

Replicating DNA at top speed : chromatin at risk

Citation for published version (APA):

Spaapen, F. A. (2010). *Replicating DNA at top speed : chromatin at risk*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2010

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

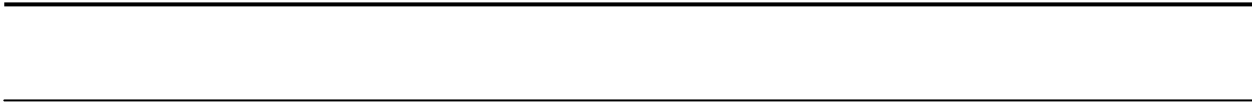
www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



Summary



Summary

All genetic information that a cell needs to function is stored in its DNA. Genes are transcribed into mRNA, which is subsequently translated into proteins. When a cell prepares for cell division, the nuclear DNA is duplicated and divided between two daughter cells and all genetic information is maintained. During development, cells acquire specific functions, mediated by gene-environment interactions. Resting stem or progenitor cells are activated by molecules in their direct environment. These signals are transduced to the nucleus, where, depending on the nature of the signal(s), specific genes are activated, resulting in the production of RNA's (mRNA, non-coding RNAs) and proteins which trigger a differentiation program, that ultimately leads to formation of specialized, fully functional cells.

Although most somatic cells in a human body contain identical DNA sequences, the vast variety of cellular phenotypes implies that the information stored in the DNA sequence on its own is not sufficient to explain cell diversity and function. An additional layer of regulation, other than the DNA sequence itself, regulates accessibility of the DNA template. Nuclear DNA is not 'naked' but packed into a complex structure called chromatin. Chromatin predominantly consists of DNA wrapped around histone proteins. Histone proteins can be posttranslationally modified, and via these modifications many different protein complexes can bind and regulate chromatin. Chromatin structure is found in several 'states', ranging from tightly condensed inaccessible chromatin to open and accessible chromatin. Processes like DNA duplication (replication) and gene activation (transcription) are regulated by changes in chromatin structure, via increased or decreased accessibility of the DNA template. Collectively, these processes, that may involve concerted action of chemically modified DNA and proteins and non-coding RNAs, are referred to as epigenetic regulation. Polycomb group proteins (PcG) have been identified as epigenetic regulators of chromatin structure, and are best known as transcriptional regulators of Hox genes. An overview of our current understanding of regulation of replication and transcription by epigenetics in general and by PcG proteins in particular is presented in chapter 2.

Although insight into Polycomb biology has improved a lot over recent years, mechanisms of action of PcG proteins are far from fully understood. Main questions are What is the mechanism behind PcG-mediated transcriptional repression? Is there perhaps a role of PcG in replication and DNA repair? How are PcG proteins involved in mediating gene-environment interactions? How are PcG proteins regulated themselves? How are PcG proteins targeted to lineage-type specific gene targets?

As PcG proteins are involved in antero-posterior axis formation and many single PcG mutants cause skeletal abnormalities, this thesis aimed at elucidating the role of PcG proteins in one important aspect of enchondral ossification, namely chondrogenic differentiation.

Summary

The formation of bone (enchondral ossification) is a multistep process, in which an extracellular matrix is produced by chondrocytes that is ultimately calcified by osteocytes. Numerous locally produced soluble factors regulate different stages in this process, strongly suggesting that the microenvironment plays an important role in enchondral ossification. Many of these factors are activated in response to hypoxia, and downstream of HIF1 α activation, which is consistent with the absence of blood vessels in cartilage. Most of these findings result from *in vitro* studies, and currently studies on enchondral ossification often are performed on whole embryos or growth plates. Chapter 3 describes the molecular analysis of pathways relevant to enchondral ossification in a novel *in vivo* model in rabbits. The model makes use of experimentally induced local damage of periosteum, which results in activation of mesenchymal stem cell (MSC)-like activity, and *periosteal callus* formation. Subsequently the callus is used to functionally restore an experimentally induced articular cartilage lesion. Analysis of mRNA and protein expression in the repaired lesion confirms that the model recapitulates the sequential steps of normal chondrogenic development. In addition, we provide *in vivo* evidence that during the chondrogenic phase Hif1 α is activated, suggesting that the conditions of periosteal callus formation are, at least transiently, hypoxic.

