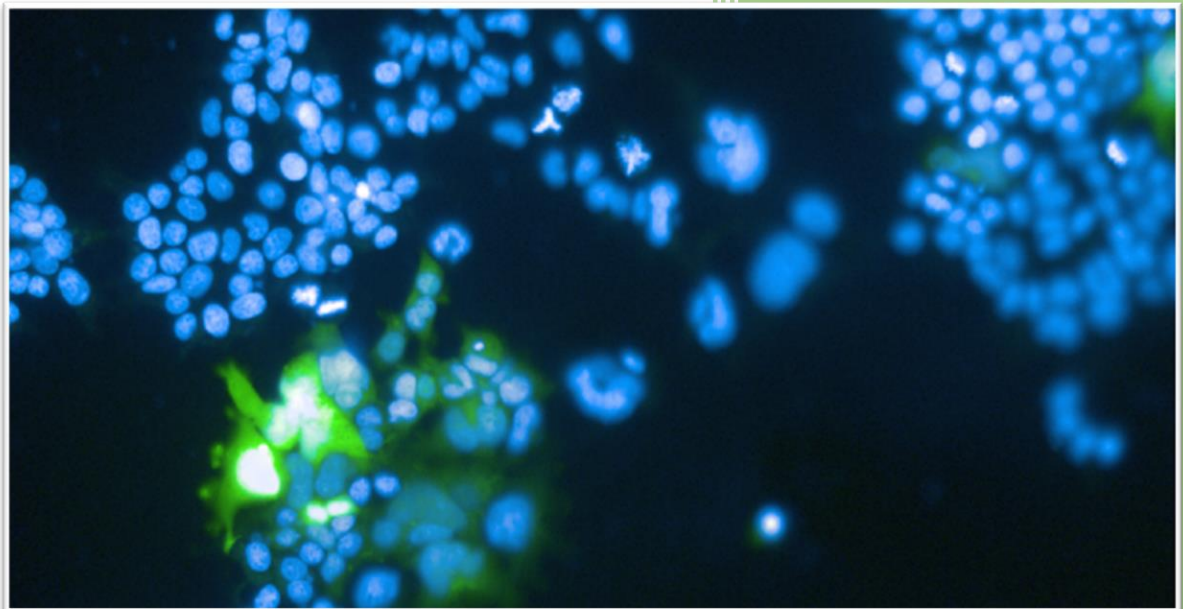


Functionele en moleculaire karakterisatie van de interactie tussen MeCP2 en LEDGF



Bachelor in de agro- en biotechnologie

Afstudeerrichting biotechnologie

Campus Roeselare

Student: Anouk Speleers

Academiejaar 2022 - 2023

Begeleidende docent(en):

Dr. Annick Keirsebilck

Stagementor(en):

Prof. dr. Zeger Debyser

Saskia Lesire

Abstract

Retrotranspositie is een fenomeen waarbij LINE-1 elementen zich verplaatsen naar een andere locatie in het genoom door het vormen van een RNA-tussenproduct. Dit proces wordt gereguleerd door een aantal factoren zoals transcriptionele repressie door MeCP2. Één van de interactiepartners van MeCP2 is LEDGF, een transcriptionele co-activator. Dit project focust op de moleculaire en functionele karakterisatie van het MeCP2-LEDGF complex. Enerzijds wordt aangetoond dat beide isoformen van LEDGF interageren met beide isoformen van MeCP2 met behulp van co-immunoprecipitaties. Het interactiedomein van de beide eiwitten wordt geïdentificeerd. Er wordt aangetoond dat het N-terminaal deel van LEDGF interageert met het ID- en TRD-domein van MeCP2. De functie van het complex is nog niet gekend dus wordt een hypothese gevormd. Afhankelijk van de interactiepartners van MeCP2 zal het eiwitcomplex de retrotranspositie inhiberen of activeren. De invloed van het MeCP2-LEDGF complex op de retrotranspositie wordt bestudeerd aan de hand van de LINE-1 retrotranspositie assays met een EGFP of Fluc reporter. Aan de hand van respectievelijk een groen fluorescent signaal of een lichtsignaal kan de hoeveelheid retrotranspositie onderzocht worden. De experimenten bevestigen dat MeCP2 een inhibitor is van de retrotranspositie, maar de functie van het MeCP2-LEDGF complex is complexer dan initieel vooropgesteld. Verder onderzoek zal nodig zijn om de functie van het MeCP2-LEDGF complex te karakteriseren.

Trefwoorden: LINE-1 retrotranspositie, MeCP2, LEDGF, LINE-1 EGFP retrotranspositie assay, LINE-1 Fluc assay

Afbeelding voorblad: Confocale microscopische afbeelding van de HEK293T cellen getransfecteerd met het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide. Op deze afbeelding zijn de nuclei blauw gekeurd en de groen fluorescente proteïne is met een groene kleur aangeduid.

Woord vooraf

In het kader van het behalen van de professionele bachelor agro- en biotechnologie afstudeerrichting biotechnologie heb ik deze bachelorproef geschreven. Het onderwerp baseert zich op het onderzoek dat tijdens de stage, die hiermee gecombineerd wordt, wordt gevoerd. Ik heb gedurende 60 dagen stage gelopen te Leuven in het labo voor Moleculaire Virologie en Gentherapie onder leiding van Prof. Dr. Zeger Debyser.

De opleiding Agro- en biotechnologie is een relatief algemene opleiding waar verschillende domeinen van de biotechnologie behandeld worden. Ik ben voornamelijk geïnteresseerd in wat men bij ons de rode biotechnologie noemt. Dit omvat vooral moleculaire biologie, cyto- en histologie en immunologie. Mijn stage sluit dus perfect aan bij mijn interessegebied. De onderzoeksgroep onder leiding van Prof. Dr. Zeger Debyser onderzoekt verschillende aspecten rond LINE-1 retrotranspositie. Deze elementen worden ook wel de springende genen genoemd. Ik focus mij op het MeCP2-LEDGF complex dat een invloed heeft op de LINE-1 retrotranspositie. Tijdens mijn stage karakteriseer ik dit complex zowel op moleculair als op functioneel niveau.

Ik wil Prof. Dr. Zeger Debyser bedanken voor het aanbieden van deze stageplaats en voor het begeleiden van mijn bachelorproef, maar ook voor alle wetenschappelijke kennis die u mij heeft bijgebracht. Daarnaast wil ik ook Saskia Lesire bedanken voor mij zo een aangename en leerrijke stageperiode te bezorgen. Elke vraag die ik stelde, legde je met plezier uit. Op elk onderdeel van mijn bachelorproef heb je meerdere malen feedback gegeven. Voor elk probleem had je een oplossing. Ik kon geen betere mentor wensen. Jouw enthousiasme, maar ook dat van het volledige team liet me heel welkom voelen en creëerde een heel aangename werkomgeving. Ik kwam altijd met plezier naar het labo. Ik wil ook Dr. Annick Keirsebilck bedanken voor goede begeleiding tijdens mijn stageperiode, maar ook voor het nalezen van mijn bachelorproef. Daarnaast wil ik u ook bedanken voor alle kennis die u mij heeft bijgebracht de afgelopen drie jaar.

Dankjewel aan mijn mama en pluspapa om telkens te luisteren naar mijn verhalen ook al was het vaak chinees voor jullie. De potjes ingevroren spaghettisaus en de vele motiverende woorden maakten het schrijven veel aangenamer. Broer en zus dankjewel om mij te steunen, te motiveren en te verdragen als ik af en toe eens kort was. Kristina je lieve berichtjes, filmpjes en de motiverende kreten om 12 uur 's nachts aan het raam van mijn kot gaven me dat extra duwtje in de rug om het beste van mezelf te geven. Dankjewel om zo een fantastische vriendin te zijn!

Ik wil de vriendinnen van mijn richting bedanken voor alle motiverende berichtjes. Als laatste wil ik alle studenten in het lab bedanken voor de toffe sfeer. We zaten allemaal in hetzelfde schuitje, maar de chocomelkjes, terrasjes en de vele babbelmomentjes toverden altijd wel een lach op mijn gezicht.

Anouk Speleers
26 mei 2023

Inhoudsopgave

Lijst van afkortingen	5
Technische fiche stageplaats	7
1 Inleiding	8
1.1 Transpositie	8
1.1.1 DNA transposons	8
1.1.2 Retrotransposons	8
1.1.3 Ziektebeelden	11
1.2 Methyl - CpG bindingsproteïne (MeCP2)	12
1.2.1 Isoformen MeCP2 E1 en MeCP2 E2	12
1.2.2 Functie MeCP2	13
1.3 Lens epithelium afgeleide groeifactor (LEDGF)	14
1.3.1 Isoformen LEDGF/p75 en LEDGF/p52	14
1.3.2 Functie LEDGF	15
1.4 LINE-1 retrotranspositie assay	16
1.4.1 Proefopzet LINE-1 retrotranspositie assay	16
1.4.2 L1 _{RP} -EGFP reporter plasmide	16
1.4.3 JM111 negatieve controle plasmide	17
1.5 Conclusie	18
2 Doelstelling	19
3 Materiaal en methoden	20
3.1 Celcultuur	20
3.1.1 Doel	20
3.1.2 Principe	20
3.1.3 Materiaal	20
3.1.4 Methode	20
3.2 Western blot	20
3.2.1 Doel	20
3.2.2 Principe	20
3.2.3 Materiaal	20
3.2.4 Methode	21
3.3 Co-immunoprecipitatie (co-IP)	21
3.3.1 Doel	21
3.3.2 Principe	21
3.4 Precipitatie/ pull down	23
3.4.1 Doel	23
3.4.2 Principe	23
3.4.3 Materiaal	23
3.4.4 Methode	23
3.5 LINE-1 EGFP retrotranspositie assay	24
3.5.1 Doel	24
3.5.2 Principe	24
3.5.3 Materiaal	24
3.5.4 Methode	24
3.6 LINE-1 Fluc assay	26
3.6.1 Doel	26
3.6.2 Principe	26
3.6.3 Materiaal	26
3.6.4 Methode	26
4 Resultaten en discussie	28
4.1 Moleculaire karakterisatie van het LEDGF-MeC P2 eiwitcomplex	28
4.1.1 Interactie tussen de verschillende isoformen van MeCP2 en LEDGF	28

4.1.2	Eiwit-eiwitinteractie versus DNA-gemedieerde interactie	29
4.1.3	Verificatie van het LEDGF-MeCP2 complex via een pull down.....	31
4.1.4	Identificatie van het MeCP2-domein dat interageert met LEDGF.....	32
4.2	Functionele karakterisatie van het LEDGF-MeCP2 eiwitcomplex	35
4.2.1	Co-immunoprecipitatie in LEDGF knock-out (KO) cellijnen.....	35
4.2.2	LINE-1 EGFP retrotranspositie test in LEDGF KD en rescue HEK293T cellen	38
4.2.3	Real time PCR (qPCR).....	40
4.2.4	Functionele karakterisatie met behulp van de LINE-1 Fluc assay.....	41
5	Besluit.....	44
6	Publiceerbaar artikel.....	I
	Literatuurlijst	II
	Addendum	IV
7	Samenstelling buffers.....	IV
7.1	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM).....	IV
7.1.1	Doel	IV
7.1.2	Materiaal en methoden.....	IV
7.2	Fosfaat buffer zoutoplossing (PBS)	IV
7.2.1	Doel	IV
7.2.2	Materiaal en methode.....	IV
7.3	Proteïne ladingsbuffer (LB).....	V
7.3.1	Doel	V
7.3.2	Materiaal en methoden.....	V
7.4	Transfer buffer.....	V
7.4.1	Doel	V
7.4.2	Materiaal en methode.....	V
7.5	PBS-T	V
7.5.1	Doel	V
7.5.2	Materiaal en methode.....	V
7.6	Polyethyleenimine (PEI)	VI
7.6.1	Doel	VI
7.6.2	Materiaal en methoden.....	VI
7.7	Radioimmunoprecipitatie assay buffer (RIPA)	VI
7.7.1	Doel	VI
7.7.2	Materiaal en methode.....	VI
7.8	Trisbuffer zoutoplossing (TBS)	VI
7.8.1	Doel	VI
7.8.2	Materiaal en methode.....	VI
7.9	Tween-20 trisbuffer zoutoplossing (TBS-T)	VI
7.9.1	Doel	VI
7.9.2	Materiaal en methode.....	VI
7.10	Natriumdodecylsulfaat buffer (SDS-buffer)	VII
7.10.1	Doel	VII
7.10.2	Materiaal en methode.....	VII
7.11	Lysis buffer.....	VII
7.11.1	Doel	VII
7.11.2	Materiaal en methode.....	VII
8	Productinformatie van de verschillende componenten.....	VIII
9	Plasmidenmappen	IX
10	Schematische voorstellingen co-immunoprecipitaties en pull down.....	XII
10.1	co-IP voor de interactie tussen de verschillende isoformen van endogeen LEDGF en FLAG-MeCP2.....	XII
10.2	co-IP voor de interactie tussen HA-LEDGF en endogeen MECP2.....	XII
10.3	Pull down voor de interactie tussen GST- of FLAG-LEDGF en endogeen MECP2.....	XIII

Lijst van afkortingen

ALS	amyotrofische laterale sclerose
BC	backcomplement
BCA	bicinchoninezuur assay
BSA	bovine serumalbumine
CFTR	cystisch fibrose transmembraangeleidingsregelaar
Co-IP	co-immunoprecipitatie
CR	charged regions
CREB1	cAMP responsief element bindend eiwit 1
CTD	C-terminaal domein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dnase	desoxyribonuclease
ECL	versterkt chemiluminescent
EGFP	versterkt groen fluorescent proteïne
FCS	foetaal bovine kalfserum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GST	glutathion-S-transferase
HA	hemaglutinine
HDAC	histon deacetylasen
HIV	humaan immunodeficiëntievirus
HIV-AIDS	humaan immunodeficiëntievirus -immunodeficiëntiesyndroom
HRP	horseradish peroxidase
IBD	integrase bindend domein
ID	intervening domein
ITR	geïnverteerde terminale herhalingen
KD	knockdown
KO	knock-out
LB	ladingsbuffer
LEDGF	lens epithelium afgeleide groeifactor
LINE-1	long interspaced element 1
LTR	lange terminale herhaling
MBD	methyl-bindingsdomein
MeCP2	methyl-CpG bindingsproteïne 2
Mnase	micrococcal nuclease
NLS	nucleair lokalisatiesignaal
NTD	N-terminaal domein

ORF	open leesraam
Ori	startplaats voor de replicatie
PBS	fosfaatbuffer zoutoplossing
PBS-T	trisbuffer zoutoplossing met 0.1% triton-X100
PEI	polyethyleenimine
PI	protease inhibitor
PSIP1	PC4- en SRSF-interactieproteïne 1
qPCR	real time PCR
RIPA	radioimmunoprecipitatie assay
Rluc	Renilla luciferase
RNP	ribonucleoproteïne partikel
RT	reverse transcriptie
SDS	natriumdodecylsulfaat
SINE	short interspaced element
SRD	supercoiled-DNA-herkenningsdomein
TBS	trisbuffer zoutoplossing
TBS-T	trisbuffer zoutoplossing-Tween 20
TNPO1	transportine 1 eiwit
TRD	transcriptie repressor domein
UTR	niet-vertaalde regio
WT	wild type

Technische fiche stageplaats

Naam stageplaats:	Departement Farmaceutische en Farmacologische Wetenschappen
Adres:	ON5 Herestraat 49 - bus 1023
	3000 Leuven
Telefoonnummer:	+32 16 37 40 61
GSM-nummer:	/
Faxnummer:	/
E-mail:	zeger.debyser@kuleuven.be
Directeur/diensthoofd:	Prof. Dr. Zeger Debyser
Stagementor:	Prof. Dr. Zeger Debyser en Saskia Lesire
Sector:	Moleculaire biologie
Afdeling/Groep binnen de stageplaats:	Labo Moleculaire Virologie en Gentherapie
Aantal werknemers:	52
Omzet:	/
Producten:	/
Specialisatie:	/
Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:	<p>The Stress Oncoprotein LEDGF/p75 Interacts with the Methyl CpG Binding Protein MeCP2 and Influences its Transcriptional Activity</p> <p>Targeted editing of the PSIP1 gene encoding LEDGF/p75 protects cells against HIV infection</p>
Bijkomende gegevens:	/

1 Inleiding

1.1 Transpositie

Transpositie is een fenomeen waarbij een stuk DNA via een DNA- of RNA-tussenproduct springt naar een andere locatie in het genoom. Retrotranspositie komt bij heel wat organismen voor (Eickbush, 2001). Het menselijk genoom bestaat bijvoorbeeld voor 45% uit springende genen. Deze worden ook wel transponeerbare elementen of transposons genoemd. Transpositie, het kopieer- en plakmechanisme van DNA-sequenties, speelde een belangrijke rol in de evolutie. Het droeg bij aan de expansie van het genoom. Nochtans is transpositie de oorzaak van een aantal ziektebeelden zoals het Rett syndroom, een aantal neurodegeneratieve ziektes, heel wat tumoren en kankers (Gao et al., 2015; Saleh et al., 2019; *Transposons | Learn Science at Scitable*, n.d.). De transponeerbare elementen worden opgedeeld in twee klassen aan de hand van welk tussenproduct gebruikt wordt om zich te verplaatsen. Klasse I zijn de retrotransposons en klasse II zijn de DNA transposons (Saleh et al., 2019).

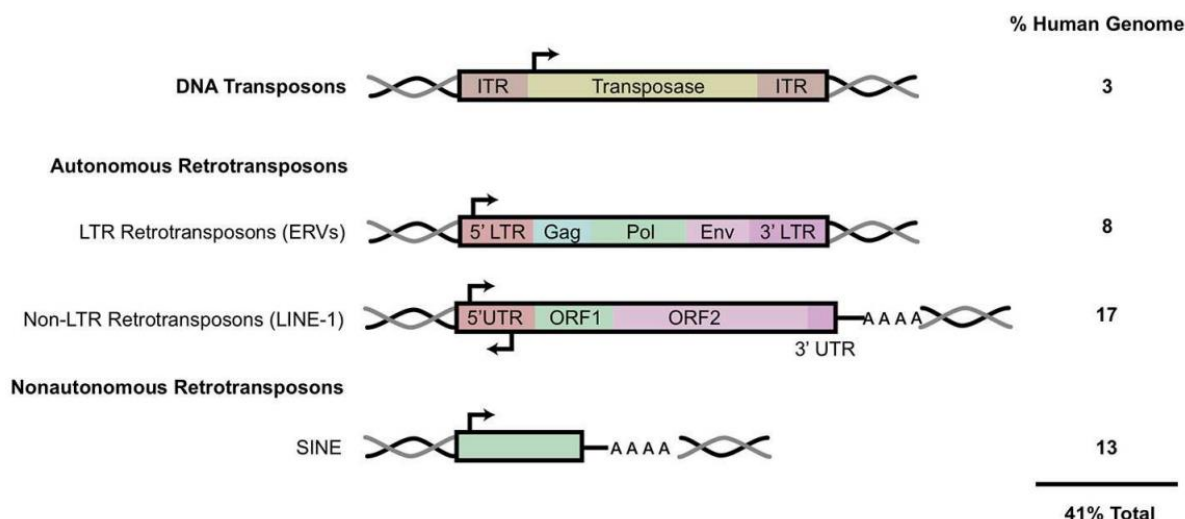
1.1.1 DNA transposons

DNA transposons zijn de eerste grote groep van transponeerbare elementen. Ongeveer 3% van het genoom bestaat uit DNA transposons (figuur 1). De elementen bewegen doorheen het genoom via een DNA-tussenproduct. Momenteel zijn DNA transponeerbare elementen niet meer actief in zoogdieren. DNA transposons bevatten de informatie voor het eiwit transposase. Dit enzym bevat een endonuclease activiteit. De sequentie van het transposase is in DNA transposons geflankeerd door geïnverteerde terminale herhalingen (ITR). Dit betekent dat de basenpaarvolgorde op het einde aan de rechterkant in de sense streng geïnverteerd wordt en vervolgens gebruikt wordt voor het einde aan de linkerkant in de antisense streng. Het transposase herkent deze regio's en knipt de sequentie van het DNA transposon uit het genoom om vervolgens te insereren op een andere plaats. Hier wordt niet met een RNA-tussenproduct gewerkt zoals bij de klasse I transponeerbare elementen (Muñoz-López & García-Pérez, 2010; *Transposons | Learn Science at Scitable*, n.d.).

1.1.2 Retrotransposons

De tweede grote groep van transponeerbare elementen zijn retrotransposons. Ongeveer 41% van het menselijk genoom bestaat uit retrotransposons (figuur 1). Deze elementen verplaatsen zich doorheen het genoom via een RNA-tussenproduct. De retrotransposons worden opgedeeld in twee groepen, namelijk lange terminale herhalingselementen (LTR) en niet-LTR elementen. LTR's zijn korte stukjes sequenties die herhaald worden. Het menselijk genoom bestaat ongeveer voor 8% uit LTR transposons en voor 33% uit niet-LTR retrotransposons (figuur 1) (Ayarpadikannan & Kim, 2014; Saleh et al., 2019).

Bij autonome LTR transposons, ook humane endogene retrovirussen genoemd, worden de coderende sequenties geflankeerd door deze LTR's. De coderende sequenties coderen voor structurele proteïnen zoals eiwitten die nodig zijn voor de vorming van het capsid of de enveloppe. Deze genen worden de gag-genen en env-genen genoemd. De pol-genen die ook aanwezig zijn in de sequentie van de LTR transposons coderen voor enzymatische proteïnen zoals protease en reverse transcriptase. Doordat deze transponeerbare elementen coderende sequenties bevatten, kunnen de transponeerbare elementen via het vormen van een virus-like partikel zich autonoom vermenigvuldigen en integreren op andere plaatsen in het genoom (Havecker et al., 2004; Saleh et al., 2019).

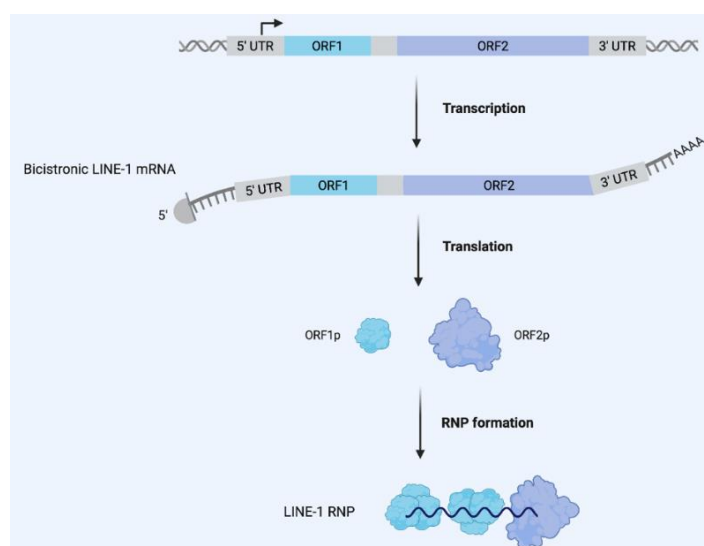


Figuur 1: Schematische voorstelling van de verschillende transponeerbare elementen opgedeeld in de verschillende klassen en subklassen. Er bestaan twee grote klassen van transposons. Dit zijn de DNA- en retrotransposons. De laatste klasse kan nogmaals opgedeeld worden in autonome en niet-autonome retrotransposons. Tot deze laatste groep behoren de SINE elementen. De autonome retrotransposons kunnen opgedeeld worden in twee subklassen. Dit zijn de LTR retrotransposons en de niet-LTR retrotransposons. Tot de laatste subklasse behoren de LINE-1 elementen. Bij elke klasse is weergegeven wat het relatieve aandeel van die klasse in het humane genoom is (Saleh et al., 2019).

Zoals eerder vermeld is de andere groep binnen de retrotransposons de niet-LTR transposons. Hiertoe behoren de long interspaced elementen 1 (LINE -1) en de short interspaced elementen (SINE). De LINE-1 transposons kunnen zich autonoom repliceren, terwijl de SINE transposons dit niet kunnen. De SINE transponeerbare elementen bevatten de coderende sequenties voor de proteïnen die nodig zijn tijdens de replicatiecyclus niet. De SINE transposons zijn voor de retrotranspositie cyclus afhankelijk van LINE-1 elementen. De LINE-1 elementen zijn de enige retrotransposons zijn die momenteel nog actief zijn in het humane genoom (Saleh et al., 2019). Om deze reden is het interessant om de replicatiecyclus van een LINE-1 retrotransposon meer in detail te bekijken.

1.1.2.1 LINE-1 transposons

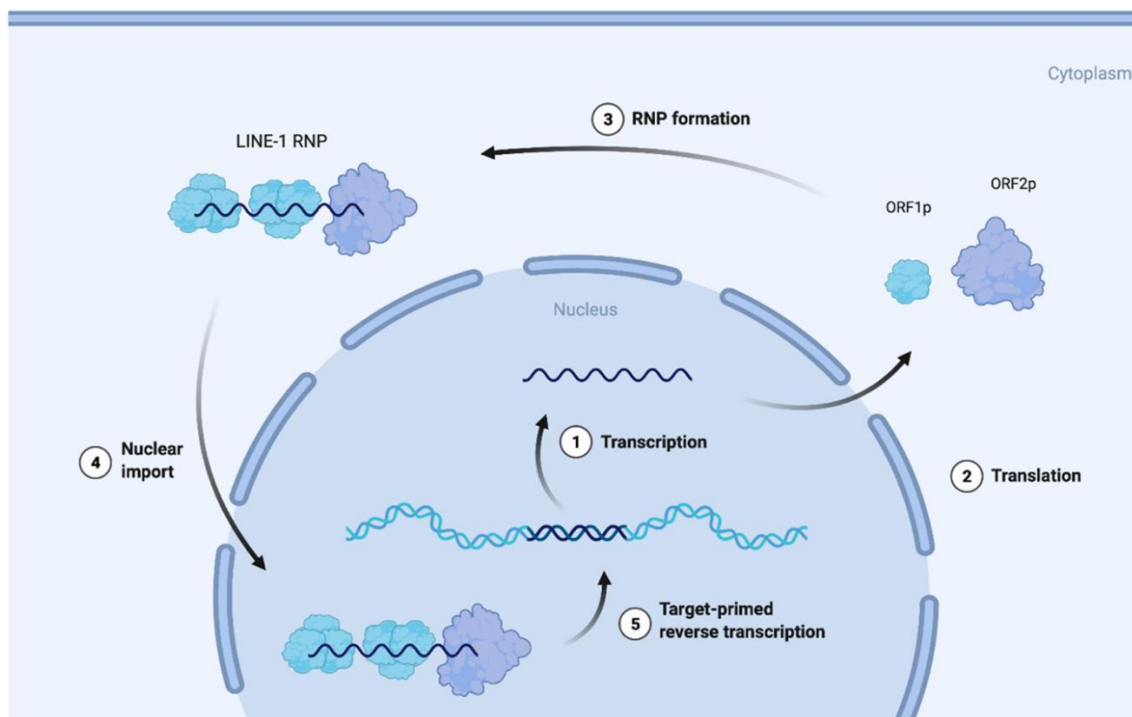
De lengte van de sequentie van een LINE-1 element is ongeveer 6kb en bevat drie open leesramen. Het transposon bevat een 5' niet-vertaalde regio (UTR) die een promotor activiteit in zowel de sense als antisense streng bevat. Er is ook een 3'UTR aanwezig (figuur 2). De drie open leesramen coderen elk voor proteïnen die van belang zijn voor de replicatiecyclus van de transposons (Idica et al., 2017; Saleh et al., 2019).



