Universiteit Leiden
The Netherlands

The environmentally-regulated interplay between local three-dimensional chromatin architecture and gene expression

Rashid, F.Z.M.

Citation

Rashid, F. Z. M. (2021, June 22). *The environmentally-regulated interplay between local three-dimensional chromatin architecture and gene expression*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3192230

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/1887/3192230

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

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The handle https://hdl.handle.net/1887/3192230 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Rashid, F.Z.M.
Title: The environmentally-regulated interplay between local three-dimensional chromatin architecture and gene expression
Issue Date: 2021-06-22

Samenvatting

Wanneer een *Escherichia coli* celpellet gelyseerd wordt in een eindvolume dat 50 keer kleiner is dan het pellet zelf, is het resultaat een oplossing die zo viskeus is dat er met een pincet geleiachtige druppels uit kunnen worden gehaald. Het is fascinerend om te bedenken dat dit viskeuze materiaal, dat 50 keer geconcentreerd is, ingekapseld door een membraan een cel vormt die leeft. De blauwdruk van het leven van deze cel staat geschreven in het circulaire genoom dat een diameter heeft van ongeveer 1.5 mm. Het genoom wordt gevouwen door "nucleoid associated proteins" (NAPs) en bestaat in de vorm van een fase-gescheiden structuur in de cel. De cel staat voor een grote uitdaging: de blauwdruk van zijn leven moet opeengepakt blijven om voor de celdeling verdeling over dochtercellen mogelijk te maken, terwijl tegelijkertijd individuele genen toegankelijk moeten blijven voor de cel om snel te kunnen reageren op zowel gunstige als ongunstige omgevingsfactoren. De NAPs die hier zorg voor dragen moeten daarom beschikken over architecturele eigenschappen om het genoom compact te maken én moeten gevoelig zijn voor signalen uit de omgeving om een respons vanuit het genoom mogelijk te maken. Door vooruitgangen in fluorescentiemicroscopie, "chromosome conformation capture" (3C) gebaseerde technieken en *in vitro* "genome-in-a-box" benaderingen is het mogelijk geworden een begin te maken om de principes van chromosoomorganisatie en -dynamiek te ontrafelen. In dit proefschrift worden "single-cell" fluorescentiemicroscopie, "ensemble reverse transcriptase quantitative PCR" (RT-qPCR) in combinatie met 3C-qPCR en "single-molecule Förster resonance energy transfer" (smFRET) gebruikt om inzicht te krijgen in de fascinerende wisselwerking tussen driedimensionale chromatinestructuur en genexpressie. Op basis van de observaties met deze technieken wordt een genregulatiemodel voorgesteld waarin de architecturele eigenschappen en regulatoire functies van NAPs samen komen.

Een actueel overzicht van de wisselwerking tussen chromosoomorganisatie en genoomtransacties, inclusief replicatie, transcriptie en segregatie in bacteriën wordt gegeven in **Hoofdstuk 1**. Chromosoomvouwing en -compactie op moleculair niveau ten gevolge van de binding van NAPs wordt beschreven, evenals de wisselwerking tussen NAPs en de eiwitten die NAPs reguleren waardoor chromatinestructuur wordt gemoduleerd. De hiërarchische organisatie van bacteriële chromosomen wordt ook behandeld in **Hoofdstuk 1**. Tenslotte wordt er een overzicht gegeven van de invloed van NAPs met architecturele eigenschappen en genoomtransacties op lokale en globale patronen van chromosoomorganisatie, en hoe dit beïnvloed kan worden door omgevingsfactoren

De driedimensionale structuur van het prokaryote chromosoom is gecodeerd in zijn sequentie als bindingsplaatsen met verschillende sterkte voor de verschillende NAPs die tot expressie komen in de cel, en in de vorm van de locatie van transcriptie-eenheden en geassocieerde regulerende elementen. Dit vraagt om het bestuderen van chromosoomarchitectuur in relatie tot genoomsequentie. Hi-C maakt dit mogelijk. Hi-C is een "chromosome conformation capture" gebaseerde techniek die op nabijheid gebaseerde ligatie combineert met "next generation sequencing" om de fysieke nabijheid van chromosomale loci in de driedimensionale ruimte te detecteren. Een gedetailleerd protocol voor Hi-C in prokaryoten wordt gegeven in **Hoofdstuk 2**.

In **Hoofdstuk 3** wordt het door H-NS gereguleerde osmosensitieve operon *proVWX* van *Escherichia coli* gebruikt als modelsysteem en wordt - voor het eerst in bacteriën - aangetoond dat de activiteit van een transcriptie-eenheid gecorreleerd is met driedimensionale genoomarchitectuur. RT-qPCR werd gebruikt om het transcriptieprofiel van het *proVWX* operon in kaart te brengen. Specifiek, werd de rol van H-NS en StpA in de regulatie van expressie van het operon bestudeerd. 3C-qPCR en "live cell" FROS werden gebruikt om de vorming van een lus tussen de promoter en de terminator van *proVWX* aan te tonen onder condities waarbij het operon niet actief is, dan wel de destabilisatie van de lus bij osmolaire condities die *proVWX* activeren. De resultaten gepresenteerd in **Hoofdstuk 3** laten ook zien dat StpA, dat vaak wordt gezien als moleculaire "back-up" van H-NS, eigen fysiologische rollen heeft in wildtype cellen naast H-NS.

De dynamiek in chromosoomorganisatie en de associatie met genomische processen creëren een noodzaak om het genoom op een niet-invasieve, natuurlijke manier in beeld te brengen. In **Hoofdstuk 4** wordt HI-NESS (H-NS-based indicator for nucleic acid stainings) beschreven. HI-NESS is een minimaal invasieve kleurstof die DNA aankleurt en is gecreëerd door het DNA bindende domein van H-NS te fuseren met een fluorescent eiwit. HI-NESS labelt het chromosoom in *Escherichia coli* cellen die H-NS missen, eukaryote cellen in cultuur en in embryos van zebravissen.

Hoe het gerapporteerde werk in dit proefschrift een basis vormt voor het onderzoeken van chromosoomorganisatie en dynamiek in bacteriën en archaea – een domein dat algemeen wordt gezien als de ontbrekende schakel tussen bacteriën en eukaryoten – wordt bediscussieerd in **Hoofdstuk 5**. In dit hoofdstuk

wordt een model voorgesteld waarin de wisselwerking tussen chromosoomstructuur en genoomtransacties een drijvende kracht in evolutie is.