During cellular differentiation cells receive extracellular signals that lead to changes of the transcriptome (all cellular RNAs produced by transcription of DNA), resulting in production of RNAs and proteins needed for a specific cell type to adapt and function. At the onset of this project knowledge on Immediate Early Genes (IEGs) in chondrogenic differentiation was limited. The identification of IEGs as strong responders to a changing microenvironment (inducing chondrogenic differentiation), prompted us to study the role of the IEG Egr1 during ATDC5 chondrogenesis (chapter 4). In a loss-of-function approach, using short hairpin RNAs targeting Egr1 mRNA, Egr1 was found to function in at least two, possibly interconnected, processes: Egr1 is required for transcriptional activation of downstream chondrogenic differentiation pathways and Egr1 controls initiation of crucial epigenome wide reprogramming during chondrogenesis. Additionally, Egr1-LOF cells accumulate DNA damage, activate DNA damage responses, and induce a senescence-like response, which may be related to abnormal epigenetic responses. Relevantly, chapter 4 describes two ways in which Egr1 may connect to PcG biology.

Polycomb repressive complex 1 (PRC1) mutant mice display abnormalities in skeletal development that correlate to defective maintenance of HOX gene expression boundaries, but our understanding of epigenetic mechanisms underlying chondrogenic differentiation is poor. To gain more insight in molecular mechanisms mediated by PRC1 during chondrogenesis, we studied Bmi1 in ATDC5 chondrogenic differentiation (chapter 5). Upon induction of differentiation ATDC5 cells undergo a transient phase of hyperproliferation. Loss of Bmi1 leaves the cells incapable of undergoing this expansion phase. Bmi1-LOF cells accumulate massive amounts of DNA damage,

arrest in S-phase, and consequently display characteristics of replicative senescence. Accumulation of DNA damage and activation of intra-S-phase checkpoints is associated with replication stress, collisions of replication and transcription machineries. This led us to study global localization of transcription and replication. Interestingly, control cells showed spatially separated regulation of these two DNA-based processes, whereas this coordinated regulation is lost in Bmi1-LOF cells during rapid proliferation. Furthermore, DNA damage in Bmi1-deficient cells accumulates at sites of *de novo* DNA synthesis, suggesting that loss of PRC1 function during hyperproliferation renders the cells unable to deal with increased chromatin stress. The data presented in chapter 5 reveals an important function for PRC1 in orchestrating simultaneous chromatin-associated processes, i.e. DNA replication and transcription, extending PRC1 function as merely transcriptional repressors.

Valproic acid (VPA) is a drug used to treat epilepsy and other neurological conditions. VPA administration during pregnancy can lead to neural tube defects, skeletal transformations and other adverse effects in the unborn child. VPA was designated as an epigenetic drug, but molecular mechanisms of actions are unclear. Treatment of differentiating ATDC5 cells with VPA in therapeutically relevant concentrations completely abrogates the ability of chondrogenic progenitors to differentiate, which is accompanied by severe alterations in global epigenetic modifications. Additionally, VPA affects the differentiation-induced hyperproliferation in a TP53-dependent manner. Completely in line with the data presented in chapters 4 and 5, VPA treated cells accumulate replication stress, DNA damage, and induce senescence-like responses, further strengthening the conclusions that epigenomic remodeling is critical for proper differentiation to occur (chapter 6).

Taken together, data in this thesis shows that in response to extracellular differentiation stimuli, epigenomic remodeling allows cells to and tune DNA-templated processes (transcription, replication), under conditions of increased proliferation and RNA and protein production. When epigenomic reprogramming fails, combined stress of uncoordinated transcription and replication stress leaves cells incapable of undergoing chondrogenic differentiation. The significance of the results in this thesis is discussed in chapter 7.