Figuur 2: Vereenvoudigde weergave van de sequentie van een LINE – 1 element. Deze sequentie bevat een 5'UTR en een 3'UTR-regio waarbij de 5'UTR een promotoractiviteit bevat. De twee belangrijkste open leesramen van het LINE-1 transposon zijn ORF1 en ORF2. ORF1 codeert voor een proteïne met RNA-affiniteit en een chaperone activiteit. ORF2 codeert voor een proteïne dat zowel een endonuclease als een reverse transcriptase activiteit bevat. Tijdens de replicatiecyclus van het LINE-1 element kunnen deze eiwitten samen met het geproduceerde mRNA een ribonucleoproteïne complex vormen in het cytoplasma van de cel. Dit complex kan later in de replicatiecyclus terug geïmporteerd worden naar de nucleus (Saleh et al., 2019) (figuur gemaakt door Saskia Lesire).

Het open leesraam ORF0 codeert voor een proteïne waarvan de exacte functie niet gekend is, maar die de retrotranspositie bevordert. Het eerste open leesraam ORF1 codeert voor een proteïne dat RNA bindt en een chaperone activiteit bevat. Het laatste open leesraam ORF2 codeert voor een proteïne met reverse transcriptase en endonuclease activiteit. Dit is van belang voor de autonome replicatiecyclus van de LINE-1 elementen (figuur 2) (Idica et al., 2017).

De LINE-1 replicatiecyclus (figuur 3) start met het RNA-polymerase II dat bindt op de promotor die aanwezig is in de 5'UTR-regio. Dit initieert het afschrijven van het transposon element. Na de transcriptie wordt mRNA verkregen met een 5' cap-structuur en een 3' poly-A-staart. Vervolgens wordt een deel van het geproduceerde mRNA vertaald. Vanuit de twee verschillende open leesramen (ORF1 en ORF2), worden twee verschillende eiwitten in het cytoplasma geproduceerd. Deze proteïnen zullen in het cytoplasma aan het overige LINE-1 mRNA binden. Elke afzonderlijke mRNA-streng bindt met trimeren van ORF1 en met één ORF2 proteïne. Dit geheel vormt een ribonucleoproteïne partikel (RNP). Dit RNP wordt terug geïmporteerd vanuit het cytoplasma naar de nucleus. Daar start de reverse transcriptie (RT) van het mRNA door de RT-activiteit van ORF2. Er wordt cDNA geproduceerd en geïnsereerd in het humane genoom via endonuclease activiteit van ORF2. Dit mechanisme wordt target-primed reverse transcriptie genoemd. Een alternatief mechanisme dat minder vaak voorkomt, is het starten van de reverse transcriptie in het cytoplasma. Het cDNA-product of een onafgewerkte versie wordt dan geïmporteerd naar de nucleus (Saleh et al., 2019). De import van het RNP wordt gerealiseerd met behulp van het transportine 1 eiwit (TNPO1; Idica et al., 2017). Dit proteïne bindt aan de nucleair lokalisatiesignalen aanwezig in het complex en importeert het RNP naar de kern. Hoe dit exact gebeurt, is momenteel nog niet volledig in detail gekend (Saleh et al., 2019).



Figuur 3: Schematische voorstelling van de replicatiecyclus van een LINE-1 retrotransposon. De cyclus start met het initiëren van het afschrijven van de LINE-1 sequentie. Dit gebeurt doordat het RNA-polymerase II bindt op de promotor in de 5'UTR – regio. Zo wordt mRNA geproduceerd en vervolgens vertaald naar de correcte eiwitten in het cytoplasma. Deze proteïnen vormen een complex met het overige niet-vertaalde mRNA. Dit complex wordt het ribonucleoproteïne partikel genoemd. Dit geheel wordt terug geïmporteerd naar de nucleus waar er via de reverse transcriptase en de endonuclease activiteit van het ORF2 eiwit, cDNA geproduceerd wordt. Dit cDNA wordt vervolgens op een andere locatie in het humane genoom geïnsereerd (Saleh et al., 2019) (figuur gemaakt door Saskia Lesire).

Waar het transponeerbare element exact wordt geïnsereerd in het genoom is variabel. Dit zorgt voor verschillen tussen individuen. Niet alle somatische cellen binnen één individu vertonen hetzelfde retrotranspositiepatroon (Muotri et al., 2005). Dit betekent dat het genoom van de somatische cellen niet identiek is. Dit wordt somatisch mozaïcisme genoemd. Hoewel de exacte insertieplaats variabel is, hebben LINE-1 elementen een voorkeur om te insereren in intergenetische AT-rijke regio's. Er zijn nog een heel aantal andere factoren die de plaats van integratie van de LINE-1 elementen in het humane genoom beïnvloeden, zoals de aan- of afwezigheid van bepaalde single nucleotide polymorfismen en het celttype (Oliver et al., 2002; Saleh et al., 2019).

1.1.3 Ziektebeelden

In heel wat ziektebeelden spelen transponeerbare elementen een rol. Bijvoorbeeld bij een aantal neurodegeneratieve aandoeningen en het Rett Syndroom. De activatie van de inflammatoire respons kan mogelijk veroorzaakt worden door retrotranspositie (Saleh et al., 2019).

1.1.3.1 Neurodegeneratieve aandoeningen

In het algemeen speelt LINE-1 een rol in het verouderingsproces van de mens. De LINE-1 activiteit wordt minder gehïbeerd naarmate een individu veroudert. De oorzaak is een demethylatie van de LINE-1 promotor. LINE-1 retrotranspositie heeft een invloed op het ontwikkelen van verschillende ouderdomsziekten (Saleh et al., 2019).

De neurodegeneratieve ziekten waaraan transpositie gelinkt wordt, zijn sporadische amyotrofische laterale sclerose (ALS) en sporadische ziekte van Alzheimer. Bij dit laatste treedt een mozaïcisme in het genoom van de neuronen van patiënten met de ziekte van Alzheimer op. Deze variaties komen voor in de sequentie van het amyloid precursor eiwit. Dit eiwit wordt gelinkt aan de ziekte van Alzheimer. De variaties die werden ontdekt, zijn afkomstig van RNA-producten. Mogelijks spelen dus retrotransposons hier een rol (Saleh et al., 2019).

Een andere neurodegeneratieve aandoening is de ziekte van Parkinson. Patiënten met deze aandoening vertonen volgende symptomen: trillen, stijve spieren en evenwichtsproblemen. Deze symptomen worden veroorzaakt door het versneld afsterven van de neuronen in de substantia nigra. Dit wordt veroorzaakt door ofwel de blootstelling aan neurotoxinen ofwel de aanwezigheid van specifieke mutaties. Een verhoogde LINE-1 retrotranspositie kan een oorzaak zijn van het initiëren van deze mutaties in neuronen waardoor deze afsterven (Blaudin de Thé et al., 2018).

1.1.3.2 Inflammatoire aandoeningen

Een gezond individu heeft een aangeboren en een verworven immuunsysteem. Als een virus de cellen van een individu infecteert, wordt het immuunsysteem geactiveerd. De activatie gebeurt door de aanwezigheid van viraal DNA in het cytoplasma. Hierdoor wordt de cascade voor de productie van interferonen gestimuleerd. Interferonen activeren de ontstekingsreactie zolang er viraal DNA aanwezig is. Door de stijging van de productie van LINE-1 elementen, zal er meer LINE-1 mRNA of cDNA in het cytoplasma aanwezig zijn. Dit veroorzaakt een ontstekingsreactie die lijkt op de ontstekingsreactie tegen viraal DNA of RNA zoals bij patiënten met het Aicardi Goutieres syndroom. Patiënten met deze aandoening hebben een opregulatie van LINE-1 retrotranspositie veroorzaakt door een mutatie in de proteïnen die in normale omstandigheden de LINE-1 retrotranspositie onderdrukken. De retrotransponeerbare elementen spelen potentieel een rol in verschillende inflammatoire aandoeningen en auto-immuunziekten (Saleh et al., 2019).

1.1.3.3 Neurologische ontwikkelingsstoornissen

Rett Syndroom is een neurologische ontwikkelingsstoornis waarbij patiënten onder meer autistische kenmerken vertonen. De oorzaak van deze aandoening zijn mutaties aanwezig in het methyl – CpG bindingsproteïne (MeCP2) (Saleh et al., 2019).

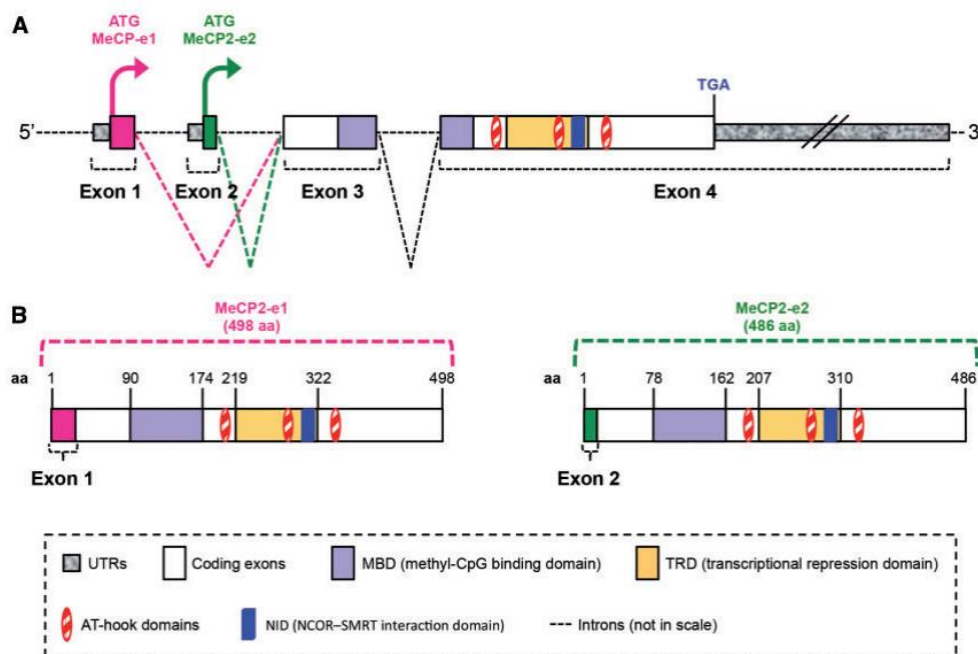
MeCP2 is onder andere een repressor van de LINE-1 retrotranspositie (Muotri et al., 2010). Samen met histon deacetylases (HDAC) en Sin3a vormt het een complex dat bindt op de 5' UTR-regio van de retrotransposons. Zo wordt de transcriptie van deze elementen verhinderd. Patiënten met het Rett Syndroom hebben mutaties in het MeCP2 eiwit. Afhankelijk van waar deze mutaties voorkomen, verliest het MeCP2 eiwit één of meerder functies. Vinden de mutaties plaats in het methyl – bindingsdomein (MBD) dan kan MeCP2 niet meer aan DNA binden. Mutaties in het transcriptie repressor domein (TRD) verhinderen mogelijks de interactie met de interactiepartners van MeCP2. Deze mutaties leiden in het algemeen tot het verlies van de repressorfunctie van MeCP2 waardoor er meer retrotranspositie plaatsvindt (Saleh et al., 2019).

1.2 Methyl - CpG bindingsproteïne (MeCP2)

MeCP2 heeft verschillende functies in de cel. Het eiwit heeft een regulerende rol in de retrotranspositie en is van belang voor de chromatinestructuur. Hieronder wordt de structuur en de verschillende functies van het eiwit verder besproken (Saleh et al., 2019).

1.2.1 Isoformen MeCP2 E1 en MeCP2 E2

Het MeCP2 eiwit heeft twee isoformen, namelijk MeCP2 E1 en MeCP2 E2. Deze isoformen ontstaan door alternatieve splicing van het mRNA. De varianten van MeCP2 zijn heel gelijkelijk en verschillen enkel in het N-terminaal domein. De MeCP2 E1 variant is 498 aminozuren lang, terwijl de E2 variant 486 aminozuren lang is (figuur 4). De twee varianten ontstaan uit een verschillende combinatie van de exonen aanwezig in het MeCP2 gen. MeCP2 E1 bestaat uit de exonen 1, 3 en 4. Exon 2 wordt door middel van alternatieve splicing verwijderd, terwijl de E2 variant bestaat uit de exonen 2, 3 en 4. Deze isoform ontstaat door de aanwezigheid van een alternatieve startplaats aan het begin van exon 2. Hierdoor zijn de verschillende domeinen aanwezig in MeCP2 identiek in beide varianten behalve het N-terminaal domein (Della Ragione et al., n.d.).



Figuur 4: Een schematische weergave van de sequenties van de verschillende isoformen van MeCP2. (A) Een schematische weergave van de opbouw van de sequentie van het MeCP2-gen. Hierbij wordt getoond hoe de twee varianten via alternatieve splicing ontstaan. Op de sequentie wordt aangeduid welk domein van welk exon afkomstig is. (B) Een schematische weergave van de twee isoformen van MeCP2. Aan de linkerkant wordt MeCP2 E1 weergegeven en aan de rechterkant MeCP2 E2. Op de schematische eiwitsequenties worden de verschillende domeinen aanwezig in de isoformen aangeduid (Della Ragione et al., n.d.).

De verschillende domeinen die aanwezig zijn in MeCP2 zijn het N-terminaal domein (NTD), het methyl-bindingsdomein (MBD), het intervering domein (ID), het transcriptie repressor domein (TRD) en het C-terminaal domein (CTD). Het NTD is het enige domein dat verschillend is tussen beide isoformen. Dit domein is van belang voor de stabiliteit van het eiwit en versterkt de DNA-binding tussen MeCP2 en dubbelstrengig DNA (Bin Akhtar et al., 2022; Chahrour et al., 2008; Della Ragione et al., n.d.). Het tweede domein is het MBD. Dit domein interageert met dubbelstrengig DNA. Dit domein staat in voor een selectieve binding met specifieke plaatsen in het humane genoom zoals gemethyleerde CpG-eilanden. Het derde domein dat aanwezig is in het MeCP2 eiwit is het ID. Dit domein speelt een rol in de DNA-interactie en het domein zorgt voor de verhoging van de stabiliteit van het MBD (Claveria-Gimeno et al., 2017). Het voorlaatste domein is het TRD. Wanneer MeCP2 een repressor complex vormt dan vertoont dit domein affiniteit voor bijvoorbeeld het eiwit Sin3a en de HDAC-eiwitten. In dit domein is er een nucleair lokalisatiesignaal (NLS) aanwezig. Dit zorgt dat na translatie een deel van het MeCP2 eiwit dat in het cytoplasma gesynthetiseerd wordt, geïmporteerd wordt naar de kern. (Bianciardi et al., 2015; Claveria-Gimeno et al., 2017; Olson et al., 2014). Het laatste domein van MeCP2 is het CTD. Dit domein speelt een rol bij de DNA-interactie en de interactie met de anderen proteïnen in het repressor- of activatorcomplex. Op de eiwitsequentie zijn buiten deze vijf grote domeinen ook een aantal kleinere domeinen aanwezig zoals drie AT-hook domeinen. Deze domeinen zorgen voor het selectief binden van het complex aan het humane genoom in de cellen (Della Ragione et al., n.d.).

1.2.2 Functie MeCP2

Methyl-CpG bindingsproteïne (MeCP2) is geen weefsel-specifiek proteïne. Afhankelijk van het soort weefsel is het expressieniveau van MeCP2 hoger of lager. De weefsels waar MeCP2 het meest tot expressie komt, zijn de hersenen, longen en milt. De twee isoformen worden niet in gelijke mate tot expressie gebracht zoals bijvoorbeeld in de hersenen. De varianten van MeCP2 worden differentieel tot expressie gebracht in verschillende delen van de hersenen (Liyanage & Rastegar, n.d.).

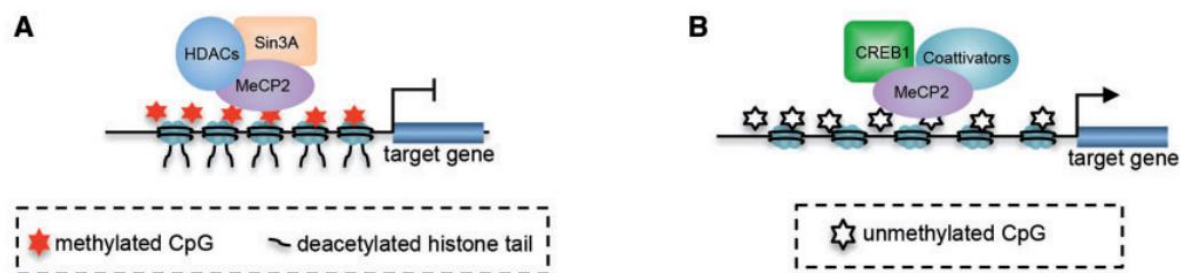
MeCP2 behoort tot de methyl-CpG bindingsproteïne familie. Deze familie bestaat uit een aantal proteïnen die een gelijkaardig methyl-CpG bindingsdomein (MBD) hebben. De methyl-CpG bindingsproteïne familie speelt een rol in de regulatie van de transcriptie (H. Li et al., 2005). Buiten de regulerende rol tijdens de transcriptie, speelt MeCP2 een rol in de modulatie van de chromatinestructuur (Liyanage & Rastegar, n.d.).

1.2.2.1 Transcriptionele regulatie

MeCP2 is een multifunctioneel proteïne. Afhankelijk van de interactiepartners van MeCP2 wordt een repressie- of activeringscomplex gevormd. MeCP2 vormt een repressiecomplex als de interactiepartners bijvoorbeeld HDAC en Sin3a zijn (figuur 5). Het MeCP2 eiwit herkent met het MBD de gemethyleerde CpG-eilanden in het genoom. Hierop kan het repressorcomplex binden. Zo wordt de transcriptie van het gen verhinderd zoals de transcriptie van bijvoorbeeld de LINE-1 genen. De inhibitie van de transcriptie gebeurt op twee manieren. In het complex zijn HDAC-proteïnen aanwezig. Deze eiwitten zorgen voor de condensatie en dus opvouwing van chromatine. Chromatine is op deze manier minder beschikbaar voor transcriptie. Het RNA-polymerase kan fysiek niet aan de promotor om de transcriptie te initiëren. De tweede manier waarop de transcriptie wordt verhinderd, is door deacetylatie van de genen waarop het repressorcomplex bindt. Zo wordt op een epigenetische manier de expressie van deze genen gehinderd. Het Sin3a proteïne zorgt voor de complexvorming tussen de eiwitten MeCP2 en HDAC (Della Ragione et al., n.d.; Nan et al., 1998).

Zoals eerder vermeld kan MeCP2 ook een activeringscomplex vormen. In dit geval interageert MeCP2 met bijvoorbeeld het cAMP responsief element bindend eiwit 1 (CREB 1) en andere co-activators (figuur 5). Dit complex herkent de CpG-eilanden in het humane genoom en stimuleert de transcriptie van de genen (Bin Akhtar et al., 2022; Chahrour et al., 2008; *CREB1*

CAMP Responsive Element Binding Protein 1 [Homo Sapiens (Human)] - Gene - NCBI, n.d.; Della Ragione et al., n.d.).



Figuur 5: Schematische weergave van MeCP2 als repressor - en activatorcomplex. (A) Weergave van het repressorcomplex. Dit eiwitcomplex inhibeert de transcriptie als het bindt op de promotor van de doelwitsequentie. Hier gaat MeCP2 de binding aan met HDAC's. Dit complex zorgt enerzijds voor de opvouwing van het chromatine en anderzijds deacetyleert het de doelwitsequentie. Zo wordt de transcriptie op twee verschillende manieren geïnhibeerd. (B) Weergave van het activatorcomplex van MeCP2 met CREB1 en andere co-activators. Als dit complex bindt op de promotor van de targetsequentie dan wordt de transcriptie van dit gen geactiveerd (Della Ragione et al., n.d.).

1.2.2.2 Chromatinestructuur

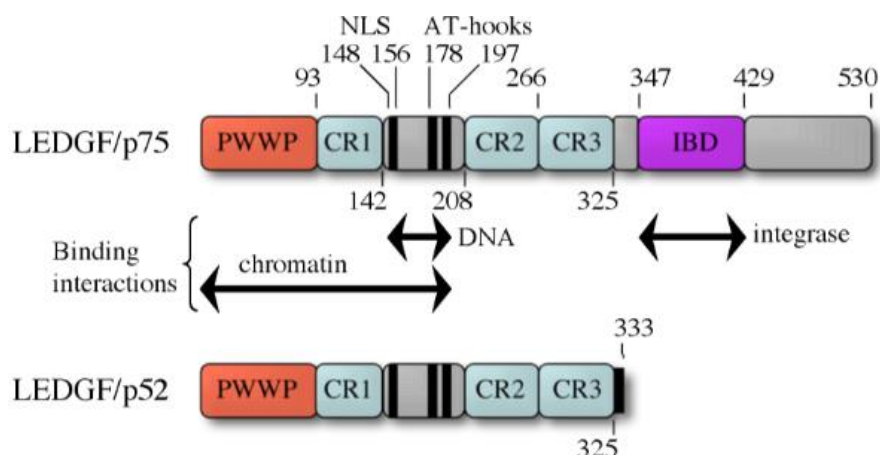
De regulatie van de transcriptie van een aantal genen is niet de enige functie van MeCP2. Een andere functie is het reguleren van de chromatinestructuur. MeCP2 helpt de DNA strengen op te vouwen tot heterochromatine. Dit gebeurt doordat het eiwit het genoom helpt op te vouwen tot nucleosomale arrays die op hun beurt verder worden opgevouwen tot nucleosomen. Het opvouwen van chromatine is noodzakelijk voor verschillende processen zoals celdeling of differentiatie (Della Ragione et al., n.d.).

1.3 Lens epithelium afgeleide groeifactor (LEDGF)

Het tweede eiwit waar deze literatuurstudie op focust is de lens epithelium afgeleide groeifactor (LEDGF). Dit eiwit speelt een rol in de regulatie van de transcriptie van een aantal genen. Na verder wetenschappelijk onderzoek, werd er ontdekt dat LEDGF een interactiepartner is van MeCP2. Dit werd al aangetoond voor de interactie tussen de LEDGF/p75 isoform en MeCP2. Dit complex heeft een invloed op de transcriptionele activiteit (Leoh et al., 2012; R. Li et al., 2016).

1.3.1 Isoformen LEDGF/p75 en LEDGF/p52

Het LEDGF-eiwit is afkomstig van het PC4- en SRSF-interactieproteïne 1 (PSIP1) -gen. Van het eiwit bestaan er twee isoformen, namelijk LEDGF/p75 en LEDGF/p52. De twee isoformen van het LEDGF-eiwit ontstaan door alternatieve splicing van het mRNA van dit gen. De LEDGF/p75 isoform heeft een lengte van 530 aminozuren, terwijl de LEDGF/p52 isoform een lengte heeft van 333 aminozuren (figuur 6). De eiwitten bestaan uit verschillende domeinen die elk hun eigen functie hebben. De LEDGF isoformen hebben een identiek N-terminaal deel. De LEDGF/p75 variant bestaat uit twee grote domeinen. Dit is het PWWP-domein en het integrase bindend domein (IBD). Dit laatste is niet aanwezig in de LEDGF/p52 variant. In beide varianten zijn er een aantal geladen regio's aanwezig. Dit zijn de "charged regions" (CR) (Basu et al., 2012).



Figuur 6: Schematische voorstelling van de opbouw van de proteïnesequentie van de twee isoformen van LEDGF. De isoformen hebben een identiek N – terminaal deel, maar het C-terminaal deel is verschillend tussen de isoformen. Beide isoformen hebben een PWWP-domein dat instaat voor de binding met chromatine. Er zijn in beide varianten een aantal geladen regio's (CR1; CR2; CR3) aanwezig die de interactie tussen DNA en het proteïne bevorderen. De AT-hooks in beide isoformen spelen een rol bij de DNA-binding van de proteïne. In de LEDGF/p75 variant is een extra domein aanwezig. Dit is het integrase bindend domein (IBD). Dit domein bindt het HIV-1 integrase-eiwit. Dit complex speelt een rol bij de HIV1- replicatiecyclus voornamelijk tijdens het integreren van het virale genoom in het genoom van de cel (Basu et al., 2012; Engelman & Cherepanov, n.d., 2012).

Het PWWP-domein dat aanwezig is in beide isoformen heeft heel wat functies. De belangrijkste functie is de chromatine binding wat samen wordt gerealiseerd met de drie geladen regio's (CR1, CR2 en CR3) en de AT-hooks. De AT-hooks kunnen ook afzonderlijk DNA binden (figuur 6). Het integrase bindingsdomein (IBD) dat enkel aanwezig is in de LEDGF/p75 isoform, bindt met het humaan immunodeficiëntie virus (HIV)-1 integrase-eiwit. Dit is van belang in de replicatiecyclus van het HIV1-virus. Dit vormt een complex dat de integratie van het viraal genoom in het genoom van de cel verwezenlijkt. Achter de sequentie van het PWWP - domein is een nucleair lokalisatiesignaal aanwezig. Dit signaal zorgt voor de import van LEDGF naar de nucleus van de cel na translatie. Als laatste heeft de LEDGF/p75 variant een extra domein dat aanwezig is in de tweede geladen regio (CR2). Dit is het supercoiled-DNA-herkenningsdomein (SRD). Dit domein maakt het mogelijk voor LEDGF/p75 om te binden op actieve transcriptieplaatsen (Leoh et al., 2012).

