



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structural changes in single chromatin fibers induced by tension and torsion

Meng, H.

Citation

Meng, H. (2014, October 9). *Structural changes in single chromatin fibers induced by tension and torsion*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29020>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29020>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29020> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Meng, He

Title: Structural changes in single chromatin fibers induced by tension and torsion

Issue Date: 2014-10-09

Samenvatting

Om de 2 meter DNA die elke menselijke cel bevat te passen in de kern van de cel zit het DNA opgevouwen in chromatine. Nucleosomen zijn de kleinste eenheid waarin het DNA in chromatine zit opgerold. Een nucleosoom bestaat uit 147 baseparen DNA die 1,7 keer gewikkeld zijn om een histon-octameer. De interacties tussen de histonen en DNA maken een nucleosoom een van de meest stabiele eiwit-DNA complexen onder fysiologische condities. Als gevolg van deze eigenschap is het zeer geschikt voor zijn verpakkingsfunctie.

Sinds in de jaren 70 van de vorige eeuw werd ontdekt dat in eukaryote cellen DNA gevouwen zit in chromatine, wordt gedacht dat de functie van deze structuur verder gaat dan alleen DNA compactie. Chromatine is niet statisch in de celkern, maar speelt een belangrijke regulerende rol in diverse levensprocessen, zoals replicatie en transcriptie. Voor deze processen moeten de twee ketens van DNA in chromatine, die om elkaar gedraaid zijn in een rechtsdraaiende dubbele helix, worden ontwonden en van elkaar gescheiden worden. Enzymen zoals topoisomerasen en RNA polymerasen zijn hiervoor voortdurend bezig de helix uit te rekken en te draaien.

Het effect van krachten als spanning en torsie op DNA zonder nucleosomen is een onderwerp dat door middel van enkel-molecuul technieken goed bestudeerd is in de afgelopen 20 jaar. De effecten die deze krachten uitoefenen op chromatine zijn echter nog nauwelijks onderzocht. In dit proefschrift laat ik zien hoe een enkele chromatine vezel reageert op span- en torsiekrachten die uitgeoefend worden met behulp van een magnetisch pincet. Deze resultaten geven een fysische beschrijving van de veranderingen in chromatine zoals deze plaatsvinden als genen worden uitgelezen, of tijdens de delingscyclus van de cel.

Om de effecten van span- en torsiekrachten op de chromatine vezel te onderzoeken, heb ik eerst de mechanische eigenschappen van supercoiled DNA bestudeerd

(**Hoofdstuk 2**). Experimentele data gemeten met een magnetisch pincet wijzen erop dat opgewikkelde, gedraaide, en gedenameerde vormen van DNA in een gesloten topologisch gebied naast elkaar bestaan bij krachten kleiner dan 1 piconewton en 6% ontwindings van het DNA. Een verbreding van de overgang tussen deze drie toestanden ontstaat wanneer de grootte van het topologisch gebied wordt beperkt tot een paar duizend baseparen. Zulke korte DNA ketens laten bij een constante kracht en torsie discrete niveaus van extensie zien, die stapsgewijze veranderingen in de grootte van het gedenameerde DNA voorstellen. Naast metingen presenteer ik in dit hoofdstuk een statistisch mechanisch model voor korte DNA gebieden door de complete partitiefunctie te berekenen. De resultaten van dit model beschrijven kwantitatief de stabiliteit van de drie verschillende toestanden in supercoiled DNA. Dit nieuwe inzicht heeft wellicht implicaties voor het mechanisme van eiwitten die interactie hebben met DNA en de topologie van het DNA beïnvloeden, zoals topoisomerasen, transcriptie factoren, histonen en moleculaire motoren actief op DNA, zoals DNA- en RNAPolymerases.

Vervolgens beschrijf ik krachtspectroscopie van torsievrije chromatine vezels, gereconstitueerd op DNA dat een aantal eenheden van de zogenaamde Widom 601 sequentie bevat (**Hoofdstuk 3**). Om de ontvouwing van chromatine vezels te begrijpen presenteer ik nieuwe experimentele data en een nieuw kwantitatief model voor alle aspecten van ontvouwing van een chromatine vezel door kracht. Aan de hand van dit statistisch mechanisch model vergelijk ik de ontvouwing van individuele nucleosomen met die van volledig gevouwen chromatine vezels, bestaande uit meerdere nucleosomen. Ondanks het gebruik van de Widom 601 sequentie en het behoedzaam titreren van histonen tijdens de reconstitutie dialyse, blijkt het nodig te zijn heterogeniteit van chromatine fibers wat betreft nucleosoomcompositie mee te nemen. Dit levert consistente waarden op voor de vrije energie van DNA ontvouwing en de extensies van elk van de vier nucleosoom conformaties. Ik heb een nieuwe intermediaire conformatie gevonden tussen 2,5 en 7 piconewton. Bovendien wordt een kwalitatief verschil getoond in het ontvouwingsgedrag van chromatine vezels met 50 baseparen en 20 baseparen DNA tussen de nucleosomen, wat duidt op een andere vouwingsstructuur. Deze resultaten geven een fysisch inzicht in hoe de toegankelijkheid van DNA in volledig gevouwen en gedeeltelijk ontvouwen chromatine vezels wordt gereguleerd.

Tenslotte heb ik de stabiliteit van supercoiled chromatine vezels bestudeerd (**Hoofdstuk 4**). Door span- en torsiekrachten uit te oefenen met het magnetische pincet kon ik een sterk asymmetrische reactie op het op- en ontwinden van de chromatine

vezel meten. Negatieve supercoiling stabiliseert de vezel tegen ontvouwing. Positieve supercoiling kan worden geabsorbeerd door de chromatine vezel. Deze anisotropie laat de chiraliteit van een linksdraaiende helix zien. Wanneer de kracht groter is dan $\sim 2,5$ piconewton ontvouwt de chromatine vezel, waarbij één winding van het DNA los komt van elk nucleosoom. De mate van ontvouwing is afhankelijk van de graad van supercoiling. Opmerkelijk is dat positieve supercoiling ontvouwing faciliteert, maar overtollige positieve supercoiling de vezel weer terugvouwt. Een statistisch mechanisch model wordt gepresenteerd waarin topologie, elasticiteit, chromatine vouwing en ontvouwing op verschillende niveaus van supercoiling zijn opgenomen. Deze inzichten beschrijven de effecten van torsie op een gevouwen chromatine vezel met behulp van een nieuw kwantitatief model voor chromatine supercoiling.

Samenvattend heb ik door individuele chromatine vezels zorgvuldig te manipuleren met behulp van een magnetisch pincet de effecten van kracht en torsie op de structuur van chromatine kunnen meten. Ik heb aangetoond dat deze veranderingen in chromatine vezels met 3 tussenstappen plaatsvinden. Daarnaast heb ik de anisotrope respons van chromatine fibers op supercoiling laten zien, wat de linkshandige chiraliteit van chromatine aantoont. De mechanische eigenschappen van de chromatine vezel geven belangrijke aanwijzingen over de veranderingen van chromatine tijdens bijvoorbeeld transcriptie, of bij de werking van enkele anti-kanker geneesmiddelen die direct ingrijpen in de controle van supercoiling in de cel. De nieuwe kennis van de mechanische eigenschappen van DNA en chromatine is belangrijk voor een fundamenteel begrip van deze en velerlei andere processen waarin DNA een rol speelt.

