

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

UMI[®]

Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

Université de Sherbrooke

HnRNP A1 et UP1: maturation, liaison aux séquences télomériques et

modulation de la réplication des télomères *in vitro*

Par

Frédéric Dallaire

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en Microbiologie

août 1999



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56887-3

Canada

Table des matières

Liste des figures.....	ii
Listes des sigles, abréviations et symboles	iv
Résumé	
1. Introduction	p. 1
2. Matériel et Méthodes	p. 36
3. Résultats	p. 58
4. Discussion et Conclusion	p. 96
5. Remerciements	p. 107
6. Liste des références.....	p. 108

Listes des figures

- Figure 1. Mode d'action proposé de la télomérase sur les extrémités d'ADN simple-brin..... p. 14
- Figure 2. Mutagenèse dirigée par oligonucléotide de l'ADNc de la protéine hnRNP A1 cloné dans le plasmide pK+ Δ XbaI-TAG-A1, au niveau des acides aminés aux abords du site de clivage de A1 en UP1..... p. 38
- Tableau 1. Constructions plasmidiques réalisées. p. 40
- Figure 3. Cartes de restriction de clonages effectués..... p. 41-42
- Figure 4. Essai de clivage de A1 en UP1 *in vitro* et *in vivo*..... p. 61
- Figure 5. La conversion de A1 en UP1 ne serait pas nécessaire pour son activité sur les télomères. p. 66-67
- Figure 6. Spécificité de liaison de A1/UP1 aux répétitions télomériques. p. 72-73
- Figure 7. Différence de liaison de GST-UP1 et UP1 à des oligonucléotides possédant des répétitions télomériques. P. 77
- Figure 8. Modèle de liaison de UP1 et GST-UP1 aux oligonucléotides Tel2, Tel4, Tel6 et TS10. p. 79-80
- Figure 9. Influence de A1/UP1 sur l'activité de l'ADN polymérase α *in vitro*.. p.83-84

Figure 10. Influence de UP1/A1 sur l'activité télomérasique *in vitro*. p. 91

Figure 11. UP1 inhibe l'activité TdT. p. 94

Figure 12. Modèle du maintien des extensions simple-brin par A1/UP1. p. 106

Listes des sigles, abréviations et symboles

α -MEM	"alpha Modified Eagle Medium"
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	Sulfate d'ammonium
μCi	microCurie
μg	microgramme
μl	Microlitre
μM	micromolaire
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
BSA	"Bovine serum albumine"
CaPO_4	Phosphate de Calcium
cm^2	centimètre ²
D.O.	Densité optique
dA ou dATP	2'-déoxyadénosine 5'-triphosphate
dC ou dCTP	2'-déoxycytidine 5'-triphosphate
dG ou dGTP	2'-déoxyguanosine 5'-triphosphate
dI	2'-déoxinosine 5'-triphosphate
D-MEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
dNTPs	déoxyribonucléotides 5'triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Tétraacétate d'Éthylènediamine disodium

EGTA.....	acide Éthylène Glycol-bis(β-aminoéthyl éther)-N,N,N'.N'-tétracétique
EST	Ever Shorter Telomere
<i>g</i>	Force gravitationnelle
<i>g</i>	gramme
GST	Gluthatione-S-Transférase
Hepes.....	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- piperazineéthane-sulfonique
hnRNP.....	"Heterogenous nuclear ribonucleoprotein"
IPTG.....	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobases
KCl.....	Chlorure de potassium
kDa.....	KiloDalton
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
K ₂ HPO ₄	Phosphate de potassium dibasique
LB	Bouillon Luria
LTR.....	"Long terminal repeats"
M.....	Molaire
mg	milligramme
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
ml	Millilitre
mM.....	Millimolaire
mmol	Millimole

NaH ₂ PO ₄	Phosphate de Sodium monobasique
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de Sodium dibasique
Na ₂ S ₂ O ₅	Métabisulphite de sodium
NaCl.....	Chlorure de sodium
NaOAc.....	Acétate de sodium
NaOH.....	Hydroxide de sodium
NE.....	Extrait nucléaire
ng.....	nanogramme
nm.....	nanomètre
nt.....	Nucléotide
Oligo.....	Oligonucléotide
PAGE.....	"Polyacylamide gel electrophoresis"
pb.....	paire de bases
PBS.....	Phosphate buffered saline
PCNA.....	Proliferating cell nuclear antigen
PCR.....	Polymerase chain reaction
pH.....	mesure de l'acidité
pmoles.....	picomoles
PMSF.....	Fluoride de phénylméthylsulfonyl
Pol.....	Polymérase
Ppi.....	Pyrophosphate
Pyrimidines.....	T et C
rA ou rATP.....	adénosine 5'-triphosphate

