



Universiteit
Leiden
The Netherlands

RIF1, ZBTB24 and repeat silencing

Wu, H.

Citation

Wu, H. (2020, October 21). *RIF1, ZBTB24 and repeat silencing*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136945>

Version: 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/1887/136945>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136945> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wu, H.

Title: RIF1, ZBTB24 and repeat silencing

Issue date: 2020-10-21

Appendix

Nederlandse samenvatting

Meer dan 50% van het humane genoom bestaat uit repetitief DNA. Dit DNA werd lange tijd beschouwd als “junk DNA”, maar krijgt in toenemende mate aandacht van wetenschappers uit verschillende disciplines. Repetitive DNA-elementen blijken namelijk een belangrijke functie te hebben in verschillende biologische processen, waaronder het behoud van de stabiliteit van het genoom, de regulatie van genexpressie en de vorming van tumoren. In zoogdieren zijn repetitieve DNA-elementen over het algemeen transcriptioneel inactief in somatisch weefsel en bevatten DNA methylatie en repressieve histonmodificaties zoals H3K9me2 en H3K9me3. Wanneer deze DNA-elementen worden gereactiveerd, dan kan dit leiden tot genominstabiliteit en afwijkende transcriptie en uiteindelijk tot ziekte. Op dit moment zijn ongeveer 20 ziektes in verband gebracht met repetitieve DNA-gebieden en dit aantal neemt nog steeds toe. In dit proefschrift richten we ons op twee eiwitten, RIF1 en ZBTB24. Beide eiwitten zijn betrokken bij de regulatie van repetitief DNA in het genoom van eukaryoten.

RIF1 is een multifunctioneel eiwit dat een functie heeft in vele biologische processen, inclusief in transcriptionele regulatie. In **hoofdstuk 2** hebben we de functie van RIF1 in de regulatie van repetitief DNA bestudeerd in muis- en humane modelsystemen. We vonden dat RIF1 deficiëntie leidt tot reactivatie van ampliconische genclusters op het X-chromosoom. Het was al bekend dat Rif1 H3K9 methyltransferase complexen kan stabiliseren. Wij laten nu zien dat H3K9me2 verrijking in deze ampliconische gebieden is verminderd in afwezigheid van RIF1 en dat er dus een mogelijke rol voor de H3K9me pathway hierin is. Verder vonden we dat EHMT1 knockdown ook leidt tot reactivatie van genclusters op het X-chromosoom. Tot slot hebben we aangetoond, zowel in muis- als in humane modellen, dat RIF1 deficiëntie gevolgen heeft voor de repressie van een groep kiembaangen en dat deze regulatie deels afhankelijk is van DNA methylatie. Samen laten deze resultaten zien dat RIF1 een belangrijke functie heeft in de transcriptionele regulatie van X-chromosoom genclusters en een groep van kiembaangen. Het onderliggende mechanisme lijkt bovendien geconserveerd te zijn tussen muizen en mensen.

Immunodeficiëntie, Centromeerinstabiliteit en Faciale anomalieën syndroom (ICF-syndroom) is een zeldzame en genetisch heterogene ziekte met een autosomaal recessieve overerving. Verlaagde DNA methylatie in pericentromerische gebieden is het moleculaire kenmerk van dit syndroom en wordt gevonden in alle ICF-subtypes. Er zijn mutaties in vier genen geïdentificeerd die het ICF-syndroom kunnen veroorzaken, namelijk in *DNMT3B* (ICF1), *ZBTB24* (ICF2), *CDCA7* (ICF3) en *HELLS* (ICF4). Hoe deze vier ICF genen functioneel samenwerken is nog onbekend. Bovendien zijn de moleculaire functies van ZBTB24 en CDCA7 grotendeels onbegrepen. **Hoofdstukken 3, 4 en 5** richten zich op het ICF2 gen, *ZBTB24*. In **hoofdstuk 3** hebben we muis embryonale stamcellen (mESCs) gemaakt die een *Zbtb24*^{ΔBTB/ΔBTB}-mutatie bevatten. Als gevolg hiervan bevatten deze mESCs geen Zbtb24 eiwit. Met behulp

van RNA sequencing hebben we vervolgens aangetoond dat *Zbtb24* een specifieke groep van genen positief reguleert en dat het ICF3 gen *Cdca7* hier één van is. Verder ontdekten we dat *ZBTB24* een transcriptiefactor is welke *CDCA7* expressie kan activeren door directe binding aan het promotergebied van *CDCA7*. Al onze bevindingen hebben we gevalideerd in humane celmodellen en deze regulatie blijkt in hoge mate geconserveerd te zijn tussen muis en mens.

