



Doctoral Thesis

## **CAF-1 dependent and independent functions of MSI1 in chromatin dynamics and flowering time control**

**Author(s):**

Exner, Vivien

**Publication Date:**

2008

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005596156> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 17688

**CAF-1 dependent and independent functions of MSI1 in chromatin dynamics and  
flowering time control**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

VIVIEN A. EXNER

Dipl. Natw. ETH

Born 1<sup>st</sup> of February 1979

citizen of Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Wilhelm GRUISSEM, examiner

Prof. Nikolaus AMRHEIN, co-examiner

PD Dr. Lars HENNIG, co-examiner

2008

## ABSTRACT

Chromatin dynamics and stability are both required to control normal development of multicellular organisms. Chromatin Assembly Factor CAF-1, which consists of the subunits FASCIATA1, FASCIATA2 and MS11 in *Arabidopsis thaliana*, is a histone chaperone that facilitates chromatin formation and the maintenance of specific chromatin states. CAF-1 exists in all eukaryotes, but because mutants are not available in most multicellular model organisms, the role of CAF-1 in development is poorly understood. In *Arabidopsis*, *fasciata* mutants are viable, demonstrating that CAF-1 is not essential for cell division in plants. *Arabidopsis* CAF-1 mutants have defects in shoot apical meristems; in addition, CAF-1 is required to establish seedling architecture, leaf size and trichome differentiation. CAF-1 is needed to restrict branching of trichomes on rosette leaves. Increased trichome branching in CAF-1 mutants is not strictly correlated with increased nuclear DNA content. Double mutant analyses revealed epistatic interactions between CAF1 mutants and *stichel*, a component of the endoreduplication-independent trichome pathway, but non-epistatic interactions between CAF1 mutants and *glabra3* and *kaktus*. In addition, mutations in CAF-1 could partly suppress the strong overbranching and polyploidization phenotype of *kaktus* mutants. These results revealed that CAF-1 function is not restricted to meristems, but that CAF-1 is also needed to control genome replication at multiple steps of development.

Duplication of chromatin following DNA replication requires spatial reorganization of chromatin domains assisted by CAF-1, and we studied the genomic consequences of CAF-1 loss and the function of CAF-1 in heterochromatin formation. Genes located in heterochromatic regions are usually silent, and it was found that this transcriptional repression persists in the absence of CAF-1 in *Arabidopsis*. However, the use of microarrays revealed that genes that are active during late S phase, when heterochromatin is duplicated, were upregulated in CAF-1 mutants. *Arabidopsis* CAF-1 mutants also have reduced cytological heterochromatin content; however, DNA methylation of pericentromeric repeats was normal, demonstrating that CAF-1 is not required for maintenance of DNA methylation. Instead, hypomethylation of the genome, which has only mild effects on the development of wild type plants, completely arrested development of CAF-1 mutants. These results suggested that CAF-1 functions in heterochromatin formation. CAF-1 and DNA methylation, which is also needed for heterochromatin formation, have partially redundant functions that are essential for cell proliferation. Interestingly, transcriptional repression and heterochromatin compaction can be genetically separated, and CAF-1 is required only for the complete compaction of heterochromatin but not to maintain transcriptional repression of heterochromatic genes.

CAF-1 subunits can have additional functions, and MSI1 is independently of CAF-1 needed for a normal transition to flowering as evident from the delayed flowering of partially complemented *msi1* mutants. I performed a genetic suppressor screen to better understand how MSI1 functions in the floral transition. One isolated suppressor mutant was a novel *CRYPTOCHROME1 (CRY1)* allele. Cryptochromes are blue light photoreceptors that control deetiolation, entrain the circadian clock and are involved in flowering time control. However, while the role of cryptochrome 2 in flowering time control is firmly established, the reported effects for cryptochrome 1 varied with growth conditions and alleles used. I found direct evidence that CRY1 can function as an activator of the floral transition. A hypersensitive CRY1 protein suppressed the late flowering phenotype of partially complemented *msi1* mutants under long day conditions and rendered them very early flowering under short day conditions. In addition, plants carrying that point mutation are also hypersensitive towards blue and red light. These results suggested that partially complemented *msi1* mutants flower later than wild-type due to delayed activation of *FT*, which can be activated by the novel hypersensitive CRY1 protein. In addition, these results revealed the intimate cross-talk between cryptochrome-mediated blue and phytochrome-mediated red light signaling cascades, which most likely is crucial for concerted plant development under natural light conditions.

A second mutant recovered from the genetic screen was a *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1)* allele. LHP1 is similar to HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1), which co-localizes with heterochromatin in mammals and flies and is guided there by recognition of H3K9me2 and H3K9me3. HP1 and LHP1 have a very similar amino acid sequence and are both involved in gene silencing. However, instead of exhibiting a heterochromatic localization, LHP1 binds to euchromatic regions of the genome that are marked by H3K27me3, even though it also binds to H3K9me3 *in vitro*. The results presented here showed that disruption of the chromo domain abolishes H3K27me3 recognition, releases gene silencing and causes similar phenotypic alterations as transcriptional *lhp1* null mutants. Therefore, binding to H3K27me3 is essential for LHP1 protein function.

