

Regulation of Polycomb Group proteins : the complex, the kinase and the interactor

Citation for published version (APA):

Niessen, H. E. C. (2009). Regulation of Polycomb Group proteins : the complex, the kinase and the interactor. Maastricht: Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2009

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

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

[Link to publication](#)

General rights

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

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

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

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

The specific function of a cell is mostly determined by the genes and proteins it expresses. The information required to make a protein is stored in DNA and is called a gene. Through transcription and translation of genes proteins are produced. As cell types with different functions express different sets of proteins, it is important to regulate which genes are transcribed, and equally important, which genes are not. The latter is in part controlled by Polycomb Group (PcG) proteins, which are an important part of the transcriptional memory system of a cell: they mark certain genes with repressive signals during developmental and differentiation processes. The repressive marking includes post-translational modifications (PTMs) on histone proteins, such as trimethylation of Lysine 27 on histone 3 (H3K27me3) and ubiquitylation of Lysine 119 on histone 2A (H2AK119ub1). Two main Polycomb Repressive Complexes are recognized, namely PRC1 and PRC2. The histone methyltransferase activity of PRC2 member EZH2 is responsible for the H3K27me3 mark, to which CBX proteins of the PRC1 complex can bind. Other PRC1 proteins, such as RNF2 ubiquitylate H2A. Together this, in general, maintains transcriptional repression. The basic biological concepts that are used in PcG biology, such as histones, chromatin and epigenetics, are described in Chapter 1.

Although the mechanisms that contribute to PcG-mediated silencing, as described above, are relatively well-known, there are still many aspects of PcG biology that are not understood. One important question formed the basis of the research described in this thesis: how is Polycomb Group function regulated? Answering this question is important, as PcG proteins control several biological processes. PcG proteins are essential for embryonic development and stem cell renewal. Among the genes that are targeted by PcG proteins are transcription factors, components of signalling pathways and tumor suppressor genes. Since PcG proteins control epigenetic silencing of many genes involved in cell fate decisions, it is not surprising that deregulated expression of PcG proteins is frequently found in cancer. The role for PcG proteins in the development of cancer is discussed in Chapter 2. Putative mechanisms of how PcG proteins contribute to tumorigenesis are bypass of senescence and maintenance of cancer stem cells.

PcG proteins are not only involved in post-translational modification of chromatin-associated proteins, they are targeted for PTMs, such as ubiquitylation, sumoylation and phosphorylation themselves (Chapter 3). These modifications affect protein function by affecting protein stability, protein-protein interactions and enzymatic activities. The exact molecular mechanisms in, and biological relevance of the majority of PTMs on Polycomb function are

Summary

not known. The research described in this thesis aimed to identify PcG phosphorylation sites, involved kinases and the relevance of PcG phosphorylation in terms of complex composition, chromatin association and gene repression.

At the beginning of this project it was known that at least some PcG proteins are phosphorylated and that this phosphorylation correlates with chromatin dissociation in a cell cycle-dependent fashion. The identification of MAPKAPK3 (MK3) as an interaction partner of the PRC1 complex member PHC2 provided an interesting lead to further elucidate the functional relevance of PcG phosphorylation (Chapter 4). Stimulation of the ERK and p38 MAPK cascades, of which MK3 is a downstream target, leads to the phosphorylation of the PRC1 members PHC1 and BMI1. *In vitro* data establish that MK3 can directly phosphorylate BMI1. The induced phosphorylation of most PRC1 proteins correlates with both dissociation from chromatin and appearance of H3S28 phosphorylation. PHC1 staining, however, is not lost upon phosphorylation but is redistributed within the nucleus. This indicates a differential response of PRC1 complex members to phosphorylation. Manipulation of MK3 levels in cells confirms that Bmi1 phosphorylation is, at least in part, dependent on MK3. Furthermore the overexpression of MK3 results in expression of p14^{ARF}, a cell-cycle inhibitor, indicating derepression of the PcG target gene CDKN2A. These results are in line with the hypothesis that activation of MAPK signalling cascades lead to phosphorylation and chromatin dissociation of PcG proteins, thereby relieving transcriptional repression and allowing for gene activation.

