



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Quantifying nucleosome dynamics and protein binding with PIE-FCCS and spFRET

Martens, C.L.G.

Citation

Martens, C. L. G. (2023, February 1). *Quantifying nucleosome dynamics and protein binding with PIE-FCCS and spFRET*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3514600>

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/1887/3514600>

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

Samenvatting

Nucleosomen zijn het eerste niveau van DNA compactie in de kern van eukaryote cellen. In menselijke cellen wordt op deze manier ongeveer twee meter DNA gecondenseerd tot een bol met een diameter van zes micrometer. Hoewel het zich in deze sterk gecondenseerde staat bevindt, die chromatine wordt genoemd, is het DNA in chromatine betrokken bij processen zoals transcriptie en DNA-reparatie, en moet het DNA hiervoor toegankelijk zijn. Hiervoor wordt de structuur van chromatine gemoduleerd door histonstaartmodificaties, eiwitherkenningselementen in de DNA-sequentie en een groot aantal eiwit-DNA interacties. Eerdergenoemde processen hebben vaak directe DNA-toegang nodig en zijn daarvoor afhankelijk van een verandering in de nucleosoom compactie. In dit proefschrift beschrijf ik de resultaten van Pulsed Interleaved Excitation and Fluorescence (Cross) Correlation Spectroscopy (PIE-F(C)CS) gecombineerd met single-pair Förster Resonance Energy Transfer (spFRET) gebruikt om dynamiek en stabiliteit van enkele nucleosomen te bestuderen, welke afhangt van subtiele verschillen in de lengte van DNA uiteinden, DNA-sequentie, histonvarianten en specifieke en niet-specifieke eiwitinteracties. Deze techniek kan conformatieveranderingen van enkele nanometers meten, en is een uitstekende techniek om nucleosomale compactie te volgen, aangezien het nucleosoom slechts tien nanometer in diameter is. In combinatie met F(C)CS en PIE, is het mogelijk om met spFRET de conformatie veranderingen op een tijdschaal van micro- tot milliseconden te volgen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van eerdere studies van het nucleosoom, zijn rol in chromatine compactie *in vitro* en *in vivo* en de effecten van DNA-sequentie, histonmodificaties en eiwitinteracties op de stabiliteit en dynamiek van nucleosomen. Studies tonen een dubbele rol voor het nucleosoom; als stabiele structuur die herkend wordt door transcriptiefactoren die selectief binden aan specifieke histonmodificaties of DNA sequenties, en een dynamische entiteit die in staat is om DNA tijdelijk los te laten waardoor processen op het DNA kunnen worden gereguleerd. Dit alles gebeurt terwijl DNA in de cellen zit gevouwen op een schijnbaar ongeorganiseerde manier. In **Hoofdstukken 2 en 3** gaan we dieper in op de optische, analytische

