werd gegeven dat telomeren aan een nucleaire matrixstructuur vast zouden zitten en zo een rol zouden spelen bij de ruimtelijke positionering van chromosomen in de celkern. Het bestaan van een nucleaire matrix is al lange tijd controversieel en het is onduidelijk waaruit deze matrixstructuur zou moeten bestaan. Van lamine-eiwitten is bekend dat zij een netwerk vormen aan de binnenzijde van de kernmembraan, maar bovendien verspreid aanwezig zijn door de gehele kern. Om te onderzoeken of deze lamine-eiwitten mogelijk betrokken zijn bij de positionering van telomeren is RNA interferentie toegepast om de expressie van de lamine-eiwitten lamine A/C, lamine B2 en het lamine-geassocieerde eiwit emerine sterk te reduceren in U2OS cellen. Daarbij is onderzocht of een sterke afname van deze eiwitten invloed heeft op de positionering en/of dynamiek van telomeren in de levende cel. Om een eventuele rol van nucleaire actinefilamenten in de positionering van telomeren te onderzoeken zijn cellen opgegroeid in aanwezigheid van een stof welke actinepolymerisatie remt. De dynamische bewegingen van de telomeren worden gekwantificeerd met het in hoofdstuk 2 beschreven computerprogramma STACKS. De resultaten laten zien dat vermindering van lamine A/C, emerine, en gepolymeriseerd actine, maar niet van lamine B2, leidt tot een toename van mobiliteit van telomeren. Dit suggereert dat telomeren verankerd liggen aan een structuur die lamine A/C, emerine en actine bevat, maar geen lamine B2. Een eventuele rol voor het eiwit lamine B1 bij de positionering van telomeren in de celkern wordt nog onderzocht.

In **hoofdstuk 4** wordt aangetoond dat telomeren een belangrijke rol spelen bij de vorming van PML lichaampjes. In U2OS en in embryonale cellen van de muis leidt blootstelling aan de DNA methylerende stof methyl methaansulfonaat (MMS) tot het uiteenvallen van PML lichaampjes. Nadat de cellen van de DNA methylering hersteld waren, blijken de PML lichaampjes zich weer te herstellen, wat ons in staat stelde om de *de novo* vorming van PML lichaampjes te bestuderen. Na verschillende structuren in de celkern onderzocht te hebben, blijkt de vorming van PML lichaampjes plaats te vinden aan telomeer DNA.

Cellen afkomstig van leukemiepatiënten (acute promyelocytische leukemie) worden getypeerd door de afwezigheid van intacte PML lichaampjes. In deze cellen is het mogelijk om de vorming van PML lichaampjes te induceren door de cellen te behandelen met ars-eentrioxide. Toediening van ars-eentrioxide is één van de behandelmethoden voor acute promyelocytische leukemie. Bij deze leukemiecellen blijken de PML lichaampjes ook aan telomeren gevormd te worden. Bovendien blijkt tijdens de vorming van PML lichaampjes een eiwit dat betrokken is bij de sumoylering van eiwitten aanwezig te zijn op telomeren. Dit doet vermoeden dat modificatie van telomeereiwitten met SUMO de vorming van PML lichaampjes initieert.

In **hoofdstuk 5** is een onderzoek beschreven naar de associatie van kernlichaampjes met chromatine. Op basis van studies waarin de dynamiek van chromatine met die van kernlichaampjes is vergeleken is geconcludeerd dat de dynamiek van kernlichaampjes beperkt wordt door de toegankelijkheid en dynamiek van chromatine, terwijl stabiele interacties met chromatine werden uitgesloten. Deze conclusie staat haaks op studies waarin associaties van PML and Cajal lichaampjes met specifieke chromatine loci waargenomen zijn. Om te onderzoeken of de dynamiek van kernlichaampjes inderdaad beperkt wordt door de dichtheid van chromatine zijn cellen blootgesteld aan de stof MMS. Als gevolg hiervan blijkt de dynamiek van kernlichaampjes enorm toe te nemen zonder dat er aanwijzingen zijn dat de dynamiek van chromatine toeneemt. De kernlichaampjes blijken los te komen van hun chromatine omgeving en daarna door de kern te bewegen. Uit deze observaties kan geconcludeerd worden dat de kernlichaampjes door hun associatie met chromatine sterk in hun beweging beperkt worden.

