

DISS. ETH no. 22644

# Maintenance of chromatin integrity by novel Cullin 4-based ubiquitin ligases

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Mia Mengxue Li Brodersen**

Master of Biochemistry, University of Oxford

born 18<sup>th</sup> November 1985

citizen of the United Kingdom

accepted on the recommendation of

Professor Matthias Peter, examiner

Professor Claus Azzalin, co-examiner

2015

---

## Summary

Cullin 4 (CUL4) is a scaffold protein capable of forming a multitude of E3 ubiquitin ligases. It is an important regulator of DNA replication and the DNA damage response. However, the molecular mechanisms of only a handful of Cullin 4-RING E3 ubiquitin ligases (CRL4s) are well understood. In an effort to fill this gap in knowledge, an RNAi-based live-cell imaging screen was carried out in the Peter group to identify new CUL4 adaptors that function in S phase. This led to the identification of two CUL4 adaptors WDR23 and WDR42a which are required for S phase progression and the characterisation of their functions became the focus of this PhD work.

DNA replication requires a steady supply of nascent histones for chromatin assembly. Changes in histone dosage have detrimental effects on the cell cycle, genome stability and development. Here, we present functional characterisation of CRL4<sup>WDR23</sup> showing that the ubiquitin ligase performs a novel function in stimulation of histone mRNA processing.

The stem-loop binding protein (SLBP) is an important regulator of histone mRNA processing and translation, and this protein was found to be a ubiquitylation target of CRL4<sup>WDR23</sup>. When the ubiquitylation activity of CRL4<sup>WDR23</sup> is disengaged through disruption of its complex formation or when WDR23 is downregulated in cells, unprocessed histone mRNAs were

strongly accumulated and the pool of histone proteins was depleted. The effect of this on cells was a significant reduction in replication fork speed, S phase delay through CHK1 activation and grossly impaired cell growth.

After replication begins, DNA double strand breaks (DSBs) that appear can be accurately repaired by homologous recombination using available nascent DNA as the template. The phenotypic characterisation of WDR42a depletion showed that its function is required for efficient homologous recombination repair of DSBs. Upon WDR42a depletion, this repair activity is reduced leading to strong accumulation of persistent DNA DSBs that activate the DNA damage checkpoint and trigger apoptosis.

The newly identified functions of the two CUL4 adaptors, WDR23 and WDR42a, in histone mRNA processing and homologous recombination repair respectively represent new insights into the range of regulatory roles performed by CUL4-based E3 ligases. These findings further highlight the importance of CUL4 in DNA replication and also emphasise the functional diversity of CUL4s in maintaining a normal S phase. Using the range of substrate specific adaptors at its disposal, CUL4 is able to juxtapose and integrate different functionalities to fulfil its overall goal as a guardian of chromatin integrity. Ultimately, the characterisation of more CUL4 adaptors, including the two presented here, will lead us to a better understanding of how CUL4 maintains normal replication and genome stability.

# Zusammenfassung

Das Protein Cullin4 (CUL4) ist strukturgebend für eine Vielzahl von E3-Ubiquitin-Ligasen und hat eine wichtige regulatorische Funktion während der DANN-Replikation sowie in der DNA-Schadensantwort. Trotz der tragenden Rolle dieser Cullin-4-basierten E3-Ubiquitin-Ligasen (CRL4) sind die molekularen Details ihrer Funktion kaum bekannt.

Um die zelluläre Aufgabe verschiedener CRL4s besser zu verstehen, hat das Labor von Professor Matthias Peter einen Mikroskopie-basierten RNAi-Screen durchgeführt, der darauf abzielte neue S-Phase-spezifische CUL4-Adaptoren zu identifizieren. Im Zuge dessen wurden die zwei neuen CUL4-Adaptoren WDR23 und WDR42a isoliert, die für den Ablauf der S-Phase wichtig sind. Die detaillierte funktionale Charakterisierung dieser Adaptoren ist der Fokus dieser Doktorarbeit.

Für die Assemblierung von Chromatin während der DNA-Replikation benötigt es einen stabilen Pool von naszenten Histonen. Jegliche Änderung der Histonmenge hat fatale Auswirkungen auf Zellzyklus, Genomstabilität und Entwicklung. In dieser Arbeit zeigen wir eine bisher nicht bekannte Funktion der CRL4<sup>WDR23</sup>-Ligase in der Prozessierung von Histon-mRNA. Unsere Untersuchung hat ergeben, dass die CRL4<sup>WDR23</sup>-Ligase das „stem-loop“-bindende Protein (SLBP) ubiquitiniert, das seinerseits die Prozessierung und Translation von Histon-mRNA reguliert. Wenn die

Ubiquitinierungs-Aktivität von CUL4<sup>WDR23</sup> durch die Inhibierung der Komplexformation aufgehoben oder WDR23 herunterreguliert wird, akkumuliert in der Zelle unprozessierte mRNA und die Histonzahl sinkt merklich. Als direkte Konsequenz beobachteten wir eine signifikante Reduktion der Geschwindigkeit von Replikationsgabeln, eine Verzögerung der S-Phase durch die Aktivierung von CHK1 sowie einen generellen Effekt auf das Zellwachstum.

Direkt nachdem die Zelle die DNA-Replikation initiiert hat, werden dabei auftretende Doppelstrangbrüche (DSBs) akkurat mittels homologer Rekombination und naszenter DNA als Vorlage repariert. Die phänotypische Charakterisierung von der Herunterregulierung von WDR42a hat ergeben, dass die Funktion des Proteins entscheidend für die effiziente Reparatur nach dem Prinzip der homologen Rekombination ist. Die Herunterregulierung von WDR42a führt dazu, dass persistierende Doppelstrangbrüche den „DNA-Damage-Checkpoint“ aktivieren und in letzter Konsequenz Apoptose auslösen.

Die Identifizierung und detaillierte Charakterisierung der jeweiligen Funktion der CUL4-Adaptoren WDR23 und WDR42a in der Prozessierung von Histon-mRNA sowie der homologen Rekombination ermöglichte neue Einsichten in die Funktionsbandbreite der CUL4-basierten E3-Ligasen. Diese Arbeit unterstreicht die Relevanz von CUL4 während der DNA-Replikation und verdeutlicht die funktionale Diversität von CUL4s für einen problemlosen Ablauf der S-Phase. Durch eine Reihe von substratspezifischen Adaptoren kann CUL4 parallel unterschiedlichste Funktionen wahrnehmen und wird so seiner übergeordneten Rolle gerecht, die Chromatin-Integrität zu schützen. Langfristig wird die Charakterisierung von weiteren CUL4-Adaptoren, ähnlich wie in dieser Arbeit aufgezeigt, zu einem besseren

Verständnis der Funktion von CUL4 zur Erhaltung der Genomintegrität führen.