



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Gene regulation in embryonic development

Berg, P.R. van den

Citation

Berg, P. R. van den. (2021, May 19). *Gene regulation in embryonic development*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3163752>

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/1887/3163752>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/3163752> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Berg, P.R. van den

Title: Gene regulation in embryonic development

Issue date: 2021-05-19

SAMENVATTING

We vertrouwen er op dat de cellen in ons lichaam talloze taken verrichten. Zo zijn er bijvoorbeeld cellen die een fysieke barrière vormen met de buiten wereld, cellen die insuline produceren, en cellen die het zuur in onze maag uitscheiden. Om aan deze taken te voldoen heeft de evolutie ervoor gezorgd dat wij veel verschillende genen hebben, de functionele eenheden van informatie die we hebben geërfd van ons voorouders. Genen zijn opgeslagen in de DNA moleculen in de kern van onze cellen, en samen worden ze ons genoom genoemd. Echter, het louter opslaan van informatie is niet voldoende, het dient ook vertaald te worden naar verschillende soorten moleculen die de taken van de cel daadwerkelijk kunnen uitvoeren. De overdracht van genetisch informatie van het DNA naar deze moleculen vormt het centrale dogma van de moleculaire biologie:

1. Genen in het genoom kunnen worden *gerepliceerd*, waarmee een identieke kopie wordt gemaakt. Dit gebeurt als cellen zich delen en elke cel een kopie van het genoom nodig heeft.
2. Genen in het genoom kunnen worden *getranscribeerd*, wat transcripten produceert (RNA moleculen). Dit gebeurt wanneer bepaalde eiwitten nodig zijn in de cel. Alle transcripten in de cel worden samen het transcriptoom genoemd.
3. Genen in het transcriptoom kunnen worden *getransleerd*, wat eiwitten produceert. Deze moleculen zijn verantwoordelijk voor het merendeel van de arbeid die de cel verricht. Alle eiwitten in de cel worden samen het proteoom genoemd.

Het centrale dogma van de moleculaire biologie is een uitstekend model dat in staat is om te beschrijven hoe genetische informatie wordt overgedragen van DNA naar eiwit. Echter, het omschrijft niet *welke* informatie wordt overgedragen en hoe *snel*. Dat is waar *gen regulatie* een rol speelt. Gen regulatie is een verzameling biochemische processen die de cel inzet om er voor te zorgen dat het fijn afgesteld proteoom heeft, wat cruciaal is voor het functioneren van de cel. Gen regulatie is ook een van de rode draden tussen de hoofdstukken van dit proefschrift. Elke hoofdstuk in dit proefschrift betreft een ander type gen regulatie (grofweg langs de lijnen van het centrale dogma).

In de **Introductie** introduceren we het concept *cell type* en beschrijven we hoe nauw verwant dit onderwerp is aan gen regulatie en ontwikkeling (nog een rode draad van dit proefschrift). We beschrijven dan in lektentaal een aantal concepten die nodig zijn om de rest van het proefschrift te begrijpen. We beschrijven DNA methylering als vorm van epigenetische regulatie (epigenetica: overdraagbare veranderingen in het genoom die de sequentie zelf niet aantasten). Daarna duiken we kort in de transcriptie regulatie, de controle mechanismen

die beslissen welke genen op welk moment worden getranscribeerd, en translatie regulatie, wat bepaalt met welke snelheid translatie plaatsvindt. Tot slot beschrijven we *omics*, een verzameling van relatief nieuwe technieken die cruciaal zijn voor het meten van de eerder genoemde processen en die veel worden toegepast in dit proefschrift.

