

# Summary

In plants, two distinct repressive epigenetic marks involved in chromatin compaction and gene repression, histone H2A Lys121 monoubiquitination (H2AK121ub) and histone H3 Lys27 trimethylation (H3K27me<sub>3</sub>), are implemented by Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and 2 (PRC2), respectively. However, since none of the PRC complex subunits contain DNA binding domains, there has been great interest in how Polycomb Group (PcG) proteins identify and are recruited to their target genes. Recently, telobox cis-elements and TELOMERE REPEAT BINDING FACTORS (TRBs) were shown to recruit PRC2 to a subset of PcG target genes to establish H3K27me<sub>3</sub> and mediate gene repression. Contradictory to this role in gene repression, TRB1 and teloboxes were previously linked to promoter regions of highly expressed genes of the translation machinery. To evaluate if TRB2 and TRB3 share TRB1's dual nature in gene regulation, I generated genome-wide TRB2 and TRB3 binding data which I correlated with published TRB1 binding, H3K27me<sub>3</sub>, and H2AK121ub data to identify functional differences between TRB paralogues.

TRB1 enriched for 7825 genomic sites, whereas TRB2 and TRB3 associated with 4226 and 2094 sites, respectively. When considering all target regions, one of the most striking differences between TRB1-3 was that TRB2 and TRB3 significantly enriched for exonic regions and associated above genomic average with PRC2 target genes, which was especially true for all TRB3 and TRB2/TRB3 common target genes. TRB1 was overall depleted for PRC2 target genes and only enriched for exons if TRB2 and/or TRB3 as well as H3K27me<sub>3</sub> were also enriched at the locus. In contrast, TRB2 and TRB3 did not significantly associate with exons in the presence of TRB1 and absence of H3K27me<sub>3</sub>. When correlating these data with H2AK121ub, most of TRB1-3 and H3K27me<sub>3</sub> common target genes were also enriched for H2AK121ub. However, consistent with its depletion at PRC2 target genes, TRB1 enriched for genes only marked by H2AK121ub. These genes were associated with rapid responses to environmental stimuli. In contrast, TRB3 enriched for genes marked by both, H2AK121ub and H3K27me<sub>3</sub>, and of which many were involved in developmental processes. Interestingly, TRB2 was associated with both gene groups equally, building a kind of bridge between TRB1 and TRB3 function. Non-PcG targets showed the previously described involvement with ribosomal and translation-related processes.

TRBs recognised target genes through telobox/telobox-like elements which were enriched in their peak centres. Mutating telobox/telobox-like elements in *SEP2* and *SEP3* promoter-reporter constructs induced gene expression and reduced H3K27me3 at these loci, confirming the importance of telobox/telobox-like elements in gene repression. Reconstituting TRB1 occupancy at the mutated *SEP3* promoter region through tethering experiments partially restored gene repression, validating TRB mediated PRC2 recruitment. However, TRB1 binding to the *SEP3* promoter was likely not direct *in planta*, since in contrast to TRB3, TRB1 was unable to interact with the *SEP3* promoter region and other telobox-like elements *in vitro*. As a result, TRB1 may only associate with extratelomeric telobox/telobox-like motifs in complexes. Furthermore, TRB1 may affiliate with some of those complexes independently of TRB2 or TRB3, as TRB1 had considerably more binding sites than either TRB2 or TRB3, of which many did not overlap. This hypothesis was consistent with the fact that in contrast to TRB2 and TRB3, TRB1 significantly enriched for a more loosely conserved telobox-like element as well as for many motifs that located off peak centre. In summary, even though TRB1-3 had many common target genes, my results suggest that TRB1-3 have functionally diversified and that functions outside of a TRB1-3 complex may be dependent on the formation of different potential subcomplexes that recognise off centre motifs and act in specific genomic environments.

# Zusammenfassung

In Pflanzen werden zwei unterschiedliche repressive epigenetische Markierungen, die an der Chromatinkompaktierung und Genrepression beteiligt sind, namentlich Histon-H2A-Lys121-Monoubiquitinierung (H2AK121ub) und Histon-H3-Lys27-Trimethylierung (H3K27me<sub>3</sub>), durch den Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) bzw. 2 (PRC2) implementiert. Da jedoch keine der PRC-Komplex-Untereinheiten DNA-Bindungsdomänen enthält, besteht bis heute großes Interesse daran herauszufinden, wie die Polycomb-Group (PcG) -Proteine ihre Zielgene identifizieren und zu diesen rekrutiert werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass Telobox-cis-Elemente und TELOMERE REPEAT BINDING FACTORS (TRBs) PRC2 für eine Untergruppe von PcG-Zielgenen rekrutieren, um H3K27me<sub>3</sub> zu etablieren und die Genrepression zu vermitteln. Im Gegensatz zu ihrer Rolle in der Genrepression waren TRB1 und Teloboxen zuvor mit Promotorregionen hochexprimierter Gene der Translationsmaschinerie verknüpft worden. Um herauszufinden, ob TRB2 und TRB3 die unterschiedlichen Rollen von TRB1 in der Genregulierung aufweisen, habe ich genomweite TRB2- und TRB3-Bindungsdaten generiert und sie mit veröffentlichten TRB1-Bindungs-, H3K27me<sub>3</sub>- und H2AK121ub-Daten korreliert, um funktionale Unterschiede zwischen TRB-Paralogen zu identifizieren