1.3.2 Functie LEDGF

LEDGF is een multifunctioneel proteïne en geen weefsel-specifiek proteïne. Het eiwit komt in verschillende weefsels en verschillende cellen tot expressie. Ten eerste speelt LEDGF een rol in de transcriptionele regulatie. Het LEDGF-eiwit is een co-activator die een interactie vormt met het RNA - polymerase II - complex om zo de transcriptie te stimuleren. Een andere functie van het eiwit is dat LEDGF een groeifactor voor lens epitheelcellen is. De derde gekende functie is dat LEDGF, meer bepaald de LEDGF/p75 isoform, cellen beschermt tegen de effecten van oxidatieve stress. Deze stress induceert cel schade en eventueel celdood. LEDGF wordt een stress survival proteïne genoemd. De isoform bekomt deze bescherming door te binden op een aantal promotorregio's om zo de transcriptie van specifieke genen te stimuleren. Deze genen coderen voor eiwitten die de cellen beschermen tegen oxidatieve stress. Voorbeelden zijn genen die coderen voor heat shock elementen en stress elementen (Leoh et al., 2012).

De LEDGF/p75 isoform is niet enkel een beschermingsproteïne. De isoform wordt geassocieerd met een aantal ziektebeelden. Dit zijn een aantal kankers, maar ook het humaan immunodeficiëntievirus-verworven immunodeficiëntiesyndroom (HIV-AIDS) en een aantal auto-immuunziekten. Een aantal oog- en inflammatoire aandoeningen worden ook geassocieerd met LEDGF/p75 (Leoh et al., 2012). In kanker is LEDGF/p75 een oncoproteïne. Dit betekent dat als dit eiwit tot expressie wordt gebracht, het de ontwikkeling van kankercellen

bevordert. In het geval van acute myeloïde leukemie gebeurt een translocatie van de sequentie van LEDGF waardoor een fusie-eiwit wordt gevormd tussen LEDGF/p75 en NUP98. Dit zorgt ervoor dat de kanker resistent wordt tegen chemotherapie. De cellen ondervinden stress door de chemotherapie en LEDGF is een stress survival proteïne waardoor de celdood veroorzaakt door de chemotherapie wordt tegengegaan (Basu et al., 2012; Leoh et al., 2012).

LEDGF/p75 is een van de sleutelproteïnen in de infectie van het humaan immunodeficiëntievirus (HIV). Verworven immunodeficiëntiesyndroom (AIDS) wordt veroorzaakt door HIV. Het virus tast het immuunsysteem aan waardoor lichte infectieziekten levensbedreigend kunnen zijn. HIV is een retrovirus en dus een RNA-virus. De replicatiecyclus van dit virus vertoont veel gelijkenissen met de replicatiecyclus van retrotransposons. Na de infectie van het een cel met HIV, wordt de inhoud van het viruspartikel vrijgegeven in de cel. Het virale genoom wordt net als in de retrotranspositie cyclus omgezet tot cDNA en dit wordt geïmporteerd naar de nucleus. De import wordt gerealiseerd met behulp van LEDGF/p75. Enerzijds bindt het LEDGF-eiwit het cDNA en anderzijds bindt het een integrase eiwit. Door het vormen van dit complex kan het virusgenoom makkelijk geïmporteerd en geïntegreerd worden in het genoom van de geïnfecteerde cel. Als LEDGF niet aanwezig zou zijn dan zou de integratie van het virale genoom moeilijker verlopen en zou het virus zich niet kunnen vermeerderen (Engelman & Cherepanov, 2012; *HIV Replication Cycle | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, n.d.).

Naar de isoform LEDGF/p75 is heel wat wetenschappelijk onderzoek gevoerd. Het heeft heel wat functies in de cel en in verschillende aandoeningen. De LEDGF/p52 isoform is minder goed gekend. In kankercellen zal de LEDGF/p52 variant de transcriptie van LEDGF/p75 inhiberen waardoor het apoptose in de kankercellen induceert (Leoh et al., 2012).

1.4 LINE-1 retrotranspositie assay

Om meer inzicht te krijgen in de LINE-1 retrotranspositie, bestaan er verschillende technieken. Als de kinetiek van de LINE-1 retrotranspositie gedurende een bepaalde periode onderzocht wordt dan is de LINE-1 retrotranspositie test een goede techniek om dit in kaart te brengen (Ostertag et al., 2000).

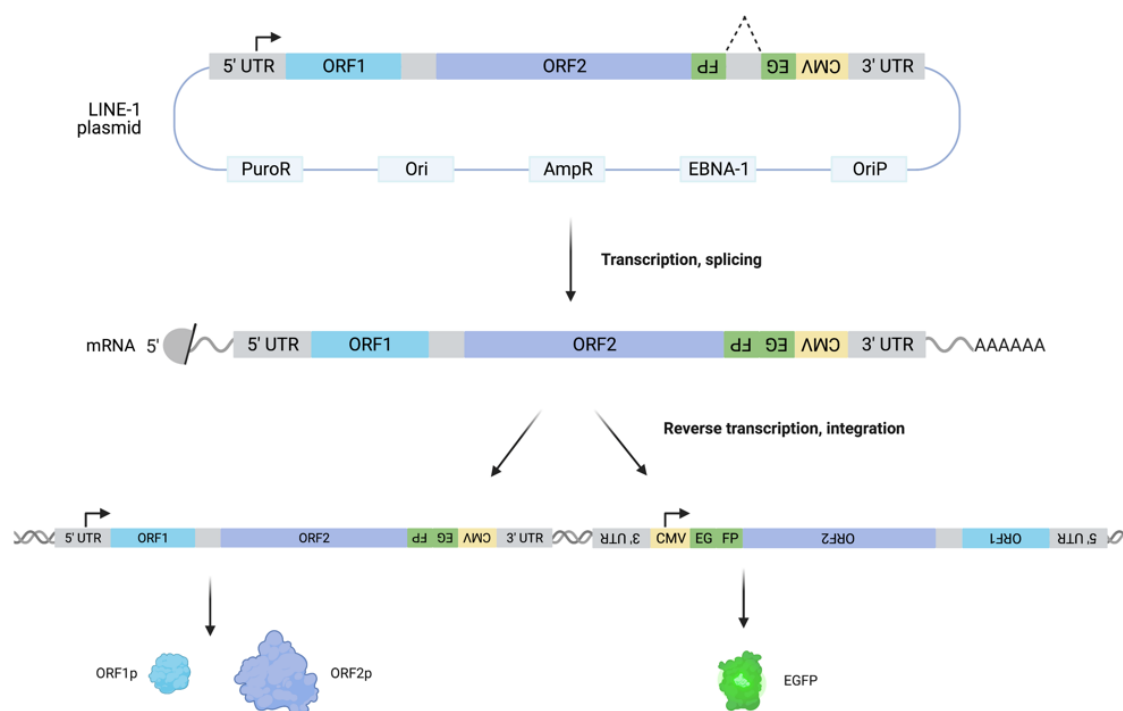
1.4.1 Proefopzet LINE-1 retrotranspositie assay

De test heeft als doel om op individueel celniveau in celculturen de LINE-1 retrotranspositie kinetiek gedurende een periode van ongeveer 13 dagen op te volgen. De test bestaat uit een opeenvolging van verschillende technieken. Er wordt gestart met een transfectie. Dit wordt gevolgd door het opgroeien van de celcultuur waarbij er op bepaalde tijdstippen stalen worden genomen van de celcultuur. Als laatste worden de stalen geanalyseerd via flowcytometrie (Ostertag et al., 2000).

1.4.2 L1_{RP}-EGFP reporter plasmide

Om de LINE-1 retrotranspositie op te volgen, werd een speciaal plasmide gesynthetiseerd namelijk het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide. In het plasmide zijn een aantal belangrijke elementen aanwezig (figuur 7). Er zijn twee startplaatsen voor de replicatie (Ori) van het plasmide aanwezig. Deze zorgen ervoor dat het plasmide zich kan repliceren in zowel bacteriën als in eukaryote cellen. Er zijn op het plasmide twee resistentiegenen aanwezig. Het eerste gen is het ampicilline resistentiegen. Dit selectiegen wordt gebruikt na de transformatie van bacteriën met dit plasmide om zo enkel getransformeerde bacteriën over te houden. Hieruit wordt het plasmide verder opgezuiverd. Het tweede selectiegen is een hygromycine of een puromycine resistentiegen. Net zoals bij bacteriën wordt dit gebruikt om na de transfectie te selecteren op de getransfecteerde cellen. Als laatste is het gen van interesse aanwezig op het plasmide. In dit geval is het gen van interesse het DNA van een LINE-1 retrotransposon gefusioneerd met een versterkt groen fluorescent proteïne (EGFP) expressiecassette (Ostertag et al., 2000).

Het gen van interesse bevat de sequentie van een LINE-1 element. Dit omvat zowel de 5' als 3' niet-vertaalde regio en het eerste en tweede open leesraam zoals eerder werd besproken. Deze sequentie wordt gefusioneerd met een EGFP - expressiecassette. De expressiecassette wordt in de tegenovergestelde richting gefusioneerd met het DNA van de LINE-1 retrotransposons. De expressiecassette bevat een promotor (pCMV), een transcriptie terminatiesignaal en de sequentie van het EGFP onderbroken door een γ -globine intron. Door gebruik te maken van deze opbouw kan er enkel, na het doorlopen van de retrotranspositiecyclus, EGFP tot expressie gebracht worden. Door middel van splicing wordt het intron uit de EGFP-sequentie verwijderd. Hoe meer retrotranspositie hoe meer groen fluorescent signaal detecteerbaar is tijdens de analyse met de flowcytometer (Ostertag et al., 2000).



Figuur 7: Schematische weergave van het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide. Dit plasmide wordt gebruikt in LINE-1 retrotranspositie assays. Het plasmide bevat een startplaats voor de replicatie (Ori) voor het repliceren van het plasmide in zowel bacteriën als in eukaryote cellen. Het plasmide bevat twee resistentiegenen. Het ampicilline resistentiegen wordt gebruikt na de transformatie van het plasmide in bacteriën, terwijl het puromycine resistentiegen gebruikt wordt voor de selectie na de transfectie van het plasmide in eukaryote cellen. Als laatste is het gen van interesse aanwezig op het plasmide. Dit bestaat uit de sequentie van het LINE-1 element gefusioneerd met een versterkt groen fluorescente proteïne (EGFP) expressiecassette. Deze cassette bevat een promotor (pCMV) en een transcriptie terminatiesignaal. Het bevat de sequentie van EGFP onderbroken door een γ -globine intron. De expressiecassette wordt in omgekeerde richting gefusioneerd met de sequentie van het LINE-1 transposon (Ostertag et al., 2000) (figuur gemaakt door Saskia Lesire).

1.4.3 JM111 negatieve controle plasmide

Tijdens de test wordt telkens een negatieve controle meegenomen. Dit is het JM111 negatieve controle plasmide. Dit plasmide vertoont veel gelijkenissen met het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide. Het verschil tussen beide is de aanwezigheid van twee puntmutaties in de ORF1 van de sequentie van de LINE-1 transposon waardoor de replicatiecyclus van de retrotransposons niet kan worden uitgevoerd. Dit wil zeggen dat er geen fluorescent signaal mag worden waargenomen in met het JM111 plasmide getransfecteerde cellen (Ostertag et al., 2000).

1.5 Conclusie

Transpositie is een complex onderwerp waar steeds meer en meer wetenschappelijk onderzoek naar gevoerd wordt. Het humane genoom bestaat voor 45% uit deze springende genen. De transposons speelden een belangrijke rol in de evolutie, maar zijn ook de oorzaak van heel wat aandoeningen. Momenteel zijn enkel de LINE-1 retrotransposons actief in het humane genoom. Hoeveel retrotranspositie er in de cellen plaats vindt, wordt gereguleerd door verschillende eiwitten zoals MeCP2. Dit eiwit vormt een repressorcomplex met de eiwitten HDAC en Sin3a waardoor de retrotranspositie wordt geïnhibeerd. Dit zijn niet de enige interactiepartners van MeCP2. LEDGF is een voorbeeld van een andere interactiepartner van MeCP2. LEDGF reguleert de transcriptie van een aantal genen, maar heeft ook tal van andere functies. Het is een sleutelproteïne in de HIV-replicatiecyclus. Deze cyclus lijkt heel erg op de replicatiecyclus van LINE-1 retrotransposons. Om meer inzicht te krijgen in de LINE-1 retrotranspositie kan de LINE-1 retrotranspositie assay gebruikt worden in verschillende experimenten. Deze assay is een combinatie van verschillende technieken om de LINE-1 retrotranspositie kinetiek gedurende een bepaalde periode te onderzoeken. Over transpositie is al heel wat gekend, maar veel mechanismen hebben nog meer wetenschappelijk onderzoek nodig. Verder wetenschappelijk onderzoek is noodzakelijk om nog meer inzicht te krijgen in de transponeerbare elementen (Ostertag et al., 2000; Saleh et al., 2019).

2 Doelstelling

MeCP2 is een transcriptiefactor die op verschillende plaatsen in het genoom bindt om de transcriptie te reguleren. Afhankelijk van welke proteïnen interageren met MeCP2 is dit eiwitcomplex een activator of repressor van de transcriptie van de doelwitgenen. Het activeren of inhiberen van de transcriptie wordt gerealiseerd door de chromatinestructuur te wijzigen. Wetenschappelijke onderzoek toont aan dat er een interactie optreedt tussen MeCP2 en LEDGF. Deze interactie wordt gerealiseerd door een binding tussen MeCP2 en het PWWP-CR1 domein van LEDGF. Het exacte domein waarmee MeCP2 deze binding aangaat werd nog niet onderzocht. De onderzoeksgroep van Prof. Dr. Zeger Debyser onderzoekt dit complex. Hoe dit complex de transcriptionele activiteit zou kunnen reguleren is nog niet gekend. Hiervoor is verder wetenschappelijk onderzoek noodzakelijk (Leoh et al., 2012).

Het eerste doel van deze stage is het bepalen van welke domeinen van de proteïnen exact de interactie realiseren tussen LEDGF en MeCP2. Beide eiwitten hebben elk twee isoformen. Er wordt tijdens de stage onderzocht of er een verschil is tussen beide isoformen en hoe de interactie per isoform tussen beide eiwitten tot stand komt. Dit wordt onderzocht aan de hand van co-immunoprecipitaties.

Het tweede doel van deze stage is het onderzoeken van de transcriptionele rol van het MeCP2-LEDGF complex in LINE-1 retrotranspositie. Dit complex zou mogelijks de retrotranspositie beïnvloeden. Dit wordt onderzocht aan de hand van een aantal technieken zoals de LINE-1 EGFP assay en de LINE-1 Fluc assay. De LINE-1 EGFP assay bestudeert de transpositiekinetiek op individueel celniveau gedurende een periode van 13 dagen. De LINE-1 Fluc assay is een verkorte test om de relatieve hoeveelheid retrotranspositie te onderzoeken. Tijdens deze test worden de cellen gedurende een periode van 4 dagen gevolgd op individueel celniveau om zo een test te vinden die representatief is voor de retrotranspositie binnen een kortere tijdspanne.

Tijdens de stageperiode wordt vooral fundamenteel onderzoek gevoerd naar de eiwitten LEDGF en MeCP2 en hun regulerende rol tijdens de LINE-1 retrotranspositie. Als dit gekend is, kan dit als basis dienen om specifieke aandoeningen en mechanismen beter te begrijpen en te behandelen.

3 Materiaal en methoden

3.1 Celcultuur

3.1.1 Doel

Verschillende cellijnen worden in cultuur gehouden in functie van andere experimenten. De cellen staan op deze manier snel ter beschikking voor het uitvoeren van een experiment.

3.1.2 Principe

Het in cultuur houden van cellen bestaat uit het herhaaldelijk opgroeien en splitsen van de cellijn. Dit gebeurt door de cellen tweemaal per week te splitsen met een splitsingscoëfficiënt van 1/25.

3.1.3 Materiaal

Cellen, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) met GlutaMAX [Fisher scientific], foetaal bovine kalfserum (FCS) [Gibco], gentamicine [Fisher scientific], fosfaatbuffer zoutoplossing (PBS), trypsine [Fisher scientific], T25 falcons, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, laminaire flow, incubator. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

3.1.4 Methode

Cellen in cultuur in een T25 cultuurfles die 90 procent confluent zijn, worden gewassen met 5 ml PBS. Breng daarna 500µl trypsine op de cellen en wacht tot deze loskomen. Voeg 4.5ml DMEM-medium met 5% FCS en gentamicine (50µg/ml) (5% DMEM groeimedium) toe aan de falcon. Maak een homogene celsuspensie. De cellen worden gesplitst met een splitsingscoëfficiënt van 1/25. Voeg 5ml 5% DMEM groeimedium met eventueel een selectieantibioticum toe aan de 200µl overgebleven celsuspensie. De cellen worden 72 tot 96 uur geïncubeerd op 37°C met 5% CO₂. (Daarna worden de cellen opnieuw gesplitst.)

3.2 Western blot

3.2.1 Doel

Een western blot wordt uitgevoerd om de eiwitten in een staal te onderzoeken waarbij de eiwitten worden gescheiden op basis van grootte. Dit wordt gevisualiseerd met antilichamen.

3.2.2 Principe

De eerste stap van een western blot bestaat uit het scheiden van de stalen op een polyacrylamidegel. Na het lopen van de gel en het blotten op een nitrocellulosemembraan, wordt de blot geïncubeerd met een antilichamen. Er wordt gewerkt via een indirecte detectie waarbij het secundair antilichaam gelabeld is met een horseradish peroxidase (HRP). Dit enzyme kan verschillende substraten omzetten. Tijdens de omzetting wordt een lichtsignaal geproduceerd. Een substraat is bijvoorbeeld luminol of een versterkte versie ervan zoals het versterkt chemiluminescent (ECL). Op deze manier worden de verschillende bandjes op het membraan gevisualiseerd.

3.2.3 Materiaal

Stalen, 6x ladingsbuffer (LB), fosfaat glycine natriumdodecylsulfaat (SDS) buffer [Novex life technologies], tris glycine (4/15%) gel [Bio-rad], transferbuffer, trisbuffer zoutoplossing met 0.1% triton-X100 (PBS-T), GAPDH primair antilichaam [Abcam], LEDGF primair antilichaam [Abcam] MeCP2 primair antilichaam [Cell signaling], secundair goat anti rabbit antilichaam HRP gelabeld [Aligent] melkpoeder [Régilait], ponceau kleuring [Sigma Aldrich], clarity western ECL substrate [Bio-rad], petriplaten, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, tafelcentrifuge, western blot module, stroombron, Transblot Turbo Transfer systeem [Bio-rad], schudder, visualisatietoestel [Amersham ImageQuant 800 Fluor]. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

3.2.4 Methode

Kook de stalen waaraan ladingsbuffer (6x) wordt toegevoegd gedurende 10 minuten op 98°C. De gewenste hoeveelheid van elk staal wordt geladen op een tris-glycine (4-15%) gel in een tris glycine SDS buffer (10x) die tien keer verdund wordt. Van de proteïne merker wordt er 7µl geladen op de gel. Loop de gel gedurende 10 minuten op 90V en vervolgens 45-60 minuten op 140V. Daarna wordt een semi-natte elektroblotting uitgevoerd. Hierbij worden de gel, sponzen en het membraan in transferbuffer gedompeld. De gel wordt geblot op een nitrocellulosemembraan. Het blotten gebeurt op 25V voor 30 minuten. Hierna wordt het membraan kort gekleurd met een ponceau kleuring. Dit wordt gevisualiseerd en de blot wordt eventueel in stukken gesneden (om verschillende proteïnen te visualiseren op het membraan). De stukken blot worden één uur geblokt in PBS -T met 5% melkpoeder. Na het blokken wordt dit overnacht op 4°C op een schudder geïncubeerd met de primaire antilichamen verdund in PBS-T met 5% melkpoeder.

Verwijder het primair antilichaam. Was de blot drie keer met PBS-T. Eénmaal wordt de blot snel gewassen. De andere twee keer wordt de blot gedurende 15 minuten op de schudder gewassen. Maak een 1:20 000 verdunning van het secundaire antilichaam in PBS-T met 5% melkpoeder. Incubeer de blot één uur in de antilichaamoplossing op de schudder. Was de blot opnieuw driemaal met PBS-T zoals eerder werd beschreven. Breng het ECL-substraat op de blot en incubeer dit 5 minuten in het donker. Visualiseer de blot.

3.3 Co-immunoprecipitatie (co-IP)

3.3.1 Doel

Co-immunoprecipitatie is een opeenvolging van verschillende technieken waarbij de eiwitinteractie in celculturen onderzocht wordt.

3.3.2 Principe

Co-immunoprecipitatie is een combinatie van verschillende technieken. Het protocol spreidt zich over vijf dagen en wordt opgedeeld in drie grote delen. Er wordt gestart met een transfectie van de cellijnen. De keuze van de cellijnen hangt af van het doel van het experiment. Het getransfecteerde plasmide zal het eiwit van interesse tot expressie brengen. Dit eiwit is gefusioneerd met een tag zodat dit later geprecipiteerd kan worden. Het tweede onderdeel van een co-IP is de precipitatie. Hiervoor wordt een cellysaat gemaakt van de getransfecteerde cellen. Dit wordt geïncubeerd met beads die de tag aan het eiwit herkennen. Aan het cellysaat met de beads wordt Dnase toegevoegd zodat een DNA-gemedieerde interactie voorkomen wordt en enkel eiwitinteracties onderzocht worden. Wanneer de beads worden neergeslagen, wordt het eiwit van interesse met interactiepartners geprecipiteerd. In het laatste onderdeel van de co-IP worden de stalen geëluëerd van de beads door dit op te koken in aanwezigheid van dithiothreitol en SDS in de ladingsbuffer. De geprecipiteerde eiwitten in het eiwitcomplex worden geïdentificeerd via een western blot.

3.3.2.1 Materiaal

HEK293T cellen, plasmiden, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) met GlutaMAX [Fisher scientific], foetaal bovine kalfserum (FCS) [Gibco], gentamicine (50mg/ml) [Fisher scientific], 150 mM NaCl, polyethyleenimine (PEI), radioimmunoprecipitatie assay buffer (RIPA), protease inhibitor (PI) [Merck life science BV], fosfaatbuffer zoutoplossing (PBS), anti-hemaglutinine (HA) magnetische beads [MedChemExpress], FLAG-beads [sigma Aldrich], trisbuffer zoutoplossing (TBS), trisbuffer zoutoplossing - Tween 20 (TBS-T), Dnase (10u/µl) [Sigma Aldrich], petriplaten, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, laminaire flow, mini-centrifuge, ijs, schrapers, 1,5 ml en 2 ml eppendorfen, 15 ml en 50 ml falcons, incubator, draaiend wiel, microscoop. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

3.3.2.2 Methode

Dag 1: opgroeien van de gewenste cellijn

De cellijn wordt uitgeplaat in een petriplaat aan een dichtheid van 70 miljoen cellen per plaat. Per transfectieconditie wordt er in triplo gewerkt. De cellen worden opgegroeid in 5% DMEM groeimedium. De cellen worden overnacht geïncubeerd op 37°C met 5% CO₂.

Dag 2: transfectie met plasmide DNA

De uitgezaaide cellen hebben een confluëntie van ongeveer 70%. Eén plaat wordt getransfecteerd met een transfectiemix die bestaat uit een DNA-mix en een PEI-Mix. De DNA-mix voor één plaat bestaat uit 20 µg DNA in 800 µl 150mM NaCl. De PEI-mix bestaat uit 100µl PEI en 700µl 150mM NaCl. Per conditie wordt er in drievoud gewerkt. Er wordt een mix gemaakt waarbij rekening gehouden wordt met overmaat. Maak de beide suspensies eerst afzonderlijk en meng vervolgens de oplossingen door te inverteren. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur. Verwijder het oud medium van de cellen. Per plaat wordt er 5 ml DMEM 2% FCS medium met 50µg/ml gentamicine toegevoegd aan de transfectiemix. Meng dit voorzichtig door te inverteren. Verdeel 6.8ml van het medium met de transfectiemix over de plaat. Incubeer overnacht op 37°C, 5% CO₂.

Dag 3: cellysaat maken en incubatie met de beads

Maak per conditie 800µl lysis buffer door 50x PI op te lossen in RIPA buffer. Verwijder het medium van de cellen. Was de plaat twee keer met 4ml PBS. Pipeteer alles droog met een P1000 pipet. Werk per conditie. Voeg 800µl lysis buffer toe aan de eerste plaat. Schraap de plaat droog en zet alles over op de volgende plaat. Herhaal dit twee keer. Transfereer vervolgens het cellysaat naar een 2ml eppendorf. Incubeer het cellysaat gedurende 30 minuten op ijs. Na de incubatieperiode wordt dit 10 minuten op maximumsnelheid gecentrifugeerd op 4°C. Pipeteer het supernatans naar een nieuw epje. Neem 30 µl staal (input) en vries dit meteen in. Voeg aan het overige lysaat 5µl Dnase toe.

Voor een co-IP met FLAG-beads wordt er per conditie 20 µl beads toegevoegd. Was de beads eerst drie keer met TBS in een 1/8 verhouding door te centrifugeren op 6.8g voor 1 minuut. Na het wassen wordt één conditie beads (20µl) opgelost in 90µl TBS-buffer. Voeg per conditie 100µl opgeloste beads toe aan het cellysaat. Incubeer op 4°C overnacht op een draaiend wiel.

Voor een co-IP met magnetische beads wordt er per conditie 20 µl beads toegevoegd. Was de beads eerst drie keer met TBS-T in een 1/8 verhouding door de beads telkens in een magnetische houder te plaatsen. Na het wassen wordt één conditie beads (20µl) opgelost in 90µl TBS-buffer. Voeg per conditie 100µl opgeloste beads toe aan het cellysaat. Incubeer op 4°C overnacht op een draaiend wiel.

Dag 4: pull down en western blot

Voor een co-IP met FLAG-beads worden de stalen gecentrifugeerd op 6.8g voor 1 minuut op 4°C. Verwijder het supernatans en was de stalen (precipitaat) drie keer met minstens 700µl TBS-buffer per staal. Centrifugeer telkens op 6.8g voor 1 minuut op 4°C. Voeg aan elk staal (precipitaat) 40 µl ladingsbuffer toe. Er wordt 10µl ladingsbuffer toegevoegd aan de input stalen. Vervolgens worden de stalen geanalyseerd via een western blot. Zie sectie 3.2 voor het protocol van deze techniek.

Voor een co-IP met magnetische beads wordt het supernatans verwijderd door de beads in een magnetische houder te plaatsen. Was de beads driemaal met 700µl TBS-T. Voeg vervolgens 20µl SDS-buffer toe aan elk staal. Kook de stalen vijf minuten op 95°C. Transfereer het supernatans naar een nieuw epje. Voeg 6x LB toe en analyseer met behulp van een western blot. Zie sectie 3.2 voor het protocol van deze techniek.

3.4 Precipitatie/ pull down

3.4.1 Doel

Een pull down is een opeenvolging van technieken waarbij de interactie tussen een recombinant opgezuiverd proteïne en endogene eiwitten uit een cellysaat onderzocht wordt.

