

Multiple Enhancers Control
***FLOWERING LOCUS T* Expression with**
Temporal and Spatial Specificity

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Tingting, Yang

Aus Yantai, China

Köln, 2019



Max Planck Institute for
Plant Breeding Research

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Pflanzen (Direktor Prof. Dr. G. Coupland) angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. George Coupland
Berichterstatter: Prof. Dr. Ute Höcker
Beisitzerin/ Schriftführerin: Dr. Franziska Turck
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Juliette de Meaux

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2020



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, FLOWERING LOCUS T (*FT*) as part of florigen moves from leaves to shoot apical meristem (SAM) to induce the floral transition under inductive long day (LD) conditions. Phylogenetic shadowing analysis identified four highly conserved blocks, which were named Block *A*, *B*, *C* and *E*. Promoter truncation analysis and DNA methylation induced by Inverted Repeats (IRs) revealed that *Block C* acts as a distal enhancer, while *Block E* is a shadow enhancer that mediated the expression of *FT* in phloem cells of leaves in LDs. However, *Block C* and *Block E* are not required for *FT* expression in siliques, since GUS signal can be detected under the control of 4.0 kb *FT* promoter lacking both enhancers in both LD and short day (SD) conditions.

To understand the temporal and spatial expression specificity of *FT* in different tissues, we used the CRISPR/ Cas system to confirm the function of *Block C* in its native chromosomal position. Mutation of a CCAAT box in *Block C* resulted in reduced *FT* expression and a late flowering phenotype. Meanwhile, a third enhancer located in the *FT* promoter region was identified in this study. A *cis*- regulatory element between 1.2 kb to 1.4 kb upstream of *FT* translation start site acts as a Silique Expression Element (*SEE*) and was found to be essential for *FT* expression in siliques. The expression of *FT* in siliques was shown to be required for higher seed yield production. Six core motifs were predicted within *SEE* by re-analysis of DAP-seq data. Mutagenesis of motif II dramatically decreased GUS signal, while mutagenesis of motif VI increased GUS signal in siliques.

To study the level of the repressive histone modification H3K27me3 at *Block C* and *SEE*, we applied fluorescence-activated cell sorting (FACS) using a transgenic line that expresses a fluorescent marker under the control of the phloem companion cell-specific *SUCROSE TRANSPORTER 2* promoter (*SUC2p*). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay revealed that the abundance of H3K27me3 on leaf and silique specific enhancers changes according to their function in controlling spatial expression of *FT* in different tissues.

The temporal and spatial expression of *FT* is connected to chromatin architecture. Engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) method was adapted to detect chromatin interaction in *A. thaliana* mesophyll protoplasts. We optimized the enChIP method to confirm previously reported chromatin loop structures in *A. thaliana*. A weak interaction of *ACH1* and *ACH2*, which was robustly detected by Hi-C was confirmed by enChIP

method in protoplasts while weaker interactions as reported for *FT* and *APOLO/PID* could not be confirmed.

In sum, we identified a silique specific enhancer, which regulates *FT* expression in silique and controls seeds production. The chromatin state of *Block C* and *SEE* changed when they regulated *FT* expression in a tissue specific manner. Meanwhile, the modified enChIP method is an independent method for detecting the interaction among different chromatin regions, but the method appears to be limited to detecting very strong interactions.

Zusammenfassung

In *Arabidopsis thaliana* wandert FLOWERING LOCUS T (FT) als Teil des Florigens von den Blättern zum apikalen Meristem (SAM), um die Blüte unter Bedingungen eines induktiven Langtags zu induzieren. Durch phylogenetische Schattenanalyse wurden vier hochkonservierte Blöcke identifiziert, die als *Block A*, *B*, *C* und *E* bezeichnet wurden. Durch transgene Promotor Analyse und DNA-Methylierung, die durch Inverted Repeats (IRs) induziert wurde, zeigten, dass *Block C* als distaler transkriptioneller Enhancer wirkt, während *Block E* ein sogenannter Schatten Enhancer ist, der die Expression von *FT* in Phloemzellen von Blättern in LDs vermittelt. *Block C* und *Block E* sind jedoch nicht für die *FT* Expression in Schötchen erforderlich, da das GUS-Signal unter der Kontrolle eines 4.0 kb *FT* Promotors sowohl unter LD- als auch unter Kurztag-Bedingungen nachgewiesen werden kann.

Um die zeitliche und räumliche Expressionsspezifität von *FT* in verschiedenen Geweben zu verstehen, verwendeten wir das CRISPR/Cas-System, um die Funktion von *Block C* zu bestätigen. Die Mutation der CCAAT Box in *Block C* führte zu einem spät blühenden Phänotyp. In der Zwischenzeit wurde in dieser Studie ein dritter Enhancer in der *FT*-Promotorregion identifiziert. Ein cis-regulatorisches Element zwischen 1,2 kb und 1,4 kb stromaufwärts der *FT*-Übersetzungsstartstelle fungiert als Schötchen-Expressionselement (SEE) und wurde als essentiell für die *FT*-Expression in Schötchen befunden. Die Expression von *FT* in Schötchen ist für eine hohe Samenproduktion erforderlich. Sechs Kernmotive wurden durch die Verwendung von DAP-seq Daten innerhalb von *SEE* vorhergesagt. Die Mutagenese von Motiv II verringerte das GUS-Signal dramatisch, während die Mutagenese von Motiv VI das GUS-Signal in Schötchen erhöhte.

Um das Niveau von H3K27me3 von *Block C* und *SEE* zu untersuchen, verwendeten wir fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) unter Verwendung einer transgenen Linie, die einen fluoreszierenden Marker unter der Kontrolle des Promotors des Phloem-Begleiter-Zell-spezifischen *SUCROSE TRANSPORTER 2* (*SUC2*) exprimiert. Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay) zeigt, dass sich das Niveau von H3K27me3 an Schötchen-spezifischen Enhancern entsprechend ihrer Funktion bei der Kontrolle der räumlichen Expression von *FT* in verschiedenen Geweben ändert.

Der zeitliche und räumliche Ausdruck von *FT* wird irgendwie durch die Chromatinarchitektur bestimmt. Zur Detektion der Chromatin-Wechselwirkung in *Arabidopsis*-Mesophyll-

Protoplasten wurde eine durch DNA-Bindungsmoleküle vermittelte Methode zur Chromatin-Immunpräzipitation (enChIP) entwickelt. Wir haben die enChIP-Methode optimiert, um einige Chromatinstrukturen bei *A. thaliana* zu bestätigen. Eine Interaktion von *ACH1* und *ACH2*, die durch Hi-C nachgewiesen wird, konnte mit der enChIP-Methode in Protoplasten bestätigt werden.

Zusammenfassend konnten wir einen Schötchen-spezifischen Enhancer identifizieren, der die *FT*-Expression in diesem Gewebe reguliert und die Samenproduktion beeinflusst. Der Chromatinzustand von *Block C* und *SEE* änderte sich, wenn sie die *FT*-Expression auf gewebespezifische Weise regulierten. Die modifizierte enChIP-Methode ist eine unabhängige Methode zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Chromatinregionen, allerdings scheint sie darauf beschränkt zu sein, sehr starke Wechselwirkungen zu detektieren.