In summary, I conclude that CAF-1 is needed for complete heterochromatin compaction and normal coordination of gene expression programs. Loss of CAF-1 interferes with multiple steps during development, such as seedling, leaf or trichome development. The CAF-1 subunit MSI1 is needed to activate *FT* during the floral transition in a CAF-1 independent way, most likely by counteracting the repression of *FT* by LHP1. It is possible that MSI1 is needed for histone replacement or histone variant deposition after LHP1 has been removed from the *FT* locus. Future experiments will have to show how LHP1, MSI1 and CAF-1 regulate *FT* and if nucleosome composition is altered during *FT* activation.

## ZUSAMMENFASSUNG

Für die Entwicklung mehrzelliger Organismen sind sowohl die Stabilität als auch die Dynamik des Chromatins wichtig. Der Chromatin Assembly Factor CAF-1, der in *Arabidopsis thaliana* aus den Untereinheiten FASCIATA1, FASCIATA2 und MSI1 besteht, ist ein Histon-Chaperon, das Aufbau und Erhalt des Chromatins ermöglicht. CAF-1 existiert in allen Eukaryonten; da aber in den meisten Modellorganismen CAF-1 Mutanten nicht lebensfähig sind, ist über die Funktion von CAF-1 während der Entwicklung wenig bekannt. In *Arabidopsis* dagegen sind *fasciata* Mutanten lebensfähig, was belegt, dass CAF-1 in Pflanzen für die Zellteilung nicht essentiell ist. *Arabidopsis* CAF-1 Mutanten haben defekte Apikalmeristeme. Zusätzlich wird CAF-1 für die Anlage der Keimlingsstruktur, der Blattgröße und für die Trichomdifferenzierung benötigt. So beschränkt CAF-1 die Verzweigung der Trichome auf den Rosettenblättern. Die verstärkte Trichomverzweigung in CAF-1 Mutanten korreliert nicht mit einer Zunahme des DNA-Gehaltes des Zellkerns. Die Analyse von Doppelmutanten hat gezeigt, dass eine epistatische genetische Interaktion zwischen CAF-1 Mutanten und *stichel*, einem Bestandteil des endoreduplikationsunabhängigen Regulationsweges der Trichomverzweigung, besteht. Dagegen sind die genetischen Interaktionen von CAF-1 Mutanten mit *glabra3* oder *kaktus* nicht epistatisch. Zusätzlich unterdrücken Mutationen im CAF-1 Komplex teilweise die sehr ausgeprägte Trichomüberverzweigung und starke Zunahme des DNA-Gehaltes von *kaktus* Mutanten. Diese Resultate zeigen, dass die Funktion von CAF-1 nicht nur auf die Meristeme beschränkt ist, sondern dass CAF-1 auch für die Kontrolle der Genomreplikation in verschiedenen Phasen in der Entwicklung benötigt wird.

Die Duplikation des Chromatins im Anschluss an die DNA-Replikation verlangt eine räumliche Restrukturierung des Chromatins, ein Vorgang, der durch CAF-1 unterstützt wird. Wir haben daher die Folgen des CAF-1 Verlustes auf genomischer Ebene untersucht. Gene, die in heterochromatischen Bereichen lokalisiert sind, sind normalerweise transkriptionell inaktiv, und die Abwesenheit von CAF-1 allein führt nicht zu einer Reaktivierung dieser Gene. Allerdings hat die Verwendung von Microarrays gezeigt, dass Gene, die charakteristisch für die späte S-Phase, in der Heterochromatin dupliziert wird, sind, in CAF-1 Mutanten verstärkt transkribiert werden. Zudem ist die Menge an cytologisch sichtbarem Heterochromatin in CAF-1 Mutanten reduziert. Trotzdem wurde keine Veränderung im Methylierungsmuster der pericentromeren Bereiche festgestellt. Dieser Befund zeigt, dass CAF-1 nicht generell für den Erhalt der DNA-Methylierung benötigt wird. Dagegen führte eine Hypomethylierung des Genoms zu einem vollständigen Abbruch der Entwicklung in Keimlingen ohne CAF-1 Funktion, während sie auf die Entwicklung von Wildtypkeimlingen nur geringe Auswirkungen hat. Diese Resultate zeigen, dass CAF-1 eine Rolle in der

Ausbildung von Heterochromatin spielt. Des Weiteren haben CAF-1 und DNA-Methylierung, die ebenfalls für die Ausbildung von Heterochromatin benötigt wird, teilweise redundante Aufgaben, die für die Zellproliferation essentiell sind. Interessanterweise können transkriptionelle Repression und Heterochromatinkompaktierung genetisch getrennt werden. CAF-1 wird nur für die vollständige Verdichtung von Heterochromatin benötigt nicht aber, um die transkriptionelle Repression heterochromatischer Gene aufrechtzuerhalten.