3.4.2 Principe

Een precipitatie of een pull down is een andere manier om eiwitinteracties te onderzoeken. Tijdens een pull down worden de cellen niet getransfecteerd, maar wordt er aan het cellysaat van HEK293T cellen een recombinant proteïne van interesse toegevoegd. Dit proteïne kan mogelijk een eiwitinteractie vertonen met bepaalde endogene proteïnen in het cellysaat. Het toegevoegd recombinant proteïne bevat een tag waardoor het, na incubatie met het cellysaat, met de gepaste beads wordt geprecipiteerd. Eventuele interactiepartners van het recombinant proteïne worden op deze manier mee geprecipiteerd. Vervolgens wordt dit via een western blot geanalyseerd.

3.4.3 Materiaal

HEK293T cellen, recombinante proteïnen, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) met GlutaMAX [Fisher scientific], foetaal bovine kalfserum (FCS) [Gibco], gentamicine (50mg/ml) [Fisher scientific], radioimmunoprecipitatie assay buffer (RIPA), protease inhibitor (PI) [Merck life science BV], fosfaatbuffer zoutoplossing (PBS), FLAG- beads [Sigma Aldrich], glutathion-S-transferase (GST) -beads [Thermo scientific], trisbuffer zoutoplossing (TBS), Dnase (10u/μl) [Sigma Aldrich], petriplaten, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, laminaire flow, mini-centrifuge, ijs, schrapers, 1.5 ml en 2 ml eppendorfen, incubator, draaiend wiel, microscoop. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

3.4.4 Methode

Daag 1: opgroeien van de gewenste cellijn

De cellijn wordt uitgeplaat in een petriplaat aan een densiteit van 70 miljoen cellen per plaat. Per conditie wordt er in triplo gewerkt. De cellen worden opgegroeid in 5% DMEM groeimedium. De cellen worden 36 uur geïncubeerd op 37°C met 5% CO₂.

Daag 2: cellysaat maken en incubatie met de beads

Maak per conditie 800μl lysis buffer door 50x PI op te lossen in RIPA buffer. Verwijder het medium van de cellen. Was de plaat twee keer met 4ml PBS. Pipeteer alles droog met een P1000. Werk per conditie. Voeg 800μl lysis buffer toe aan de eerste plaat. Schraap de plaat droog en zet alles over op de volgende plaat. Herhaal dit twee keer en transfereer het cellysaat naar een 2ml eppendorf. Incubeer het cellysaat gedurende 30 minuten op ijs. Na de incubatieperiode van het lysaat wordt dit 10 minuten op maximumsnelheid gecentrifugeerd op 4°C. Pipeteer het supernatans naar een nieuw epje en voeg hieraan 8μg recombinant proteïne toe. Neem 30 μl staal (input) en vries meteen in. Voeg aan het overige lysaat 5μl Dnase toe. Per conditie wordt er 20 μl beads toegevoegd aan het lysaat. Was de beads eerst drie keer met TBS in een 1/8 verhouding door te centrifugeren op 6.8g voor 1 minuut. Na het wassen wordt één conditie beads (20μl) opgelost in 90μl TBS-buffer. Voeg per conditie 100μl opgeloste beads toe aan het cellysaat. Incubeer op 4°C overnacht op een draaiend wiel.

Daag 3: pull down en western blot

Centrifugeer de stalen op 6.8g voor 1 minuut op 4°C. Verwijder het supernatans en was de stalen drie keer met minstens 700μl TBS-buffer per staal. Centrifugeer telkens op 6.8g voor 1 minuut op 4°C. Voeg aan elk staal (precipitaat) 40 μl ladingsbuffer toe. Er wordt 10μl ladingsbuffer toegevoegd aan de input stalen. Vervolgens worden de stalen geanalyseerd via een western blot. Zie sectie 3.2 voor het protocol van deze techniek.

3.5 LINE-1 EGFP retrotranspositie assay

3.5.1 Doel

LINE-1 EGFP retrotranspositie assay is een techniek waarbij de retrotranspositie kinetiek gedurende een periode van 13 dagen onderzocht wordt in verschillende cellijnen.

3.5.2 Principe

Dit experiment start met een transfectie van een aantal cellijnen waarin de retrotranspositie kinetiek onderzocht wordt. Twee verschillende plasmiden worden gebruikt voor de transfectie. Het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide wordt gebruikt om de retrotranspositie op te volgen aan de hand van een EGFP-signaal. Het tweede plasmide is het JM111 negatief controle plasmide. Dit plasmide bevat een mutatie waardoor het de retrotranspositiecyclus niet kan doorlopen. Na het transfecteren van de cellen worden de cellen gedurende 13 dagen in cultuur gehouden en wordt er op dag zes, tien en dertien een staal genomen. Het EGFP-signaal in de stalen wordt geanalyseerd aan de hand van een flowcytometer en de geïntegreerde EGFP-kopieën worden via qPCR bepaald. De plasmidenmappen van de gebruikte plasmiden worden weergegeven in het addendum sectie 9.

3.5.3 Materiaal

Verschillende cellijnen, L1RP-EGFP reporter plasmide, JM111 negatieve controle plasmide, poly-D-lysine [Sigma Aldrich], PBS, DMEM [Fisher scientific], FCS [Gibco], 50mg/ml gentamicine [Fisher scientific], opti-MEM [Fisher scientific], lipofectamine 3000 en P3000 reagens [Fisher scientific], trypsine [Fisher scientific], puromycine [Fisher scientific], 4% paraformaldehyde [Sigma Aldrich], 48-well plaat, 6-well platen, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, laminaire flow, mini-centrifuge, 1.5 ml en 2 ml eppendorfen, incubator, Attune flowcytometer [Invitrogen], cell counter [Bio-rad], DNA mini kit [QIAamp], primers, SYBR-Green PCR mastermix [Applied Biosystems], CFX OPUS 96 Real-time PCR system [Bio-rad]. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

Tabel 1: Sequentie van de verschillende primers

Primer	Sequentie
Forward primer EGFP	5'- GGTCACGAACTCCAGCAG - 3'
Reverse primer EGFP	5'- CAGAAGAACGGCATCAAGG - 3'
Forward primer β -actine	5'- TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA - 3'
Reverse primer β -actine	5'- CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG - 3'

3.5.4 Methode

Transfectie:

Bedek een 48-well plaat met poly-D-lysine en laat dit 20 minuten incuberen. Verwijder de poly-D-lysine van de plaat en was de plaat driemaal met PBS. Plaat de cellijnen uit in de gecoate 48-well plaat aan een densiteit van 50 000 levende cellen per well. De cellen worden uitgeplaat in 250 μ l in DMEM, 10% FCS en 50 μ g/ml gentamicine groeimedium (10% DMEM groeimedium). Per cellijn worden er acht wells uitgeplaat. Incubeer de cellen overnacht op 37°C, 5% CO₂.

Controleer de cellen onder de microscoop en bereid de transfectiemix voor. Van elke cellijn werden acht wells uitgeplaat. Drie ervan worden getransfecteerd met het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide. De volgende drie worden getransfecteerd met het JM111 negatieve controle plasmide. De overige twee worden niet getransfecteerd. De transfectiesuspensie bestaat uit 100ng plasmide DNA, 0.2 μ l P3000 reagens, 0.3 μ l lipofectamine 3000 en 50 μ l opti-MEM per well. Bereken de totale hoeveelheid (met overmaat) transfectiemix per conditie en verdeel de

hoeveelheid opti-MEM in twee. De ene helft wordt gemixt met de totale hoeveelheid DNA en de andere helft met de totale hoeveelheid lipofectamine 3000 en P3000 reagens. Meng vervolgens de lipofectamine-mix met de DNA-mix en incubeer dit 20 minuten op kamertemperatuur. Verwijder het oud medium en voeg voor de transfectiecondities 100µl opti-MEM en 50µl van de transfectiemix aan de cellen toe. Voor de niet- getransfecteerde conditie voeg 150µl opti-MEM toe. Incubeer dit gedurende vier uur op 37°C, 5% CO₂. Vervang na vier uur het medium met 200µl 10% DMEM groeimedium. Dit is dag nul van het experiment. Incubeer de cellen gedurende 24 uur op 37°C, 5% CO₂.

Expandeer de cellen op dag twee naar een 6-well plaat. Was de cellen eerst met PBS en voeg vervolgens 20µl trypsine toe aan elke well. Wacht tot de cellen loskomen en voeg 180µl 10% DMEM groeimedium toe. Maak een homogene celsuspensie en zet alles over naar de 6-well plaat en voeg 2.5ml 10% DMEM groeimedium toe. Incubeer de cellen overnacht op 37°C, 5% CO₂. Vervang vervolgens (dag drie) het medium door 2.5ml 10% DMEM groeimedium met 1µg/ml puromycine om de getransfecteerde cellen te selecteren. Voor de conditie van de niet- getransfecteerde cellen, voeg het selectiemedium toe aan één van de twee wells. Incubeer de cellen gedurende 72 uur op 37°C, 5% CO₂.

Celcultuur van de getransfecteerde cellen:

Kijk onder de microscoop of de cellen geselecteerd zijn. Hou de cellen in cultuur en splits deze op dag zes, tien en dertien en neem telkens staal. Dit gebeurt door de 100µl trypsine toe te voegen aan elke well. Wacht tot de cellen loskomen en voeg vervolgens 900µl 10% DMEM groeimedium toe. Maak een ééncellige suspensie en neem van elke well 100µl staal. Fixeer dit met 100µl 4% paraformaldehyde in een 96-well plaat. Laat 200µl van de celsuspensie in de well en voeg hier 2.5ml 10% DMEM groeimedium met 1µg/ml puromycine aan toe. Incubeer de celculturen op 37°C, 5% CO₂. Op dag 13 wordt de overige celsuspensie in een eppendorff gepipetteerd. Centrifugeer de celsuspensie in de eppendorfs voor vijf minuten op 1200rpm. Was de pellets één keer met PBS en draai dit opnieuw af gedurende vijf minuten op 1200rpm. Bewaar de pellets in de diepvries op -20°C. Bewaar de gefixeerde stalen op 4°C.

Flowcytometrie:

De gefixeerde stalen in de 96-well plaat worden verdund met 100µl PBS. Transfereer de stalen naar een geschikte 96-well plaat voor de flowcytometer. De stalen worden geanalyseerd aan de hand van de forward scatter, de side scatter en de blauwe 488nm laser via het BL1 kanaal.

Real time PCR voor de geïntegreerde kopijen:

Extraheer het genomisch DNA met de QIAamp DNA mini kit volgens het bijgevoegde protocol. Elk staal wordt met twee verschillende primersets (EGFP en β-actine) geamplificeerd en per primerset wordt elk staal in drievoud geanalyseerd. Per staal wordt een mastermix gemaakt van 1µl forward primer (5µM), 1µl reverse primer (5µM), 10µl SYBR-Green PCR mastermix en 3µl gedemineraliseerd water. Per staal wordt er 5 µl DNA (20ng/µl) en 15µl mastermix samengevoegd. Maak een standaard door een verdunningsreeks te maken van één van de stalen. Start bij een concentratie van 125ng en verdun telkens met een factor van 1/5 tot 0.2ng/µl. Amplificeer en analyseer de stalen met behulp van het Real-time PCR-toestel op onderstaande temperatuur cyclus.

Tabel 2: Cyclusparameters van het qPCR protocol

Temperatuur	Tijd	
95°C	10 minuten	} x40
95°C	10 seconden	
55°C	30 seconden	
	Uitlezen plaat	
95°C	1 minuut	
Smeltcurve van 55°C tot 95°C	0,5°C per 5 seconden	

3.6 LINE-1 Fluc assay

3.6.1 Doel

Het doel van de LINE-1 Fluc assay is om de retrotranspositie van verschillende cellijnen op individueel celniveau in kaart te brengen in een tijdspanne van 4 dagen.

3.6.2 Principe

Deze assay vertoont gelijkenissen met de LINE-1 EGFP retrotranspositie assay en is mogelijk een verkort alternatief representatief experiment voor LINE-1 EGFP retrotranspositie assay. In deze assay worden verschillende cellijnen getransfecteerd met drie verschillende plasmiden. Het eerste plasmide pXY014 wordt gebruikt om de retrotranspositie op te volgen aan de hand van een Fluc – signaal. De hoeveelheid retrotranspositie kan gemeten worden aan de hand van het lichtsignaal dat vrijkomt bij de omzetting van D-luciferine door firefly luciferase. Het is een positieve controle dat een retrotranspositie competent LINE-1 gen bevat. Het tweede pXY015 plasmide is een negatieve controle dat een gemuteerd LINE-1 gen bevat. pXY017 is het onderzochte plasmide en bevat een CAG-promoter in plaats van een LINE-1 promoter. De getransfecteerde cellen worden gedurende vier dagen in cultuur gehouden en op de laatste dag worden de cellen geanalyseerd. De resultaten van het Fluc-sigitaal kunnen genormaliseerd worden voor totale hoeveelheid proteïne via een bicinchoninezuur assay (BCA) of voor transfectie efficiëntie via een Renilla luciferase (Rluc) assay. Renilla luciferase komt constitutief tot expressie op de plasmiden. De transfectie efficiëntie wordt gemeten worden aan de hand van het lichtsignaal dat vrijkomt bij de omzetting van coelenterazine door renilla luciferase. De plasmidenmappen van de gebruikte plasmiden worden weergegeven in het addendum sectie 9.

3.6.3 Materiaal

Cellijnen, plasmiden pYX014; pYX015; pYX017, PBS, DMEM [Fisher scientific], FCS [Gibco], gentamicine (50mg/ml) [Fisher scientific], puromycine [Fisher scientific], lipofectamine 3000 en P3000 reagens [Fisher scientific], opti-MEM [Fisher scientific], bovine serumalbumine (BSA; 2mg/ml) [Thermo scientific], lysis buffer, ONE-Glo luciferase assay system kit [Promega], gedemineraliseerd water, BCA-reagens [Pierce BCA protein assay kit], Dual-Glo® Luciferase Assay System kit [Promega], trypaanblauw [Sigma Aldrich] 96-well plaat, conische 96-well plaat, incubator, microtiterplaat, centrifuge, micropipetten en pipetpunten, pipetboy en pipetten, laminaire flow, mini-centrifuge, 1.5 ml en 2 ml eppendorfen, Envision luminometer [Perkin Elmer], cell counter [Bio-rad]. De samenstelling van de buffers staat beschreven in het addendum sectie 7 en de catalogusnummers van de componenten in sectie 8.

3.6.4 Methode

Transfectie:

Bedek een 48-well plaat met poly-D-lysine en laat dit 20 minuten incuberen. Verwijder de poly-D-lysine van de plaat en was de plaat driemaal met PBS. De cellijnen worden uitgeplaat in een 96-well plaat aan een densiteit van 20 000 cellen per well. De cellen worden opgegroeid in 200µl 5% DMEM groeimedium. Per cellijn worden er 12 wells uitgeplaat. Incubeer de cellen overnacht op 37°C, 5% CO₂. Vervolgens worden de cellen getransfecteerd met behulp van lipofectamine. De transfectiemix per well bevat 100ng plasmide DNA, 0.2µl P3000 reagens, 0.3µl lipofectamine 3000 en 50 µl opti-MEM. Bereken per conditie de totale hoeveelheid transfectiemix (met overmaat) en verdeel de totale hoeveelheid opti-MEM in twee. Voeg de totale hoeveelheid DNA toe aan de ene helft en beide componenten van het lipofectaminereagens aan de andere helft. Voeg de mixen samen en incubeer dit gedurende 15 minuten op kamertemperatuur. Voeg aan elke well 50µl van de transfectiesuspensie toe. Aan de niet-getransfecteerde conditie wordt aan elke well 50µl opti-MEM toegevoegd. Incubeer dit gedurende vier uur op 37°C, 5% CO₂. Vervang na vier uur het medium met 200µl 5% DMEM, groeimedium. Dit is dag nul van het experiment. Incubeer de cellen overnacht op 37°C, 5% CO₂. Vervang op dag één het medium door 200µl 5% DMEM groeimedium met 1µg/ml puromycine. Kies voor de niet-getransfecteerde conditie per cellijn één well waarop dit

selectiemedium wordt gebracht. De andere worden geïncubeerd met 200µl 5% DMEM groeimedium. Incubeer de cellen 72 uur op 37°C, 5% CO₂.

Analyseren van de stalen:

Kijk onder de microscoop of de cellen geselecteerd zijn. Was de cellen tweemaal met PBS. Lyseer de cellen met 70µl lysisbuffer en vries de plaat in op -80°C. Als de plaat volledig is ingevroren, ontdooi vervolgens de plaat en transfereer alle inhoud naar een conische 96-well plaat. Centrifugeer dit vijf minuten op 1000rpm. Om de hoeveelheid luciferase en dus de hoeveelheid retrotranspositie te bepalen wordt het luciferase assay gebruikt. In deze assay wordt 5µl van elk staal toegevoegd aan 25µl van het Fluc substraat. Detecteer het lichtsignaal via de Envision luminometer.

Voor het normaliseren van de resultaten van de luciferase assay wordt er gewerkt met een BCA. Verdun de BSA tien keer zodat de concentratie 0.2mg/ml is. Maak een standaardreeks met 1/5 verdunningen. De standaardreeks wordt dus 0µl BSA, 5µl BSA, 10µl BSA, 15µl BSA, ... tot en met 55µl BSA. Voeg aan elke well van de standaard 10µl lysisbuffer toe en vul elke well met gedemineraliseerd water tot een eindvolume van 100µl. Maak de standaardreeks in duplo. Voor de analyse van de stalen worden de stalen 10 maal verdund in een nieuwe 96-well plaat. Het eindvolume van de stalen is 100µl. Voeg per well 100µl van het BCA-reagens toe. Bereken de totale hoeveelheid (met overmaat) en meng reagens A met reagens B in een 1:50 ratio. Incubeer de stalen gedurende 30 minuten op 37°C en lees de absorbantie uit op 540nm via de Envision.

Een andere manier om de resultaten te normaliseren is door gebruik te maken van de Dual-Glo® Luciferase Assay System kit volgens bijgevoegd protocol. Het lichtsignaal wordt gedetecteerd via de Envision luminometer.

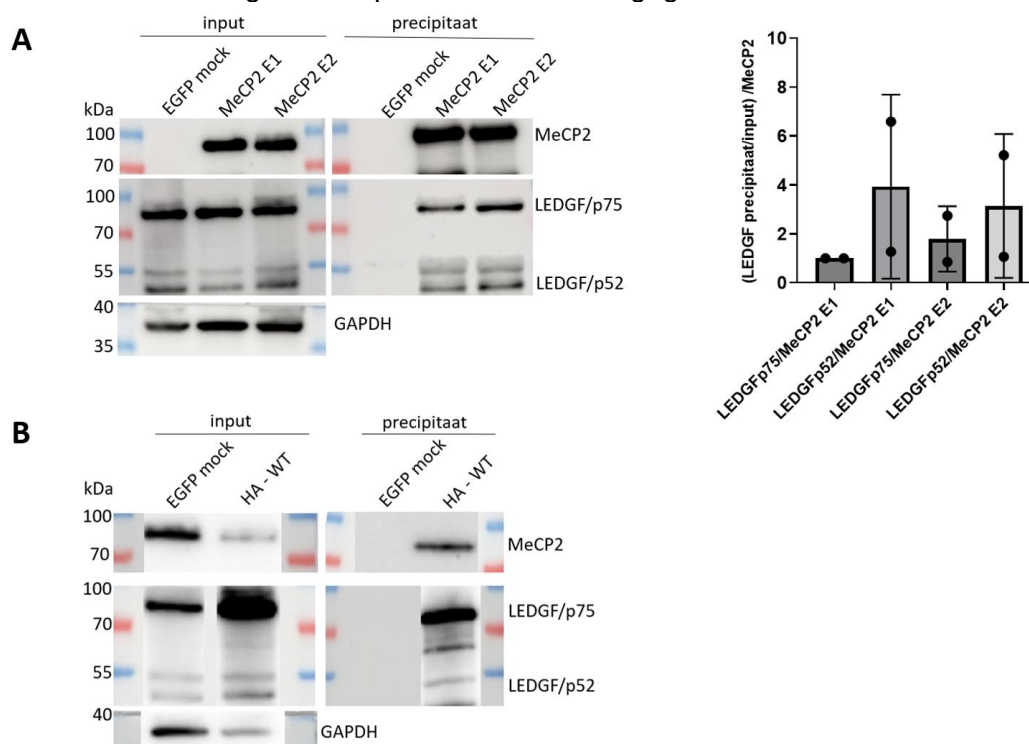
4 Resultaten en discussie

4.1 Moleculaire karakterisatie van het LEDGF-MeC P2 eiwitcomplex

4.1.1 Interactie tussen de verschillende isoformen van MeCP2 en LEDGF

In dit project wordt het LEDGF-MeCP2 eiwitcomplex onderzocht. Het project wordt opgesplitst in twee grote delen. In het eerste deel wordt voornamelijk het LEDGF-MeCP2 complex op moleculair niveau gekarakteriseerd. Eerder wetenschappelijk onderzoek toonde aan dat er interactie is tussen MeCP2 en LEDGF. In deze bachelorproef wordt de interactie tussen de isoformen van beide eiwitten verder onderzocht. Zowel LEDGF als MeCP2 hebben twee isoformen. Mogelijks vertonen bepaalde isoformen een grotere affiniteit voor elkaar. Dit wordt onderzocht met behulp van co-immunoprecipitatie (co-IP). Het protocol van deze techniek staat beschreven in sectie 3.3.

Het eerste experiment focust op de interactie tussen de verschillende isoformen van LEDGF en MeCP2. Dit wordt onderzocht met behulp van een co-IP waarbij HEK293T cellen worden getransfecteerd met twee verschillende plasmiden die elk een isoform van MeCP2 gemerkt met een FLAG-tag tot expressie brengen. HEK293T cellen brengen zowel LEDGF als MeCP2 endogeen tot expressie (input). Endogeen LEDGF-eiwit wordt geprecipiteerd door het vormen van een eiwitcomplex met FLAG-MeCP2 wat wordt geprecipiteerd met FLAG-beads (figuur 8). Na scheiden en blotten van het cellysaat en precipitaat worden MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38kDa) gevisualiseerd door een indirecte detectie met verschillende antilichamen. De schematische voorstelling van het protocol wordt weergegeven in het addendum sectie 10.1.



Figuur 8: Co-immunoprecipitaties (co-IP) die de interactie tussen de verschillende isoformen van MeCP2 en LEDGF aantonen. (A) HEK293T cellen werden getransfecteerd met twee verschillende plasmiden die elk een isoform van MeCP2 gemerkt met een FLAG-tag tot expressie brengen. De resultaten van het precipitaat van de LEDGF isoformen in de co-IP worden gekwantificeerd en genormaliseerd ten opzichte van de input van LEDGF en het precipitaat van MeCP2. (B) HEK293T cellen werden getransfecteerd met een plasmide dat hemaglutinine (HA) gemerkt LEDGF/p75 tot expressie brengt. Het EGFP mock plasmide is een controle plasmide. De verschillende stalen worden gevisualiseerd voor MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. Het LEDGF-antlichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. De GAPDH- en MeCP2-antilichamen worden in een 1:1000 verdunning gebruikt.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat elke conditie van getransfecteerde cellen één van de gemerkte isoformen van MeCP2 tot expressie brengt (figuur 8, panel A). EGFP mock is een controle conditie. Na de transfectie worden beide isoformen geprecipiteerd door gebruik te maken van de FLAG-beads (figuur 8, panel A). Het tweede eiwit dat wordt onderzocht in het cellysaat (input) en precipitaat is LEDGF. In elk input staal zijn beide isoformen van het endogeen LEDGF aanwezig. De isoformen van LEDGF worden geprecipiteerd in de stalen waar gemerkt MeCP2 tot expressie komt. De resultaten van de verschillende blots worden gekwantificeerd en genormaliseerd. Het precipitaat van de verschillende isoformen van LEDGF wordt genormaliseerd ten opzichte van de input van LEDGF en het geprecipiteerde MeCP2 (figuur 8, panel A).

Er wordt een tweede experiment uitgevoerd om de eiwitinteractie tussen LEDGF en MeCP2 te bevestigen. Dit is een co-IP waar LEDGF in plaats van MeCP2 wordt geprecipiteerd met magnetische beads. In dit experiment worden HEK293T cellen getransfecteerd met een plasmide dat hemaglutinine (HA) gemerkt LEDGF/p75 tot expressie brengt. De resultaten van dit experiment tonen aan dat de transfectie geslaagd is. Het HA-LEDGF/p75 komt tot expressie in de getransfecteerde cellen (figuur 8, panel B, input). In dit experiment worden de verschillende stalen ook gevisualiseerd voor MeCP2 dat endogeen in HEK293T cellen tot expressie komt. MeCP2 is in het cellysaat (input) van elk staal aanwezig, maar het wordt enkel geprecipiteerd in het staal getransfecteerd met het HA-LEDGF/p75. De schematische voorstelling van het experiment wordt weergegeven in het addendum sectie 10.2.

Er wordt geconcludeerd dat MECP2 en LEDGF met elkaar interageren. Dit wordt gevalideerd door twee onafhankelijke experimenten. De interactie tussen de eiwitten in het eerste experiment wordt aangetoond doordat LEDGF enkel wordt geprecipiteerd in de stalen getransfecteerd met MeCP2. De proteïnen vormen een eiwitcomplex. In dit experiment wordt niet enkel de interactie bevestigd, maar wordt de bindingsaffiniteit van de verschillende isoformen van LEDGF voor de isoformen van MeCP2 onderzocht. De resultaten tonen aan dat LEDGF/p52 een grotere bindingsaffiniteit heeft voor de beide isoformen van MeCP2.

MeCP2 precipiteert beide isoformen van LEDGF in één conditie. Dit wil zeggen dat het domein dat interageert met MeCP2 gemeenschappelijk is tussen LEDGF/p75 en LEDGF/p52. Dit interactiedomein ligt in het N-terminale deel van de eiwitten. Dit bevestigt de resultaten van Leoh et al., 2012. De onderzoekers toonden aan dat LEDGF/p75 interageert met MeCP2 via het N-terminaal domein. De experimenten in deze bachelorproef tonen dezelfde resultaten aan voor LEDGF/p75 en een parallel resultaat voor LEDGF/p52.

De interactie tussen MeCP2 en LEDGF wordt gevalideerd door het uitvoeren van een tweede co-IP waar diverse parameters worden gewijzigd. Er wordt in dit experiment gewerkt met een plasmide dat gemerkt LEDGF tot expressie brengt. Het precipiteren van het complex gebeurt in de omgekeerde richting. LEDGF is gemerkt met een HA-tag. Dit is een andere tag dan gebruikt werd in de vorige co-IP. De beads die worden gebruikt tijdens het precipiteren zijn magnetische beads. Door andere beads en een ander tag te gebruiken kan een specifieke interactie tussen MeCP2 en de beads of de tag worden uitgesloten. MeCP2 wordt mee geprecipiteerd door een complexvorming met LEDGF.