RBD	RNA binding domain
rC ou rCTP	cytidine 5'-triphosphate
rG ou rGTP	guanosine 5'-triphosphate
rNTPs	ribonucléotides 5'triphosphate
RPA	"Replication protein A"
RPM	Révolution par minute
RRM	"RNA recognition motif"
rTP	"Replication terminale protein"
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium Dodécyl sulfate
snRNPs	"Small nuclear ribonucleoproteins"
T ou TTP	2'-déoxythymidine 5'-triphosphate
TBS	"Tris-buffered saline"
TBST	"Tris-buffered saline 0.05% Tween 20"
TCA	acide trichloroacétique
TdT	Terminal deoxynucléotidyl transférase
TE	Tris-EDTA 10:1 (10 mM:1 mM)
U ou UTP	uridine 5'-triphosphate
U	unité
UP	primer universel
V	Volt
V/H	Volt/heure

Université de Sherbrooke
HnRNP A1 et UP1: maturation, liaison aux séquences télomériques et modulation de
la réplication des télomères *in vitro*
Frédéric Dallaire
Département de Microbiologie et d'Infectiologie
Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie et Infectiologie
Août 1999

Résumé

Des résultats antérieurs ont montré que la protéine hnRNP A1 est impliquée dans l'allongement des télomères. Le fragment N-terminal de A1, nommé UP1, est lui aussi en mesure de provoquer l'allongement des télomères dans une lignée cellulaire de souris. A1 et UP1 sont tous deux capables de lier spécifiquement des répétitions télomériques *in vitro*, mais seul UP1 possède la capacité d'interagir avec la télomérase. Donc, A1/UP1 semble être important pour la modulation de l'allongement des télomères. Malgré des évidences suggérant l'existence d'une activité protéolytique permettant de convertir A1 en UP1, mes résultats n'ont pas révélé une telle activité *in vivo* ni *in vitro*. De plus, la mutation des acides aminés au site de clivage présumé n'affecte pas l'activité de A1 sur les télomères. Ces résultats suggèrent que la conversion de A1 en UP1 n'est pas nécessaire à son activité sur les télomères. L'interaction spécifique de UP1 avec la télomérase pourrait refléter le besoin d'une modification post-traductionnelle influençant la structure du domaine riche en glycines (e.g., phosphorylation). Un modèle de la liaison de UP1 sur des répétitions télomériques simple-brin humaines a pu être établi. Ce modèle propose que UP1

pourrait se lier sous forme de dimère à deux séquences TAGGGT. Finalement, A1/UP1 est capable d'inhiber l'activité de deux enzymes répliquant les télomères, soit la télomérase et l'ADN polymérase α . UP1 inhibe aussi la déoxynucléotidyl transférase terminale lorsqu'un site de liaison pour UP1 est présent sur le substrat. Mes résultats suggèrent qu'A1/UP1 pourrait contribuer à la formation d'une structure capable de bloquer l'accès aux facteurs normalement chargés de reconnaître les bris d'ADN.

1. Introduction

Les organismes eucaryotes unicellulaires et multicellulaires possèdent des chromosomes linéaires. Ces chromosomes contiennent toutes l'information génétique essentielle pour le fonctionnement et la survie des cellules. L'extrémité des chromosomes a été nommée télomère par H.J. Muller. Ce dernier suggérait que comme, suite à des cassures chromosomiques induites par irradiation aux rayons X chez la *Drosophila*, on ne retrouvait que des chromosomes complets sans cassure, ceci indiquait que le télomère était essentiel pour la survie des organismes (Muller, 1938). Il supposait également que les télomères devaient être présents à l'extrémité naturelle de tous les chromosomes eucaryotes (Muller, 1938). Basée sur des observations génétiques et cytologiques, McClintock a rapporté que des chromosomes brisés chez le maïs fusionnaient fréquemment avec d'autres chromosomes brisés pour générer des chromosomes dicentriques, destinés à se briser à la prochaine division. Parce que des chromosomes munis de télomères ne fusionnent pas avec d'autres, elle émit l'hypothèse que la fonction essentielle des télomères est de protéger contre leur fusion bout-à-bout (McClintock, 1939, McClintock, 1942).

