



Doctoral Thesis

## Function of Arabidopsis RBR in developmental transitions

**Author(s):**

Morello, Simona

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010106214> →

**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. 21662

FUNCTION OF *ARABIDOPSIS* RBR IN DEVELOPMENTAL  
TRANSITIONS

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

**SIMONA MORELLO**

MSc. Of science ETH in Biology, ETH Zurich

Born February 3<sup>rd</sup> 1983

Citizen of Chiasso (TI)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Grissem, examiner

Prof. Dr. Christian Hardtke, co-examiner

Prof. Dr. Claus Azzalin, co-examiner

2014

# Abstract

---

Retinoblastoma protein (pRb/p105) is a highly interactive protein associated with multiple activities. Together with two members of the pocket family of proteins (p107 and p130) it controls the G1 to S-phase transition of the cell cycle. The activity of pRb is controlled mainly through its phosphorylation. Upon mitogenic stimuli the cells start to progress throughout the G1 phase of the cell cycle and pRb is increasingly phosphorylated, thus inactivated, by cyclin-dependent kinases. Upon the completion of the cell cycle pRb it is brought back to its active hypophosphorylated status and the active forms binds and sequesters E2F transcription factors to inhibit the temporally incorrect transcription of S-phase genes. The activity of pRb is important to suppress cell division activities in cells with damaged DNA, therefore pRb is a tumor suppressor and its inactivation is a prerequisite for about 70% of human cancers to develop into tumors. Furthermore, the protein participates in epigenetic events to control cell differentiation, embryo development and apoptosis in response to prolonged stress. Other processes affected by pRb include mitogenic progression, red/ox balance and metabolism.

In contrast to mammals, *Arabidopsis thaliana* (thale cress) contains a single functional pRb orthologue, the RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein. The principal role in governing cell division and differentiation by targeting E2F transcription factor activities and regulating epigenetic events is maintained, but interestingly after RBR loss the plant does not develop tumors, although it has been demonstrated that the absence of RBR causes uncontrolled division of totipotent cells. Furthermore, *Arabidopsis* develop majorly post-embryonically and provides therefore a unique opportunity to study the involvement of RBR in mechanisms regulating fate decisions during development.

RBR loss of function in the male gametophyte is lethal while it causes developmental defects in female gametogenesis. Recent studies based on RBR loss during early sporophytic stages have demonstrated that the protein is also involved in the management of the transcriptional programs promoting developmental transitions. More precisely, RBR recruits the polycomb group complex (PcG) PRC2 to regulate heterochromatinization of developmentally-regulated genes. Therefore, RBR co-suppression embryos are not able to switch to the autotrophic phase and arrest their development. The role of RBR in controlling cell division patterns, cell differentiation and stem cells populations have also been demonstrated by using conditional RBR loss of function mutants.

In this study we sought to expand the RBR interactome and gain more understandings about the role of RBR during phase transitions. To this end we performed protein-protein interaction studies (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) and also transcriptional and epigenetic profiling (RNA-seq and ChIP-seq) of seedlings undergoing photomorphogenesis with normal and reduced RBR levels. BiFC

studies allowed us to confirm that RBR interacts with members of the nuclear import machinery (KPNB1 and IMPA2), two RBR interaction partners previously detected in high-throughput studies. RNA-seq studies were performed on seedlings with normal and reduced RBR levels collected at four equally distant timepoint during either photomorphogenesis or skotomorphogenesis. We show that during the time window considered for this study, the protein influences about 10% of the transcriptional status of the seedlings and our results confirm the role of RBR in the correct maintenance of cycle activities. Furthermore, we demonstrate that its absence causes an increased transcription of genes associated to both DNA repair and cell division and most importantly we report that seedlings deprived of RBR respond slower than controls to light-induced changes and have altered levels of transcripts involved in carbon and nitrogen metabolism. Our genome wide enrichments of Histone 3 lysines 27 and lysine 4 trimethylation (H3K27m3 and H3K4m3) were determined at the beginning of photomorphogenesis and 24h after photomorphogenesis (16h light and 8h dark) and 24h of skotomorphogenesis. This revealed that the absence of RBR negatively impacted both chromatin marks at the genome wide levels. The reduction of H3K4m3 mirrored the reduced transcriptional responses to light, while the levels of H3K27m3 were particularly reduced before the onset of photomorphogenesis, further confirming the role of RBR as regulator of fate decisions.

Together our study indicate that RBR participates in early events of photomorphogenesis by both influencing the transcriptional and epigenetic status of the developing seedling.