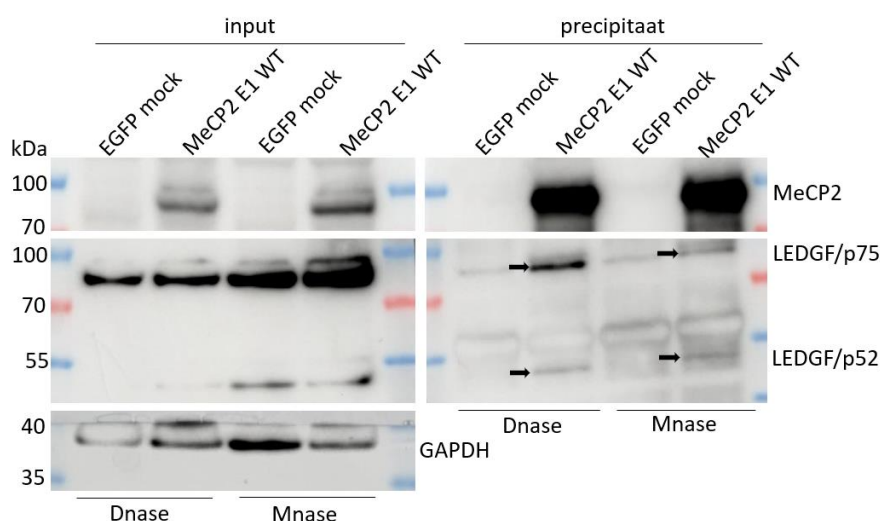
4.1.2 Eiwit-eiwitinteractie versus DNA-gemedieerde interactie

MeCP2 en LEDGF zijn DNA-bindende eiwitten. Eiwitcomplexen die gevormd worden bij co-IP's komen mogelijks tot stand door de aanwezigheid van DNA. In dat geval binden beide eiwitten onafhankelijk van elkaar aan DNA. Dit complex wordt vervolgens op zijn geheel geprecipiteerd zonder dat MeCP2 en LEDGF interageren. Om uit te sluiten dat de interactie enkel tot stand komt door indirecte binding via DNA wordt tijdens het protocol van een co-immunoprecipitatie desoxyribonuclease (Dnase) toegevoegd om het aanwezige dubbelstrengig DNA af te breken en een DNA-gemedieerde interactie te voorkomen. Dnase is een endonuclease. Een alternatief voor Dnase is Mnase. Dit staat voor micrococcal nuclease

en is een endonuclease. Mnase breekt zowel enkelstrengig als dubbelstrengig DNA of RNA af. Het is een efficiënter nuclease dan Dnase waardoor de kans kleiner is op de aanwezigheid van onafgebroken DNA of RNA in het cellysaat.

De invloed van de verschillende nucleasen wordt vergeleken in een co-IP. In dit experiment worden twee condities per nuclease getest. De eerste conditie is een controle waarbij de cellen getransfecteerd worden met het EGFP mock plasmide. De tweede conditie bestaat uit de transfectie van een plasmideconstruct dat MeCP2 E1 gemerkt met een FLAG-tag tot expressie brengt in HEK293T cellen. Na het transfecteren en lyseren van de cellen worden beide condities in twee groepen geprecipiteerd. Bij de eerste groep is dit in aanwezigheid van Dnase, terwijl dit bij de tweede groep Mnase is. De schematische voorstelling wordt weergegeven in het addendum sectie 10.1.

Om variaties die niet veroorzaakt worden door de verschillende nucleasen te vermijden, wordt het protocol aangepast. Er wordt één gezamenlijke transfectiemix gemaakt voor de EGFP mock conditie van beide groepen. Dit wordt ook gedaan voor de MeCP2 E1 conditie. Een tweede aanpassing bestaat erin dat na het lyseren en afdraaien van het cellysaat de stalen getransfecteerd met hetzelfde plasmideconstruct worden gepoold en vervolgens terug herverdeeld. Na precipitatie van MeCP2 E1 met FLAG-beads wordt gekeken of LEDGF kon worden geprecipiteerd. Op het membraan worden MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa) gevisualiseerd door middel van een indirecte detectie met verschillende antilichamen.



Figuur 9: co-IP waarbij Dnase vergeleken wordt met Mnase. HEK293T cellen worden in deze co-IP getransfecteerd met twee verschillende condities. Dit wordt in tweevoud uitgevoerd. De eerste conditie is de transfectie van het EGFP mock controle plasmide in HEK293T cellen. In de tweede conditie worden de cellen getransfecteerd met een plasmideconstruct dat MeCP2 E1 gemerkt met een FLAG-tag tot expressie brengt. Na het lyseren van de cellen wordt tijdens het precipiteren aan de ene groep Dnase toegevoegd en aan de andere groep Mnase. De verschillende stalen worden gevisualiseerd voor MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. Het LEDGF-antilichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. De GAPDH- en MeCP2-antilichamen worden in een 1:1000 verdunning gebruikt. De gradiënt in intensiteit van de LEDGF-bandjes komt door problemen met het antilichaam.

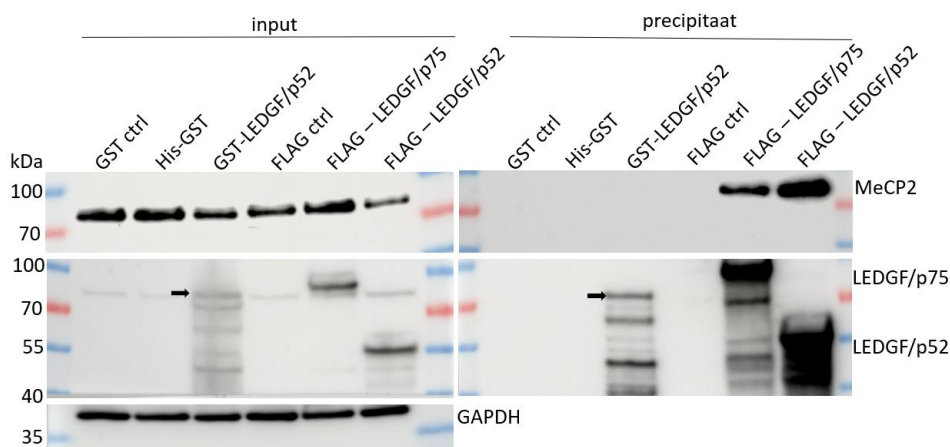
De resultaten tonen aan dat de transfectie van de verschillende condities gelukt is (figuur 9). MeCP2 wordt tot expressie gebracht (input) en geprecipiteerd in de MeCP2 E1 condities behandeld met Dnase en Mnase. De isoformen van LEDGF worden endogeen tot expressie gebracht in HEK293T cellen en zijn dus aanwezig in het cellysaat (input) van elk staal. De gradiënt in intensiteit van de bandjes komt door problemen met het antilichaam. Na het precipiteren van MeCP2 met behulp van FLAG-beads zijn de isoformen van LEDGF aanwezig in het precipitaat van de MeCP2 E1 conditie van beide groepen. Er is een verschil in intensiteit

van de LEDGF/p75 bandjes tussen de verschillende groepen (figuur 9). Er is meer LEDGF geprecipiteerd in de groep behandeld met Dnase.

Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat LEDGF onafhankelijk van DNA en RNA wordt geprecipiteerd door complexvorming met MeCP2. Er is een daling van de hoeveelheid LEDGF/p75 dat wordt geprecipiteerd in aanwezigheid van Mnase. Dit wil zeggen dat een deel van dit eiwit wordt neergeslagen door middel van een DNA-gemedieerde interactie tussen DNA, LEDGF/p75 en MeCP2. Een ander deel wordt geprecipiteerd door een eiwit-eiwitinteractie tussen LEDGF en MeCP2. De ratio verandert tussen de hoeveelheid gebonden LEDGF/p75 en LEDGF/p52 tussen beide groepen. Dit is een indicatie dat LEDGF/p75 meer affiniteit vertoont voor DNA en RNA dan LEDGF/p52. Om een betrouwbare conclusie te trekken moet dit experiment herhaald en gekwantificeerd worden om na te gaan of het verschil tussen de LEDGF isoformen en de nuclease behandeling significant is.

4.1.3 Verificatie van het LEDGF-MeCP2 complex via een pull down

De interactie tussen MeCP2 en LEDGF wordt op een derde manier via een pull down geverifieerd. Tijdens dit experiment wordt een recombinant proteïne toegevoegd aan het cellysaat van HEK293T cellen. Dit proteïne kan interageren met de endogene eiwitten aanwezig in het cellysaat. Er worden verschillende soorten recombinante proteïnen getest. Het eerste recombinant proteïne is het LEDGF/p52 eiwit gemerkt met een glutathion-S-transferase (GST). Dit wordt geprecipiteerd door middel van GST-beads. De twee andere recombinante proteïnen die worden getest zijn FLAG-LEDGF/p75 en FLAG-LEDGF/p52. Deze recombinante proteïnen worden geprecipiteerd met FLAG-beads. Na het scheiden van de stalen op een poly-acrylamidegel en blotten op een membraan worden MeCP2 (75kDa), GST-LEDGF/p52 (73kDa), FLAG-LEDGF/p75 (75kDa), FLAG-LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa) gevisualiseerd door middel van een indirecte detectie met verschillende antilichamen. De schematische voorstelling van het protocol wordt weergegeven in het addendum sectie 10.3.



Figuur 10: Pull down met recombinant GST-LEDGF/p52, FLAG-LEDGF/p75 en FLAG-LEDGF/p52. Dit zijn de resultaten van de pull down waarin drie verschillende recombinante proteïnen worden getest. De proteïnen zijn GST-LEDGF/p52, FLAG-LEDGF/p75 en FLAG-LEDGF/p52 die geprecipiteerd worden met respectievelijk GST-beads of FLAG-beads. De recombinante proteïnen werden toegevoegd aan het cellysaat (input) en MeCP2 wordt enkel geprecipiteerd in de stalen waaraan de FLAG gemerkte recombinante proteïnen worden toegevoegd. Als extra controleconditie wordt His-GST toegevoegd aan het cellysaat. De verschillende stalen worden gevisualiseerd voor MeCP2 (75kDa), GST-LEDGF/p52 (73kDa), FLAG-LEDGF/p75 (75kDa), FLAG-LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. Het LEDGF- en MeCP2-antilichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. Het GAPDH-antilichaam wordt in een 1:1000 verdunning gebruikt.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat de recombinante proteïnen het verwachte moleculair gewicht hebben (figuur 10). De recombinante proteïnen werden allemaal geprecipiteerd met de gepaste beads. De verschillende bandjes bij de input en het precipitaat van het GST-LEDGF/p52 staal wijzen op onzuiverheden in het recombinant proteïnestaal.

MeCP2 wordt endogeen tot expressie gebracht in HEK293T cellen en wordt enkel geprecipiteerd in de stalen waar recombinant FLAG-LEDGF/p75 en FLAG-LEDGF/p52 wordt toegevoegd (figuur 10).

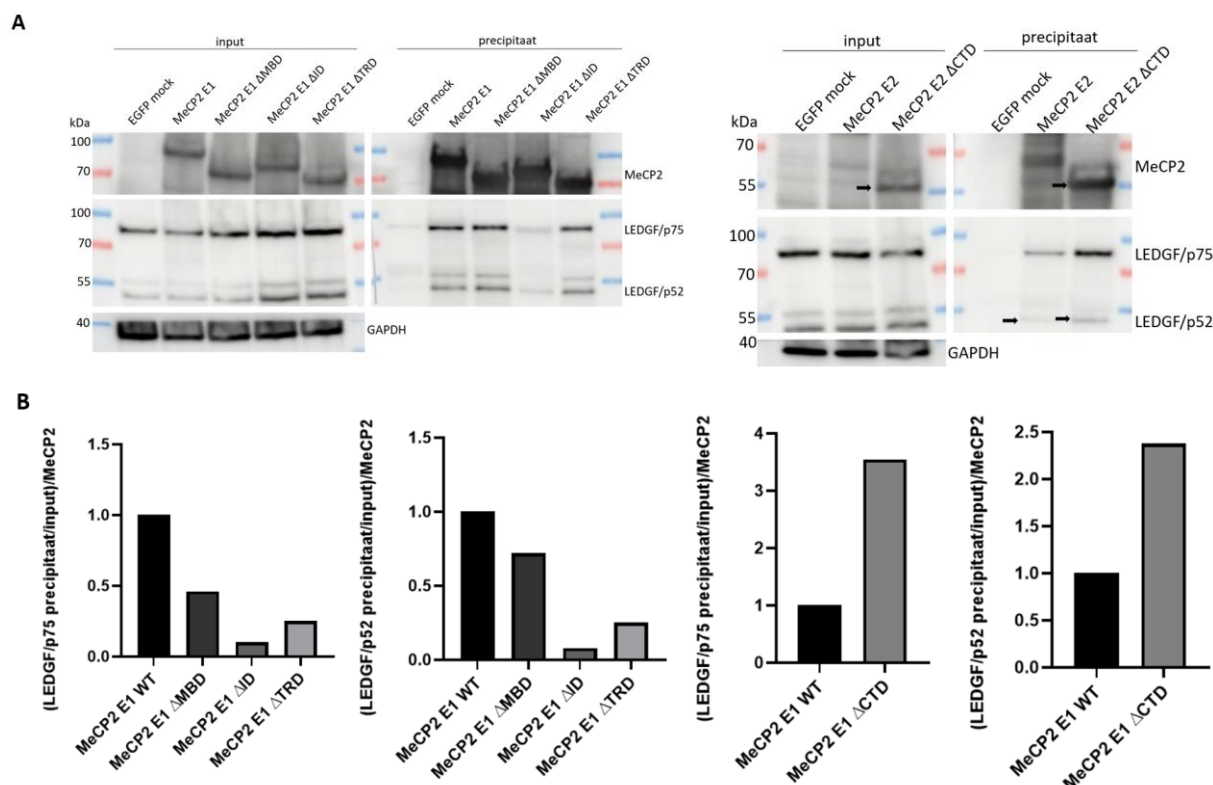
De conclusie die wordt getrokken uit het resultaat van dit experiment is dat LEDGF gemerkt met een FLAG-tag een eiwitcomplex vormt met MeCP2. GST-LEDGF/p52 interageert niet met MeCP2. Dit is mogelijks een vals negatief resultaat. Na het lyseren wordt aan elk cellysaat 8µg recombinant proteïne toegevoegd. Door de onzuiverheden in het GST-LEDGF/p52 staal wordt er veel minder recombinant proteïne toegevoegd. Dit heeft invloed op de hoeveelheid MeCP2 die kan worden geprecipiteerd met het aanwezige GST-LEDGF/p52. De hoeveelheid is mogelijks te laag om te detecteren via een western blot. Het experiment moet herhaald worden om een betrouwbare conclusie te kunnen nemen. Voorafgaand moet een nieuwe purificatie gebeuren van het recombinant proteïne zodat er minder onzuiverheden aanwezig zijn in het staal.

4.1.4 Identificatie van het MeCP2-domein dat interageert met LEDGF

De vorige experimenten bewijzen dat LEDGF een eiwitcomplex vormt met MeCP2. Zoals in sectie 1.2.1 wordt beschreven, bestaan beide isoformen van MeCP2 uit vijf grote domeinen. Deze domeinen zijn het NTD, MBD, ID, TRD en het CTD. Elk domein heeft een specifieke functie. Om een beter inzicht te krijgen in het LEDGF-MeCP2 eiwitcomplex, wordt onderzoek gevoerd naar welke domeinen van MeCP2 interageren met LEDGF. Dit wordt onderzocht aan de hand van een aantal co-IP's waarbij verschillende MeCP2 deletieconstructen worden gebruikt om de cellen te transfecteren. Op deze manier wordt het interactiedomein van MeCP2 verwijderd in één van de constructen waardoor LEDGF niet meer met MeCP2 kan interageren. Door telkens een ander domein te verwijderen, wordt het interactiedomein geïdentificeerd.

In het eerste experiment worden de cellen getransfecteerd met plasmiden die deletieconstructen van de MeCP2 E1 tot expressie brengen. Per deletieconstruct wordt telkens één domein van MeCP2 verwijderd. De resultaten van de deletieconstructen worden vergeleken met de het resultaat van het plasmide dat wild-type (WT) MeCP2 E1 tot expressie brengt. Het NTD-deletieconstruct is voor beide isoformen hetzelfde construct, want het enige verschil tussen de E1 en E2 isoform van MeCP2 is het NTD. De stalen worden gescheiden via een western blot. Op de blot worden MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa) gevisualiseerd door middel van een indirecte detectie met verschillende antilichamen. Het MeCP2-antilichaam dat standaard gebruikt wordt om het MeCP2- eiwit te visualiseren herkent een epitoom in het CTD-domein en kan dus niet gebruikt worden om het CTD-deletieconstruct van MeCP2 te visualiseren. Om dit mutant eiwit te visualiseren wordt het FLAG-antilichaam gebruikt die de FLAG-tag herkent. De schematische voorstelling van het experiment wordt weergegeven in het addendum sectie 10.1.

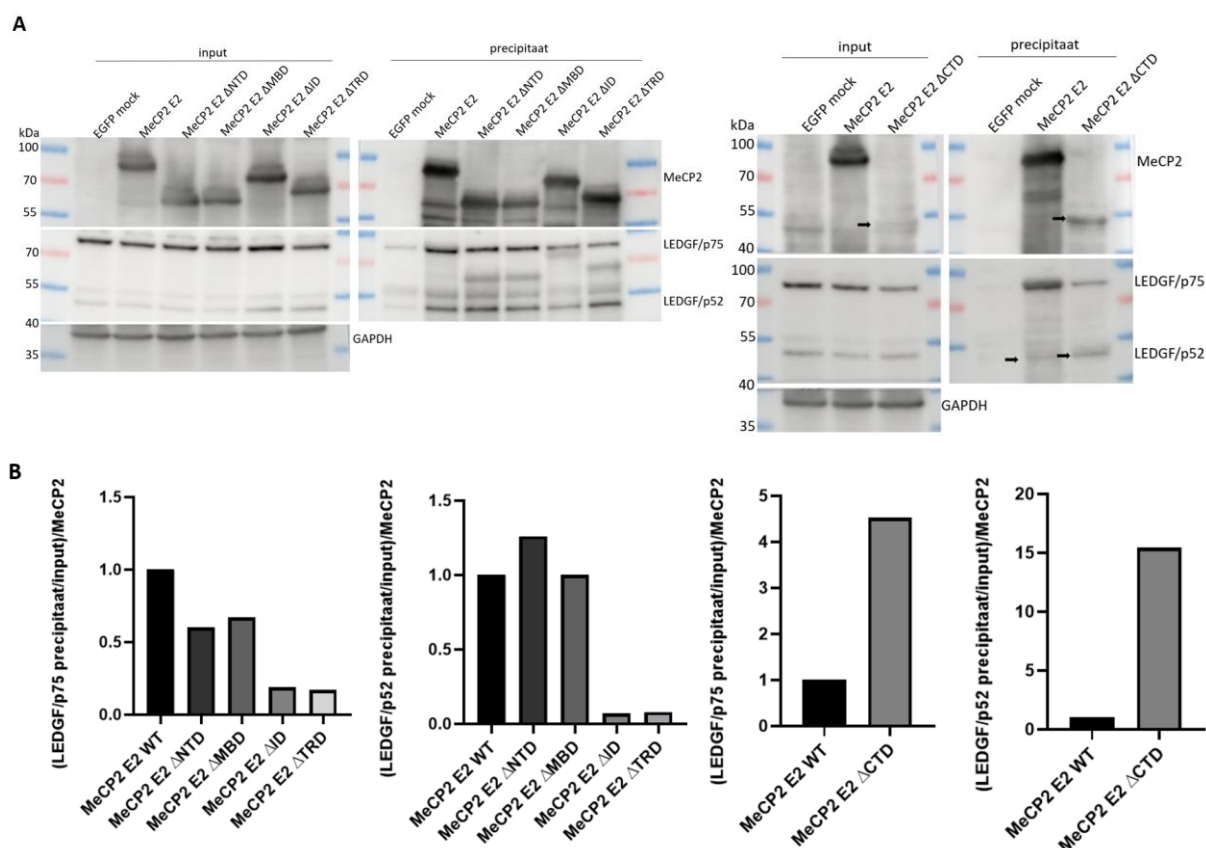
Doordat verschillende delen van het MeCP2-eiwit verwijderd worden, zal dit eiwit niet altijd ter hoogte van 75 kDa lopen op een western blot. Dit varieert tussen de 75 en 65kDa afhankelijk van de grootte van het domein dat wordt verwijderd. Het CTD-deletieconstruct heeft een grootte van ongeveer 55kDa. Om de hoeveelheid gebonden LEDGF tussen de verschillende deletieconstructen te vergelijken, worden de resultaten van de geprecipiteerde LEDGF isoformen gekwantificeerd en genormaliseerd ten opzichte van de input van LEDGF. Dit resultaat wordt vervolgens genormaliseerd ten opzichte van de hoeveelheid geprecipiteerd MeCP2. Deze resultaten worden vergeleken met de WT E1 isoform MeCP2.



Figuur 11: co-IP met de deletieconstructen van MeCP2 E1. (A) HEK293T cellen getransfecteerd met verschillende deletieconstructen van MeCP2 E1. MeCP2 E1 bestaat uit vijf verschillende domeinen. Dit zijn NTD, MBD, ID, TRD en CTD. Per deletieconstruct wordt telkens één domein van MeCP2 verwijderd. Het NTD-deletieconstruct wordt niet meegenomen in deze co-IP, maar bij de co-IP van de MeCP2 E2 deletieconstructen. Doordat verschillende delen worden verwijderd, loopt MeCP2 niet meer ter hoogte van 75kDa op de gel. De grootte varieert tussen de 75 en 65kDa afhankelijk van de lengte van het domein dat verwijderd wordt. Het CTD-deletieconstruct heeft een grootte van ongeveer 55kDa en wordt aangeduid met een zwarte pijl. De verschillende stalen worden gevisualiseerd voor LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. Het LEDGF-antilichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. De MeCP2- en MeCP2-antilichamen worden in een 1:1000 verdunning gebruikt. Het FLAG-antilichaam wordt in een 1:400 verdunning gebruikt. (B) Om de hoeveelheid gebonden LEDGF tussen de verschillende deletieconstructen te vergelijken worden de resultaten van de geprecipiteerde LEDGF isoformen gekwantificeerd en genormaliseerd ten opzichte van de input van LEDGF. Dit resultaat wordt vervolgens genormaliseerd ten opzichte van de hoeveelheid geprecipiteerd MeCP2. Deze resultaten worden vergeleken met de WT E1 isoform MeCP2.

In dit experiment geven de resultaten weer dat de transfectie van elke conditie gelukt is. De verschillende deletieconstructen komen tot expressie in de HEK293T cellen (figuur 11, panel A, input). De verschillende MeCP2-eiwitten worden allemaal geprecipiteerd door middel van FLAG-beads. LEDGF wordt endogeen tot expressie gebracht in HEK293T cellen en is dus aanwezig in het cellysaat (input) van elk staal (figuur 11, panel A). De LEDGF isoformen worden geprecipiteerd in de stalen getransfecteerd met constructen van MeCP2 E1. De hoeveelheid geprecipiteerd LEDGF/p75 bij MeCP2 E1 TRD- en ID- constructen ligt lager in vergelijking met MeCP2 E1 WT. De resultaten bij LEDGF/p52 zijn gelijkaardig aan de resultaten van LEDGF/p75 (figuur 11, panel B).

Mogelijks interageren de isoformen van MeCP2 op een andere manier met LEDGF. Om dit te onderzoeken wordt een gelijkaardige co-IP uitgevoerd zoals hierboven beschreven. In deze co-IP worden de verschillende deletieconstructen van het MeCP2 E2 gebruikt. Net als bij de E1 isoform bestaat de MeCP2 E2 uit vijf domeinen. Dit zijn het NTD, MBD, ID, TRD en CTD. De cellen worden getransfecteerd met verschillende plasmidenconstructen waar telkens één van de domeinen wordt verwijderd. De co-IP van de E2 deletieconstructen wordt analoog uitgevoerd als de co-IP van de E1 deletieconstructen. De schematische voorstelling van het protocol wordt weergegeven in het addendum sectie 10.1.



Figuur 12: co-IP met MeCP2 E2 deletieconstructen. (A) HEK293T cellen worden getransfecteerd met verschillende deletieconstructen van MeCP2 E2. MeCP2 E2 bestaat uit vijf verschillende domeinen. Dit zijn NTD, MBD, ID, TRD en CTD. Per deletieconstruct wordt telkens één domein van MeCP2 verwijderd. Doordat verschillende deletieconstructen worden gemaakt, loopt MeCP2 niet meer ter hoogte van 75kDa op de gel. De grootte varieert tussen de 75 en 65kDa afhankelijk van de lengte van het domein dat verwijderd wordt. Het CTD-deletieconstruct heeft een grootte van ongeveer 55kDa en wordt aangeduid met een zwart pijltje. De verschillende stalen worden ook gevisualiseerd voor LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. Het LEDGF-antilichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. De GAPDH- en MeCP2-antilichamen worden in een 1:1000 verdunning gebruikt. Het FLAG-antilichaam in een 1:400 verdunning. (B) De hoeveelheid gebonden LEDGF wordt vergeleken tussen de verschillende deletieconstructen door kwantificatie van de resultaten van de geprecipiteerde LEDGF isoformen. Dit wordt genormaliseerd ten opzichte van de input van LEDGF en het geprecipiteerde MeCP2. Deze resultaten worden vergeleken met de MeCP2 E2 wild type.

De resultaten tonen aan dat MeCP2 tot expressie komt in de getransfecteerde cellen (input) en de transfectie is dus geslaagd. Precipitatie van de varianten van MeCP2 is geslaagd door gebruik te maken van FLAG-beads (figuur 12, panel A). LEDGF wordt endogeen tot expressie gebracht in HEK293T cellen en is dus aanwezig in het cellysaat (input) van elk staal (figuur 12, panel A). De verschillende MeCP2 E2 deletieconstructen precipiteren beide isoformen van LEDGF. De intensiteit van de bandjes van LEDGF bij het TRD- en ID-deletieconstructen is lager ten opzichte van de rest (figuur 12, panel A). De kwantificatie toont aan dat de stalen getransfecteerd met TRD- en ID- deletieconstructen van MeCP2 E2 minder van beide LEDGF isoformen precipiteren in vergelijking met MeCP2 E2 WT (figuur 12, panel B).

