

# Functions of Arabidopsis retinoblastoma related protein in maintenance of chromatin structure

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Matveeva, Elena

**Publication date:**

2011

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006634253>

**Rights / license:**

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

**Functions of Arabidopsis Retinoblastoma related protein  
in maintenance of chromatin structure**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

**ELENA MATVEEVA**

Diploma Molecular Biology, Novosibirsk State University, Russia

Master of Science, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Germany

Born on 26<sup>th</sup>, 1974

Citizen of Russia

Prof. Dr. Wilhelm Gruissem, examiner

Prof. Dr. Claudia Köhler, co-examiner

Prof. Dr. Andrew Fleming, co-examiner

## **Abstract**

The Tumor suppressor Retinoblastoma (Rb) protein is an important cellular protein, which serves as a critical regulator of entry into the cell cycle and its inactivation in normal cells leads to deregulated growth. The fundamental functions of Rb in the control of cell growth and differentiation are very well studied. In previous works it has been shown that the Rb protein takes part in direct inhibition of E2F, recruits histone deacetylases (HDACs) and other chromatin modifying factors to balance cell cycle via gene repression. Rb protein mutants in different species demonstrate that it is involved in different pathways and has important cellular functions besides regulation of cell cycle and cellular differentiation.

Retinoblastoma related (*RBR*) protein is a plant homolog of the Rb, which is primarily known as a negative regulator of the cell cycle. RBR has been shown to bind to promoter regions of many regulated genes in a complex with E2F/DP, which preferentially recognizes the canonical binding site TTTCCCGC and different variations of it.

Recent studies indicate that loss of Rb function leads to genome instability. We made an attempt to understand underlying molecular mechanisms of the role of the *Arabidopsis thaliana* RBR protein in genome integrity.

Since *rbr* knockout mutants are gametophytically lethal, we generated Arabidopsis RBR RNAi lines which showed a reduced level of RBR protein upon induction with  $\beta$ -estradiol. We studied the role of the RBR protein in genome integrity using established inducible RBRi lines in a reporter line for homologous recombination.

In this work we show that RBR takes part in maintaining genome integrity directly and indirectly via binding to the regulatory region of the *FAS1* gene, one of the subunits of chromatin assembly factor 1 (CAF-1) and by regulation of homologous recombination and non-homologous end joining processes. Additionally, RBR might regulate base-excision repair via inactivation of the *PARP2* gene. *In vivo* down-regulation of the RBR gene in the inducible RBR RNAi lines leads to a 40-50 fold increase in homologous recombination, especially in organs with actively dividing cells. Reduction in the RBR protein level leads to a strong activation of genes involved in homologous recombination and a less pronounced activation of the non-homologous end joining pathway in Arabidopsis. The extent of genomic rearrangements upon RBR down-regulation appeared to be enhanced upon stress.

These studies delineate an important function of the known tumor suppressor protein in genome integrity and demonstrate an involvement of the protein in the DNA methylation process.

Mapping of the *in vivo* DNA interaction sites of RBR greatly increases understanding of the mechanism and logic of the cellular events, in which RBR protein plays an important role. To broaden our knowledge in studies of the RBR activity we performed a ChIP-Chip experiment with chromatin from

an Arabidopsis tissue culture using RBR antibodies. As a result we identified a set of new genomic binding sites of the RBR protein, which potentially contributes to the functional studies of the protein and further develops and expands a hypothesis of E2F independent DNA binding activity of the protein.

In the current studies were identified new targets of RBR protein, which contributes to the functional studies of the protein. In these targets, novel RBR DNA-binding motifs were identified which may support evidences of an E2F-independent DNA binding activity of the RBR protein.

Rb-E2F complexes have been shown to regulate genes that control DNA methylation in mammals. Arabidopsis METHYLTRANSFERASE1 (MET1), a homolog of mammalian DNA methyltransferase DNMT1, is implicated in maintaining DNA methylation during plant development and regulation of certain imprinted genes, but functional interactions between MET1 and RBR are unknown. Therefore, we investigated regulatory interactions between RBR and MET1 during gametophytic differentiation. MET1 expression was increased in pollen and ovules of *rbr*/RBR plants. This suggested that MET1 could be a direct target of the RBR protein complex. To confirm our hypothesis, we performed fine mapping of the binding sites of RBR within the MET1 promoter. We conclude from the results that MET1 is directly regulated by RBR possibly via binding to E2F sites, providing a new insight into the evolutionary role of MET1-RBR interaction during cellular differentiation.

## **Zusammenfassung**

Das Tumor unterdrückende Retinoblastoma (Rb) Protein ist ein entscheidender Regulator des Eintritts in den Zellzyklus. Die Inaktivierung in normalen Zellen führt zu dereguliertem Wachstum. Die grundlegenden zellulären Funktionen von Rb bei der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung sind gut untersucht. Wie bereits von verschiedenen Forschern gezeigt wurde, ist das Rb-Protein an verschiedenen biochemischen Prozessen beteiligt. Dazu zählt unter anderem die direkte Hemmung von E2F Transkriptions Faktoren, die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen und anderen Chromatin modifizierenden Faktoren, welche den Zellzyklus über Genrepression regulieren. Retinoblastoma Protein Mutanten in verschiedenen Pflanzenarten zeigen, dass Rb auch an anderen Stoffwechselwegen beteiligt ist und neben der Regulation des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung weitere wichtige zelluläre Funktionen besitzt.