Les protozoaires ciliés comme *Tetrahymena* (Blackburn et Gall, 1978) et *Oxytricha* (Klobutcher et al., 1981) ont facilité la recherche sur les télomères de par leur nombre élevé d'extrémités chromosomiques. Après la méiose, d'une manière régulée selon le développement, les chromosomes des ciliés sont clivés en fragments de taille subchromosomale. Ces fragments sont répliqués pour générer un noyau polyploïde, le macronoyau, lequel contient des millions de télomères (Prescott, 1994). Ainsi,

comparé au modeste nombre de chromosomes (et donc des télomères) de la plupart des organismes, le macronoyau des ciliés est une riche source d'ADN télomérique, de protéines structurales et d'enzymes qui protègent et répliquent cet ADN. Malgré la structure nouvelle du macronoyau des ciliés, plusieurs caractéristiques (structure, fonction) des télomères des ciliés sont aussi partagés par les télomères d'organismes comme la levure et l'humain.

Structure et séquences des extrémités chromosomiques

Les extrémités des chromosomes de plusieurs organismes eucaryotes ont été isolées et séquencées, divisant celles-ci en deux sections: l'ADN sous-télomérique, plus centromérique et l'ADN télomérique terminal, situé à l'ultime extrémité des chromosomes. À l'opposé de l'ADN télomérique terminal, l'ADN sous-télomérique n'est pas conservé entre les espèces, possède une structure très variable et sa fonction est souvent inconnue (Murray et Szostak, 1986).

L'ADN télomérique terminal possède une caractéristique structurale commune aux télomères eucaryotes, c.-à-d. la présence de répétitions en tandem d'une courte (5-8 nt) séquence, qui est riche en G sur le brin d'ADN s'étendant en direction 5'→3'. Ces répétitions sont, selon les études génétiques chez *Saccharomyces cerevisiae*, nécessaires et suffisantes pour la fonction des télomères (Szostak et Blackburn, 1982, Lundblad et Szostak, 1989). Voici quelques exemples de répétitions terminales: TTTTGGGG chez *Oxytricha* (Klobutcher et al., 1981), (TTGGGG)_n chez *Tetrahymena thermophila* (Blackburn et Gall, 1978), (TTTAGGG)_n chez les plantes

(Richards et Ausubel, 1988), TTAGGG chez les trypanosomes et les mammifères (Blackburn et Challoner, 1984, Van der Ploeg et al., 1984, Moyzis et al., 1988, Brown, 1989, Meyne et al., 1989). Cependant, chez des espèces de levures, ces séquences terminales sont très divergentes en contenu et en longueur (McEachern et Blackburn, 1994, Cohn et al., 1998). La levure *Kluyveromyces lactis* possède une répétition télomérique particulièrement large et parfaitement répétée de 25 pb (McEachern et Blackburn, 1994). Chez *S. cerevisiae* et la levure à fission *Shizosaccharomyces pombe*, les séquences télomériques sont plus courtes et imprécises, soit 5'-TG₁₋₃-3' et 5'-GGTTACA-3', respectivement (Shampay et Blackburn, 1988, Hiraoka et al., 1998). Même si les télomères d'un même génome sont constitués des mêmes répétitions, les séquences terminales répétées varient donc en fonction des espèces. Il existe par contre des exceptions. Chez la Drosophile, deux éléments transposables télomères-spécifiques faisant partie d'une famille de rétrotransposons long interspersed elements (LINEs) non-LTR et polyadénylés (Biessmann et al., 1992a, Biessmann et al., 1992b, Danilevskaya et al., 1992, Biessmann et al., 1994, Danilevskaya et al., 1994) ont été retrouvés aux extrémités des chromosomes. Le premier, Het-A (6 kb), est capable de "guérir" des chromosomes délétés aux extrémités (Mason et Biessmann, 1995). L'autre, TART (10 kb), a des caractéristiques similaires (Sheen et Levis, 1994) à Het-A mais code pour une reverse transcriptase à l'opposé de Het-A. Ces éléments forment des chaînes de répétitions aux extrémités des chromosomes de la Drosophile. Chez l'algue *Chlorella*, un élément transposable nommé Zepp ayant les caractéristiques des rétrotransposons non-viral (LINE-like) est

retrouvé parfois avec ou sans séquences télomériques associées. Zepp a la propriété de s'insérer à l'intérieur de lui-même au niveau des télomères [Higashiyama et al, 1997].

Le séquençage des télomères a révélé une autre caractéristique des extrémités des chromosomes eucaryotes: le brin télomérique riche en G s'étend au-delà du brin riche en C, créant une extension simple-brin 3'. Chez les ciliés, cette extension est de 12 à 16 nt et elle persiste tout au long du cycle de vie végétatif de l'organisme (Klobutcher et al., 1981, Henderson et Blackburn, 1989). Au contraire, chez *S. cerevisiae*, des extensions G-riche plus longues qui sont plus variables en longueur (50-100 nt) ont été détectées pendant la phase S tardive, phase durant laquelle les télomères sont répliqués (Wellinger et al., 1993a, Wellinger et al., 1993b). Des extensions encore plus grandes (50-150 nt) ont été détectées chez l'humain (Makarov et al., 1997, McElligott et Wellinger, 1997, Wright et al., 1997). Ainsi, même si elles peuvent être très variables en longueur, les extensions 3' simple-brin des télomères sont conservées chez différents eucaryotes. Avoir une extension simple-brin semble donc être critique, car seulement cette forme peut servir de substrat à la télomérase (voir plus loin) (Lingner et Cech, 1996).