TRB1 reichte sich an 7825 genomischen Stellen an, wohingegen TRB2 und TRB3 mit 4226 bzw. 2094 Stellen assoziiert waren. Bei der Betrachtung aller Zielregionen bestand einer der auffälligsten Unterschiede zwischen TRB1-3 darin, dass TRB2 und TRB3 für exonische Regionen signifikant angereichert und mit den PRC2-Zielgenen über dem genomischen Durchschnitt assoziiert wurden, was insbesondere für alle TRB3 und gemeinsamen Zielgenen von TRB2 und TRB3 galt. TRB1 war im Ganzen für PRC2-Zielgene abgereichert und für Exons nur dann angereichert, wenn TRB2 und/oder TRB3 sowie H3K27me<sub>3</sub> ebenfalls am Locus angereichert waren. Im Gegensatz dazu assoziierten TRB2 und TRB3 in Gegenwart von TRB1 und Abwesenheit von H3K27me<sub>3</sub> nicht signifikant mit Exons. Bei der Korrelation dieser Daten mit H2AK121ub waren die meisten der gemeinsamen TRB1-3 und H3K27me<sub>3</sub> Zielgene auch für H2AK121ub angereichert. Beständig mit seiner Erschöpfung an PRC2-Zielgenen reichte sich TRB1 nur für Gene an, die mit H2AK121ub markiert wurden. Diese Gene waren mit einer schnellen Reaktion auf Umweltreize

verbunden. Im Gegensatz dazu reicherte sich TRB3 an Genen an, die sowohl von H2AK121ub als auch von H3K27me3 gekennzeichnet und von denen viele an Entwicklungsprozessen beteiligt waren. Interessanterweise war TRB2 mit beiden Gengruppen gleichermaßen assoziiert und bildete eine Art Brücke zwischen der TRB1- und der TRB3-Funktion. Nicht-PcG-Targets zeigten die zuvor beschriebene Beteiligung an ribosomalen und translationsbezogenen Prozessen.

TRBs erkannten Zielgene durch Telobox/telobox-ähnliche Elemente, die in ihren Peakzentren angereichert waren. Das Mutieren von Telobox/telobox-ähnlichen Elementen in *SEPALLATA2* (*SEP2*)- und *SEP3*-Promotor-Reporter-Konstrukten induzierte die Genexpression und reduzierte H3K27me3 an diesen Loci, was die Bedeutung von Telobox/telobox-ähnlichen Elementen in der Genrepression bestätigt. Die Wiederherstellung der TRB1-Belegung in der mutierten *SEP3*-Promotorregion durch Tethering-Experimente stellte die Genrepression teilweise wieder her und bestätigte die durch TRB vermittelte PRC2-Rekrutierung. Die *in planta* Bindung von TRB1 an den *SEP3*-Promotor war jedoch wahrscheinlich nicht direkt, da TRB1 im Gegensatz zu TRB3 nicht mit der *SEP3*-Promotorregion und anderen telobox-ähnlichen Elementen *in vitro* interagieren konnte. Folglich kann TRB1 wahrscheinlich nur in einem Komplex extratelomere Telobox/telobox-ähnlichen Motive binden. Darüber hinaus wäre es möglich, dass TRB1 mit einigen dieser Komplexe unabhängig von TRB2 oder TRB3 assoziiert, da TRB1 wesentlich mehr Bindungsstellen als TRB2 oder TRB3 hatte, von denen sich viele nicht überlappten. Diese Hypothese stimmte mit der Tatsache überein, dass sich TRB1 im Gegensatz zu TRB2 und TRB3 für ein weniger konserviertes telobox-ähnliches Element sowie für viele Motive außerhalb des Peak-Zentrums signifikant anreicherte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl TRB1-3 viele gemeinsame Zielgene hatten, die hier beschriebenen Ergebnisse darauf hindeuten, dass sich TRB1-3 funktionell diversifiziert haben und dass Funktionen außerhalb eines TRB-Komplexes von der Bildung verschiedener potentieller Unterkomplexe abhängig sein könnten, welche die Motive außerhalb der Peak-Zentren erkennen können und in bestimmten genomischen Umgebungen agieren.