Retinoblastoma Related (RBR) ist ein pflanzliches Rb Homolog, welches in erster Linie als ein negativer Regulator des Zellzyklus bekannt ist. RBR bindet an Promoter Regionen der regulierten Gene in einem Komplex mit E2F/DP, welcher bevorzugt die kanonische Bindungsstelle TTTCCCGC und verschiedene Varianten davon erkennt.

Aktuelle Studien zeigen, dass der Verlust der Rb-Funktion zu Genominstabilität führt. Wir machten einen Versuch, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Rolle des Arabidopsis RBR-Proteins in der Genom-Integrität zu verstehen.

Da RBR Knockout-Mutanten gametophytisch letal sind, haben wir Arabidopsis RBR RNAi Linien konstruiert, die nach Induktion mit  $\beta$ -Estradiol ein deutlich niedrigeres Niveau des RBR Proteins aufwiesen. Wir untersuchten die Rolle des Transkriptionsfaktors RBR in der Genom-Integrität mit diesen induzierbaren RBRI Linien in Arabidopsis Linien, die zusätzlich in ihrem Genom fragmentierte Luciferase (Luc) oder  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Gene als Substrate für die homologe Rekombination enthielten.

Wir zeigen, dass RBR direkt und indirekt an der Aufrechterhaltung der Genom-Integrität beteiligt ist. Das erfolgt unter anderem durch die Bindung an die regulatorische Region des Gens FAS1, einer der Untereinheiten von Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1) und durch die Regulation der homologen Rekombination und des nicht-homologen Endverknüpfungs Prozesses (NHEJ). Darüber hinaus könnte RBR die Basis-Exzisionsreparatur über die Inaktivierung des Gens PARP2 regulieren. Reduktion von RBR in den induzierbaren RNAi-Linien führt zu einem *in vivo* nachgewiesenen 40 bis 50-fachen Anstieg der homologen Rekombinationshäufigkeit in der ganzen Pflanze, vor allem in Organen mit sich aktiv teilenden Zellen. Die Reduktion von RBR-Protein führt zu einer starken Aktivierung von Genen der

homologen Rekombination und weniger ausgeprägten Aktivierung des NHEJ Weges. Das Ausmaß der genomischen Veränderungen nach RBR Reduktion wurde durch Stress verstärkt.

Die Bestimmung der *in vivo* DNA Bindungsstellen von RBR tragen massgeblich zum Verständnis von Mechanismen und logischen Regulierungsprozessen zellulärer Vorgänge bei, in welchen RBR eine entscheidende Rolle spielt. Zur Erweiterung unseres Wissens über RBR führten wir ein Chromatin-Immunopräzipitations Experiment mit einer Arabidopsis Gewebekultur und RBR-Antikörper durch. Als Ergebnis identifizierten wir eine Reihe neuer Genom-Bindungsstellen des RBR-Proteins, die zum weiteren Verständnis der RBR-Funktionalität beitragen. Unsere Untersuchungen erlauben uns die Hypothese einer E2F unabhängigen DNA Bindungsaktivität des Proteins.

Diese Untersuchungen zeigten eine wichtige Funktion eines Tumor-Suppressor-Proteins in der Genom-Integrität und demonstrierten die Beteiligung des Proteins am DNA-Methylierungs Prozess. Zusätzlich identifizierten wir neue DNA Bindungsstellen des RBR-Proteins, die zum funktionellen Verständnis des Proteins beitragen können. In diesen Bindungsstellen konnten wir neue RBR DNA Interaktionsmotive identifizieren, die eine E2F unabhängige DNA-Bindung des RBR Proteins unterstützen.

Es wurde gezeigt, dass der Rb-E2F Komplex Gene reguliert, welche für die Regulation von DNA-Methylierungen in Säugetieren zuständig sind. Arabidopsis Methyltransferase (MET1), ein Homolog von DNMT1 in Säugetieren, ist involviert in DNA-Methylierung während der Pflanzenentwicklung und der Regulierung von bestimmten Genen mit genomischem Imprinting. Funktionale Interaktionen zwischen MET1 und RBR waren aber noch unbekannt.

Deshalb untersuchten wir regulatorische Interaktionen zwischen RBR und MET1 während der gametophytischen Differenzierung. MET1 Expression war in Pollen und Eizellen von *rbr/RBR* Pflanzen erhöht, was nahelegt, dass MET1 unmittelbar von einem RBR-Protein-Komplex reguliert wird. Deshalb führten wir eine Feinkartierung der Bindungsstellen von RBR innerhalb des MET1 Promotors durch. Wir folgern, dass MET1 direkt von RBR reguliert wird, möglicherweise über E2F Bindungsstellen. Dies bietet einen neuen Einblick in die evolutionäre Rolle der MET1-RBR Interaktion während der zellulären Differenzierung.