La longueur des télomères est généralement mesurée comme la taille moyenne des fragments de restriction terminaux (TRFs), libérés par digestion avec des enzymes de restriction coupant souvent dans le génome. Ces fragments comprennent des séquences sous-télomériques en plus des répétitions télomériques normales. Les TRFs généralement apparaissent comme une traînée sur un gel, parce qu'à la fois la taille de la région sous-télomérique et le nombre de répétitions varient sur différentes

extrémités de chromosomes. Ainsi, en moyenne, les TRFs humains sont de 3 à 20 kb (Harley, 1991).

Rôles des télomères

Positionnement dans le noyau

Chez les levures à fission et à bourgeonnement, les télomères sont arrangés en groupes et localisés préférentiellement à la périphérie nucléaire (Funabiki et al., 1993, Gilson et al., 1993, Gilson et al., 1994). Il a également été montré que Rap1 et les protéines Sir (voir plus loin) colocalisent avec l'ADN sous-télomérique en 6-8 foyers dans le noyau, se retrouvant en périphérie nucléaire (Palladino et al., 1993, Gotta et al., 1996, Gotta et al., 1997.). Cette localisation périphérique est partagée par les télomères des chromosomes polytènes de la *Drosophile* (Agard et Sedat, 1983), de la plante *Pisum sativum* (Rawlins et Shaw, 1990), de *Trypanosoma brucei* (Chung et al., 1990) et des cellules germinales de vertébrés durant les phases précoces de la première division méiotique (Kipling et al., 1995). Par contre, dans le noyau des cellules somatiques de mammifères, les télomères sont situés à des positions très variables, quoique des évidences de distribution spatiale de télomères individuels selon le type cellulaire ou le stage du cycle cellulaire ont été montré chez plusieurs organismes (Manuelidis et Borden, 1988, Vourc'h et al., 1993). Le seul chromosome à occuper une localisation périphérique est le chromosome X inactif des mammifères femelles (Walker et al., 1991).

Les télomères humains ont été montrés comme étant associés à la matrice nucléaire (de Lange, 1992), définie comme une composante insoluble du noyau comprenant l'enveloppe nucléaire et des protéines internes. Cette association dépend des répétitions TTAGGG, de leur position à l'extrémité des chromosomes et d'un facteur protéique (de Lange, 1992). En vérifiant cette association chez des lignées cellulaires de mammifères ayant différentes tailles de télomères, les points d'attache semblent s'étendre sur 20-30 kb de séquences télomériques, à un point d'ancrage par kilobases (kb) (Luderus et al., 1996). La protéine TRF1, qui lie les répétitions TTAGGG double-brin chez les mammifères (voir plus loin), cofractionne avec les préparations de matrices et colocalise avec l'ADN télomérique au niveau du noyau, suggérant que cette protéine pourrait être impliquée dans l'association des télomères à la matrice. Les télomères semblent donc aider au positionnement des chromosomes dans le noyau par son association à la matrice nucléaire et sa localisation périphérique chez plusieurs espèces.

Silence transcriptionnel des gènes adjacents

Chez la levure, les gènes adjacents aux télomères subissent une répression transcriptionnelle, qui est causée par leur position télomère-proximale (Gottschling et al., 1990). Des protéines liant les télomères sont impliquées dans ce processus, telles Rap1 et les protéines SIR2, SIR3 et SIR4, qui répriment également la transcription des gènes des loci "mating-type" HML et HMR, situés à proximité de sites de liaison pour Rap1 (voir plus loin). Ainsi, les télomères de levures sont impliqués dans la répression transcriptionnelle des gènes qui leur sont adjacents.