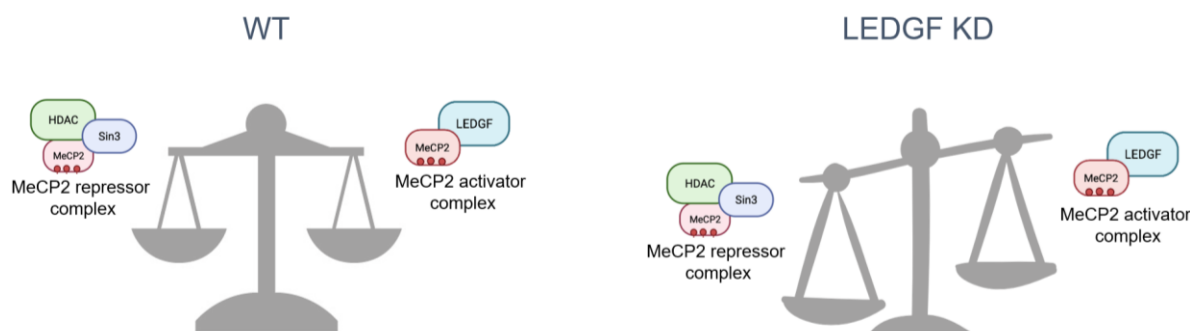
Uit de resultaten van het eerste experiment wordt geconcludeerd dat er minder LEDGF/p75 geprecipiteerd wordt bij een deletie van het TRD, maar ook van het ID (figuur 11, panel B). Dit is analoog voor LEDGF/p52. Deze domeinen spelen een rol in de interactie tussen LEDGF en MeCP2. In elke conditie wordt LEDGF nog geprecipiteerd en dus wordt het volledige bindingsdomein niet verwijderd in dit experiment. Om deze resultaten te bevestigen moet het experiment uitgevoerd worden met een nieuwe conditie waarbij de cellen worden getransfecteerd met een plasmideconstruct waar zowel het TRD als het ID uit verwijderd wordt.

Er wordt op basis van de resultaten van het tweede experiment geconcludeerd dat het TRD en ID een rol spelen in de complexvorming tussen de beide isoformen van LEDGF en MeCP2 E2. Er is een duidelijke daling in intensiteit van de bandjes van LEDGF te zien bij de stalen getransfecteerd met de TRD- en ID-deletieconstructen. De kwantificatie en normalisatie bevestigt deze conclusie. In deze condities wordt LEDGF nog altijd lichtjes geprecipiteerd, dit wil zeggen dat het exacte interactiedomein nog niet verwijderd wordt. Vermoedelijk ligt dit op de overgang tussen het ID en TRD. Om deze vermoedens te bevestigen, moet het experiment herhaald worden met een nieuwe conditie waarbij de cellen worden getransfecteerd met een plasmideconstruct waar zowel het TRD als het ID wordt uit verwijderd.

4.2 Functionele karakterisatie van het LEDGF-MeCP2 eiwitcomplex

Het tweede deel van dit project focust zich op de functionele karakterisatie van het LEDGF-MeCP2 eiwitcomplex. Aan de hand van een aantal experimenten wordt dit verder onderzocht. In de literatuur staat MeCP2 beschreven als een transcriptionele regulator. Het inhibeert de transcriptie als het een repressorcomplex vormt met de interactiepartners HDAC en Sin3a. Wetenschappelijk onderzoek toont aan dat MeCP2 ook een activeringscomplex kan vormen door te interageren met andere eiwitten zoals bijvoorbeeld CREB. Op basis van deze informatie wordt een hypothese opgesteld:

MeCP2 vormt een activeringscomplex als de interactiepartners LEDGF en andere co-activators zoals CREB zijn. In WT-cellen zijn beide complexen van MeCP2 in evenwicht aanwezig (figuur 13). In een LEDGF knock down (KD) cellijn wordt er minder LEDGF tot expressie gebracht waardoor er minder activeringscomplex gevormd wordt. Dit wordt gecompenseerd met het vormen van een repressorcomplex. Deze hypothese wordt onderzocht aan de hand van een aantal experimenten.



Figuur 13: Schematische voorstelling van de hypothese. MeCP2 komt in wild type cellen voor als een activerings- en een repressorcomplex. Dit hangt af van de interactiepartners van MeCP2. Als MeCP2 een eiwitcomplex vormt met HDAC en Sin3a vormt het een repressorcomplex en inhibeert het de transcriptie van verschillende genen. Een activeringscomplex wordt gevormd doordat MeCP2 affiniteit vertoont voor LEDGF en andere co-activators zoals CREB. Beide complexen zijn in wild type cellen in evenwicht aanwezig. Dit wil zeggen dat in een LEDGF KD cellijn minder activeringscomplex gevormd wordt doordat er minder LEDGF aanwezig is in deze cellen. Dit tekort wordt gecompenseerd door het vormen van meer repressorcomplex. Deze hypothese wordt onderzocht aan de hand van een aantal experimenten (figuur gemaakt door Saskia Lesire).

4.2.1 Co-immunoprecipitatie in LEDGF knock-out (KO) cellijnen

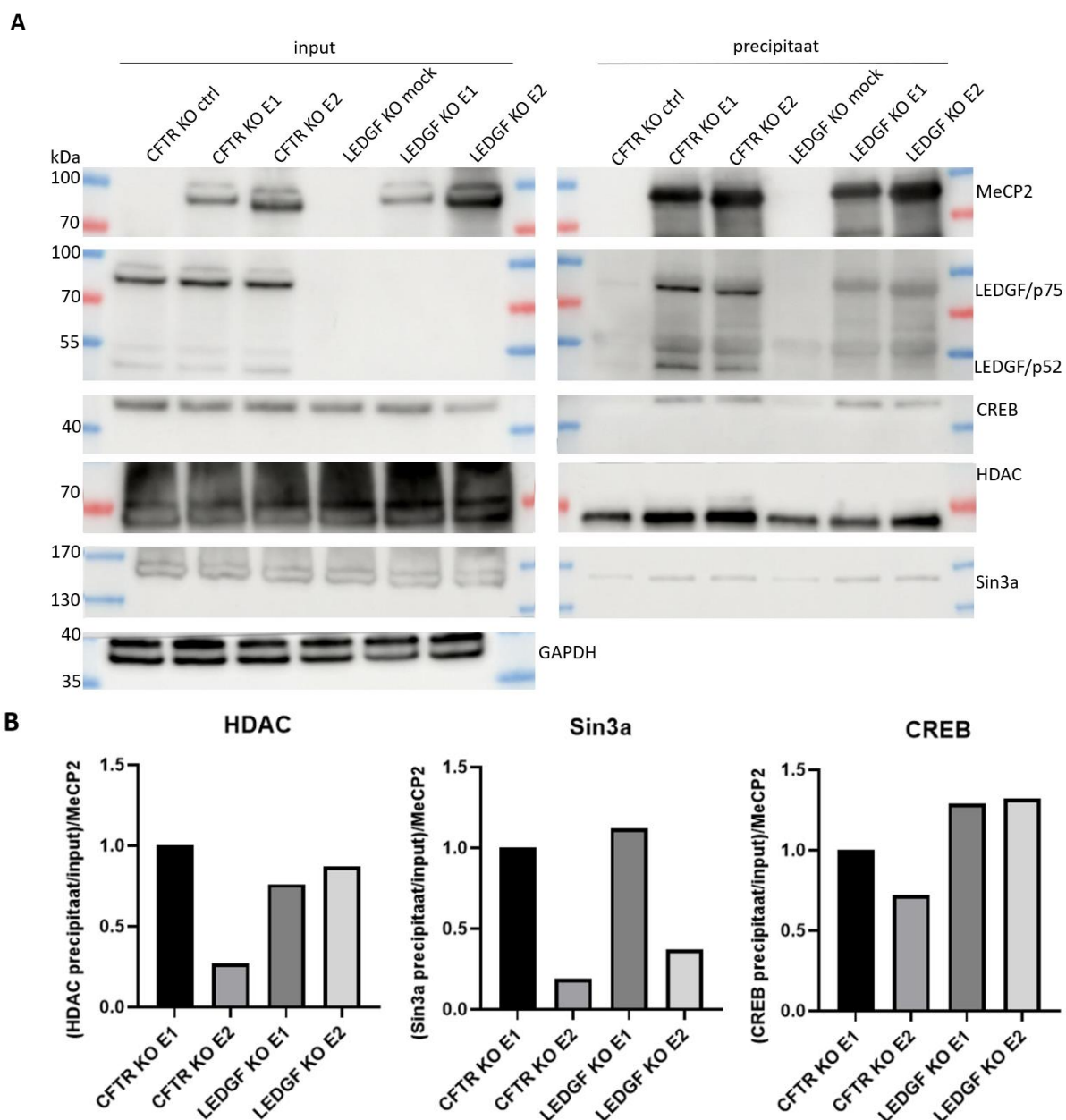
In eerste instantie wordt de hypothese onderzocht door een co-IP (zie sectie 3.3 voor het protocol) uit te voeren in verschillende cellijnen. Er wordt gebruik gemaakt van een cystisch fibrose transmembraangeleidingregelaar (CFTR) KO HEK293T cellijn en een LEDGF KO HEK293T cellijn. De CFTR KO cellijn is een controle. CFTR komt niet tot expressie in HEK293T cellen, dus knock-out van CFTR zou geen invloed mogen hebben op het interactiecomplexe van de cel en kan daarom dus als controle gebruikt worden. Zowel de CFTR KO als de LEDGF KO cellijn worden getransfecteerd met twee verschillende plasmidenconstructen die elk een isoform van MeCP2 tot expressie brengen. Na het precipiteren van FLAG-MeCP2 worden de verschillende stalen gescheiden op een polyacrylamidegel en geblot op een membraan. Hierop worden MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa), HDAC (60kDa), CREB (43kDa) en Sin3a

(150kDa) gevisualiseerd door middel van een indirecte detectie met verschillende antilichamen. De resultaten van de verschillende blots worden gekwantificeerd. Het precipitaat van HDAC, Sin3a en CREB wordt genormaliseerd ten opzichte van de input en dit resultaat wordt genormaliseerd ten opzichte van het precipitaat van MeCP2.

De transfectie van de plasmiden met verschillende isoformen van MeCP2 in de verschillende cellijnen is geslaagd. De verschillende isoformen komen tot expressie (input) en worden geprecipiteerd met FLAG-beads (figuur 14, panel A). In de controle cellijn komt LEDGF endogeen tot expressie en wordt ook geprecipiteerd. De co-IP is geslaagd. In de LEDGF KO cellijn wordt geen LEDGF gedetecteerd in het cellysaat, maar LEDGF wordt wel geprecipiteerd (figuur 14, panel A). De andere eiwitten die worden gevisualiseerd op de blot zijn de mogelijke interactiepartners van MeCP2. HDAC, Sin3a en CREB worden endogeen tot expressie gebracht in alle cellijnen. Bij visualisatie van HDAC en Sin3a input is er iets misgelopen. CREB en Sin3a worden enkel geprecipiteerd in de cellijnen getransfecteerd met een plasmideconstruct dat één van de isoformen van MeCP2 tot expressie brengt. HDAC wordt in alle cellijnen geprecipiteerd (figuur 14, panel A). De kwantificatie toont aan dat er geen betrouwbare daling of stijging is van de verschillende interactiepartners van MeCP2 in de LEDGF KO cellijn ten opzichte van de CFTR KO cellijn (figuur 14, panel B).

Uit de resultaten wordt besloten dat de gebruikte LEDGF KO cellijn geen effectieve knock-out is. Er kan nog altijd LEDGF worden geprecipiteerd in een eiwitcomplex met elk van de isoformen van MeCP2. Dit is dus een knockdown cellijn. Een tweede probleem dat wordt vastgesteld is dat HDAC wordt geprecipiteerd in alle condities. Er wordt minder in de controleconditie geprecipiteerd. Een oplossing om de specifieke interactie tussen de beads en HDAC te vermijden, is om MeCP2 te merken met een andere tag zodat dit kan worden geprecipiteerd met andere beads. Een derde probleem dat zich voordoet in dit experiment zijn de witte vlakken aanwezig in de bandjes van de input van Sin3a en HDAC. De oorzaak hiervan is mogelijk een te hoge concentratie van het eiwit in het lysaat waardoor het toestel de bandjes niet correct visualiseert. De bandjes liggen niet meer in de lineaire range van het gebruikte antilichaam waardoor een witte vlek in het bandje wordt gevisualiseerd. Dit experiment moet nogmaals herhaald worden waarbij er minder cellysaat (input) wordt geladen op de gel of het primair antilichaam meer verdund wordt.

Met de vooropgestelde hypothese in het achterhoofd wordt verwacht dat in de LEDGF KO cellijn de hoeveelheid geprecipiteerd CREB zal dalen omdat er minder activeringscomplex kan gevormd worden. De hoeveelheid geprecipiteerd Sin3a en HDAC zou volgens de hypothese stijgen. De resultaten van de western blot en de kwantificatie (figuur 14) spreken dit tegen. Dit is een eerste indicatie dat de hypothese niet correct zou zijn. Om een betrouwbare conclusie te kunnen nemen, moet dit herhaald worden met een andere LEDGF KO cellijn en andere plasmideconstructen waar MeCP2 met een andere tag tot expressie komt. Dit wordt geprecipiteerd met andere beads die geen specifieke interactie vertonen met HDAC.



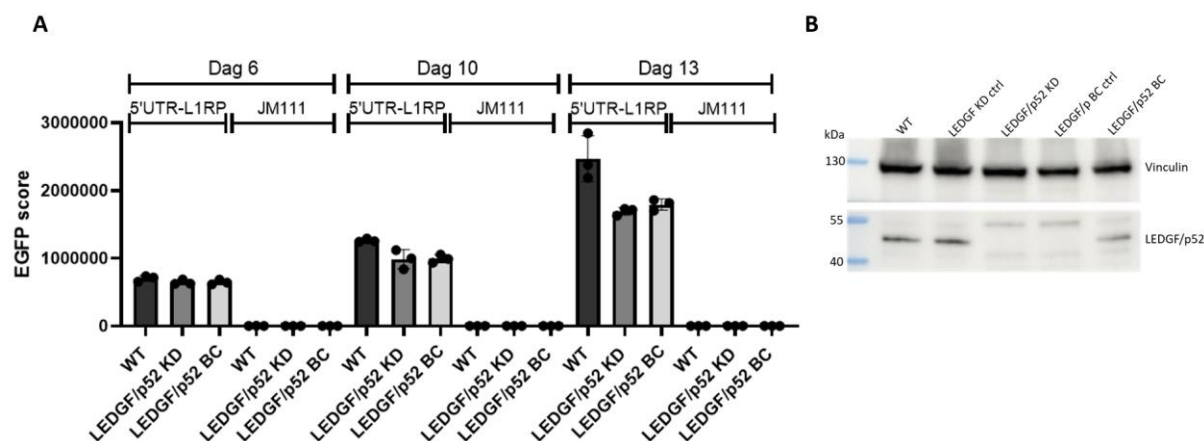
Figuur 14: co-IP in een CFTR KO en LEDGF KO cellijn. (A) De verschillende cellijnen worden getransfecteerd met plasmideconstructen die de isoformen van MeCP2 gemerkt met een FLAG-tag tot expressie brengen. De verschillende stalen worden gevisualiseerd voor MeCP2 (75kDa), LEDGF/p75 (75kDa), LEDGF/p52 (52kDa) en GAPDH (38kDa), HDAC (60kDa), CREB (43kDa) en Sin3a (150kDa). GAPDH is een huishoudgen en geeft de hoeveelheid geladen cellysaat weer. De transfectie en de precipitatie van de plasmiden met verschillende isoformen van MeCP2 in de verschillende cellijnen is geslaagd. De verschillende interactiepartners van MeCP2 worden in alle condities endogeen tot expressie gebracht. De mogelijke interactiepartners zijn LEDGF/p75, LEDGF/p52, CREB, HDAC en Sin3a. Beide isoformen van LEDGF, CREB en Sin3a worden geprecipiteerd in de stalen getransfecteerd met een plasmide dat één van de isoformen van MeCP2 tot expressie brengt. HDAC wordt in alle condities geprecipiteerd. Bij de visualisatie van de input van Sin3a en HDAC zijn er problemen. Er is een wit vlak in het midden van de bandjes aanwezig. Het LEDGF-antlichaam wordt in een 1:500 verdunning gebruikt. De Sin3a-, HDAC-, CREB- en MeCP2-antilichamen worden in een 1:1000 verdunning gebruikt. Het GAPDH-antlichaam wordt in een 1:2000 verdunning gebruikt. (B) De resultaten hiervan worden gekwantificeerd en genormaliseerd. De hoeveelheid geprecipiteerd HDAC, Sin3a en CREB wordt genormaliseerd ten opzichte van de input en dit resultaat wordt genormaliseerd ten opzichte van het precipitaat van MeCP2.

4.2.2 LINE-1 EGFP retrotranspositie test in LEDGF KD en rescue HEK293T cellen

4.2.2.1 Flowcytometrie

De LINE-1 EGFP retrotranspositie test (zie sectie 3.5 voor het protocol van deze techniek) is een techniek om de retrotranspositie kinetiek gedurende 13 dagen in verschillende cellijnen op te volgen. In de literatuur werd dit al in een MeCP2 KD cellijn onderzocht. In deze cellijn stijgt de hoeveelheid retrotranspositie ten opzichte van een WT-celijn (Muotri et al., 2010). Dit is een gevolg van de lagere hoeveelheid MeCP2, een inhibitor van retrotranspositie, die tot expressie wordt gebracht. In het labo van Prof. Dr. Debyser werden al een aantal LINE-1 EGFP retrotranspositie testen uitgevoerd. Deze experimenten tonen aan dat een LEDGF/p75 KD-celijn een reductie vertoont van de retrotranspositie. In een eerste experiment wordt onderzocht of dit effect specifiek is voor LEDGF/p75 of dit ook wordt waargenomen in een LEDGF/p52 KD-celijn.

In het eerste experiment wordt de retrotranspositie kinetiek in drie cellijnen opgevolgd. Dit zijn een wild type, een LEDGF/52 KD en een LEDGF/p52 backcomplement (BC) cellijn. De verschillende cellijnen worden getransfecteerd met het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide en het JM111 negatief controle plasmide. Op dag zes, tien en dertien wordt staal genomen van elke getransfecteerde cellijn. Deze resultaten worden geanalyseerd met de flowcytometer.



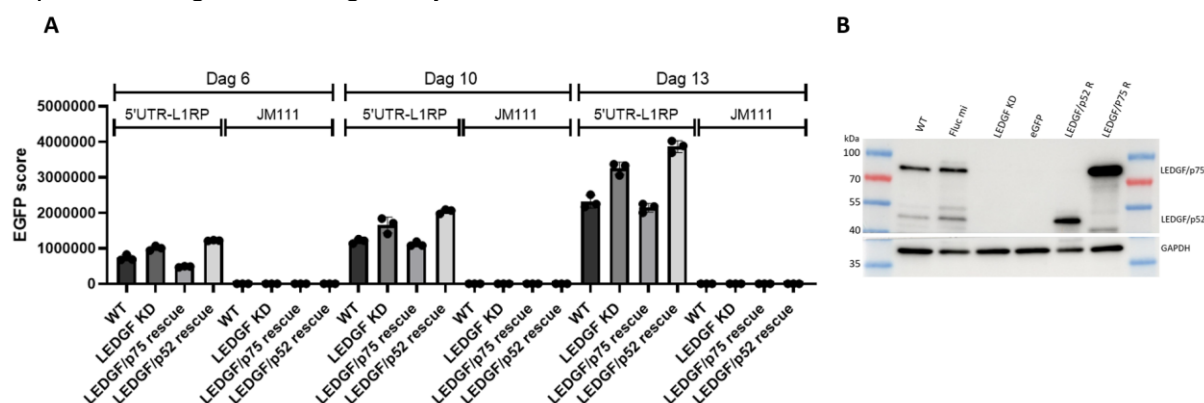
Figuur 15: LINE-1 EGFP retrotranspositie assay in LEDGF/p52 KD en LEDGF/p52 BC-celijnen. (A) Retrotranspositie wordt gedurende 13 dagen opgevolgd door op dag zes, tien en dertien staal te nemen. Wild type, een LEDGF/p52 KD en een LEDGF/p52 BC-celijn worden getransfecteerd met het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide en het JM111 negatief controle plasmide. De verschillende stalen worden geanalyseerd met een flowcytometer. Om de EGFP-score te bepalen, wordt het aantal positieve cellen vermenigvuldigd met het gemiddelde fluorescent signaal per cel. (B) Western blot voor de validatie van de verschillende gebruikte cellijnen. Het LEDGF-antilichaam wordt gebruikt in een 1:500 verdunning. Het GAPDH-antilichaam wordt gebruikt in een 1:1000 verdunning.

Hoe langer de cellijnen in cultuur worden gehouden, hoe meer retrotranspositie heeft plaatsgevonden (figuur 15). De resultaten van de experimenten wijzen op een positieve invloed van LEDGF op de retrotranspositie. Een knockdown van LEDGF/p52 heeft als gevolg dat de hoeveelheid retrotranspositie daalt ten opzichte van het wild type. Een backcomplement van deze LEDGF/p52 zorgt voor een lichte stijging van de hoeveelheid retrotranspositie ten opzichte van de LEDGF/p52 KD-celijn (figuur 15, panel A). De verschillende cellijnen worden gevalideerd door het cellysaat te analyseren via een western blot. Het herstel van de expressie van LEDGF/p52 in de LEDGF/p52 BC-celijn is niet volledig (figuur 15, panel B).

Uit het resultaat van dit experiment wordt besloten dat de retrotranspositie een kinetisch proces is dat minimaal 13 dagen lang plaatsvindt waarbij de retrotranspositie stijgt doorheen de tijd. Een KD van LEDGF/p52 zorgt voor minder retrotranspositie. Een herstel van deze isoform zorgt terug voor een stijging van retrotranspositie. De hoeveelheid retrotranspositie van LEDGF/p52 BC-celijn is lager in vergelijking met de WT-celijn, maar de western blot toont aan dat het herstel van expressie van LEDGF/p52 niet volledig is. De LEDGF/p52 BC-celijn

wordt meegenomen om na te gaan of het resultaat bekomen in de LEDGF/p52 KD-cel lijn een LEDGF/p52 specifiek resultaat is of het veroorzaakt wordt door een artefact van het miRNA waarmee de cellen getransduceerd worden. In eerdere experimenten uitgevoerd in het labo van Prof. Dr. Debyser werden analoge resultaten bekomen voor de LEDGF/p75 isoform. Deze resultaten bevestigen de hypothese dat beide isoformen van LEDGF een effect hebben op LINE-1 retrotranspositie.

Er wordt een tweede experiment opgezet om de eerder bekomen resultaten te valideren. In dit experiment worden vier verschillende cellijnen gedurende dertien dagen opgevolgd. Dit zijn een wild type, een LEDGF KD van beide isoformen, een LEDGF/p75 rescue en een LEDGF/p52 rescue cellijn. Het experiment wordt op een analoge manier als het eerste experiment uitgevoerd en geanalyseerd.



Figuur 16: LINE-1 EGFP retrotranspositie assay in LEDGF KD en rescue cellijnen. (A) Retrotranspositie wordt gedurende 13 dagen opgevolgd door op dag zes, tien en dertien staal te nemen. Wild type, een LEDGF KD van beide isoformen, een LEDGF/p75 rescue en een LEDGF/p52 rescue-cel lijn worden getransfecteerd met het L1^{RP}-EGFP reporter plasmide en het JM111 negatief controle plasmide. De verschillende stalen worden geanalyseerd met een flowcytometer. Om de EGFP-score te bepalen, wordt het aantal positieve cellen vermenigvuldigd met het gemiddelde fluorescent signaal per cel. (B) Western blot voor de validatie van de verschillende gebruikte cellijnen. Het LEDGF-antilichaam wordt gebruikt in een 1:500 verdunning. Het GAPDH-antilichaam wordt gebruikt in een 1:1000 verdunning.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat een knockdown van LEDGF voor meer EGFP-sig naal zorgt en er dus meer retrotranspositie aanwezig is (figuur 16, panel A). Een herstel van de knockdown met LEDGF/p75 zorgt voor een daling van retrotranspositie naar de vergelijkbare hoeveelheid in de wild type cel lijn. Een herstel met LEDGF/p52 zorgt daarentegen voor het nog meer doorlopen van de retrotranspositiecyclus in vergelijking met het wild type (figuur 16, panel A). De verschillende cellijnen worden gevalideerd door het cellysaat te analyseren via een western blot (figuur 16, panel B).

Het patroon in de hoeveelheid retrotranspositie per dag is eerder onverwachts bij dit experiment. Een LEDGF-knockdown zou volgens de hypothese een inhiberend effect moeten hebben op de retrotranspositie. Dit is het tegenovergestelde van het resultaat van dit experiment. Een herstel met één van beide isoformen zou de retrotranspositie hoeveelheid naar hetzelfde niveau als dat van het wild type moeten brengen. Dit is het geval bij een herstel met LEDGF/p75 maar niet met een herstel van LEDGF/p52. Zowel een KD van de beide isoformen van LEDGF en een rescue met LEDGF/p52 geven een stijging in retrotranspositie.

Het analyseren van de stalen met de flowcytometer heeft enkele limitaties. Tijdens het doorlopen van de retrotranspositiecyclus moet het intron in de EGFP-cassette correct worden verwijderd worden via splicing. Bovendien moet na het omzetten van het mRNA, het cDNA in de correcte richting worden geïntegreerd in het genoom. De cel bevat verschillende beschermingsmechanismen tegen retrotransposons. Dit is bijvoorbeeld 5' truncatie waardoor het mogelijk is dat er maar een fragment van EGFP geïntegreerd wordt in plaats van de volledige EGFP-sequentie. Alle transposons die niet aan bovenstaande vereisten voldoen,

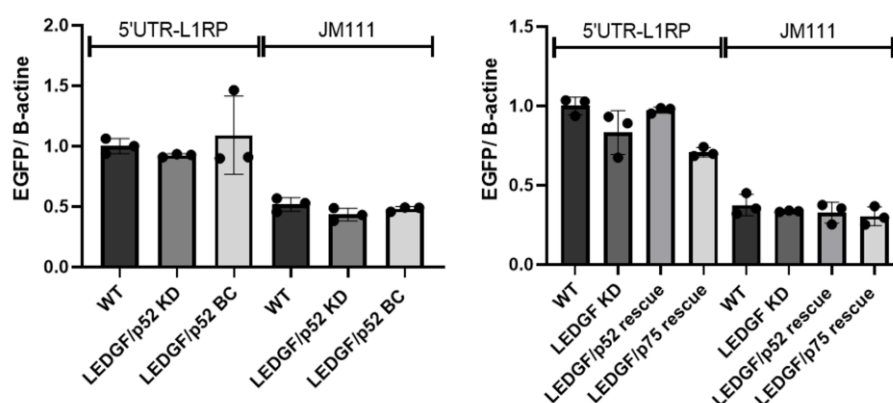
brengen geen actief EGFP tot expressie en worden dus niet gedetecteerd via de flowcytometer. De transcriptie van EGFP is ook afhankelijk van een CMV promotor. De resultaten van de flowcytometer hangen dus ook af van de transcriptie van EGFP. Dit kan een verklaring zijn voor de onverwachte resultaten.

