



Doctoral Thesis

Role of human UPF1 in telomere stability processes

Author(s):

Chawla, Raghav

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006490883> →

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 N° 19680

ROLE OF HUMAN UPF1 IN TELOMERE STABILITY PROCESSES

A Dissertation submitted to
ETH ZÜRICH

For the Degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
RAGHAV CHAWLA

Doctor of Medicine, University of Lausanne

Born on 14 November 1980 & Citizen of Windisch AG

Accepted on the Recommendation of:

Prof. Claus Azzalin, ETH Zürich
Prof. Ulrike Kutay, ETH Zürich
Prof. Massimo Lopez, University of Zürich
Prof. Oliver Mühlemann, University of Berne

2011

ABSTRACT IN ENGLISH

Given their resemblance with double-stranded DNA breaks, the ends of linear eukaryotic chromosomes have evolved into sophisticated and protective nucleoprotein structures, so-called telomeres. Consisting of long tracts of tandem DNA repeats, telomeres attract a variety of specialized proteins, which help to assure genome stability by keeping in check the DNA repair machineries. In addition, telomeres delay the loss of coding sequences resulting from the inability of conventional DNA polymerases to fully replicate the extremities of linear chromosomes. Maintaining the stability of telomeres is not only key to safeguarding the genome but is also crucial for the viability of cells, tissues and entire organisms. It has previously been shown that the conserved helicase and ATPase UPF1 binds to human telomeres *in vivo*. Although more famous for its central role in cytoplasmic RNA surveillance, human UPF1 is also directly involved in maintaining genome stability by allowing complete replication of DNA. Intriguingly, depletion of UPF1 in human cancer cells leads to an early S phase arrest, to severe chromosomal aberrations, including marked telomere instability, and to accumulation of telomeric repeat-containing RNA molecules at telomeric chromatin. Here, we characterize the specific role of human UPF1 in safeguarding telomere integrity in more detail. First, we show that UPF1 binds to chromatin in a telomere length-dependent manner and that this binding is stimulated by the PI3K-related protein kinase ATR. Of note, ATR is essential for genome stability maintenance specifically during S phase, presumably by stabilizing and restarting stalled replication forks. Second, we identify a UPF1-specific telomeric interactome, consisting of the telomeric factor TPP1, the ribonucleoprotein telomerase and, most likely, the so-called CST complex, comprising Ctc1, Stn1 and Ten1. Telomerase is a reverse transcriptase capable of synthesizing telomeric repeats *de novo* and adding them to the end of telomeres, thereby maintaining telomeric DNA. Intriguingly, UPF1's interaction with telomerase is also mediated by ATR. Third, we reveal that the telomeric defects induced by UPF1 depletion stem predominantly from inefficient leading-strand telomere replication. Finally, we demonstrate that UPF1's enzymatic activities are essential for its protective roles at telomeres. Indeed, the ectopic expression of an ATPase-deficient mutant version of UPF1, in contrast to that of wild type UPF1, is unable to rescue the telomere instability induced by depletion of endogenous UPF1 in human cancer cells. Our results uncover so far unappreciated molecular mechanisms underlying the protective role of human UPF1 in preserving telomere stability. They portray a scenario where UPF1 orchestrates crucial aspects of telomere biology, including telomere replication and telomere length homeostasis. We believe that our data will have a strong impact not only on our understanding of telomere function but also on that of the intriguing connection between genome stability and RNA metabolism pathways.

ABSTRACT IN GERMAN

Aufgrund ihrer Verwandtschaft mit DNA-Doppelstrangbrüchen haben sich die Enden linearer eukaryotischer Chromosome zu raffinierten und protektiven Nukleoproteinstrukturen, sogenannten Telomeren, entwickelt. Diese bestehen aus langen Strängen kurzer, hintereinander wiederholter DNA-Sequenzen und ziehen eine Vielfalt spezialisierter Proteine an, welche helfen die Genomstabilität zu bewahren, indem sie die DNA-Reparaturmechanismen in Schach halten. Zudem verzögern Telomere den Verlust kodierender Sequenzen, der sich aus der Unfähigkeit herkömmlicher DNA-Polymerasen ergibt, die Extremitäten linearer Chromosomen vollständig zu replizieren. Die Erhaltung der Telomerstabilität ist nicht nur ein Schlüssel zur Wahrung des Genoms sondern auch ausschlaggebend für die Lebensfähigkeit von Zellen, Geweben und ganzen Organismen. Es wurde im Vorfeld der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die konservierte Helikase und ATPase UPF1 menschliche Telomere *in vivo* bindet. Obwohl menschliches UPF1 eher für seine zentrale Rolle in der zytoplasmischen RNA-Überwachung bekannt ist, ist es auch direkt an der Erhaltung der Genomstabilität beteiligt, indem es eine vollständige DNA-Replikation ermöglicht. Interessanterweise führt die Depletion von UPF1 in menschlichen Krebszellen zu einer Arretierung des Zellzyklus' zu Beginn der S-Phase, zu schweren chromosomalen Aberrationen, einschliesslich ausgeprägter Telomerinstabilität, und zu einer Akkumulation von RNA-Molekülen mit telomerischen Sequenzen an telomerischem Chromatin. Hier erläutern wir die spezifische Rolle von menschlichem UPF1 in der Bewahrung der Telomerstabilität mehr im Detail. Zuerst zeigen wir auf, dass UPF1 Chromatin in einer Weise bindet, die sowohl von der Telomerlänge als auch von der PI3K-verwandten Proteinkinase ATR abhängt. Dabei ist zu beachten, dass ATR insbesondere für die Genomerhaltung während der S-Phase entscheidend ist, vermutlich indem es stockende Replikationsgabeln stabilisiert und ihren Neustart ermöglicht. Zweitens identifizieren wir ein UPF1-spezifisches telomerisches Interaktom, welches den telomerischen Faktor TPP1, das Ribonukleoprotein Telomerase und höchstwahrscheinlich den sogenannten CST-Komplex, bestehend aus Ctc1, Stn1 und Ten1, umfasst. Die Telomerase ist eine reverse Transkriptase, welche telomerische Sequenzen *de novo* synthetisieren und den Telomerenden zufügen kann und dadurch die telomerische DNA bewahrt. Spannenderweise wird auch die Interaktion von UPF1 mit Telomerase von ATR vermittelt. Drittens enthüllen wir, dass die durch UPF1-Depletion verursachten telomerischen Defekte überwiegend von einer ineffizienten Leitstrang-Telomerreplikation stammen. Schliesslich zeigen wir, dass die enzymatischen Aktivitäten von UPF1 für seine protektive Rolle an Telomeren ausschlaggebend sind. In der Tat kann die ektopische Expression einer ATPase-defizienten mutanten Version von UPF1 im Gegensatz zu derjenigen von Wildtyp-UPF1 die durch Depletion von endogenem UPF1 ausgelöste Telomerinstabilität in menschlichen Krebszellen nicht verhindern. Unsere Ergebnisse enthüllen bis anhin unerkannte molekulare Mechanismen, welche der protektiven Rolle von menschlichem UPF1 in

der Bewahrung der Telomerstabilität zugrundeliegen. Sie stellen ein Szenario dar, in welchem UPF1 kritische Aspekte der Telomerbiologie orchestriert, einschliesslich der Telomerreplikation und der Regulation der Telomerlänge. Wir sind der Meinung, dass unsere Daten einen starken Einfluss sowohl auf unser Verständnis der Funktion von Telomeren als auch auf dasjenige der faszinierenden Verbindung zwischen der Genomstabilitätserhaltung und RNA-metabolischen Vorgängen haben werden.