



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulatory DNA binding peptides as novel tools for plant functional genomics

Lindhout, B.I.

Citation

Lindhout, B. I. (2008, October 1). *Regulatory DNA binding peptides as novel tools for plant functional genomics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13123>

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/1887/13123>

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

Nederlandse Samenvatting

De mogelijkheid om genen op een specifieke wijze te reguleren creëert diverse manieren om genfunctie te kunnen bestuderen of moduleren. Artificiële transcriptiefactoren (ATFs), bestaande uit een eiwitdomein voor DNA-binding en een domein voor regulatie van transcriptie, kunnen specifieke regulatie bewerkstelligen. De ontwikkeling van ATFs is in een stroomversnelling terecht gekomen met de komst van zinkvingertechnologie. Zinkvingers zijn kleine eiwitdomeinen, die aaneen gekoppeld kunnen worden tot een domein met meerdere zinkvingers (een polydactiel zinkvingerdomein, afgekort als PZF domein). In een PZF is elke individuele zinkvinger verantwoordelijk voor de binding aan drie basenparen in het DNA. Op deze manier zal een PZF bestaande uit drie zinkvingerdomeinen binden aan een negen basenparen DNA-sequentie. Het feit dat zinkvingers zulke kleine eiwitdomeinen zijn, gecombineerd met de sequentiespecifieke binding die ze aangaan met DNA, maakt dat ze uitermate geschikt zijn als basis voor het construeren van DNA-bindingsdomeinen die heel specifiek zijn voor een wat langere DNA-sequentie. Deze DNA-bindende domeinen kunnen op hun beurt gebruikt worden in ATFs (PZF-ATFs). Het is dan ook voor de hand liggend dat veel onderzoek zich heeft gericht op een systematische karakterisering van het DNA-bindende gedrag van individuele zinkvingers. Dit onderzoek heeft geresulteerd in het beschikbaar komen van een lexicon voor een groot aantal zinkvinger-DNA interacties, dus van zinkvingers waarvan bekend is welke DNA-sequentie bij voorkeur gebonden wordt en andersom. Een deel van dit lexicon heeft als basis gediend voor de constructie van de PZF-domeinen die gebruikt zijn tijdens het hier beschreven onderzoek.

Het werk beschreven in dit proefschrift had als voornaamste doelstelling te onderzoeken wat de mogelijkheden voor het gebruik van zinkvingers zijn voor het ophelderen van biologische vraagstellingen in planten. Hiertoe was het allereerst noodzakelijk om te bepalen op welke manier individuele zinkvingers het beste aan elkaar gekoppeld konden worden tot een PZF, uitgaande van een bekend deel van het zinkvinger lexicon. De experimenten beschreven in hoofdstuk 2 maken gebruik van gist voor het testen van PZF-domeinen met verschillend ontwerp. Naast PZF-domeinen waarbij alle zinkvingers aan elkaar gekoppeld zijn door middel van korte verbindende aminozuursequenties, zogenaamde "linkers", zijn er PZFs gemaakt waarbij modules van twee of drie zinkvingers onderbroken worden door langere linkers. Al deze PZFs zijn getoetst voor bindingsaffiniteit *in vitro*. De PZFs zijn vervolgens gefuseerd met een sterke transcriptionele activator en tot expressie gebracht in giststammen die een stabiel geïntegreerd reportergen bevatten met bindingsplaatsen voor de zinkvinger in de promoter. Op deze manier is bepaald dat PZF-ATFs die ontworpen zijn met louter korte linkers tussen de individuele zinkvingerdomeinen

de beste basis vormen voor het bereiken van een sterke bindingsaffiniteit en van genregulerend vermogen.