4.2.3 Real time PCR (qPCR)

Om nieuwe retrotranspositie evenementen afkomstig van het L1_{RP}-EGFP reporter plasmide te detecteren wordt qPCR gebruikt. Via real time PCR wordt de relatieve hoeveelheid geïntegreerde LINE-1 EGFP kopieën bepaald. Hierbij worden ook de kopieën die geen actief EGFP tot expressie brengen geïncubeerd. Er werden primers ontwikkeld tegen de EGFP-cassette die enkel worden geamplificeerd als het intron wordt verwijderd (Del Re et al., 2010). Op dag dertien van de LINE-1 EGFP retrotranspositie assay worden van de verschillende stalen pellets gemaakt waaruit het genomisch DNA wordt geëxtraheerd. Na de extractie volgt een qPCR waarbij EGFP wordt geamplificeerd, alsook β -actine voor normalisatie.

In het eerste experiment wordt een LEDGF/p52 KD-celijn gebruikt. De verminderde expressie van LEDGF/p52 zorgt voor een lichte vermindering in retrotranspositie ten opzichte van het wild type. Dit verschil wordt terug hersteld in de LEDGF/p52 BC-celijn. De resultaten van het tweede experiment tonen aan dat een knockdown van LEDGF een lichte vermindering geeft op de hoeveelheid retrotranspositie op dag 13. Deze vermindering wordt terug hersteld met LEDGF/p52 isoform, maar niet met de LEDGF/p75 isoform (figuur 17).

Er worden enkele verschillen geobserveerd tussen de resultaten van de qPCR en de resultaten van de flowcytometer. Het grootste verschil is te zien bij de LEDGF KD (van beide isoformen) celijn. Uit dit experiment wordt besloten dat LEDGF een activerend effect heeft op de LINE-1. De andere effecten tussen de verschillende cellijnen op de retrotranspositie zijn veel kleiner in vergelijking met de resultaten van de flowcytometer. Dit wil zeggen dat er heel veel niet-actieve transposon elementen worden geïntegreerd in het genoom. Of elementen waar er iets fout gaat in de expressie van EGFP. Het minimaal effect op de retrotranspositie tussen de verschillende cellijnen wordt mogelijks veroorzaakt door een te hoge transfectie efficiëntie. Meerdere identieke plasmiden worden mogelijks in één cel getransfecteerd. Dit zou kunnen zorgen voor een stijging van de retrotranspositie waardoor bepaalde effecten worden gemaskeerd. Dit kan opgelost worden door te werken met een lagere transfectie efficiëntie waarbij elke cel met maximaal één plasmide getransfecteerd wordt. Een andere oplossing om het effect tussen de verschillende cellijnen te vergroten is om de cellen in een vroeger stadium te analyseren met qPCR.



Figuur 17: Bepaling van de geïntegreerde kopijen in verschillende getransfecteerde cellijnen. Getransfecteerde cellen van de LINE-1 EGFP retrotranspositie experimenten worden op dag 13 gepelleerd en hieruit wordt genomisch DNA geëxtraheerd. Dit DNA wordt met twee verschillende primersets geanalyseerd. De eerste primerset amplificeert de EGFP-sequentie. De tweede primerset amplificeert het β -actine gen en wordt gebruikt om de EGFP-amplificatie te normaliseren. De cellijnen die worden geanalyseerd in het eerste experiment zijn een wild type, een LEDGF KD, een LEDGF/p75 rescue, een LEDGF/p52 rescue cellijn en een LEDGF/p52 backcomplement (BC) cellijn. In de LEDGF KD cellijn worden beide isoformen van LEDGF uitgeschakeld.

4.2.4 Functionele karakteristatie met behulp van de LINE-1 Fluc assay

Een laatste techniek die gebruikt wordt om de functie van het LEDGF-MECP2 eiwitcomplex te onderzoeken is de LINE-1 Fluc assay (zie sectie 3.6 voor het protocol van deze techniek). Dit plasmide bevat de sequentie van een LINE-1 retrotransposon gefusioneerd met een Fluc-expressiecassette die onderbroken wordt door een intron. Enkel na het doorlopen van de retrotranspositiecyclus wordt Fluc tot expressie gebracht. Dit signaal wordt gemeten via een Fluc-assay. In dit experiment worden verschillende cellijnen getransfecteerd met drie verschillende plasmiden. Het eerste plasmide is het pXY014 plasmide. Het LINE-1 element in dit plasmide staat onder controle van een LINE-1 promotor. Dit is de positieve controle in dit experiment.

Het tweede plasmide dat gebruikt wordt, is het pXY015. Dit plasmide is gelijkaardig aan het pXY014 plasmide. Het enige verschil tussen beide plasmiden is dat het negatieve controle plasmide twee puntmutaties bevat waardoor het de transpositiecyclus niet kan doorlopen. Het laatste plasmide is een plasmideconstruct dat LINE-1 gefusioneerd met een EGFP-expressiecassette onder invloed van een CAG-promotor tot expressie brengt (pXY017). Eerdere experimenten uitgevoerd in het labo van Prof. Dr. Debyser tonen aan dat de CAG-promotor een MeCP2-afhankelijke promotor is. In dit experiment wordt enerzijds onderzocht of dit construct hetzelfde patroon in expressie vertoont in de verschillende cellijnen als het pXY014 plasmide. Anderzijds wordt ook onderzocht of de LINE-1 Fluc assay een representatief verkort alternatief is voor de LINE-1 EGFP retrotranspositie assay.

4.2.4.1 Optimalisatie van de LINE-1 Fluc test

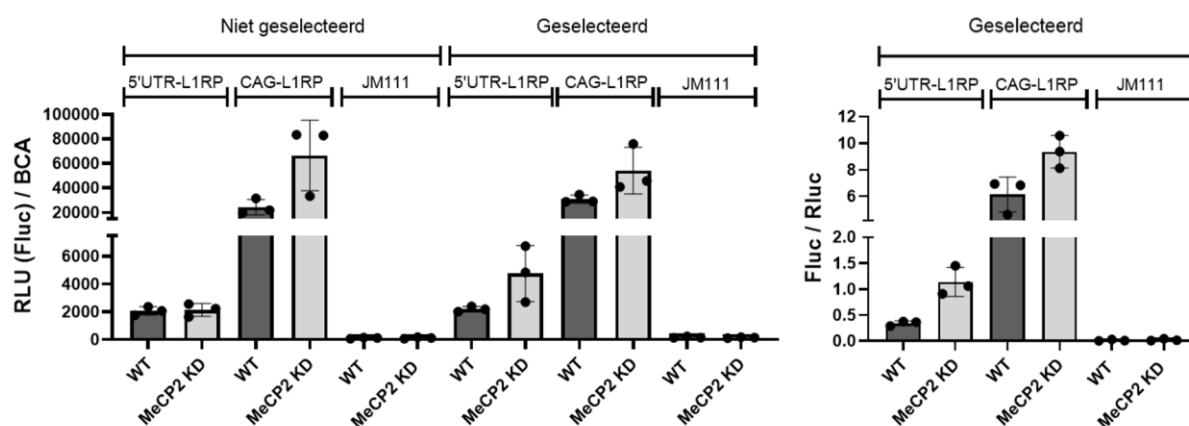
Vooraleer de cellijnen worden getest, moet deze test worden geoptimaliseerd. In het optimalisatie experiment worden twee verschillende cellijnen uitgezaaid. Dit zijn een wild type en een MeCP2 KD cellijn. Er worden verschillende parameters geoptimaliseerd. De eerste variabele is selectie na transfectie. Het selectiemedium zorgt voor een extra stressfactor voor de cellen waardoor deze sneller sterven. In dit experiment wordt onderzocht of door het niet selecteren van de cellen, het effect van MeCP2 KD nog wordt waargenomen of het wordt gemaskeerd door de niet-getransfecteerde cellen. De tweede variabele die wordt geoptimaliseerd is de normalisatiemethode. Er kan genormaliseerd worden op basis van de totale hoeveelheid proteïne door middel van het uitvoeren van een BCA of er wordt genormaliseerd ten opzichte van de transfectie-efficiëntie. Hiervoor wordt de Dual-Glo® Luciferase Assay System kit gebruikt.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat selectie van de getransfecteerde cellen zorgt voor een duidelijk verschil in retrotranspositie onder invloed van de LINE-1 promotor tussen wild type (WT) en MeCP2 KD cellijnen (figuur 18). De tweede variabele die wordt getest in dit experiment is de normalisatiemethode. De optimalisatie hiervan toont aan dat dezelfde conclusies worden getrokken uit de resultaten bij beide methoden (figuur 18). Na transfectie wordt een stijging in retrotranspositie en dus van het Fluc-sigitaal verwacht bij de MeCP2 KD cellijn, want MeCP2 is een repressor van retrotranspositie. Dit verschil tussen de wild type en de MeCP2 KD cellijn is enkel waar te nemen bij geselecteerde cellen (figuur 18). Er wordt besloten dat selectie na transfectie noodzakelijk is om een betrouwbare resultaten te verkrijgen. Het niet selecteren van de cellen maskeert het effect van de MeCP2 KD cellijn op de retrotranspositie.

De tweede variabele is de normalisatiemethode. Uit de resultaten van dit experiment wordt besloten dat de manier van normalisatie geen invloed heeft op de interpretatie van de resultaten. In toekomstige experimenten zal normalisatie gebeuren via een BCA-assay omdat dit goedkoper is dan gebruik te maken van een Fluc/Rluc assay.

Als laatste is dit experiment een extra validatie van het effect van MeCP2 op de retrotranspositie dat eerder werd waargenomen in de LINE-1 EGFP retrotranspositie assay in het labo van Prof. Dr. Debyser. In de Fluc assay wordt ook een stijging in retrotranspositie

waargenomen als MeCP2 minder tot expressie komt. Dit effect wordt zowel gezien bij het LINE-1 element onder invloed van de LINE-1 promotor en onder invloed van de CAG-promoter. Dit wil zeggen dat beide promotoren MeCP2 afhankelijk zijn. Dit komt overeen met de eerder bekomen resultaten.



Figuur 18: Optimalisatie van de LINE-1 Fluc test. De cellijnen die worden getransfecteerd met de LINE-1 Fluc plasmiden zijn een wild type (WT) en een MeCP2 KD. Het pXY014 plasmide bevat het L1RP-gen onder invloed van de endogene LINE-1 promotor gefusioneerd met de Fluc reporter cassette (5'UTR-L1RP). Het pXY015 plasmide bevat het L1RP-gen met twee puntmutaties gefusioneerd met de Fluc reporter cassette onder invloed van de endogene LINE-1 promotor (JM111). Het pXY017 plasmide bevat het L1RP-gen onder invloed van de CAG-promotor gefusioneerd met de Fluc reporter cassette (5'CAG-L1RP). De getransfecteerde cellen werden wel of niet geselecteerd met puromycine. Daarnaast worden de getransfecteerde cellen op twee verschillende manieren genormaliseerd. Ofwel worden de resultaten genormaliseerd via een BCA of met behulp van de Rluc kit. Beide methoden geven dezelfde resultaten.

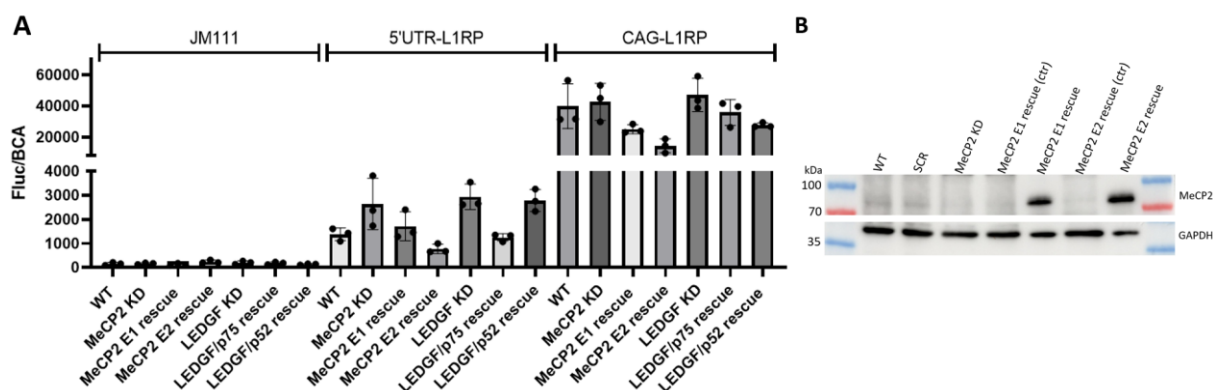
4.2.4.2 LINE-1 test met verschillende cellijnen

Na optimalisatie van de test, wordt de retrotranspositie in verschillende cellijnen onderzocht aan de hand van het geoptimaliseerd protocol. De cellijnen die worden getest zijn een wild type cellijn en een MeCP2 KD cellijn. De MeCP2 KD cellijn heeft een verlaagde expressie van MeCP2. Twee andere cellijnen die worden getest zijn rescue cellijnen. Er wordt vertrokken vanuit een MeCP2 KD cellijn en hierin wordt telkens één van de isoformen terug tot expressie gebracht. Deze cellijnen zijn een controle dat het effect dat waargenomen wordt in de MeCP2 KD cellijn niet veroorzaakt wordt door een artefact tijdens het transduceren van de cellen met het miRNA. Parallel wordt voor LEDGF hetzelfde experiment opgezet. De gebruikte cellijnen zijn een LEDGF KD, een LEDGF/p75 rescue en een LEDGF/p52 rescue cellijn. Alle cellijnen worden met de drie bovenvermelde plasmiden (pXY014, pXY015 en pXY017) getransfecteerd.

De resultaten van dit experiment worden opgedeeld in het effect van de verschillende cellijnen op de retrotranspositie onder invloed van de LINE-1 promotor en onder invloed van de CAG-promotor. MeCP2 KD zorgt voor een stijging in retrotranspositie van het LINE-1 element onder invloed van een LINE-1 promotor. Als de knockdown hersteld wordt met één van de isoformen van MeCP2 daalt de hoeveelheid retrotranspositie (figuur 19). Een LEDGF KD zorgt voor een stijging in de hoeveelheid retrotranspositie ten opzichte van het wild type. Deze stijging wordt deels hersteld als de knockdown wordt hersteld met één van de isoformen van LEDGF. De resultaten van het effect op de retrotranspositie onder invloed van de CAG-promotor in de verschillende cellijnen is gelijkaardig aan dat van het element onder invloed van de LINE-1 promotor. De verschillende cellijnen worden gevalideerd door het cellysaat te analyseren via een western blot (figuur 19 en 16, panel B).

Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat de transpositie onder controle van de CAG-promotor veel sterker is dan onder controle van een LINE-1 promotor, maar het effect van de retrotranspositie tussen de verschillende cellijnen is hetzelfde bij het onderzochte plasmide als bij de positieve controle. Door de grote variabiliteit van de replicaten is het effect van de MeCP2 knock down op de retrotranspositie minder groot dan eerder geobserveerd een LINE-1 EGFP

retrotranspositie assay. In het algemeen is er in dit experiment heel veel variabiliteit waardoor de resultaten minder betrouwbaar worden. Er wordt ook een daling verwacht in retrotranspositie hoeveelheid in een LEDGF KD cellijn en deze zou terug moeten worden hersteld in een LEDGF rescue cellijn zoals wordt waargenomen in de LINE-1 EGFP assay. Dit is niet het geval. Dit is een indicatie dat deze assay geen representatief resultaat weergeeft voor de invloed van LEDGF op de retrotranspositie op korte termijn.



Figuur 19: LINE-1 Fluc assay met verschillende cellijnen. (A) Dit experiment wordt uitgevoerd volgens het geoptimaliseerd protocol. De cellijnen die gebruikt worden zijn een wild type (WT), een MeCP2 KD, een MeCP2 E1 rescue, een MeCP2 E2 rescue, een LEDGF KD, een LEDGF/p75 rescue en een LEDGF/p52 rescue cellijn. Alle cellijnen worden met drie plasmiden getransfecteerd. Dit zijn pXY014 plasmide (positieve controle), het pXY015 plasmide (negatief controle) en een plasmideconstruct dat een transposon gefusioneerd met Fluc-expressiecassette onder invloed van een CAG-promotor tot expressie brengt (pXY017). Dit is het onderzochte plasmide. (B) Voor de validatie van elke cellijn wordt het 30µg cellysaat behalve van de MeCP2 E1 rescue en MeCP2 E2 rescue cellijnen wordt er 5µg op de western blot geladen. Dit wordt gevisualiseerd voor MeCP2 met een MeCP2-antilichaam. Dit antilichaam en het GAPDH-antilichaam worden gebruikt in een 1:1000 verdunning. De validatie van de LEDGF-cellijnen wordt weergegeven op figuur 16.

5 Besluit

Transpositie is een fenomeen waarbij DNA springt via een DNA- of RNA-tussenproduct naar een andere plaats in het genoom. Via een retrotranspositiecyclus verplaatsen LINE-1 elementen zich door het vormen van een RNA-tussenproduct naar een andere locatie in het genoom. De eerste stap van de cyclus bestaat uit de transcriptie van het element. De transcriptie wordt onder andere gereguleerd door het MeCP2 eiwit. Volgens de literatuur bevindt MeCP2 zich in een complex met HDAC en Sin3a en het wordt beschreven als een inhibitor van de transcriptie. Eerder wetenschappelijk onderzoek toont aan dat MeCP2 ook een complex kan vormen met LEDGF (Leoh et al., 2012). LEDGF en MeCP2 hebben elk twee isoformen, respectievelijk LEDGF/p75, LEDGF/p52 en MeCP2 E1, MeCP2 E2. In het eerste deel van deze bachelorproef wordt de interactie tussen de verschillende isoformen van LEDGF en MeCP2 verder gekarakteriseerd.

In eerste instantie wordt het vormen van een MeCP2-LEDGF eiwitcomplex bevestigd aan de hand van een co-IP in HEK293T cellen, die MeCP2 en LEDGF endogeen tot expressie brengen. Via een co-immunoprecipitatie wordt aangetoond dat beide isoformen van LEDGF een complex vormen met MeCP2. Dit wordt verder bevestigd via een immunoprecipitatie van LEDGF waarbij MeCP2 wordt ge-co-precipiteerd. Via een pull-down wordt verder bevestigd dat recombinant LEDGF endogeen MeCP2 kan binden. De resultaten van beide experimenten bevestigen dat LEDGF en MeCP2 interactiepartners zijn.

De bindingsaffiniteit tussen de verschillende MeCP2 en LEDGF isoformen wordt ook bepaald. De resultaten tonen aan dat LEDGF/p52 een grotere bindingsaffiniteit heeft voor de beide isoformen van MeCP2.

Verder wordt onderzocht welk domein van MeCP2 E1 en MeCP2 E2 interageert met LEDGF. De resultaten van deze experimenten tonen aan het TRD- en ID-domein van MeCP2 E1 en MeCP2 E2 een rol spelen in de interactie. Beide deleties vertonen wel nog een lichte interactie met de isoformen van LEDGF. Dit doet vermoeden dat het interactiedomein van MeCP2 voor LEDGF op de overgang van het ID en TRD ligt. De volgende stap is het maken van een nieuw deletieconstruct waarbij zowel het TRD als ID worden verwijderd.

In het tweede deel van deze bachelorproef wordt er gefocust op de functionele karakterisatie van het LEDGF-MeCP2 complex. Op basis van informatie uit de literatuur wordt volgende hypothese opgesteld: MeCP2 vormt een activeringscomplex als de interactiepartners LEDGF en andere co-activators zoals CREB zijn. In WT-cellen zijn beide complexen van MeCP2 in evenwicht aanwezig. In een LEDGF KD cellijn wordt er minder LEDGF tot expressie gebracht waardoor er minder activeringscomplex gevormd wordt. Dit wordt gecompenseerd met het vormen van een repressorcomplex. Deze hypothese wordt onderzocht aan de hand van een aantal experimenten.

Het eerste experiment is een co-IP uitgevoerd in een LEDGF KO cellijn. In deze cellijn worden de verschillende mogelijke interactiepartners van MeCP2 gevisualiseerd en gekwantificeerd. De resultaten van dit experiment spreken de hypothese tegen. In de LEDGF KO cellijn wordt er volgens de hypothese meer repressorcomplex gevormd. Na het precipiteren moet er dus meer Sin3a en HDAC in de LEDGF KO aanwezig zijn ten opzichte van de controle. Dit is niet het geval. Dit is een indicatie dat de hypothese niet correct is

De tweede techniek die de functie van het LEDGF-MeCP2 complex op LINE-1 retrotranspositie onderzoekt is de LINE-1 EGFP assay. In dit experiment wordt de retrotranspositie in verschillende cellijnen gedurende dertien dagen opgevolgd. De resultaten van dit experiment spreken de hypothese voor een deel tegen, maar het analyseren van de stalen met de flowcytometer heeft limitaties. Om een gevoeliger resultaat te krijgen wordt het aantal interne kopijen bepaald met qPCR. Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat een

knockdown van LEDGF (beide isoformen) of enkel LEDGF/p52 zorgt voor een daling in retrotranspositie. Dit effect wordt terug deels hersteld als één van de isoformen terug tot expressie wordt gebracht. De effecten tussen de verschillende cellijnen zijn minimaal waardoor het experiment geoptimaliseerd en herhaald moet worden.

De laatste techniek die gebruikt wordt om de moleculaire functie te karakteriseren is de LINE-1 Fluc assay. In deze techniek wordt de retrotranspositie na vier dagen onderzocht in verschillende cellijnen. Tijdens dit experiment wordt de invloed van het LEDGF-MeCP2 complex op de LINE-1 promotor en de CAG-promotor onderzocht. Eerder wetenschappelijk onderzoek uitgevoerd in het labo van Prof. Dr. Debyser toonde aan dat de CAG-promotor een MeCP2 afhankelijke promotor is. Volgens de hypothese zou deze promotor dus ook hetzelfde effect op de retrotranspositie moeten vertonen in de verschillende cellijnen als de LINE-1 promotor. Een vermindering in LEDGF-expressie zou een daling in retrotranspositie onder controle van de LINE-1 promotor vertonen. Herstel van de expressie van één van de LEDGF isoformen zorgt voor een stijging in de retrotranspositie. De resultaten van het effect op de retrotranspositie onder invloed van de CAG-promotor in de verschillende cellijnen is gelijkaardig aan dat van het element onder invloed van de LINE-1 promotor, maar komt niet overeen met de resultaten voor de verschillende LEDGF-cellijnen van de LINE-1 EGFP retrotranspositie assay. Dit is een indicatie dat deze geen representatief resultaat geeft voor de invloed van LEDGF op de retrotranspositie op korte termijn.

LINE-1 retrotranspositie is een complex proces dat wordt gereguleerd door een aantal verschillende factoren. Uit de resultaten van deze bachelorproef wordt besloten dat MeCP2 en LEDGF een eiwitcomplex vormen waarbij MeCP2 via het TRD- en ID-domein interageert met LEDGF. De effecten waargenomen in de co-IP, LINE-1 EGFP retrotranspositie assay en LINE-1 Fluc assay tonen aan dat de vooropgestelde hypothese niet volledig correct is en de realiteit complexer is dan initieel gedacht. Er is nog heel wat wetenschappelijk onderzoek en optimalisatie van verschillende experimenten nodig om de functie van het LEDGF-MeCP2 complex te karakteriseren. Als dit in kaart wordt gebracht, kan dit als basis dienen om specifieke aandoeningen en mechanismen beter te begrijpen en te behandelen.

6 Publiceerbaar artikel

Springend DNA veroorzaakt kanker en de ziekte van Alzheimer

De ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en kanker zijn aandoeningen die niet onbekend in de oren klinken. Vroeg of laat worden we er rechtstreeks of onrechtstreeks mee geconfronteerd. Een vriend, familielid of geliefde wordt gediagnosticeerd met één van deze aandoeningen. Verschrikkelijk nieuws dat niemand wordt toegewenst. Wetenschap en geneeskunde zijn de afgelopen jaren erg geëvolueerd, maar desondanks zijn er voor veel aandoeningen enkel symptomatische geneesmiddelen beschikbaar. Vaak is dit omdat de oorzaak van de aandoening nog niet volledig gekend is. Dit is onder andere het geval bij de ziekte van Alzheimer en de ziekte van Parkinson. Wetenschappelijk onderzoek speelt hierin een cruciale rol. Experimenten in het labo zorgen voor een beter inzicht van het ziekteverloop waardoor geneesmiddelen worden ontwikkeld deze ziekten te behandelen.

Vaak is een fout in ons DNA de oorzaak van het ontstaan van een aandoening. DNA is de drager van ons erfelijk materiaal. Ons DNA bevindt zich in de kern van onze cellen en bepaalt wie je bent en hoe je eruitziet. Sommige DNA-fragmenten hebben het vermogen om via een kopieer- en plakmechanisme zich te verplaatsen naar een ander locatie op de DNA-streng. Deze fragmenten worden ook wel springende genen genoemd. Vergelijk het met een boek waarbij een pagina wordt gekopieerd en op een willekeurige plaats terug in het boek wordt geplakt. Gebeurt dit te veel dan is het verhaal in het boek niet meer duidelijk. Dit is ook het geval voor deze springende DNA-fragmenten. Dit proces moet onder controle worden gehouden en mag niet te veel optreden, anders kan dit zorgen voor het ontwikkelen van verschillende aandoeningen. Onderzoek toont aan dat springende genen een rol spelen in de ontwikkeling van de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en verschillende kankers. Springende genen worden met een wetenschappelijke term retrotransposons genoemd.

Het kopieer- en plak- mechanisme van deze retrotransposons is reeds (grotendeels) in kaart gebracht, maar de verschillende factoren die dit proces beïnvloeden zijn voor een groot deel onbekend terrein. De onderzoekers van het labo voor Moleculaire Virologie en Gentherapie in Leuven onder leiding van Prof. Dr. Debyser focussen zich op het identificeren van deze verschillende factoren. Zo is na het uitvoeren van meerdere experimenten ontdekt dat twee eiwitten een complex vormen dat invloed heeft op het retrotranspositie proces. Deze eiwitten zijn LEDGF en MeCP2.