Réplication et Protection contre les nucléases

Les chromosomes eucaryotes font face au "End-replication-problem" (Olovnikov, 1971, Watson, 1972, Olovnikov, 1973). Les polymérase conventionnelles répliquent l'ADN seulement en direction 5'→3' et ne peuvent initier la synthèse de chaîne d'ADN *de novo*. Pour l'initiation de la synthèse, une courte amorce d'ARN de 7-14 nt est synthétisée en direction 5'→3' par la primase, qui fait partie du complexe polymérase α -primase. *In vitro*, une séquence riche en pyrimidines longue de 5-10 nt est préférée par le complexe ADN polymérase α -primase pour initier la synthèse (Badaracco et al., 1986). L'amorce est alors allongée en ADN par l'ADN polymérase α . Par contre, cette dernière est modérément processive et se dissocie facilement de l'ADN (10-60 nt de synthèse). Le "replication factor C" (RF-C) reconnaît alors l'extrémité 3' naissante, s'y attache et recrute le facteur de processivité PCNA "proliferating cell nuclear antigen". Ces facteurs induisent la dissociation du complexe pol α -primase et recrutent la polymérase δ et/ou ϵ (Tsurimoto et Stillman, 1991, Waga et al., 1994, Maga et Hubscher, 1995), lesquelles vont continuer la synthèse en continue pour le brin avancé (5'→3') et vont former un fragment d'Okasaki pour le brin retardé (3'→5'), d'une longueur de 100-200 nt chez les eucaryotes (Burgers, 1991, Siegal et al., 1992, Waga et al., 1994, Waga et Stillman, 1994, Zlotkin et al., 1996). La "replication protein A" (RPA), qui interagit avec la pol α (Dornreiter et al., 1992, Longhese et al., 1994), aide celle-ci et les pols δ/ϵ en se liant à l'ADN simple-brin, réduisant la réhybridation de celui-ci et favorisant la synthèse. La RNase HI reconnaît la jonction ADN-ARN et clive l'amorce d'ARN en une coupure unique juste en 5' du dernier ribonucléotide, peu importe si l'amorce forme ou non un hétéroduplexe avec l'ADN

matrice (Eder et al., 1993, Turchi et al., 1994, Murante et al., 1998). Le dernier ribonucléotide et une courte région de l'ADN suivant devenant non-hybridés à l'ADN matrice après l'action de la RNase, la flap endonucléase, qui utilise uniquement ce type substrat, enlève le dernier ribonucléotide et un peu d'ADN par clivage endonucléolytique. Le brin en synthèse situé en amont du site de clivage est allongé par la machinerie de réplication en place et les brins d'ADN sont ligués par la DNA ligase I, générant une molécule double-brin complète. Ces événements se produisent tous, sauf pour l'ultime extrémité du chromosome, au niveau du brin retardé des télomères. Quand l'amorce terminale d'ARN est enlevée, il n'y a plus moyen de resynthétiser la séquence du brin retardé qui est complémentaire à la région de l'amorce, car il n'y a pas de brin naissant à liguer ou pour servir d'amorce 3'OH à la synthèse. Des extrémités à bouts-francs sont générées à l'une des extrémités issues de la synthèse du brin avancé, et des extensions 3' seront donc obtenues de la synthèse du brin retardé. Ainsi, au fil des divisions cellulaires, des séquences sont non-répliquées et perdues à l'extrémité des chromosomes linéaires, raccourcissant d'au moins 7-14 bases à chaque phase S, et le taux de perte peut être encore plus rapide s'il y a dégradation ou si l'amorce n'est pas située à l'ultime extrémité du chromosome. Les cellules somatiques répliquatives de mammifères perdent environ 30-200 paires de bases (pb) de séquences télomériques par division (Harley et Villeponteau, 1995).

La perte de séquences télomériques chez la levure se produit en absence de division cellulaire et à un taux plus rapide que celui attendu par le "end-replication problem". Ainsi, elle doit être le produit d'une dégradation par de potentielles exonucléases (Wellinger et al., 1993b, Dionne et Wellinger, 1996). Une autre fonction des

télomères nous vient donc ici de cette évidence chez la levure: les télomères de levures sont essentiels pour l'intégrité des chromosomes et les préserver contre la dégradation. Comme les chromosomes de levure sans ADN télomérique sont perdus à un taux très élevé (Sandell et Zakian, 1993), cette protection prend donc toute son importance. La propriété des télomères à protéger contre la dégradation semble être une propriété qui lui est conféré par les protéines qui le lie (voir plus loin).

Il y a une corrélation entre le raccourcissement des télomères des cellules somatiques des organismes multicellulaires et l'âge cellulaire. La longueur des télomères peut prédire la capacité réplivative *in vitro* des cellules souches: des cellules avec de longs télomères ont un plus grand potentiel prolifératif (Allsopp et al., 1992). La perte de télomères a été associée avec l'âge *in vivo*: des plus vieux individus ont des télomères plus courts que de jeunes individus (Harley et al., 1990, Hastie et al., 1990, Lindsey et al., 1991, Vaziri et al., 1993). Ces évidences ont conduit à l'hypothèse que le raccourcissement des télomères aurait la fonction d'agir comme une horloge mitotique qui compte le nombre de divisions cellulaires et limite la prolifération cellulaire en signalant l'entrée en sénescence (Olovnikov, 1973, Harley, 1991, Harley et al., 1992). Le mode d'action proposé est qu'une fois que les télomères raccourcissent en dessous du seuil critique, ils perdent leur capacité à fournir un cap aux extrémités des chromosomes. Ceci active les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (médiés par p53, pRb, p21) qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire (Harley et Villeponteau, 1995). Chez l'humain, la longueur des télomères, la capacité réplivative des cellules somatiques et la durée de vie de l'organisme semblent être en corrélation. Par contre, entre les mammifères, cette situation est différente. La souche de souris

