

Author: Simone Zündorf

Title: The role of TRB interaction partners in epigenetic gene repression

Titel: Die Rolle von TRB-Interaktoren in epigenetischer Genrepression

Keywords: Epigenetics, Polycomb, TRBs

Examination data:

Erster Referent und Prüfer:	Prof. Dr. Marcel Bucher
Zweite Referentin und Prüferin:	Prof. Dr. Jane Parker
Beisitzerin/Schriftführerin:	Dr. Franziska Turck
Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Martin Hülskamp
Tag der Disputation:	16.08.2022

Summary:

In eukaryotes, the structural aspect of gene regulation has received increasing attention in recent years. Chromatin structure in particular plays a key role in gene expression, as its constitution has an impact on the accessibility for the transcription machinery and provides a platform for complex protein interactions. Seemingly minor adjustments on chromatin by means of chromatin marks have far-reaching effects and orchestrate gene expression throughout organismic development. Structural rearrangements *via* the deposition or removal of active and repressive chromatin marks determine whether chromatin is in an open or condensed state, respectively, and thus provide a molecular mechanism to dynamically and reversibly control gene expression.

Both plants and animals employ Polycomb repressive complexes (PRCs) for the establishment of such repressive chromatin marks: the hallmark modification of PRC1 being the monoubiquitination of a lysine residue on histone H2A (H2AKub), and PRC2 catalyzing trimethylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27me3). Histone marks deposited by the Polycomb machinery are recognized by a reader complex that induces local chromatin compaction to hinder transcription. Since PRCs are void of DNA-binding domains, these complexes rely on recruitment mechanisms to find and repress their target genes. This task is largely done by transcription factors (TFs), such as the TELOMERE REPEAT BINDING FACTORS (TRBs). However, outside the

PRC context, TRBs have been described to act as transcriptional activators, raising the question of what exactly allots the repressive role of TRBs in Polycomb-mediated silencing.

To shed light on this issue, I conducted a phylogenetic analysis that supports a functional divergence of the TRB paralogs, which were subsequently subjected to mass spectrometric analysis to dissect their interaction networks. Although Arabidopsis TRB paralogs did not show mutual exclusive interactomes, I identified and verified several interesting candidates that might allot the repressive role to TRBs: two histone modifiers, two TFs, and three unknown proteins. The three yet undescribed proteins were named UNSTRUCTURED TRB INTERACTORS (UTIs) in reference to their predicted intrinsically disordered domains. The candidates were validated in further experiments and analyzed regarding their interacting domains, of which in particular the N-terminal unstructured domains of the more closely related UTI2 and UTI3 appeared to be of importance for their association with the TRBs. Phenotypic analysis of mutants hints at redundant functions of the three UTIs, although the critical *uti uti2 uti3* triple mutant is currently generated and still needs to be analyzed. In CHIP-seq experiments, UTI3 did exhibit not sequence-specific DNA-binding but locally clustered together with the H3K36me3 demethylase ICU11 and TRBs at floral identity genes. Moreover, enriched sequence motifs point towards a combinatorial effect of GAGA and telobox motif in TRB-instigated Polycomb repression. Interestingly, the interaction data generated in this study and accumulative evidence from previous studies suggest a link between TRBs and histone deacetylases (HDAs) which mostly is accomplished through indirect association with the EAR repressome, a powerful genome-wide mechanism for the removal of active histone acetylation marks. While all other PRC-recruiting TFs, were already known to be directly involved in EAR-motif mediated gene repression, TRBs thus far were left out of this scenario, which now could be a determinant of their repressive role. How UTIs fit into this picture and whether they contribute to phase separation and thereby set micron-scale interaction environments, as other unstructured proteins do, are of interest in future studies.

Zusammenfassung:

In Eukaryonten hat Genregulation im strukturellen Sinne in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Struktur von Chromatin spielt insofern eine Schlüsselrolle bei der Genexpression, dass sich ihr Zustand auf die Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie auswirkt und eine Plattform für komplexe Proteininteraktionen darstellt. Scheinbar geringfügige Veränderungen an der Chromatinstruktur durch das Anbringen von kovalenten Histonmodifikationen haben weitreichende Auswirkungen auf die Ablesbarkeit von Genen. Diese Modifikationen führen entweder zu einer stärkeren oder schwächeren Verpackung des Chromatins können damit umliegende DNA-Abschnitte aktivieren oder stilllegen. Daher stellen Histonmodifikationen einen Mechanismus zur dynamischen und reversiblen Kontrolle der Genexpression dar.