en biologische hulpmiddelen die we hebben ontwikkeld en gebruikt om experimenten uit te voeren die gevoelig genoeg zijn om conformatie veranderingen in een enkel nucleosoom zichtbaar te maken. In **Hoofdstuk 2** beschrijven we de microscoop opstelling en het analyseproces voor experimenten met één molecuul. Het kwantificeren van de fluorofoorignalen in de microscoopopstelling en het optimaliseren van de uitlijning van de opstelling levert correlatiecurven van verschillende fluorescente signalen. De productie, zuivering en verwerking van DNA, nucleosomen en eiwitten zijn geoptimaliseerd, zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**. Daarnaast presenteren we een nieuw algoritme om effecten van aggregatie in lange metingen uit te sluiten. Door dit algoritme hoeft men niet 'rond de aggregaten' te meten zoals gebruikelijk is. Het gebruik van PIE-F(C)CS met spFRET maakt het mogelijk om naast de concentratie- en diffusietijden, reactie kinetiek en meerdere populaties uit één enkele meting te distilleren. Door de gegevensanalyse na de acquisitie te optimaliseren kan een hoge mate van nauwkeurigheid voor de fysieke parameters worden bereikt. Dit betekent dat PIE-FCCS in combinatie met spFRET kleine verschillen tussen twee zeer vergelijkbare biologische samples kan ophelderen. Beide methodehoofdstukken worden afgesloten met validaties van de methoden uit experimenten. In **Hoofdstuk 4** laten we de effecten zien van veranderingen in DNA-sequentie, linker-DNA en buffersamenstelling op nucleosomen. In zoutconcentraties die lager zijn dan fysiologische omstandigheden, hebben nucleosomen de voorkeur om in een gesloten conformatie te zijn. Bij toenemende NaCl-concentratie neemt de openingssnelheid van het nucleosoom toe terwijl de sluitingssnelheid hetzelfde blijft. DNA-histon-interacties worden sterker met de lengte van linker-DNA. De insertie van het Glucocorticoid Response Element (GRE) in de Widom 601 DNA-sequentie vermindert de stabiliteit van het nucleosoom wanneer het GRE dieper in het nucleosoom werd ingebracht (d.w.z. naar de dyade toe). Behalve het nucleosoom waarin de GRE naar de histonkern is gericht, verhogen alle GRE-nucleosomen hun openingssnelheden bij toenemende NaCl-concentratie. Het positioneren van de GRE in de richting van de histonkern verhoogt niet de openingssnelheid, maar verlaagt juist de sluitingssnelheid. De GRE zou de stijfheid van de DNA-streng kunnen vergroten, waardoor het energetisch minder gunstig wordt om naar de histonkern te buigen. Het positioneren van de GRE naar de dyad vermindert de kritische NaCl-concentratie waarbij het dynamisch evenwicht verandert. Het vergelijken van PIE-FCS-resultaten met bevindingen van

burst-analyse voor nucleosomen met variabele linker-DNA-lengtes in lage NaCl-concentratie geeft inzicht in het effect van linker-DNA op compactie. Het nucleosoom met de kortste linkers heeft juist een hoge FRET-populatie vergelijkbaar met het nucleosoom met de kruisende linkers in burst-analyse, terwijl PIE-FCS een gesloten fractie vertoont die vergelijkbaar was met nucleosomen zonder DNA te kruisen. Toevoeging van stabilisatorverbindingen en zuurstofvangers vertraagt de nucleosomale dynamiek aanzienlijk en nucleosomen bevinden zich dan meer in een gesloten conformatie. Men zou kunnen stellen dat het toevoegen van stabilisatoren lijkt op meer *in vivo* opeengepakte omgevingen, en we willen benadrukken dat het effect van additieven op de dynamiek en stabiliteit in overweging moet worden genomen bij het vergelijken van experimenten.

In **Hoofdstuk 5** kwantificeren we het effect van posttranslationale histon modificatie (PTM) H3K36me3 op de stabiliteit en dynamiek van nucleosomen. Nucleosomen die de H3K36-trimethylering bevatten, lijken meer open, gebaseerd op hun gemiddelde FRET- en evenwichtsconstanten. Het FRET-sigitaal laat zien dat de trimethylering de buiging van de nucleosomale uitgang naar de histonkern niet remt. Het verlaagt echter het aantal elektrostatistische interacties met een factor twee. Deze afname in DNA-histon-interacties leidt ook tot snellere dynamiek van H3K36me3-nucleosomen in zowel lage als hoge zoutomstandigheden. Verhoogde kinetiek door minder (sterke) interacties tussen DNA-armen en histonkern kan de manier zijn waarop de trimethylering de binding aan nucleosomaal DNA vergemakkelijkt in processen zoals transcriptie en DNA-herstel. Het gebruik van PIE-FCCS op enkelvoudig gelabelde nucleosomen en gelabelde varianten van het LEDGF-eiwit (wildtype en AT-hook deficiënt) laat zien dat H3K36me3 de LEDGF-affiniteit voor nucleosomen verhoogt. De diffusietijden die voor verschillende LEDGF-nucleosoom complexen worden gevonden verschillen met meer dan een milliseconde van elkaar, wat verschillende wijzen van interactie aangeeft, afhankelijk van de LEDGF-variant en of H3K36me3 al dan niet aanwezig was in het nucleosoom. Het langzaamste complex, de combinatie van LEDGF-WT en nucleosomen zonder H3K36me3, diffundeert alsnog sneller dan open nucleosomen. De resultaten voor fracties en diffusietijden voor experimenten op WT-nucleosomen lijken nauwkeuriger te zijn dan die van experimenten op H3K36me3-nucleosomen; aangezien deze waarden zijn gebaseerd op de correlatiecurve, die het nucleosoom in bepaalde conformationele toestanden vertegenwoordigt, kunnen de grote