Mus musculus possède des télomères de 50-150 kb pour une durée de vie d'environ deux ans (Kipling et Cooke, 1990, Starling et al., 1990), tandis que l'homme a des télomères de 5-30 kb et vie environ 90 ans, et une autre souche de souris (*Mus spretus*), qui possède des télomères de la taille de ceux de l'humain, ne vit que deux ans (Starling et al., 1990, Prowse et Greider, 1995). Ainsi, des mécanismes supplémentaires à la taille seule des télomères doivent intervenir pour relier âge cellulaire et durée de vie des organismes chez les mammifères.

Afin d'acquies l'immortalité, des cellules précancéreuses doivent empêcher cette horloge des générations qui détermine leur potentiel de croissance limité. Elles peuvent le faire en mutant ou bloquant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, ce qui va prolonger leur capacité proliférative jusqu'à un deuxième point: lorsqu'il reste vraiment trop peu d'ADN télomérique pour empêcher la dégradation exonucléolytique de gènes importants. L'immortalité peut être également acquise si un mécanisme de préservation des répétitions télomériques est mis en place. Les organismes unicellulaires et les cellules germinales, qui ont une capacité proliférative illimitée, ont acquis ce mécanisme afin de contrer la réplication incomplète des extrémités des chromosomes (Olovnikov, 1973).

La télomérase

La plupart des cellules mentionnées ci-haut emploient la télomérase pour répondre au besoin d'immortalité et donc pour répliquer les extrémités de leurs chromosomes. Ainsi, le raccourcissement des télomères chez ces cellules ne conduit pas nécessairement à la mort et/ou le sénescence, car l'activation de la télomérase conduit à la stabilisation ou le rallongement des télomères.

L'enzyme appelée "telomere terminal transferase" a d'abord été identifiée chez trois protozoaires ciliés. Premièrement, une activité *in vitro* qui ajoute des répétitions TTGGGG sur l'extrémité 3' d'une amorce (TTGGGG)₄ simple-brin a été isolée chez *Tetrahymena* (Greider et Blackburn, 1985) de même que chez *Oxytricha* (Zahler et Prescott, 1988) et *Euplotes* (Shippen-Lentz et Blackburn, 1989). L'enzyme de *Tetrahymena* est une ribonucléoprotéine possédant un ARN de 159 nt contenant 9 nt complémentaires à une répétition et demi TTGGGG, suggérant que cette séquence agit comme une matrice interne (Greider et Blackburn, 1987, Greider et Blackburn, 1989). Une substitution de 2 nt dans cette région de l'ARN de *S. cerevisiae* (*TLC1*) est incorporé dans l'ADN télomérique, confirmant que ce domaine sert de matrice pour l'ajout de télomères (Singer et Gottschling, 1994). Utilisant un essai d'activité télomérasique basé sur celui employé chez les ciliés, Morin (1989) a identifié une activité similaire dans des extraits totaux de cellules HeLa. L'enzyme humaine a pour séquence d'ARN matrice 5'-CUAACCCUAAC-3' qui permet d'ajouter des répétitions de 6 nt TTAGGG à un oligonucléotide contenant des répétitions télomériques

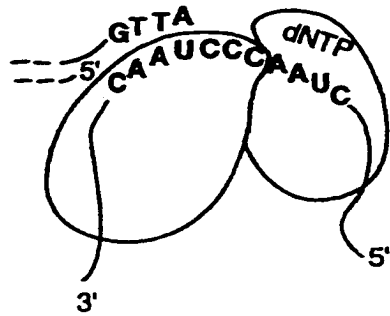
humaines ou non-humaines (Feng et al., 1995). Le maintien des télomères par la télomérase semble être un mécanisme partagé entre les eucaryotes.

