

Samenvatting

DNA bevat de genetische informatie die mensen tot unieke individuen maakt. Elke cel in een menselijk lichaam telt 23 chromosomen, die bij elkaar zo'n 40.000 genen bezitten. Elk van deze genen codeert een ander eiwit, dat van belang is voor de biologische processen in het lichaam. Het merendeel van de genen komt tot expressie in alle cellen van het menselijk lichaam, een minderheid echter uitsluitend in een specifiek celtype. Een voorbeeld van een dergelijk celtype is de rodebloed cel of erythrocyt. De erythrocyt stamt af van een zogenoemde pluripotente cel, de HSC. Zo'n cel maakt een ontwikkeling in stappen door, die erytropoëse wordt genoemd. De uiteindelijke erythrocyt is verantwoordelijk voor de productie en opslag van het hemoglobine-eiwit, dat zorgt voor het zuurstoftransport in het bloed. Het hemoglobine-eiwit bestaat uit twee α -globineketens en twee β -globineketens, die onafhankelijk van elkaar gecodeerd worden door de α - en de β -globinegenclusters.

Het humane β -globinecluster bestaat uit vijf genen, gerangschikt naar de volgorde van expressie gedurende de ontwikkeling, en een *locus control region* (LCR), gelegen vóór de genen, die vijf gebieden bevat, die overgevoelig zijn voor Dnase I. De LCR speelt een belangrijke rol in de regulatie van de expressie van de globinegenen en is noodzakelijk voor hoge genexpressieniveaus.

Het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, heeft zich voornamelijk gericht op de regulatieve elementen in het humane β -globinecluster. Daarnaast is veel aandacht besteed aan de manier waarop muizenglobineclusters worden geactiveerd. We hebben aangetoond, dat de α - en β -globinegenen van de muis op een stochastische wijze worden geactiveerd en dat de beslissing om een gen te activeren wordt genomen vóór het begin van de daadwerkelijke transcriptie. We hebben aanwijzingen, dat deze beslissing wordt genomen op het niveau van de chromatine-organisatie. Daarnaast heeft het onderzoek uitgewezen, dat het α -gencluster wordt geactiveerd vóór het β -gencluster.

Met betrekking tot de regulatieve elementen van het humane β -globinecluster heeft het onderzoek zich geconcentreerd op de overgevoelige gebieden van de LCR en de vermoedelijke onderdrukkers Enh en F, gelegen achter het γ gen. We hebben zowel HS2, HS3 als de Enh- en F-elementen door middel van homologe recombinatie in een PAC-vector verwijderd. Deze PAC-vector bevat het hele humane β -globinecluster als een 180 kb-insertie. Ons onderzoek toont aan, dat elk bestudeerd element een eigen rol heeft, maar dat de interactie tussen de diverse elementen ook noodzakelijk is voor de activering van de globinegenen en de regulering van de genen gedurende de ontwikkeling.

Het verwijderen van HS2 en HS3 had tot doel de rol van de LCR functie in de chromatine-organisatie en in de activering van de globinegenen te bestuderen. We laten zien, dat het verwijderen van HS2 vrijwel geen effect heeft op het openen van het chromatine door de LCR, aangezien in slechts een van de vier transgene lijnen met een HS2 deletie een PEV werd waargenomen. We hebben echter wel een sterk effect op de ϵ -globine-expressie waargenomen, dat duidt op een mogelijke rol voor HS2 in de activering van het ϵ -globinegen in het embryo. Het verwijderen van HS3 had een sterke afname in globine-expressie tot gevolg, die zich nadrukkelijker manifesteerde naarmate het embryo zich ontwikkelde. De afname in expressie bleek te worden veroorzaakt door een PEV-expressie van het transgen, wat meteen aangeeft dat, anders dan HS2, HS3 wél van belang is voor het openen van het chromatine door de LCR. Het verwijderen van HS3 had geen specifiek effect op de expressie van een van de individuele globinegenen.

De Enh- en F-elementen zijn verwijderd om hun rol in de regulatie van de γ -globine-genexpressie gedurende de ontwikkeling te bestuderen. De elementen bevinden zich in het γ - δ intergenengebied, waarvan is gesuggereerd, dat het een rol speelt in de $\gamma \rightarrow \beta$ -wisseling en in de regulering van de γ -expressie-onderdrukking bij volwassenen. Deze suggesties zijn gedaan naar aanleiding van de connectie tussen de verwijdering van dit gebied en erfelijke permanente aanwezigheid van foetale hemoglobine (HPFH). De verwijdering van de Enh- en F-elementen in ons onderzoek had echter geen effect op de onderdrukking van de γ -genexpressie in de volwassene, maar resulteerde daarentegen in een verhoging van de ϵ - en γ -genexpressie in de embryonale fase.

Concluderend: de hier gepresenteerde studies laten zien:

1. dat de globinegenen op een stochastische wijze worden geactiveerd;

2. dat de LCR weliswaar functioneert als een holocomplex, maar dat daarnaast ook de individuele overgevoelige gebieden elk een eigen interactie hebben met de individuele globinegenen;
3. dat de regulering van de individuele globinegenen een complex geheel is, waarin waarschijnlijk de interactie van uiteenlopende combinaties van elementen gedurende de verschillende stadia van de ontwikkeling een rol speelt.