In **Hoofdstuk 1** bekijken we hoe epigenetica de cel identiteit en transcriptie van *mouse embryonic stem cells* (mESCs) beïnvloedt. We onderzoeken een verzameling van super-enhancers (groepen van nabijgelegen enhancers, wat regio's zijn in het genoom die niet coderen voor genen maar betrokken zijn bij de transcriptie van genen elders). Super-enhancers worden vaak geassocieerd met cell identiteit en zijn daarom zeer relevant voor ontwikkelingssystemen. Daarnaast blijkt uit recente studies dat de mate van DNA methylering varieert van cel tot cel. De mechanismen die zorgen voor deze heterogene methylering zijn echter nog niet goed onderzocht. Om deze mechanismen te achterhalen creëerden we methylering reporter cellijnen voor de *Sox2* and miR-290 super-enhancers. Deze cellijnen hebben twee kleuren fluorescente eiwitten, die aan of uit zijn afhankelijk van de methyleringsgraad van elk van de twee allelen (de kopieën van de super-enhancers van moeders- dan wel vaderszijde). We tonen aan dat de methyleringsgraad van de super-enhancers niet alleen heterogeen is maar ook zeer dynamisch, omdat ze schakelen tussen aan en uit, en vice versa, in een tijdsbestek van enkele dagen. We tonen ook aan dat de methyleringsgraad de transcriptie beïnvloedt van de genen *in cis* (wat betekent dat de methyleringsgraad een lokaal effect heeft op hetzelfde chromosoom). Tot slot nemen we waar dat deze dynamische methylering niet slechts een *in vitro* artefact is omdat het ook plaatsvindt in pre-implantatie embryo's.

In **Hoofdstuk 2** gebruiken we de transcriptomen van cellen als indicator van celtype. We deden *single-cell transcriptomics* op menselijke foetale nieren in verschillende stadia van ontwikkeling. Nieren bestaan uit ongeveer 1 miljoen nefronen, de functionele eenheden die onafhankelijk kunnen opereren. De ontwikkeling van deze nefronen is asynchroon, wat betekent dat meerdere stadia van nefron-ontwikkeling tegelijk zichtbaar zijn in de foetale nier. In de transcriptomics dataset identificeren wij 22 verschillende celtypes, variërend van voorloper cellen tot volledig gedifferentieerde cellen. Sommige van deze cellen waren nieuwe, meer genuanceerde, subclassificaties van vooraf bekende cellen zoals de *nephron progenitor cells*. We zien ook dat voor de *podocyte* het transcriptoom verder blijft veranderen gedurende ontwikkeling, ondanks dat het celtype wel al vast staat. Dit soort gedetailleerde informatie over nier celtypes kan mogelijk het pad effenen naar de ontwikkeling van medicijnen voor nierziekten in de vorm van regeneratieve therapieën.

In **Hoofdstuk 3** onderzoeken we de translatie en degradatie snelheden in mESCs. Het meten van RNA is dikwijls gemakkelijker dan het meten van eiwit, en vanwege de hiërarchische relatie tussen de twee wordt er vaak van uit gegaan dat veranderingen in RNA ook plaatsvinden in het eiwit. Een plotselinge verandering van RNA concentratie zou zich dan ook moeten uiten in het bijbehorende eiwit. Hoe snel een gen's eiwit concentratie reageert op de RNA concentratie verschilt per gen en verandert dynamisch. Zodoende kan men in een

systeem dat veel veranderingen doorgaat, bijvoorbeeld gedurende differentiatie, niet simpelweg RNA meten en aannemen dat de bijpassende eiwitten gelijke patronen vertonen. In dit hoofdstuk modelleren we eiwit synthese en degradatie snelheden aan de hand van RNA en eiwit data van differentiërende mESCs. Dit stelt ons in staat om de verschillen tussen RNA en eiwit in kaart te brengen. Nog interessanter aan de modellen is dat ze de gevallen identificeren waarbij onze aanname van constante omzetsnelheden *niet* kloppen, wat suggereert dat deze genen post-transcriptioneel worden gereguleerd (gereguleerd in de eiwit synthese of degradatie stappen). Met deze modellen identificeren we nieuwe gevallen van translatie regulatie via microRNA (miR), kleine RNA moleculen die gen-coderende RNAs blokkeren. Interacties tussen mRNAs en miRs zijn doorgaans zeer moeilijk te identificeren.

In **Hoofdstuk 4** worden de modellen van het voorgaande hoofdstuk op de proef gesteld. We wilden enkele van de gevonden miR-gen interacties verifiëren. Om de interacties te testen *transfecteerden* we de cellen met *miR mimics* en *miR inhibitors* (transfecteren: het introduceren van nucleïnezuren of eiwitten in de cel). Om de timing en concentraties van de transfecties te optimaliseren creëerden we cellijnen die transfectie kunnen rapporteren middels fluorescerende eiwitten. Vervolgens transfecteerden we zes verschillende miR mimics, deden we transcriptomics en tonen we aan dat de miRs de concentratie van de voorspelde genen negatief beïnvloeden. Deze resultaten ondersteunen de toepassing van modellen als middel voor het ontdekken van translatie regulatie via een miR.