Des séquences télomériques peuvent être ajoutées par la télomérase à des amorces qui ne contiennent pas de complémentarité avec l'ARN de la télomérase mais qui possèdent une séquence riche en G pouvant recruter la télomérase (Szostak et Blackburn, 1982, Pluta et al., 1984, Champay et al., 1984, Greider et Blackburn, 1985, Greider et Blackburn, 1987). Yu et Blackburn (1991) ont montré que la télomérase peut ajouter des répétitions à des extrémités chromosomiques cassées. Ainsi, la télomérase possède une propriété de liaison à l'ADN séquence-indépendante qui requiert un site cible correspondant à celui utilisé *in vivo* pour l'ajout de séquences télomériques *de novo*. Par contre, la structure terminale simple-brin doit permettre l'extension par la télomérase. Des études *in vitro* ont montré que la télomérase ne peut allonger des extrémités à bouts francs (Lee et Blackburn, 1993), requiert une extension 3' et ne peut allonger des structures G-quartets *in vitro* (Zahler et al., 1991). Il a été proposé qu'une exonucléase 5'-3' pourrait générer l'extension appropriée dans des circonstances spécifiques (Kramer et Haber, 1993, Wellinger et al., 1993b).

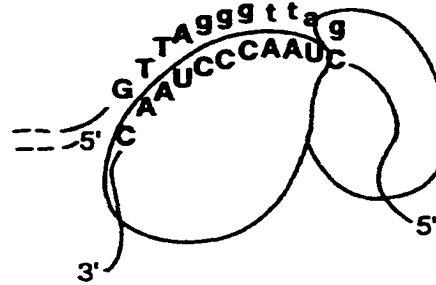
In vitro, la télomérase allonge une amorce télomérique, qui aligne le domaine matrice via des appariements Watson-Crick (Greider et Blackburn, 1989). La télomérase allonge alors l'amorce par polymérisation un nucléotide à la fois tout au long de la matrice d'ARN vers la frontière en 5'. L'activité polymérisatrice de la télomérase est par contre restreinte à la copie de la portion matrice de son ARN. Chez *T. thermophila* et *S. cerevisiae*, des mutations dans la séquence de l'ARN adjacent au domaine

matrice permet à la polymérisation de continuer au-delà de la matrice normale. Ainsi, la structure de l'ARN de la télomérase où les interactions en dehors de la région matrice semble prévenir la polymérisation au-delà de la région matrice (Autexier et Greider, 1995, Prescott et Blackburn, 1997). Par contre, en dehors de la région matrice, il y a peu de similarité de séquences entre les ARNs des différentes espèces. La polymérisation effectuée par la télomérase de la majorité des organismes (*Tetrahymena thermophila*, *E. aedicularis*, *S. castellii*, *S.cerevisiae*, mammifères) est translocative, c.-à-d. qu'après la première ronde de polymérisation, la télomérase se déplace pour repositionner l'extrémité 3' de l'amorce nouvellement allongée au début de la matrice sans relâchement du produit (Greider et Blackburn, 1989). Une nouvelle élongation est alors effectuée et ce processus est répété. La télomérase humaine peut synthétiser de 65 à 70 répétitions TTAGGG *in vitro* dans des conditions optimales (Morin, 1989), alors que celle de *Tetrahymena* peut allonger jusqu'à 8000 nt (Blackburn et al., 1989). Ce processus d'élongation par la télomérase chez les mammifères est représenté à la figure 1.

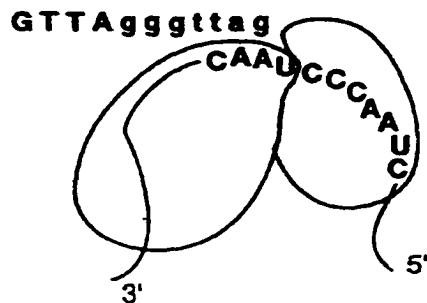
Liaison à l'amorce télomérique



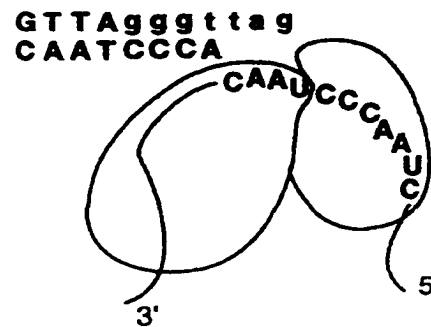
Polymérisation d'un segment de télomères



Translocation de la télomérase



Polymérisation du brin complémentaire



Répétition du processus

Figure 1. Modèle représentant le processus d'élongation par la télomérase chez les mammifères (Greider, 1996).

Phénotypiquement, une délétion du gène de l'ARN de la télomérase de levure *TLCl* ou de la protéine EST2 (voir ci-bas) conduit à un raccourcissement progressif des télomères, ce qui résulte en une diminution graduelle du taux de croissance et de viabilité, et à l'arrêt de la division cellulaire (Singer et Gottschling, 1994, Lendvay et al., 1996, Counter et al., 1997, , Lingner et al., 1997a). Ce phénotype ressemble à la même situation des cellules somatiques chez les organismes multicellulaires.