This hypothesis was further tested in Chapter 5 in which MK3 overexpression was studied in the context of cell cycle regulation. Overexpression of MK3 reduces cell proliferation and induces a senescence-like state. This is accompanied by upregulation of several cell cycle regulatory proteins, such as p16, p14^{ARF}, p21 and p53. Knockdown of relevant PcG proteins also induces senescent-like states, indicating that MK3 overexpression and PcG knockdown have the same functional implication. Concomitant overexpression of BMI1 with MK3 reverses the MK3-induced cell-morphological changes. Combined with the observation that BMI1 and MK3 overexpressing cells select for high BMI1 expression this indicates a genetic interaction between BMI1 and MK3. Chromatin Immunoprecipitations (ChIP) further demonstrated that MK3 binds to the promoters of several PcG target genes, including the *CDKN2A* locus. Activation of MK3 is sufficient for a partial release of PRC1 proteins CBX8 and PHC1 from certain genes and transcriptional activation of these genes. Surprisingly this occurs despite an unchanged H3K27me3 mark. The MK3-PRC1

Summary

interaction may act as a molecular switch, allowing the cell to regulate PcG-mediated gene expression and rapidly respond to changes in its environment. Chromatin association of PHC1 in ChIP does not mirror CBX8 enrichment, but closely resembles the MK3 occupation dynamics. This observation supported the atypical behaviour of PHC1 compared to other PRC1 proteins. To study direct phosphorylation of PRC1 proteins by MK3 *in vitro* phosphorylation studies were conducted on spotted PRC1 peptides. The strongest *in vitro* MK3 phosphorylation occurs on PHC2 peptides. The signaling-induced differences in PHC chromatin binding compared to other PRC1 proteins might be explained by (1) the direct binding of MK3 to PHC proteins and (2) the direct phosphorylation of PHC proteins by MK3.

To gain insight into regulation of Polycomb function PRC1 complex composition was studied in the context of stress-signaling (Chapter 6). Next to the identification of several PcG phosphorylation sites, a new PRC1 interacting protein, KAP1, was identified, which only binds to PRC1 under certain stress conditions. Although phosphorylation occurs on both Bmi1 and KAP1 when this interaction occurs, the phosphorylation itself is not necessary for the established interaction. Signaling pathways involved in arsenite (As) and selenite (Se) -induced phosphorylation of BMI1 and KAP1 include p38, ATM/ATR, PKC, JNK and GSK3 β pathways. The establishment of Bmi1-KAP1 association is enhanced by inhibition of PKC and JNK signalling, yet is reduced by inhibition of GSK3 β signaling under cell stress; however, inhibition of p38 and ATM/ATR signaling reduces binding only in response to Se, not to As. PcG mediated transcriptional repression is potentially regulated by this interaction. Mitogenic signalling leads to a higher mRNA expression of PcG target gene ATF3, which is potentiated by concomitant knockdown of KAP1. This might, however, occur via more global chromatin responses. The biological relevance of this interaction is therefore currently not clear.

The significance of the results and their interrelationship are discussed in Chapter 7. The research described in this thesis begins to show how activation of signaling cascades leads to phosphorylation of PcG proteins and affects their subcellular localization, protein interactions within the PRC1 complex and their binding to certain target genes, whose expression is thus regulated. Future studies on the regulation of PcG proteins by phosphorylation and other post-translational modifications will determine which impact it has on both physiological processes, such as embryonic development and stem cell renewal, and pathological processes like cancer.

Samenvatting

Samenvatting

De specifieke functie van een cel wordt grotendeels bepaald door expressie van genen en eiwitten. De informatie die nodig is om een eiwit te maken, ligt opgeslagen in het DNA en wordt een gen genoemd: de DNA code van genen wordt overgeschreven tot een RNA code (transcriptie) en vertaald in een eiwit code (translatie). Verschillen in celtype worden bepaald door welke eiwitten tot expressie worden gebracht en welke niet. Dit laatste wordt gedeeltelijk bepaald door Polycomb Groep (PcG) eiwitten; PcG eiwitten vormen een belangrijk transcriptioneel geheugensysteem: ze markeren bepaalde genen met epigenetisch repressieve signalen tijdens ontwikkeling en differentiatieprocessen. Dergelijke repressieve markering bestaat deels uit post-translationele modificaties (PTMs) op histon eiwitten, waaronder trimethylering van Lysine 27 op histon 3 (H3K27me3) en ubiquitylering van Lysine 119 op histon 2A (H2AK119ub1). Er bestaan twee belangrijke Polycomb Repressieve Complexen: PRC1 en PRC2. De histon methyltransferase activiteit van het PRC2-eiwit EZH2 is verantwoordelijk voor de H3K27me3 markering, waaraan CBX eiwitten van het PRC1 complex kunnen binden. Andere PRC1 eiwitten, waaronder RNF2, ubiquityleren H2A. In het algemeen leidt dit tot behoud van transcriptionele repressie. De algemene biologische concepten die gebruikt worden in de PcG biologie, zoals histonen, chromatine en epigenetica, worden uitgelegd in hoofdstuk 1.

