

DISS. ETH NO. 22240

**Cactin family protein Cay1 controls silencing
of telomeres and LTR retrotransposons
in fission yeast**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Luca Emanuele Lorenzi

MSc ETH Biology, ETH Zurich, Switzerland
born on 8.11.1984
citizen of Root (LU), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Claus M. Azzalin, examiner
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner
Prof. Dr. Miguel Godinho Ferreira, co-examiner
Dr. Raffaella Santoro, co-examiner

2014

Summary

The tips of linear eukaryotic chromosomes are capped by specialised nucleoprotein structures, the telomeres, which have crucial roles in maintenance of genome integrity. Telomeres consist of DNA tandem repeats bound specifically by a multiprotein complex dubbed shelterin, which brings about the genome protective function of telomeres. Also, different non-coding RNA species are produced from chromosome ends and appear to have integral roles at telomeres. A central component of shelterin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is the highly conserved protein Rap1. Besides control of telomere end protection, Rap1 regulates telomere length by restricting telomerase activity. Also, Rap1 is required for establishment and maintenance of telomeric heterochromatin, a repressive chromatin configuration which silences gene expression at chromosome ends.

Long terminal repeat (LTR) retrotransposons are parasitic DNA elements that can mobilise and jump within the genome via an RNA intermediary stage, comparable to retroviruses. Also fission yeast contains a class of LTR retrotransposons, the *Tf2* elements. As retrotransposition is potentially dangerous for genome integrity, the expression of *Tf2* LTR retrotransposons is silenced in *S. pombe*.

In this work we identify the fission yeast member of the conserved Cactin family, Cay1, as critical factor for maintenance of silencing at telomeres and *Tf2* LTR retrotransposons. Cells lacking Cay1 accumulate histone 3 lysine 9 (H3K9) acetylation and exhibit high transcript levels at chromosome ends and retroelements, while silencing at other regions with repressive chromatin is not affected. Deletion of Cay1 also causes extensive over-elongation of telomeres and leads to segregation defects, such as chromosomal bridges, when grown in the cold. Cay1 localises to telomeres and *Tf2* LTR retrotransposons and regulates the association of different histone deacetylases with these genomic elements. However, most of the functions of Cay1 at telomeres appear to be indirect. Cay1 is required for efficient splicing of *rap1⁺* pre-mRNA and Rap1 protein levels are greatly diminished in *cay1Δ* cells. We show that overexpression of Rap1 in *cay1Δ* cells prevents telomeric gene expression and H3K9 acetylation; and re-establishes nearly normal telomere length. Rap1 overexpression also strongly diminishes the occurrence of chromosomal bridges, which appear to arise from a telomeric defect. Furthermore, Cay1 controls *Tf2* LTR retrotransposon expression through Rap1-independent mechanisms. Cay1 physically interacts with the Clr6 histone deacetylase complex II component Cph2 and promotes its loading onto chromatin. Restriction of H3K9 acetylation at *Tf2* elements by Cay1 depends on Cph2, and partially explains the silencing defects observed in *cay1Δ* cells.

This work offers the first molecular characterisation of the fission yeast Cactin family protein Cay1 and reveals its central functions in regulation of gene expression at telomeres and retrotransposable elements through alteration of chromatin composition and pre-mRNA splicing.

Zusammenfassung

Eukaryotische Chromosome sind linear und enden in spezialisierten Nucleoproteinstrukturen, den Telomeren, die kritische Funktionen für die Aufrechterhaltung der Genomintegrität ausüben. Telomere bestehen aus aufeinanderfolgenden, immergleichen DNA Sequenzstücken, die spezifisch von einem Multiproteinkomplex gebunden werden. Dieser Multiproteinkomplex wird Shelterin genannt und ist verantwortlich für die Genom-Schutzfunktion der Telomere. Zudem werden an Chromosomenden verschiedene nicht-kodierende RNA Spezies produziert, die möglicherweise wesentliche Funktionen bei den Telomeren erfüllen. Eine zentrale Komponente von Shelterin in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ist das evolutiv sehr konservierte Protein Rap1. Neben der Funktion im Telomer-Genomschutz, reguliert Rap1 auch die Telomerlänge durch Inhibierung von Telomerase. Zudem ist Rap1 wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin an Telomeren. Heterochromatin ist eine repressive Chromatinstruktur, welche die Expression von Genen unterdrückt.

LTR Retrotransposons sind bewegliche, parasitäre DNA Elemente, die mittels einer RNA-Zwischenstufe im Genom herumspringen können, ähnlich wie Retroviren. Auch die Spalthefe besitzt eine Klasse von LTR Retrotransposons, die *Tf2* Elemente. Da Retrotransposition potenziell gefährlich ist für die Genomintegrität, ist die Expression von *Tf2* LTR Retrotransposons in *S. pombe* inhibiert.

In dieser Studie haben wir Cay1 als essenziellen Faktor für die Inhibierung von Telomer- und *Tf2* LTR Retrotransposon-Expression identifiziert. Cay1 ist das *S. pombe* Mitglied der evolutiv konservierten Familie von Cactin Proteinen. Zellen ohne Cay1 haben höhere Transkriptmengen sowie auch mehr Histon 3 Lysin 9 (H3K9) Acetylierung an Chromosomenden und Retroelementen. Die Inhibierung von Genexpression an anderen repressiven Chromatinregionen ist jedoch nicht betroffen. Die Cay1 Gendelektion verursacht auch eine extreme Telomerverlängerung und führt zu Segregationsdefekten, so wie zum Beispiel chromosomalen Brücken, wenn die Zellen in der Kälte wachsen. Cay1 ist an den Telomeren und *Tf2* LTR Retrotransposons vorhanden und reguliert die Anhäufung von verschiedenen Histon-deacetylasen an diesen genomischen Elementen. Die meisten Funktionen von Cay1 an den Telomeren scheinen jedoch indirekte Effekte zu sein. Cay1 wird benötigt um *rap1*⁺ prä-mRNA effizient zu spleissen und Rap1 Proteinmengen sind entsprechend massiv reduziert in *cay1Δ* Zellen. Wir konnten zeigen, dass die Überexprimierung von Rap1 in *cay1Δ* Zellen die Genexpression, sowie auch die H3K9 Acetylierung, an Telomeren inhibiert. Überexprimierung von Rap1 führt auch dazu, dass die Telomerlänge wieder abnimmt und fast Wildtyp Länge erreicht. Zudem reduziert die Rap1 Überexprimierung auch die Anzahl chromosomaler Brücken, die anscheinend von einem telomerischen Problem hervorgerufen werden. Die Expression von *Tf2* LTR Retrotransposons wird von Cay1 unabhängig von Rap1 kontrolliert. Cay1 interagiert nämlich mit Cph2, einer Komponente des Clr6 Histondeacetylasekomplex II, und fördert die Bindung von Cph2 an Chromatin. Die Inhibierung von H3K9 Acetylierung an *Tf2*

Elementen durch Cay1 ist abhängig von Cph2 und dies erklärt zum Teil auch die erhöhte Expression von *Tf2* Retrotransposons in *cay1Δ* Zellen.

Diese Studie bietet die erste molekuläre Beschreibung des *S. pombe* Cactin Proteins, Cay1, und enthüllt dessen zentrale Funktion in der Regulierung von Genexpression an Telomeren und Retrotransposons durch Kontrolle von Chromatinstruktur und prä-mRNA Spleissen.