CAF-1 Untereinheiten können auch zusätzliche Funktionen haben, und MSI1 wird unabhängig vom CAF-1 Komplex für den normalen Blühübergang benötigt. Das geht aus dem verspäteten Blühen teilweise komplementierter *msi1* Mutanten hervor. Um die Funktionen von MSI1 in der Blühkontrolle besser zu verstehen, habe ich einen genetischen Suppressor-Mutanten-Screen durchgeführt. Eine der isolierten Suppressor-Mutanten war ein neues *CRYPTOCHROME (CRY) 1* Allel. Cryptochrome sind Blaulichtphotorezeptoren, die die Deetiologisierung steuern, die circadiane Uhr auf die Umweltbedingungen abstimmen und eine Rolle in der Blühzeitpunktskontrolle spielen. Allerdings ist nur für Cryptochrom 2 eine Funktion in letzterem wirklich anerkannt. Die Effekte von Cryptochrom 1 waren je nach Experiment und verwendeten Mutantenallelen unterschiedlich. Ich habe direkte Belege gefunden, dass CRY1 als Aktivator des Blühens agieren kann. Ein hyperaktives CRY1 Protein konnte den spätblühenden Phänotyp der partiell komplementierten *msi1* Mutante teilweise unterdrücken, und zwar sowohl im Lang-, als auch im Kurztag. Zudem sind Pflanzen, die diese Punktmutation im *CRY1* Gen tragen, hypersensitiv gegenüber Blau- und Rotlicht. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass dem späten Blühen der partiell komplementierten *msi1* Mutante eine verzögerte Aktivierung von *FT*, welches durch das neue hypersensitive CRY1 Protein aktiviert werden kann, zugrunde liegt. Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass Cryptochrom-vermittelte Blaulicht- und Phytochrom-vermittelte Rotlicht-Signalisationskaskaden bereits auf der Stufe der Photorezeptoren eng miteinander verknüpft sind. Eine derartige Kommunikation von Signalwegen ist vermutlich essentiell für die Pflanzenentwicklung unter natürlichen Lichtbedingungen.

Eine zweite in dem Screen isolierte Suppressor-Mutante war ein neues *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN (LHP) 1* Allel. LHP1 ist ähnlich dem HETEROCHROMATIN PROTEIN (HP) 1, das in Tieren ein wichtiger Heterochromatinbestandteil ist und durch die Bindung an di- oder trimethyliertes Lysin 9 von Histone H3 (H3K9me<sub>2/3</sub>) auf nicht vollständig verstandene Art Transkription unterdrücken kann. HP1 und LHP1 haben eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz und sind beide in die transkriptionelle Repression von Genen involviert. Allerdings bindet LHP1 im Gegensatz zu HP1 nicht Hetero- sondern Euchromatin, welches durch die Präsenz von H3K27me<sub>3</sub> charakterisiert ist, obwohl LHP1 *in vitro* sowohl H3K27me<sub>3</sub> als auch H3K9me<sub>3</sub> bindet. Die Resultate, die hier vorgestellt werden, zeigen, dass eine LHP1 Variante mit mutierter Chromodomäne H3K27me<sub>3</sub> nicht mehr bevorzugt bindet. Diese Mutation führt

zudem zur Aktivierung normalerweise reprimierter Gene und hat ähnliche Auswirkungen auf den Phänotyp wie transkriptionelle *lhp1* Nullmutanten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung an H3K27me3 essentiell für die Funktion von LHP1 ist.

Zusammenfassend folgere ich, dass CAF-1 für die vollständige Verdichtung des Heterochromatins, sowie für die normale Koordination von Genexpressionsprogrammen benötigt wird. Der Verlust der CAF-1 Funktion behindert verschiedene Entwicklungsschritte, z.B. Keimlings-, Blatt- und Trichomentwicklung. Die CAF-1 Untereinheit MSI1 wird zusätzlich und unabhängig von CAF-1 für die Aktivierung von *FT* beim Übergang zum Blühen benötigt, vermutlich als Gegenspieler des *FT*-Repressors LHP1. Es ist möglich, dass MSI1 für ein Ersetzen von Histonen oder für den Einbau bestimmter Histonvarianten benötigt wird, nachdem LHP1 vom *FT*-Locus entfernt worden ist. Zukünftige Experimente werden zeigen, wie LHP1, MSI1 und CAF-1 *FT* regulieren, und ob sich die Histonzusammensetzung des *FT*-Chromatins während der Aktivierung von *FT* verändert.