Ofschoon een aantal mechanismen, dat betrokken is bij PcG-afhankelijke repressie, zoals hierboven beschreven, ontrafeld is, blijven er nog steeds veel aspecten van PcG biologie onbegrepen. Ondermeer de vraag hoe PcG-functie gereguleerd wordt, stond aan de basis van het onderzoek beschreven in dit proefschrift. Het beantwoorden van deze vraag is relevant, omdat PcG eiwitten belangrijke fundamentele biologische processen reguleren. PcG eiwitten zijn essentieel voor embryonale ontwikkeling en stamcel-vernieuwing. Onder de genen die gereguleerd worden door PcG eiwitten zijn transcriptiefactoren, onderdelen van signaaltransductie cascades en tumor suppressor genen. Aangezien veel van dergelijke genen betrokken zijn bij het differentiatie en celdeling, is het niet verrassend dat ontregeling van PcG-eiwitten vaak voorkomt in kanker. De rol van PcG eiwitten bij het ontstaan van kanker wordt belicht in hoofdstuk 2. Mechanismen die bijdragen aan kankerontwikkeling zijn het voorkomen van een verouderingsrespons (senescentie) en de instandhouding van kanker stamcellen.

PcG eiwitten zijn niet alleen betrokken bij het aanbrengen van post-translationele modificaties op chromatine-geassocieerde eiwitten, maar worden zelf ook post-translationeel gemodificeerd, ondermeer door ubiquitylering, sumoylering en fosforylering (hoofdstuk 3). Deze modificaties beïnvloeden de

Samenvatting

functie van eiwitten door aan te grijpen op eiwitstabiliteit, eiwit-eiwit interacties en enzymatische activiteit. De exacte gevolgen van PTMs op PcG functie op moleculair nivo en hun biologische relevantie zijn niet bekend. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had o.m. tot doel PcG specifieke gefosforyleerde aminozuren en betrokken kinases te identificeren en de gevolgen van PcG fosforylering in termen van complex compositie, chromatine associatie en gen repressie te bepalen.

Bij aanvang van dit project was het bekend dat op zijn minst enkele PcG eiwitten gefosforyleerd worden en dat deze fosforylatie op een cel-cyclus-afhankelijke manier correleerde met een PcG-dissociatie van chromatine. De identificatie van MAPKAPK3 (MK3) als interactie partner van PHC2, dat deel uitmaakt van PRC1, zorgde voor een aanknopingspunt om de functionele relevantie van PcG fosforylatie te bestuderen (hoofdstuk 4). Stimulatie van ERK en p38 MAPK cascades, van welke MK3 een target is, leidt tot de fosforylatie van PRC1 leden PHC1 en BMI1. *In vitro* data bevestigen dat MK3 direct BMI1 kan fosforyleren. De geïnduceerde fosforylatie van de meeste PRC1 eiwitten correleert met zowel de dissociatie van chromatine als de verschijning van H3S28 fosforylatie. Chromatine associatie van PHC1 gaat daarentegen niet verloren na fosforylering, maar vertoont een redistributie in de nucleus. Deze observatie correleert met een differentiële respons van PRC1 eiwitten na fosforylatie. Manipulatie van MK3 eiwit niveaus in cellen bevestigt dat BMI1 fosforylatie, op zijn minst gedeeltelijk, afhankelijk is van MK3. Verder resulteert de overexpressie van MK3 in de expressie van p14^{ARF}, een celcyclus remmer, wat een derepressie van het PcG target gen CDKN2A aangeeft. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de hypothese dat activering van MAPK-signalering leidt tot fosforylatie en chromatine dissociatie van PcG eiwitten, waardoor transcriptionele repressie wordt opgeheven en de mogelijkheid tot genactivatie ontstaat.