# Riassunto

---

Retinoblastoma (pRb/p105) è una proteina molto interattiva associata a molteplici attività. Essa controlla la transizione tra le fasi G1 e S del ciclo cellulare in concomitanza con gli altri due membri della stessa famiglia, che include le proteine p107 and p130. L'attività di pRb nella progressione del ciclo cellulare è soprattutto controllata attraverso la sua fosforilazione. La presenza di stimoli mitogeni stimola le cellule alla divisione. Durante la fase G1 del ciclo cellulare pRb viene lentamente fosforilizzata, quindi inattivata, su opera di chinasi ciclina-dipendente. pRb rimane fosforilizzata fino a quando il ciclo cellulare è terminato, poi essa viene riportata allo stato inattivo attraverso iperfosforilazione. Una volta riosforilizzata la proteina torna allo stato di attività quindi si lega e sequestra i fattori di trascrizione E2F in modo da inibire la trascrizione di geni della fase S del ciclo cellulare quando non necessari. La sua attività è pertanto anche importante per impedire che le cellule con DNA danneggiato proseguano il ciclo cellulare; per cui per definizione pRb è una proteina soppressore tumorale e il suo malfunzionamento è un prerequisito per lo sviluppo di circa il 70% dei tumori umani. Inoltre questa proteina regola eventi epigenetici associati al controllo della differenziazione cellulare, dello sviluppo embrionale e anche dell'apoptosi in risposta a lunghi periodi di stress. Altri processi influenzati da pRb includono la mitogenesi, le reazioni red/ox e il metabolismo.

A differenza dei mammiferi *Arabidopsis* (famiglia delle cruciferae) contiene un singolo ortologo funzionale di pRb, la proteina RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR). Il ruolo di RBR è mantenuto dal punto di vista evolutivo e come nei mammiferi il suo ruolo sta nel governare la divisione e la differenziazione cellulare attraverso l'interazione con fattori di trascrizione E2F o anche regolazione di attività epigenetiche. Sorprendentemente però, nelle piante una perdita di RBR non causa tumori, anche se una crescita incontrollata di cellule è stata osservata in piantine private da RBR. Inoltre, lo sviluppo di *Arabidopsis* è in maggior misura post-embriionale, quindi questo organismo rappresenta un'opportunità unica per lo studio dei meccanismi che regolano lo sviluppo e l'acquisizione dell'identità cellulare in assenza di RBR.

Nel gametofito maschile la perdita della funzione di RBR é letale, mentre causa anomalie di sviluppo nel gametofito femminile. Studi recenti dimostrano che la mancanza di RBR durante stadi sporofitici è essenziale per il controllo di programmi di trascrizione associati al particolare stadio di sviluppo che la pianta sta attraversando. Più precisamente RBR recluta il complesso gruppo-polycomb (PcG) PRC2 per regolare l'eterocromatizzazione di regioni cromosomali non richieste nelle fasi di sviluppo successive. Quindi, gli embrioni soppressi dall'attività di RBR non sono in grado di compiere la transizione autotrofica e arrestano lo sviluppo.

L'obiettivo del nostro studio é stato quello di espandere la rete di proteine che interagiscono con RBR e di approfondire il ruolo di RBR durante i maggiori cambiamenti di sviluppo che le piante attraversano, in particolare la fotomorfogenesi. A questo scopo abbiamo condotto studi bimolecolari di complementazione di fluorescenza (BiFC) per validare *in vivo* l'interazione tra RBR e presunti compagni proteici. In parallelo abbiamo condotto studi trascrizionali ed epigenetici su piantine sottoposte alla fotomorfogenesi con livelli normali e ridotti di RBR. Gli studi BiFC ci hanno permesso di confermare l'interazione tra RBR e due membri del macchinario per l'importo nucleare di proteine (KPNB1 e IMPA2), due partner molecolari individuati in precedenza in studi high-throughput. Le analisi di RNA-seq sono state compiute su piantine raccolte a quattro intervalli equidistanti durante 24 ore di fotomorfogenesi (16 ore luce/ 8 ore buio) o skotomorfogenesi.

Noi dimostriamo che nella finestra di tempo considerata in questo studio la proteina influenza di circa il 10% lo stato trascrizionale delle piantine e i nostri risultati confermano il ruolo di RBR nel controllo del ciclo cellulare. Oltretutto, dimostriamo che l'assenza di RBR causa un aumento della trascrizione di geni associati con il riparo del DNA e la divisione cellulare e riportiamo che le piantine senza RBR reagiscono più lentamente ai cambiamenti di luce rispetto alle piantine controllo e hanno livelli alterati di geni implicati nel metabolismo dell'azoto e del carbonio. I nostri studi genomici a larga scala dell'arricchimento di trimetilazione su lisine 27 e 4 dell'istone H3 (H3K27m3 e H3K4m3) sono stati determinati all'inizio del periodo di fotomorfogenesi e dopo 24 ore (fotomorfogenesi 8 ore luce e 8 ore buio, skotomorfogenesi 24 ore buio). Questi studi hanno rivelato che l'assenza di RBR influenza negativamente entrambi i marchi cromatinici a livelli globali. La riduzione di H3K4m3 si riflette nella riduzione di trascrizione di mRNA in risposta alla luce, mentre i livelli di H3K27m3 erano particolarmente ridotti prima dell'inizio della fotomorfogenesi, confermando il ruolo di RBR come regolatore di destini cellulari.

Nel complesso i nostri studi indicano che RBR partecipa agli eventi regolatori durante i primi stadi della fotomorfogenesi influenzando sia lo stato trascrizionale che quello epigenetico nello sviluppo delle piantine.