Het gebruik van sequencing-technologieën heeft ertoe geleid dat klinische onderzoekers een groot aantal genetische varianten in zowel gezonde individuen als patiënten hebben gevonden. Omdat de kennis over de pathogeniciteit van deze varianten zeer beperkt is, is nu de grootste uitdaging om te bepalen wat de mogelijke fenotypische gevolgen zijn van deze genetische varianten met onbekende klinische relevantie. In **hoofdstuk 4** hebben we een gedegen methode opgezet om functioneel onderscheid te kunnen maken tussen pathogene en neutrale *ZBTB24* varianten. We hebben ChIP-qPCR en een luciferase reporter assay gebruikt om te bepalen hoe *ZBTB24* varianten de bindings- en activatiecapaciteit van het *ZBTB24* eiwit in het *CDCA7* promotergebied beïnvloeden. We hebben hiervoor *ZBTB24* varianten getest die geïdentificeerd zijn in ICF2 patiënten en in patiënten met twee andere ziektes. Ook hebben we *ZBTB24* varianten getest die zeer waarschijnlijk single nucleotide polymorphisms (SNPs) zijn en een aantal zeldzame *ZBTB24* varianten die gevonden zijn in patiënten met kanker. Onze data laat zien dat we ICF2 missense varianten kunnen onderscheiden van *ZBTB24* SNPs en dat de twee missense varianten gevonden in twee andere ziektes zeer waarschijnlijk goedaardig zijn. Onze resultaten suggereren verder dat de zeldzame kanker varianten, waarin sleutelposities in het C2H2-ZF-domein zijn veranderd, zeer waarschijnlijk pathogeen zijn. We denken dat onze methode kan helpen bij de klinische diagnose van het ICF2 syndroom waarbij *ZBTB24* varianten zijn betrokken.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht wat het effect is van *Zbtb24* deficiëntie op DNA methylatie genoomwijd en hebben we veranderingen in het methyloom vergeleken tussen *Zbtb24*- en *Cdca7*-knockout mESCs. Zowel *Zbtb24* als *Cdca7* depletie veroorzaakte een globaal verlies van DNA methylatie, maar dit verlies was sterker in *Cdca7*-knockout mESCs. Verrassend genoeg vonden we ook hogere DNA methylatie niveaus voor ongeveer de helft van zogenaamde “differentially methylated regions” in *Zbtb24*-knockout mESCs, inclusief in promotergebieden van genen die actief getranscribeerd worden. Door vervolgens ChIP-sequencing uit te voeren in zowel mESCs als U2OS cellen konden we aantonen dat *ZBTB24* preferentieel bindt aan open chromatine gebieden in een sequentie-afhankelijk manier. In dit hoofdstuk laten we verder een geïntegreerde genoomwijde analyse van DNA methylatie, histonmodificaties, *Zbtb24* binding en genexpressie zien. Hiermee vonden we dat wanneer *Zbtb24* gebonden is aan DNA dichtbijgelegen CpG-dinucleotiden niet gemethyleerd kunnen worden. *Zbtb24* deficiëntie leidt tot een toename in DNA methylatie in een groep van *Zbtb24* targets, en dit gaat samen met lagere H3K4me3 niveaus en verlaagde

Appendix

expressie van deze targets en genen die hierdoor beïnvloed worden. Dit suggereert dat er een directe koppeling is tussen Zbtb24 binding, H3K4me3 niveaus en DNA methylatie bij sommige Zbtb24 bindingsplaatsen. Tot slot hebben we zowel in mESCs als in materiaal van een ICF2 patiënt een ZBTB24-gemedieerde hypermethylatie “signatuur” in promotergebieden gevonden. We menen dat deze ZBTB24-afhankelijke hypermethylatie kan leiden tot een mogelijke DNA methylatie biomarker voor ICF2. Ons onderzoek geeft dus inzicht in de rol van de transcriptiefactor Zbtb24 in de regulatie van DNA methylatie genoomwijd.