Deze hypothese werd verder getoetst in hoofdstuk 5 waarin MK3 overexpressie bestudeerd werd in de context van celcyclus regulatie. Overexpressie van MK3 vermindert celdeling en induceert een op celveroudering lijkende status: cellen worden groot en plat en delen niet meer. Deze verandering gaat gepaard met activering van verschillende celdelings remmers, waaronder p16, p14^{ARF}, p21 en p53. Experimenteel geïnduceerd verlies van relevante PcG eiwitten resulteert eveneens in een verouderingsrespons. Dit geeft aan dat MK3 overexpressie en PcG verlies vergelijkbare functionele gevolgen hebben. Gelijktijdige overexpressie van BMI1 en MK3 draait de MK3-geïnduceerde celmorfologische veranderingen terug. Samen met de waarneming dat BMI1 en MK3 overexpresserende cellen selecteren voor een hoge BMI1 expressie, duidt dit op

Samenvatting

een genetische interactie tussen BMI1 en MK3. Chromatine Immunoprecipitaties (ChIP) demonstreerden dat MK3 bindt aan promotoren van PcG doelwitgenen, waaronder de CDKN2A locus. Activering van MK3 is voldoende voor een gedeeltelijk verlies van chromatine-associatie van de PRC1 eiwitten CBX8 en PHC1 op bepaalde genen; dit gaat gepaard met een verhoogde transcriptie van deze genen. Opmerkelijk is dat dit gebeurt met behoud van de epigenetisch repressieve H3K27me3 markering. Onze bevindingen suggereren dat MK3-PRC1 als een moleculair schakelmechanisme werken, waardoor een cel PcG-gemedieerde gen repressie snel kan aanpassen en daarmee kan reageren op veranderingen uit de cellulaire omgeving. Chromatine-associatie veranderingen van PHC1, bepaald met behulp van ChIP, volgen niet de CBX8-associatie profielen, maar lijken eerder op die van MK3. Deze waarneming ondersteunt het eerder gevonden atypische gedrag van PHC1 in vergelijking tot andere PRC1 eiwitten. Om fosforylering van PRC1 eiwitten door MK3 te bestuderen hebben we *in vitro* fosforylerings studies gedaan op geïmmobiliseerde PRC1 peptiden. De duidelijkste *in vitro* MK3 fosforylering blijkt plaats te vinden op PHC peptiden. De signalerings-geïnduceerde verschillen in PHC-chromatine binding in vergelijking tot andere PRC1 eiwitten worden mogelijk verklaard door (1) de directe binding van MK3 aan PHC eiwitten en (2) de directe fosforylering van PHC eiwitten door MK3.

Om inzicht te krijgen in de regulering van Polycomb functie werd de complex samenstelling van PRC1 bestudeerd in de context van stress-signalering (hoofdstuk 6). Naast identificatie van verschillende PcG fosforyl-aminozuren ontdekten we een nieuw PRC1-bindend eiwit, KAP1, dat alleen aan PRC1 bindt onder stress condities. Ofschoon fosforylering plaatsvindt op zowel Bmi1 als KAP1 wanneer deze interactie plaatsvindt, blijkt fosforylering niet noodzakelijk om de interactie in stand te houden. Signaleringscascades die betrokken zijn bij Arseen (As) en Seleen (Se)-geïnduceerde fosforylering van BMI1 en KAP1 zijn onder andere P38, ATM/ATR, PKC, JNK en GSK3 β cascades. De totstandkoming van BMI1-KAP1 binding onder cel-stress condities, wordt gestimuleerd door remming van PKC en JNK signalering, en verhinderd door remming van GSK3 β . Echter, blokkering van p38 en ATM/ATR signalering vermindert de binding alleen als gevolg van Se, en niet As. Polycomb gemedieerde transcriptionele repressie wordt mogelijk beïnvloed door deze interactie. Mitogene signalering leidt tot hogere mRNA expressie van PcG target gen ATF3, die bovendien versterkt wordt door verlies van KAP1. Ofschoon de biologische relevantie van deze interactie nog niet duidelijk is, is het mogelijk dat hierbij een meer globale chromatine structuurverandering betrokken is.

Samenvatting

De betekenis van de resultaten en hun onderlinge verband worden bediscussieerd in hoofdstuk 7. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat zien hoe activering van signaaltransductie cascades leidt tot fosforylering van PcG eiwitten en daardoor hun subcellulaire locatie, eiwit interacties binnen het PRC1 complex en binding aan bepaalde target genen beïnvloed wordt, waardoor de expressie van deze genen wordt gereguleerd. Verder onderzoek naar de regulering van PcG eiwitten door fosforylering en andere post-translationele modificaties zijn nodig om de invloed van dergelijke veranderingen op zowel normale fysiologische processen, waaronder embryonale ontwikkeling en stamcel vernieuwing, als pathologische processen zoals kanker, te bepalen.