fouten worden veroorzaakt door overgangstoestanden als gevolg van de veranderde interacties van de H3-staart met nucleosomaal DNA. Ondanks het verlies van gesloten nucleosomen aan het begin van een experiment, is het verlies van FRET per nucleosoom minimaal, afhankelijk van het eiwit en de nucleosoomvarianten, wat impliceert dat LEDGF binding voornamelijk via vrije open nucleosomen verloopt en dat LEDGF-binding open nucleosomen stabiliseert.

In **Hoofdstuk 6** maken we de transitie van *in vitro* met gezuiverde eiwitten en DNA naar *ex vivo* experimenten met GR in nucleair extract. Toevoeging van het eiwit c-Jun verhoogt de diffusietijd van DNA enigszins, na uitsluiting van condensaten. Het verhogen van de concentratie van c-Jun verhoogt de diffusietijd van DNA niet, wanneer het signaal wordt gefilterd van bijdragen van condensaten. Deze waarnemingen wijzen op niet-specifieke interacties van c-Jun met DNA en impliceren een DNA-condenserende rol voor c-Jun tijdens transcriptie. Het verklaren van de interactie van GR in een nucleair extract met DNA of nucleosomen was minder eenvoudig; in agarosegel is geactiveerd GR in het nucleaire extract zichtbaar als een uitgesmeerde band in de gebieden met hoog molecuulgewicht. Dit uitsmeren kan het gevolg zijn van niet-specifieke, kortstondige interacties met andere eiwitten in het extract, wat eerder is waargenomen. Het kan ook een intrinsieke eigenschap zijn van de GR die zich in een ongeordende toestand bevindt, wat vaak wordt gecorreleerd aan het activiteitsniveau van een eiwit. Deze resultaten zijn in overeenstemming met die van FCCS experimenten, waar complexen van GR met ofwel DNA of nucleosoom nauwelijks zichtbaar zijn, wat een lage concentratie van een complex impliceert. Voor alle DNA- en nucleosoomconstructen zijn de bindingsaffiniteiten 20 nM en groter, en statistisch is er geen significant verschil in dissociatie-energie voor DNA-constructen GREh, GRE2 en GRE3. Deze resultaten verschillen van eerdere resultaten, waar werd aangetoond dat de compactie van DNA in nucleosomen, evenals het inbedden van de GRE-positie in nucleosomen, de affiniteit van GR verhoogt. Hoewel de verschillen in affiniteit klein waren, lijkt het erop dat *ex vivo*, dissociatie afhangt van de toegankelijkheid van het GRE in nucleosoom, d.w.z. een GRE die dicht bij de nucleosomale uitgang is geplaatst verhoogt de toegang voor GR.

De combinatie van deze bevindingen laat zien dat kleine veranderingen in histon-DNA-interacties, hetzij structureel of elektrostatisch, een significant effect kunnen hebben op de stabiliteit en kinetiek van nucleosomen *in vitro*.

In deze thesis hebben we laten zien dat verschillen zo klein als 7 baseparen meetbaar zijn met onze combinatie van microscopische technieken. Wanneer deze waarnemingen worden doorgetrokken naar *in vivo*-omgevingen, impliceren ze dat slechts zeer kleine energiever verschillen nodig zijn om veranderingen in de chromatine compactie op gang te brengen, waardoor DNA-eiwitinteracties en daaropvolgende processen zoals transcriptie mogelijk worden. PIE-FCCS gecombineerd met spFRET is een uitstekende techniek voor het kwantificeren van deze subtiele verschillen in zowel structurele als kinetische parameters, en zou met kleine aanpassingen ook gebruikt kunnen worden voor het meten aan *in vivo* systemen om uit te vinden welke veranderingen aan DNA sequentie, lengte of histon staarten doorslaggevend is voor de stabiliteit van en dynamiek in chromatine.