Sowohl Pflanzen als auch Tiere verwenden Polycomb repressive Komplexe (PRCs) für die Etablierung solcher repressiven Markierungen: Die charakteristischen Modifikationen von PRC1 ist H2AKub, wohingegen H3K27me3 katalysiert. Von der Polycomb-Maschine angebrachte Histonmarkierungen werden von einem Lesekomplex erkannt, der dort eine lokale Kondensation des Chromatins bewirkt und somit die Transkription verhindert. Da die PRCs allerdings keine DNA-bindenden Domänen besitzen, sind diese Komplexe auf Rekrutierungsmechanismen angewiesen, um ihre Zielgene zu finden und zu unterdrücken. Diese Aufgabe wird größtenteils von Transkriptionsfaktoren (TFs), wie den TELOMERE REPEAT BINDING FACTORS (TRBs), übernommen. Jedoch sind TRBs außerhalb des PRC-Kontextes als Transkriptionsaktivatoren beschrieben worden, was die Frage aufwirft, was genau die repressive Rolle der TRBs beim Polycomb-vermittelten Gene Silencing ausmacht. Ich führte eine phylogenetische Analyse durch, welche eine funktionelle Divergenz der TRB-Paraloge belegte. Daher wurden diese anschließend einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen, um ihre Interaktionsnetzwerke zu entschlüsseln. Obwohl die TRB-Paraloge von Arabidopsis keine sich gegenseitig ausschließenden Interaktome aufwiesen, identifizierte und verifizierte ich mehrere interessante Kandidaten, die den TRBs eine repressive Rolle zuweisen könnten: zwei Histon-Modifikatoren, zwei TFs und drei unbekannte Proteine. Die drei noch unbeschriebenen Proteine wurden in Anlehnung an ihre vorhergesagten intrinsisch ungeordneten Domänen als UNSTRUCTURED TRB INTERACTORS (UTIs) genannt. Die Kandidaten wurden in weiteren Experimenten als TRB-Interaktoren validiert und hinsichtlich ihrer interagierenden Domänen analysiert, von denen insbesondere die N-terminalen unstrukturierten Domänen der näher verwandten UTI2 und UTI3 für die Assoziation mit TRBs von Bedeutung zu sein scheinen. Die phänotypische Analyse von Mutanten deutet auf redundante Funktionen der drei UTIs hin,

obwohl die wesentliche *uti uti2 uti3* Dreifachmutante, die derzeit erzeugt wird, noch analysiert werden muss. In ChIP-seq-Experimenten zeigten die UTIs keine sequenzspezifische DNA-Bindung, sondern häufen sich an mit der H3K36me3-Demethylase ICU11 und TRBs an Blütenidentitätsgenen, die ebenfalls ein telobox-proximales GAGA-Motiv aufweisen. Darüber hinaus deuten angereicherte Sequenzmotive auf eine kombinatorische Wirkung von GAGA und Telobox-Motiv bei der TRB-vermittelten Polycomb-Repression hin. Interessanterweise suggerieren die in dieser Studie gewonnenen Interaktionsdaten und die sich häufenden Belege aus anderen Studien eine Verbindung zwischen TRBs und Histondeacetylasen (HDAs), die meist durch eine indirekte Assoziation mit dem EAR-Repressom zustande kommt, einem leistungsfähigen genomweiten Mechanismus zur Entfernung aktivierender Acetylgruppen von Histonschwänzen. Während von allen anderen PRC-rekrutierenden TFs bereits bekannt war, dass sie direkt an der EAR-Motiv-vermittelten Genrepression beteiligt sind, wurden die TRBs bisher aus diesem Szenario ausgeklammert, was nun jedoch ein wichtiger Faktor auf ihre repressive Rolle sein könnte. Wie genau sich UTIs in dieses Bild einfügen und ob sie zur Phasentrennung beitragen und dadurch Interaktionsumgebungen im Mikromaßstab schaffen, wie es andere unstrukturierte Proteine tun, ist für künftige Studien von Interesse.