

DISS. ETH NO. 20507

---

# **Characterization of Human Telomeric Repeat-Containing RNA Biogenesis and Function**

A dissertation submitted to

**ETH ZÜRICH**

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**BENJAMIN OLIVER FARNUNG**

Master of Science in Molecular Bioengineering, TU Dresden  
Born October 4th, 1980  
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Claus Azzalin, examiner  
Prof. Dr. Frédéric Allain, co-examiner  
Prof. Dr. Vikram Panse, co-examiner

2012

# Abstract

Telomeres comprise the ends of linear eukaryotic chromosomes and are nucleoprotein complexes that fulfill various crucial functions, as they protect the natural DNA ends from degradation and inappropriate repair. Furthermore, they shorten with every round of DNA replication. This process is thought to contribute to the aging of cells and organisms and makes telomeres a powerful barrier against cancer development. Because of their heterochromatic nature, telomeres have long been considered to be transcriptionally silent genomic areas. Recently, however, it has been demonstrated that telomeres are transcribed in various organisms ranging from yeast to humans to produce long, non-coding RNAs. These transcripts have been named telomeric repeat-containing RNAs (TERRA), are found only within the nucleus, and are associated with telomeres throughout the cell cycle. Mammalian TERRA is transcribed by DNA-dependent RNA polymerase II (RNAPII) using the C-rich telomeric strand as a template, with transcription starting in the subtelomeres and proceeding towards the chromosome end. However, the promoters that drive the transcription of telomeres were not identified, and TERRA could thus be a part of the so-called 'transcriptional noise' that is associated with the pervasive transcription of the human genome. Contradicting this idea, here we report the existence of CpG-island promoters within human subtelomeres. We found that at least 20 human subtelomeres contain a CpG-island and that these CpG-islands are bound by active RNAPII *in vivo*. Furthermore, we identified a TERRA transcription start site directly downstream of the CpG-island promoter and found that TERRA transcription is negatively regulated through cytosine methylation at the CpG-islands. Concerning TERRA functions, the most popular concept is that TERRA antagonizes telomerase activity. Supporting

## Abstract

---

this idea, *in vitro* experiments using TERRA-mimicking oligonucleotides have shown that TERRA inhibits telomerase through base-pairing with the telomerase RNA template. This and other observations led to the hypothesis that long telomeres produce more TERRA and inhibit telomerase, whereas short telomeres produce less TERRA and therefore are preferentially elongated. Contradicting this widespread belief, using telomerase overexpression and a telomerase inhibitor, we found that changes in telomere length do not affect steady-state TERRA levels. Furthermore, using a DNA methyltransferase double knockout cell line with high TERRA levels, we show here that endogenous TERRA does not inhibit telomerase in *in vitro* assays. We also report that telomere elongation upon telomerase overexpression happens at the same speed in two isogenic cell lines, one of which has increased TERRA levels, which disproves the idea that TERRA is a telomerase inhibitor *in vivo*. Finally, to identify transcription factors that regulate TERRA expression, we have created stable cell lines that express eGFP under the control of the TERRA CpG-island promoter. These cell lines can now be used for siRNA screening using eGFP fluorescence as a readout.

# Zusammenfassung

Telomere, die Enden von linearen eukaryotischen Chromosomen, sind Nukleinsäure-Protein Komplexe die eine Anzahl von wichtigen Funktionen erfüllen. Sie schützen die natürlichen Enden der DNS vor Degradation und unangebrachten Reparaturmechanismen. Darüberhinaus werden Telomere bei jeder DNS Replikation kürzer, was eine Ursache für das Altern von Zellen und Organismen ist und sie zu einer starken Barriere gegen die Entstehung von Krebs macht. Da Telomere zu den heterochromatischen Bereichen des Genoms gehören wurden sie für lange Zeit als nicht transkribierte Bereiche angesehen. Unlängst wurde jedoch nachgewiesen, dass Telomere in einer ganzen Reihe von Organismen angefangen bei einfachen Hefen bis hin zu menschlichen Zellen transkribiert werden, wobei eine lange nicht-kodierende RNS entsteht. Diese RNS namens TERRA ist ausschliesslich im Zellkern zu finden und bindet während des kompletten Zellzyklus an Telomere. In Säugetierzellen wird TERRA durch die DNS-abhängige RNS-Polymerase II (RNAPII) transkribiert, wobei der Cytosin-reiche DNS Strang als Vorlage dient. Die Transkription startet dabei im Subtelomer und verläuft in Richtung des Endes des Chromosoms. Promotoren die die TERRA Transkription steuern konnten bislang nicht identifiziert werden. Deshalb ist es möglich, dass TERRA zum sogenannten 'Rauschen' gehört, das mit der Transkription des menschlichen Genoms verbunden ist. Dagegen spricht jedoch die Existenz von CpG-Insel Promotoren in den Subtelomeren menschlicher Zellen über die wir hier berichten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass mindestens 20 menschliche Subtelomere eine CpG-Insel beinhalten, an die die RNAPII *in vivo* bindet. Darüberhinaus haben wir einen Transkriptions-Startpunkt identifiziert der direkt hinter der CpG-Insel liegt und zeigen, dass die TERRA Transkription durch die Methylierung

## Zusammenfassung

---

von Cytosinen der CpG-Insel negativ reguliert wird. Was die Funktionen von TERRA betrifft, ist die meistbeachtete Hypothese, dass TERRA die Telomeraseaktivität negativ reguliert. In diesem Zusammenhang wurde *in vitro* gezeigt, dass TERRA die Telomerase durch Basenpaarung mit dem Telomerase RNS-Bestandteil inhibieren kann, wobei künstliche TERRA-imitierende Oligonukleotide verwendet wurden. Dies führte zusammen mit anderen Beobachtungen zu der Hypothese, dass lange Telomere mehr TERRA produzieren wodurch die Telomerase inhibiert wird, während kurze Telomere wenig TERRA produzieren und deshalb bevorzugt durch Telomerase verlängert werden. Gegen diese weit verbreitete Hypothese sprechen jedoch unsere Ergebnisse die wir hier präsentieren. Wir haben Telomerase überexprimiert oder inhibiert und festgestellt, dass die Länge eines Telomeres keinen Einfluss auf seine Transkription hat. Des Weiteren haben wir eine DN5-Methyltransferase doppel-knockout Zelllinie mit sehr hohem TERRA Spiegel verwendet und gezeigt, dass zelleigene TERRAmoleküle die Telomerase in *in vitro* Experimenten nicht inhibieren. Wir berichten auch, dass die Verlängerung von Telomeren nach einer Telomerase-Überexpression in zwei genetisch gleichartigen Zelllinien, von denen eine stark erhöhte TERRA Spiegel hat, mit der gleichen Geschwindigkeit stattfindet. Diese Ergebnisse widerlegen die weit verbreitete Theorie, dass TERRA *in vivo* ein Telomeraseinhibitor ist. Zuletzt, haben wir stabile Zelllinien erschaffen, die eGFP unter Kontrolle des TERRA CpG-insel Promotors exprimieren. Diese Zelllinien können genutzt werden um Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die die TERRA Transkription steuern, indem Kandidaten-Gene mit Hilfe von siRNA herunterreguliert werden und im folgenden die eGFP Fluoreszenz gemessen wird.