Samenvatting

Samenvatting

Alle genetische informatie die nodig is om een cel te laten functioneren ligt opgeslagen in 'n DNA. Genen kunnen afgeschreven worden in mRNA dat vervolgens kan worden vertaald naar eiwitten. Wanneer een cel zich voorbereidt voor celdeling, wordt het DNA in de celkern gedupliceerd en wordt het verdeeld tussen de twee dochtercellen, waardoor alle genetische informatie behouden blijft. Tijdens ontwikkeling, verkrijgen cellen een specifieke functie. Dit proces wordt gemedieerd door gen-omgevings interacties. Rustende stam of progenitor cellen worden geactiveerd door moleculen in hun directe omgeving. Deze signalen worden doorgegeven naar de celkern waar, afhankelijk van de aard van de signalen, specifieke genen worden geactiveerd, resulterend in de productie van RNA (mRNA, niet coderende RNA's) en eiwitten, die een differentiatie programma kunnen activeren, wat uiteindelijk leidt tot het ontstaan van gespecialiseerde, volledig functionele cellen. Hoewel bijna alle lichaamscellen in een menselijk lichaam identieke DNA sequenties bevat, impliceert de grote variatie aan gespecialiseerde cellen, dat de informatie die in het DNA ligt opgeslagen niet voldoende is om celdiversiteit en functie te verklaren. Een andere vorm van regulatie, naast de DNA sequentie zelf, reguleert toegankelijkheid van DNA. DNA in de kern is ingepakt in een complexe structuur, dat chromatine genoemd wordt. Chromatine bestaat voornamelijk uit DNA dat om histon eiwitten gewikkeld is. Histon eiwitten kunnen posttranslationeel gemodificeerd worden, en via deze modificaties kunnen vele verschillende eiwitcomplexen het chromatine binden en het reguleren. De structuur van chromatine bevindt zich in verschillende staten, variërend van een hechte, gecondenseerde, ontoegankelijke staat tot een open en toegankelijke staat. Cellulaire processen als DNA duplicatie (replicatie) en gen activatie (transcriptie) worden gereguleerd door veranderingen in chromatine structuur, via verhoogde of verlaagde toegankelijkheid van het DNA. Chromatine structuur wordt onder meer gereguleerd door chemische modificaties van DNA en eiwitten, en niet-coderende RNA. Samen wordt deze vorm van regulatie epigenetica genoemd. Polycomb groep eiwitten (PcG) zijn geïdentificeerd als epigenetische regulatoren van chromatine structuur, en zijn vooral bekend als transcriptionele regulatoren van Hox genen. Een overzicht van ons huidige begrip van regulatie van transcriptie en replicatie door epigenetica in het algemeen en specifiek door PcG eiwitten wordt beschreven in Hoofdstuk 2.

Hoewel het inzicht in Polycomb biologie flink is toegenomen de afgelopen jaren, worden de mechanismen van PcG functioneren nog maar voor een klein deel begrepen. Er zijn in dit vakgebied verschillende kernvragen. Wat is het mechanisme van PCG gemedieerde transcriptionele repressie? Is er wellicht een rol voor PcG in replicatie en DNA reparatie? Hoe zijn PcG eiwitten betrokken bij het mediëren van gen-omgevings interacties? Hoe worden PcG eiwitten zelf gereguleerd? Hoe worden PcG eiwitten naar celspecifieke genen gestuurd?

Aangezien PcG eiwitten betrokken zijn bij antero-posterior as vorming en PcG mutante muizen skelet afwijkingen hebben, richt deze thesis zich op het verhelderen van de rol van PcG eiwitten in een belangrijk aspect van enchondrale ossificatie, namelijk chondrogene differentiatie.

De vorming van bot (enchondrale ossificatie) is een meerstaps proces, waarin een extracellulaire matrix gevormd wordt door chondrocyten (kraakbeencellen), die uiteindelijk verkalkt wordt door osteocyten (botcellen). Talloze lokaal geproduceerde oplosbare factoren reguleren de verschillende stadia van deze processen, wat aangeeft dat de directe omgeving een sterke rol speelt in enchondrale ossificatie. Veel van deze factoren worden geactiveerd in reactie op een hypoxische omgeving, en activatie van de transcriptie factor HIF1 α , wat consistent is met de afwezigheid van bloedvaten in kraakbeen. Het overgrote deel van deze bevindingen komen voort uit *in vitro* studies. Daarnaast worden vele studies naar enchondrale ossificatie uitgevoerd op totale embryos of groeiplaten. Hoofdstuk 3 beschrijft de moleculaire analyse van relevante signaleringspaden tijdens enchondrale ossificatie in een nieuw *in vivo* model in konijnen. Dit model maakt gebruik van een lokaal geïnduceerde beschadiging van het periosteum, wat resulteert in de activatie van mesenchymale stem cell (MSC) gelijkende activiteit, en periosteale callusvorming. Vervolgens wordt de callus gebruikt voor een functioneel herstel van een experimenteel geïnduceerde articulaire kraakbeen lesie. Analyse van mRNA en eiwit expressie bevestigt dat het model de opvolgende stappen van normale chondrogene ontwikkeling recapituleert. Daarnaast, bieden we *in vivo* bewijs voor activatie van HIF1 α tijdens de chondrogene fase, wat suggereert dat de omstandigheden van periosteale callusvorming, op zijn minst transient, hypoxisch zijn.