Deze studie focust zich op dit eiwitcomplex en bestaat uit twee grote delen. Enerzijds wordt de interactie tussen de eiwitten onderzocht om het complex beter te begrijpen. Anderzijds wordt de invloed van het eiwitcomplex op de springende genen onderzocht. De studie legt geen directe link met de aandoeningen, maar dient als basis om later verschillende ziektebeelden beter te begrijpen. In een volgende fase kan onderzoek gevoerd worden naar nieuwe behandelingen en geneesmiddelen zodat wanneer een vriend, familielid, geliefde of jezelf geconfronteerd wordt met het verschrikkelijk nieuws, de toekomst er hoopvoller kan uitzien.

Literatuurlijst

- Ayarpadikannan, S., & Kim, H.-S. (2014). The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. *Genomics & Informatics*, 12(3), 98. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.3.98>
- Basu, A., Rojas, H., Banerjee, H., Cabrera, I. B., Perez, K. Y., de León, M., & Casiano, C. A. (2012). Expression of the Stress Response Oncoprotein LEDGF/p75 in Human Cancer: A Study of 21 Tumor Types. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030132>
- Bianciardi, L., Fichera, M., Failla, P., Di Marco, C., Grozeva, D., Mencarelli, M. A., Spiga, O., Mari, F., Meloni, I., Raymond, L., Renieri, A., Romano, C., & Ariani, F. (2015). MECP2 missense mutations outside the canonical MBD and TRD domains in males with intellectual disability. *Journal of Human Genetics*, 61(2), 95–101. <https://doi.org/10.1038/JHG.2015.118>
- Bin Akhtar, G., Buist, M., & Rastegar, M. (2022). MeCP2 and transcriptional control of eukaryotic gene expression. *European Journal of Cell Biology*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2022.151237>
- Blaudin de Thé, F., Rekaik, H., Peze-Heidsieck, E., Massiani-Beaudoin, O., Joshi, R. L., Fuchs, J., & Prochiantz, A. (2018). Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *The EMBO Journal*, 37(15). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201797374>
- Chahrour, M., Sung, Y. J., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T. C., Qin, J., & Zoghbi, H. Y. (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*, 320(5880), 1224–1229. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1153252/SUPPL_FILE/CHAHROUR_SOM.PDF
- Claveria-Gimeno, R., Lanuza, P. M., Morales-Chueca, I., Jorge-Torres, O. C., Vega, S., Abian, O., Esteller, M., & Velazquez-Campoy, A. (2017a). The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site OPEN. <https://doi.org/10.1038/srep41635>
- Claveria-Gimeno, R., Lanuza, P. M., Morales-Chueca, I., Jorge-Torres, O. C., Vega, S., Abian, O., Esteller, M., & Velazquez-Campoy, A. (2017b). The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep41635>
- CREB1 cAMP responsive element binding protein 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.* (n.d.). Retrieved March 26, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1385>
- Della Ragione, F., Vacca, M., Fioriniello, S., & Pepe, G. (n.d.). *MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture.* <https://doi.org/10.1093/bfgp/elw023>
- Eickbush, T. H. (2001). Retrotransposons. *Encyclopedia of Genetics*, 1699–1701. <https://doi.org/10.1006/RWGN.2001.1111>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (n.d.). *The Lentiviral Integrase Binding Protein LEDGF/p75 and HIV-1 Replication.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000046>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Publishing Group.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- Gao, D., Jiang, N., Wing, R. A., Jiang, J., & Jackson, S. A. (2015). Transposons play an important role in the evolution and diversification of centromeres among closely related species. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR), 216. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00216/ABSTRACT>
- Havecker, E. R., Gao, X., & Voytas, D. F. (2004). The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, 5(6), 1–6. <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-6-225/FIGURES/3>

- HIV Replication Cycle* | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (n.d.). Retrieved March 13, 2023, from <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
- Idica, A., Sevrioukov, E. A., Zisoulis, D. G., Hamdorf, M., Daugaard, I., Kadandale, P., & Pedersen, I. M. (2017). MicroRNA miR-128 represses LINE-1 (L1) retrotransposition by down-regulating the nuclear import factor TNPO1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(50), 20494–20508. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.807677>
- Leoh, L. S., Van Heertum, B., De Rijck, J., Filippova, M., Rios-Colon, L., Basu, A., Martinez, S. R., Tungteakkhun, S. S., Filippov, V., Christ, F., De Leon, M., Debysers, Z., & Casiano, C. A. (2012). The Stress Oncoprotein LEDGF/p75 Interacts with the Methyl CpG Binding Protein MeCP2 and Influences its Transcriptional Activity. *Molecular Cancer Research*, 10(3), 378. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0314>
- Li, H., Yamagata, T., Mori, M., Yasuhara, A., & Momoi, M. Y. (2005). Mutation analysis of methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients. *Brain and Development*, 27(5), 321–325. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINDEV.2004.08.003>
- Li, R., Dong, Q., Yuan, X., Zeng, X., Gao, Y., Chiao, C., Li, H., Zhao, X., Keles, S., Wang, Z., & Chang, Q. (2016). Misregulation of Alternative Splicing in a Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS Genetics*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006129>
- Liyanage, V. R. B., & Rastegar, M. (n.d.). *Rett Syndrome and MeCP2*. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8295-9>
- Muñoz-López, M., & García-Pérez, J. L. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 11, 115–128.
- Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C. N., Deng, W., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2005). *Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition*. <https://doi.org/10.1038/nature03663>
- Muotri, A. R., Marchetto, M. C. N., Coufal, N. G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., & Gage, F. H. (2010). *L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2*. <https://doi.org/10.1038/nature09544>
- Nan, X., Cross, S., & Bird, A. (1998). Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Foundation Symposium*, 214. <https://doi.org/10.1002/9780470515501.CH2>
- Oliver, J. L., Carpena, P., Román-Roldán, R., Mata-Balaguer, T., Mejías-Romero, A., Hackenberg, M., & Bernaola-Galván, P. (2002). Isochore chromosome maps of the human genome. *Gene*, 300(1–2), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01034-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01034-X)
- Olson, C. O., Zachariah, R. M., Ezeonwuka, C. D., Liyanage, V. R. B., & Rastegar, M. (2014). Brain Region-Specific Expression of MeCP2 Isoforms Correlates with DNA Methylation within Mecp2 Regulatory Elements. *PLoS ONE*, 9(3), 90645. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090645>
- Ostertag, E. M., Luning Prak, E. T., DeBerardinis, R. J., Moran, J. V., & Kazazian, H. H. (2000). Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Research*, 28(6), 1418–1423. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.6.1418>
- Re, B. Del, Marcantonio, P., Capri, M., & Giorgi, G. (2010). *Evaluation of LINE-1 mobility in neuroblastoma cells by in vitro retrotransposition reporter assay: FACS analysis can detect only the tip of the iceberg of the inserted L1 elements*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.06.024>
- Saleh, A., Macia, A., & Muotri, A. R. (2019). Transposable elements, inflammation, and neurological disease. *Frontiers in Neurology*, 10(AUG), 894. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00894/BIBTEX>
- Transposons* | Learn Science at Scitable. (n.d.). Retrieved March 9, 2023, from <https://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518/>

Addendum

7 Samenstelling buffers

7.1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

7.1.1 Doel

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) wordt gebruikt om cellen in cultuur te houden. Het foetaal bovine kalfserum wordt toegevoegd aan het medium als extra voedingstof voor de cellen zodat deze beter zouden groeien. Gentamicine is een antibioticum dat wordt toegevoegd aan het medium om bacteriële contaminatie tegen te gaan. Afhankelijk van de gebruikte cellijn wordt een extra antibioticum toegevoegd om getransduceerde of getransfecteerde cellen te selecteren.

7.1.2 Materiaal en methoden

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	500ml	Fisher scientific	31966047
Gentamicine (50mg/ml)	50µg/ml	Fisher scientific	15750045
Foetaal bovine kalfserum	2% 5% 10%	Gibco	A4766801
Puromycine (10mg/µl)	1µg/ml	Fisher scientific	Ant – pr -1
Blasticidine (10mg/µl)	5µg/ml	Invivogen	Ant – bl-1
Zeocine	100µg/ml	Invivogen	Ant-zn-5b
Hygromycine	1,6mg/µl	Invivogen	Ant-hg-1

Voeg de correcte hoeveelheden gentamicine en eventueel andere selectieantibiotica aan de DMEM medium fles toe. Aan het medium van de WT-cellen wordt geen selectieantibioticum toegevoegd. De LEDGF/p52 KD en LEDGF KD cellen worden geselecteerd met zeocine. LEDGF/p52 BC, LEDGF/p75 rescue, LEDGF/p52 rescue en MeCP2 E1 rescue cellen worden geselecteerd door aan het medium blasticidine en zeocine toe te voegen. MeCP2 KD cellen worden geselecteerd met een medium dat blasticidine bevat en het selectiemedium van de MeCP2 E2 rescue cellen bevat hygromycine en blasticidine. Afhankelijk waarvoor het medium gebruikt wordt, wordt een andere concentratie FCS toegevoegd. De eindconcentratie van het serum in het medium is 2, 5 of 10%.

7.2 Fosfaat buffer zoutoplossing (PBS)

7.2.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt in verschillende experimenten. Het is de basis van verschillende andere buffers.

7.2.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Dulbecco's fosfaatbuffer zoutoplossing	200ml	Bio-rad	10026938
Absolute ethanol	200ml	Fisher chemical	E/0650DF/15
Gedemineraliseerd water	600ml	/	/

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat een homogene oplossing gevormd wordt.

7.3 Proteïne ladingsbuffer (LB)

7.3.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt als ladingsbuffer bij het lopen van een proteïnegel. De glycerol zorgt voor het zwaarder worden van het staal. De SDS plaatst negatieve ladingen op de eiwitten zodat deze naar de positieve pool migreren en de dithiothreitol denatureert de eiwitten door de disulfidebruggen te verbreken.

7.3.2 Materiaal en methoden

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	160mM	Sigma – Aldrich	1002683945
SDS (sodium dodecyl sulfaat)	2%	Acros Organics	419531000
DTT (dithiothreitol)	200mM	Thermo scientific	J15397-06
Glycerol	40%	VWR chemicals	24388.295
Broomfenolblauw	Een tipje	Sigma Aldrich	B7021

Meng alle componenten samen en breng op pH 7.4.

7.4 Transfer buffer

7.4.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt na het lopen van een natriumdodecylsulfaat poly-acrylamide gelelektroforese om de gescheiden eiwitten te blotten op een nitrocellulosemembraan. Dit gebeurt via een semi-natte blotting.

7.4.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Trans-Blot Turbo	200ml	Bio-rad	10026938
Absolute ethanol	200ml	Fisher chemical	E/0650DF/15
Gedemineraliseerd water	600ml	/	/

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt op 4°C.

7.5 PBS-T

7.5.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt tijdens het wassen van de blot na het uitvoeren van een western blot.

7.5.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
PBS (1x)	2 l	/	/
Tergitol	2ml	Thermo scientific	4642525500

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt.

7.6 Polyethyleenimine (PEI)

7.6.1 Doel

PEI wordt gebruikt in co-immunoprecipitaties als transfectiereagens.

7.6.2 Materiaal en methoden

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
PEI	10 μ M	Sigma Aldrich	9002-98-6
Gedemineraliseerd water	500ml	/	/

Voeg alle componenten samen en filter steriliseer de suspensie.

7.7 Radioimmunoprecipitatie assay buffer (RIPA)

7.7.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt tijdens de lysis stap in de precipitatie en co-immunoprecipitatie experimenten.

7.7.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	5,91g	Sigma – Aldrich	1002683945
NaCl	2,192g	Sigma – Aldrich	1003376855
Natrium deoxycholate	1,25g	Sigma – Aldrich	102578789
SDS (sodium dodecyl sulfaat)	0,25g	Acros Organics	419531000
Ipegal (=NP-40)	2,5 ml	Fluka Analytical	101178328

Weeg alles af en los alles op in 200ml gedemineraliseerd water op 4°C. Breng de suspensie op pH 8. Leng daarna de oplossing aan tot een totaalvolume van 250 ml.

7.8 Trisbuffer zoutoplossing (TBS)

7.8.1 Doel

Deze buffer dient als een was- en oplossingsmiddel voor de FLAG- en GST-beads.

7.8.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	60mM	Sigma – Aldrich	002683945
NaCl	150mM	Sigma – Aldrich	1003376855
Gedemineraliseerd water	600ml	/	/

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt. Breng de oplossing op een pH van 7,4 op 4°C.

7.9 Tween-20 trisbuffer zoutoplossing (TBS-T)

7.9.1 Doel

Deze buffer dient als een was- en oplossingsmiddel voor de magnetische beads.

7.9.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	50mM	Sigma – Aldrich	002683945
NaCl	150mM	Sigma – Aldrich	1003376855

Tween-20	0,5%	PanReac AppliChem	A4974.0100
Gedemineraliseerd water	600ml	/	/

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt. Breng de oplossing op een pH van 7,4 op 4°C.

7.10 Natriumdodecylsulfaat buffer (SDS-buffer)

7.10.1 Doel

Dit is de buffer die gebruikt wordt als elutieoplossing voor het elueren van de eiwitten van de magnetische beads.

7.10.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	160mM	Sigma – Aldrich	002683945
SDS	2%	Acros Organics	419531000

Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt. Breng de oplossing op een pH van 6,8.

7.11 Lysis buffer

7.11.1 Doel

Deze buffer wordt gebruikt om cellen te lyseren in het LINE-1 Fluc experiment.

7.11.2 Materiaal en methode

Component	Hoeveelheid	Firma	Catalogus nummer
Tris – HCl	50mM	Sigma – Aldrich	1002683945
NaCl	200mM	Sigma – Aldrich	1003376855
NP- 40	0.2%	Fluka Analytical	101178328
Glycerol	10%	VWR chemicals	24388.295

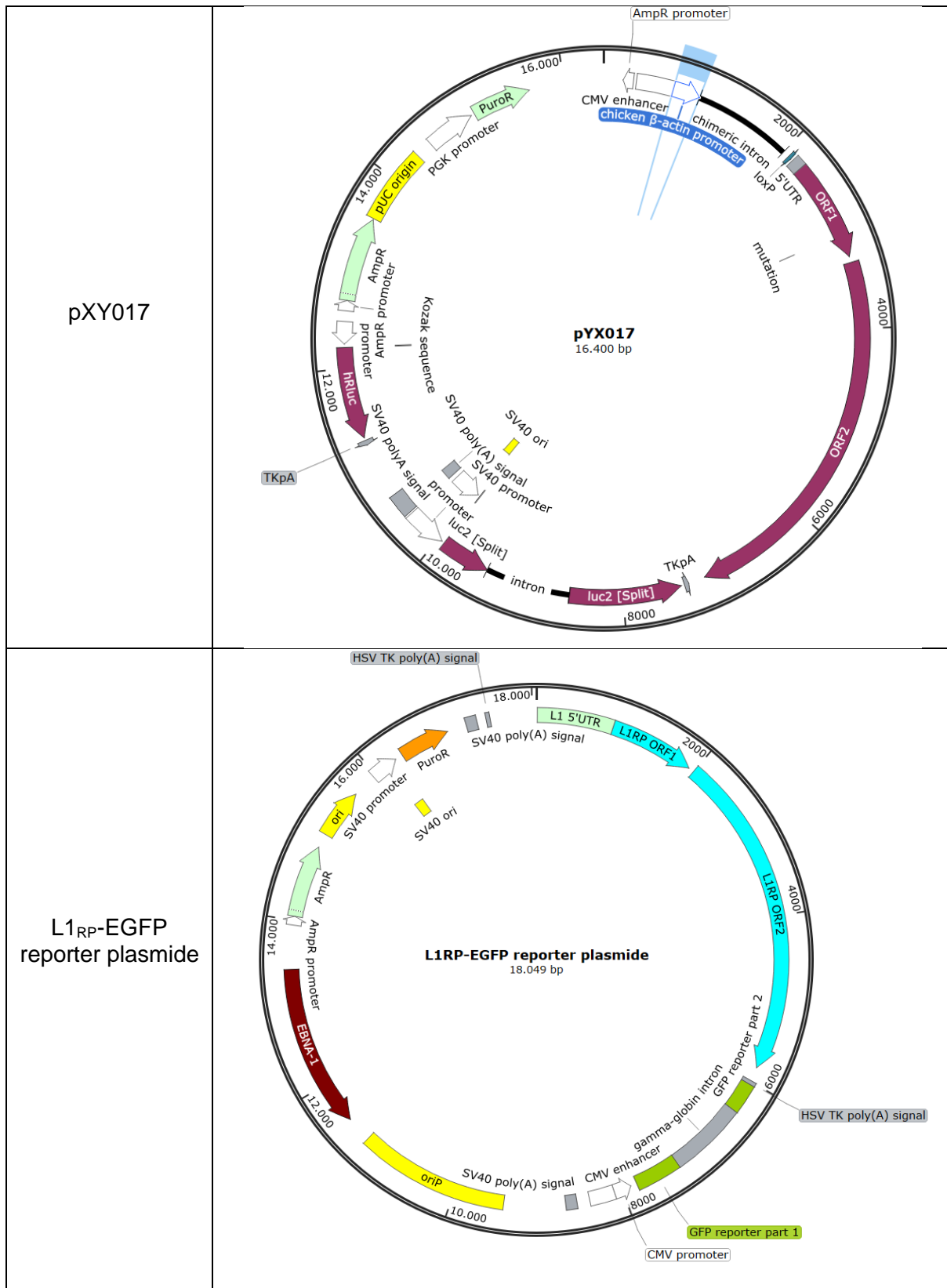
Voeg alle componenten samen en plaats dit op een magnetische roerder zodat alles goed gemengd wordt en filter steriliseer.

8 Productinformatie van de verschillende componenten

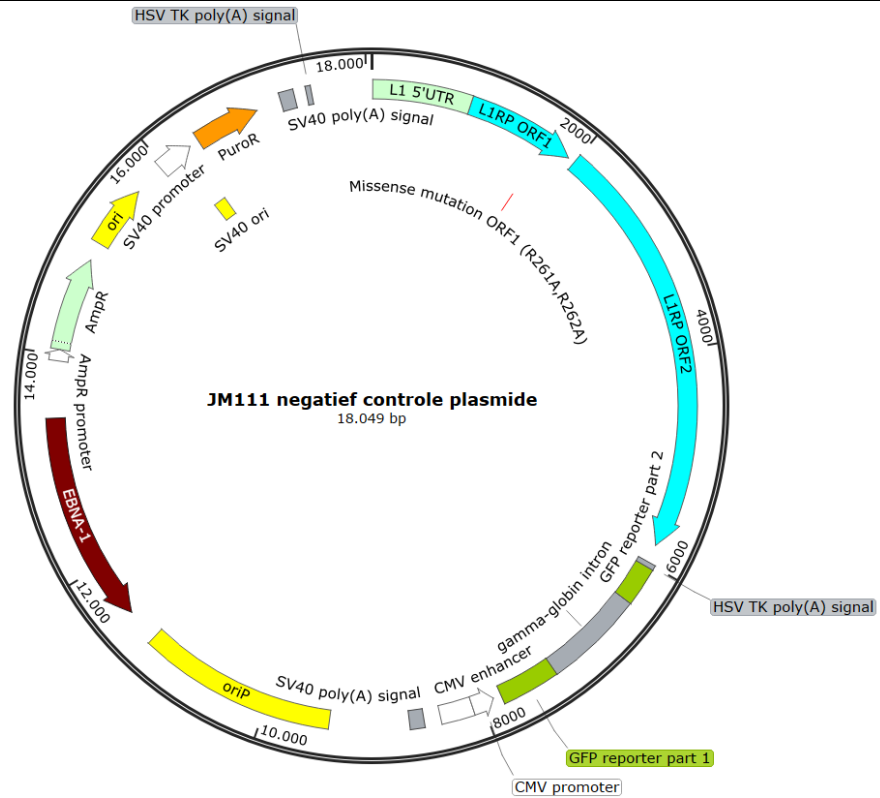
Product	Firma	Catalogusnummer
Anti-HA magnetische beads	MedChemExpress	MY-K0201
Clarity Western ECL substrate	Bio-rad	170-5061
DMEM	Fisher scientific	31966047
DNA mini kit	QIAamp	51304
Dnase I recombinant, Rnase free	Sigma Aldrich	04716728001
Dual-Glo® kit	Promega	E2920
FBS	Gibco	A4766801
Flag beads	Sigma Aldrich	1003118790
GAPDH-antilichaam	Abcam	Ab9485
Gentamicine (50mg/ml)	Fisher scientific	15750045
goat anti rabbit antilichaam	Aligent	P0448
GST beads	Thermo scientific	16101
LEDGF-antilichaam	Invitrogen	MA5-15795
Lipofectamine transfectie kit	Fisher scientific	L3000008
MeCP2 - antilichaam	Cell Signaling	34565
Melkpoeder	Régelait	/
One glow substraat	Promega	E26120
Opti-MEM	Fisher scientific	51985042
Pageruler proteïne ladder	Thermo scientific	26616
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich	HT-501128-4L
Pierce BCA protein assay kit	Fisher scientific	23225
Poly-D-lysine	Sigma Aldrich	32160801
Ponceau kleuring	Sigma Aldrich	6226-79-5
Protease inhibitor	Merck life science BV	11873580001
Puromycine	Fisher scientific	Ant-pr-1
Tris glycine (4/15%) gel	Bio-rad	5671084
Tris glycine SDS buffer	Novex life technologies	LC2675
Trypaanblauw	Sigma Aldrich	72-57-1
Trypsine	Fisher scientific	25200056
SYBR-Green PCR mastermix	Applied Biosystems	4309155

9 Plasmidenmappen

Plasmide	Plasmidemap
pXY014	<p>pXY014 15.104 bp</p> <p>5'UTR, ORF1 (2000), ORF2 (4000), TKpA (6000), intron, luc2 [Split] (8000), SV40 polyA signal promoter, puc origin (12.000), Ampicillin resistance gene, purOR (14.000).</p>
pXY015	<p>pXY015 15.100 bp</p> <p>5'UTR=AF148856, ORF1 (2000), ORF2 (4000), TKpA (6000), intron, luc2 [Rev] [Split] (8000), SV40 poly(A) signal, SV40 promoter, SV40 enhancer, SV40 ori, Kozak sequence, AmpR, PCK promoter, purOR, PUC origin, AmpR promoter, Ampicillin resistance gene.</p>

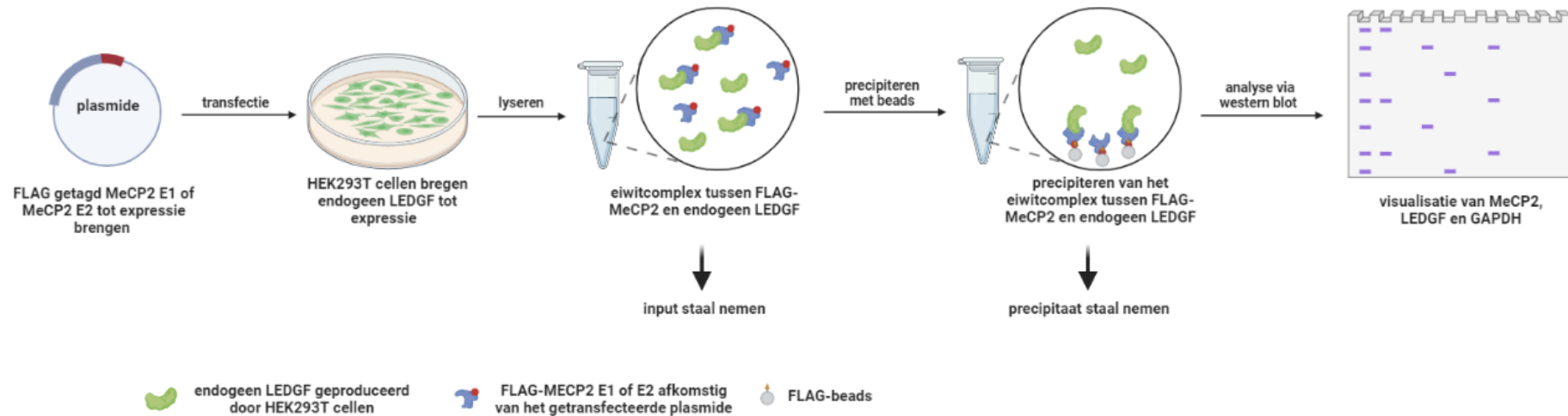


JM111 negatief
controle plasmide

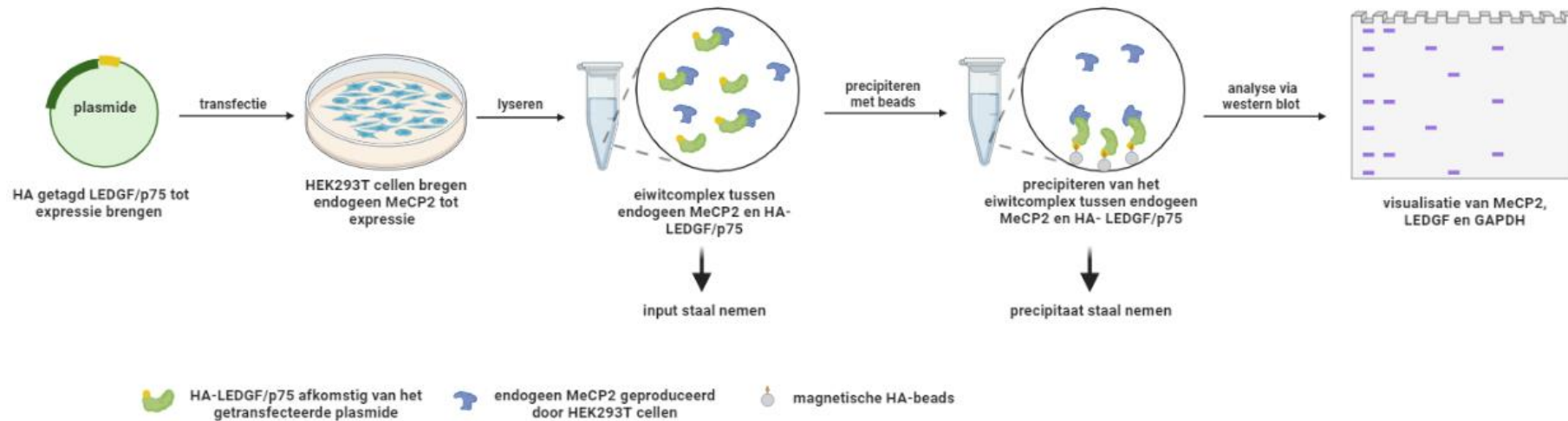


10 Schematische voorstellingen co-immunoprecipitatie en pull down

10.1 co-IP voor de interactie tussen de verschillende isoformen van endogeen LEDGF en FLAG-MeCP2



10.2 co-IP voor de interactie tussen HA-LEDGF en endogeen MeCP2



10.3 Pull down voor de interactie tussen GST- of FLAG-LEDGF en endogeen MeCP2