Verder onderzoek naar mogelijk nieuwe toepassingen voor zinkvingertechnologie in planten was gericht op de vraag of zinkvingers naast hun duidelijke toepassing in ATFs wellicht ook nuttig kunnen zijn voor cytogenetische vraagstellingen (Hoofdstuk 3). Er zijn meerdere technieken beschikbaar om chromosomen te bestuderen, maar deze gaan doorgaans uit van gefixeerd (dood) materiaal. Manieren om in levende cellen chromosomaal DNA te kunnen bestuderen zijn erg beperkt omdat DNA-bindende domeinen voor de specifieke DNA-sequenties die men wil aantonen vrijwel nooit beschikbaar zijn. Met de komst van kunstmatig te fabriceren PZF-domeinen zou deze patstelling doorbroken kunnen worden. Om een PZF-gebaseerd systeem te testen voor het aantonen van de positie van specifieke DNA-sequenties in levende plantencellen is er een PZF-domein gemaakt dat specifiek zou moeten binden aan een negen basenparen lange sequentie die voorkomt in een repetitief stuk DNA rondom het centromeer van alle chromosomen van Arabidopsis. Door deze PZF te fuseren met een fluorescent eiwit en tot expressie te brengen, was het inderdaad mogelijk om de centromeren van Arabidopsis zichtbaar te maken in levende Arabidopsis wortels. Verdere experimenten in muizencellen lieten zien dat deze methode wijd inzetbaar is, want ook in muizencellen bleek het mogelijk om repetitieve sequenties in chromosomen zichtbaar te maken door middel van fluorescente PZF-domeinen. Deze proeven vormen tegelijkertijd een bewijs dat betrekkelijk simpele drievingerige PZF-domeinen goed kunnen binden aan chromosomaal DNA in levende cellen en dat daarvoor niet per se complexere PZF-domeinen nodig zijn.

In een verdere zoektocht naar de mogelijke toepassingen voor PZFs voor het onderzoek in planten zijn er experimenten opgezet om de vraag te beantwoorden of PZFs als middel kunnen dienen voor mutagenese van een complex multi-cellulair organisme, in dit geval Arabidopsis (Hoofdstuk 4). Om dit te toetsen is er een verzameling van PZF-ATFs gecreëerd door PZFs bestaande uit drie individuele zinkvingers te fuseren met een sterke transcriptionele activator. Deze PZF-ATF collectie werd vervolgens gebruikt voor transformatie van Arabidopsis planten die een genconstruct bevatten waarmee de frequentie van homologe recombinatie bepaald kon worden in de verkregen transgene zaailingen. Transformanten met verhoogde homologe recombinatiefrequentie werden geselecteerd en na identificatie en reconstructie van het gen dat codeerde voor de in de zaailing aanwezige PZF-ATF was het mogelijk om een specifieke PZF-ATF te selecteren die kon leiden tot een extreem verhoogde frequentie van homologe recombinatie, 200- tot 1000-maal hoger dan normaal.

Het is dus gebleken dat PZF-ATFs zeer goed bruikbaar zijn als middel voor mutagenese en dat vervolgens ook de factor die een kenmerk induceert simpel in handen is te krijgen.

Verder onderzoek aan de beschikbaar gekomen zaailingen met sterk verhoogde homologe recombinatiefrequentie als gevolg van de aanwezigheid van de recombinatiebevorderende factor genaamd VP16-HRU (Hoofdstuk 5) toonde aan dat er naast die verhoogde recombinatiefrequentie weinig duidelijke macroscopische veranderingen aanwezig waren. Mutanten waren licht vertraagd in ontwikkeling en vertoonden een accumulatie van anthocyaan wanneer ze in verhoogde lichtintensiteit gegroeid werden. Analyse van genexpressieprofielen liet zien dat de hoeveelheid mRNA van een flink aantal genen sterk veranderd is als gevolg van de aanwezigheid van een gen dat codeert voor VP16-HRU. Op basis van de verkregen genexpressieprofielen werd een selectie van mogelijke doelwit genen gemaakt, welke vervolgens individueel getest werden voor hun vermogen om homologe recombinatie te induceren. Een groot aantal van deze genen bleek inderdaad homologe recombinatie in somatische cellen sterk te verhogen.

Samenvattend toont dit werk aan dat zinkvingertechnologie waardevol is voor diverse toepassingen binnen het moleculair biologisch onderzoek van planten. Naast het gebruik van zinkvingers voor het specifiek reguleren van genexpressie, is het mogelijk gebleken om zinkvingers ook te gebruiken in combinatie met fluorescente eiwitten om in levende cellen chromosomen te kunnen bekijken. Daarnaast is vastgesteld dat mutagenese met een collectie van artificiële zinkvinger-bevattende transcriptiefactoren mogelijk is, zelfs in een complex organisme als *Arabidopsis*. De door middel van deze methode geïdentificeerde mutant en de beschikbaar gekomen HR-regulerende factor kunnen in de toekomst een belangrijke bijdrage leveren aan het onderzoek naar de moleculaire mechanismen van HR.