Tijdens cellulaire differentiatie ontvangen cellen extracellulaire signalen die leiden tot veranderingen in het transcriptoom (alle RNA's die tijdens transcriptie van DNA geproduceerd worden), resulterend in productie van specifieke RNA's en eiwitten die een cel nodig heeft om zich aan te passen en een nieuwe functie aan te nemen. Aan het begin van dit project was er nauwelijks kennis van de rol van Immediate Early Genes (IEG's) tijdens chondrogene differentiatie. De ontdekking dat IEG's zeer sterk reageren op een veranderende omgeving, leidde tot het bestuderen van de rol van de IEG Egr1 tijdens chondrogene differentiatie in ATDC5 cellen (hoofdstuk 4). In een verlies van functie aanpak, gebruik makend van geïnduceerde afbraak van Egr1 mRNA, bleek Egr1 een tweeledige rol te spelen, die mogelijk verband met elkaar houden. Egr1 is vereist voor transcriptionele activatie van chondrogene differentiatie signaleringspaden, en ook initieert Egr1 cruciale epigenoom wijde herprogrammering tijdens chondrogenese. Daarnaast lopen cellen zonder Egr1 tijdens chondrogenese DNA schade op, activeren ze DNA schade responsen, en induceren ze een verouderingsresponse (senescentie), die vermoedelijk gerelateerd is aan abnormale epigentische responsen. Hoofdstuk 4 beschrijft twee manieren waarin Egr1 vermoedelijk gelinkt aan PcG biologie is.

Polycomb repressive complex 1 (PRC1) mutante muizen vertonen abnormale skelet ontwikkeling, die correleert met defecte regulatie van Hox gene expressie, maar ons begrip van epigenetische mechanismen die hieraan ten grondslag liggen is beperkt. Om meer inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen die door PRC1 gemedieerd worden tijdens chondrogenese, bestudeerden we Bmi1 in ATDC5 chondrogene differentiatie (hoofdstuk 5). In response op inductie van differentiatie ondergaan ATDC5 cellen een transiente fase van hyperproliferatie. Verlies van Bmi1 functie leidt ertoe dat de cellen deze expansie fase niet kunnen ondergaan. Zonder Bmi1 lopen de cellen enorme hoeveelheden DNA schade op, ondergaan ze een S-fase arrest, en laten ze vervolgens karakteristieken zien van replicatieve senescentie. Opstapeling van DNA schade en activatie van een S-fase arrest wordt geassocieerd met replicatie stress, collisies van replicatie en transcriptie machineriën. Hierom bestudeerden we globale lokalisatie van transcriptie en replicatie. Controle cellen lieten een ruimtelijke scheiding zien van deze twee processen, terwijl deze gecoördineerde regulatie verloren is gegaan in cellen zonder Bmi1, die deze fase van hyperproliferatie ondergaan. Daarnaast lopen de Bmi1 deficiënte cellen DNA schade op op posities waar replicatie plaatsvindt, wat suggereert dat cellen met verlies van PRC1 functie tijdens hyperproliferatie niet in staat zijn om met verhoogde chromatin stress om te gaan. De data in hoofdstuk 5 laat zien dat PRC1 een belangrijke rol speelt in het regisseren van chromatine geassocieerde processen, zoals replicatie en transcriptie, wat betekent dat PRC1 niet enkel functioneert als transcriptionele repressor.

Valproaat is (VPA) is een medicijn dat wordt gebruikt om epilepsie en andere neurologische aandoeningen te behandelen. VPA gebruik tijdens zwangerschap kan leiden tot neurale buis defecten, malformaties van het skelet, en andere aandoeningen bij het ongeborn kind. VPA is beschreven als een epigenetisch medicijn, maar de moleculaire effecten zijn onbekend. Behandeling van differentierende ATDC5 cellen met therapeutisch relevante concentraties VPA leidt ertoe dat ATDC5 cellen het vermogen om te differentieren verliezen. Dit gaat gepaard met zeer sterke veranderingen in globale epigenetische modificaties. Daarnaast, verliezen deze cellen de capaciteit om te hyperproliferen in een TP53 afhankelijke manier. Totaal in lijn met de experimenten beschreven in hoofdstukken 4 en 5, lopen de VPA behandelde cellen replicatie stress en DNA schade op. Eveneens activeren deze cellen senescentie responsen, wat verder bijdraagt aan de conclusies dat epigenomische herprogrammering essentieel is om volledige differentiatie plaats te laten vinden (hoofdstuk 6).

De data in dit proefschrift laat zien dat in response op extracellulaire differentiatie stimuli, epigenomische herprogrammering de cellen in staat stelt om DNA gebaseerde processen (o.a. transcriptie en replicatie) op elkaar af te stemmen tijdens omstandigheden van versnelde proliferatie, en RNA en eiwit productie. Wanneer epigenomische herprogrammering niet goed plaats vindt, verliezen cellen het vermogen om chondrogeen te differentiëren, vanwege replicatie stress. De significantie van de resultaten beschreven in dit proefschrift worden bediscussieerd in hoofdstuk 7.