Les deux premières protéines identifiées comme étant associées à la télomérase sont les protéines de 80 et 95 kDa de *T. thermophila*, qui copurifient avec l'activité télomérasique et avec la sous-unité ARN (Collins et al., 1995). Ces protéines forment un complexe qui s'associe avec l'ARN de la télomérase (via p80) et avec le substrat d'ADN télomérique (via p95) (Collins et al., 1995, Harrington et al., 1995, Garndhi et Collins, 1998). Une protéine (TP1/TLP1) homologue à p80 a été identifiée et est associée avec l'ARN de la télomérase de rat, de souris et de l'humain (Harrington et al., 1997a, Nakayama et al., 1997). Cependant, TP1 ne possède pas de domaines réverse transcriptase, suggérant que cette protéine est peut-être associée avec la sous-unité catalytique dans un complexe télomérasique à plusieurs composants.

Deux protéines télomérasiques de *Euplotes aediculatus*, de 43 et 123 kDa, sont apparemment non-relées aux protéines de *Tetrahymena thermophila* (Lingner et Cech, 1996, Counter et al., 1997, Hammond et al., 1997, Lingner et al., 1997b). L'homologue de p123 chez la levure, Est2p (103 kDa), a été identifié indépendamment dans une recherche pour des mutants de levures montrant une réduction de la taille des télomères et montrant de la sénescence (Lendvay et al.,

1996). Des gènes homologues à Ea-p123 et Sc-Est2p ont été identifiés chez l'humain (127 kDa), la souris (128 kDa), la levure à fission (SpTrt1, 116 kDa), *Tetrahymena thermophila* (133 kDa) et *Oxytricha* (134 kDa)(Harrington et al., 1997b, Kilian et al., 1997, Meyerson et al., 1997, Nakamura et al., 1997, Bryan et al., 1998, Greenberg et al., 1998, Martin-Rivera et al., 1998). Ici, nous référons à cette famille de protéines comme les Telomérase Reverse Transcriptases (TERTs). Est2 et p123s ont une similarité de 20% et contiennent six des sept motifs conservés dans le domaine réverse transcriptase (RT). Des mutations des résidus conservés dans les motifs RT des TERTs résultent dans une perte de l'activité télomérase chez la levure et l'humain (Counter et al., 1997, Harrington et al., 1997b, Lingner et al., 1997a, Weinrich et al., 1997, Nakayama et al., 1998). L'induction de l'expression du gène hTERT rétablit l'activité télomérasique chez des cellules télomérase négative. La composante ARN de la télomérase est aussi exprimée même dans des cellules sans activité télomérase, quoique à un niveau plus bas que dans des cellules immortelles télomérase positives (Feng et al., 1995, Avilion et al., 1996, Bryan et al., 1997) et prolonge leur durée de vie au-delà du stade de la crise. hTERT traduit *in vitro* et l'ARN de la télomérase humaine sont suffisants pour reconstituer l'activité télomérase (Weinrich et al., 1997, Beattie et al., 1998). Ces évidences suggèrent un rôle central de hTERT dans la régulation de la longueur des télomères et de la durée de vie des cellules humaines (Weinrich et al., 1997, Counter et al., 1998, Nakayama et al., 1998). La conservation des TERTs parmi les eucaryotes supporte le modèle que la télomérase a un noyau conservé (ARN plus TERT), avec d'autres sous-unités de l'holoenzyme variant entre les espèces.

Mécanismes alternatifs de maintien des télomères

Chez la *Drosophile*, le maintien des télomères se fait par transposition des éléments Het-A et TART. La séquence d'ARN de ces deux éléments est intégrée au niveau des télomères par reverse transcription de l'ARN complet, attaché aux télomères par leur queue poly(A), et ce indépendamment de la séquence de nucléotides qui s'y trouve (Biessmann et al., 1990, Biessmann et al., 1992a). TART code pour une reverse transcriptase qui est responsable de cette fonction, alors que Het-A est dépendant d'une enzyme externe pour pouvoir s'intégrer.

Même si la plupart des cellules de levure télomérase négatives meurent éventuellement, des survivants spontanés surviennent dans toutes les cultures, autant que les cellules possèdent un mécanisme de recombinaison actif. Un mode de recombinaison peut rescaper les cellules télomérase négative: la recombinaison homologue RAD52-dépendante. Chez *Saccharomyces*, la plupart des survivants acquièrent de longs bouts de séquences répétées de la région sous-télomérique par conversion génique (Wang et Zakian, 1990, Lundblad et Blackburn, 1993), générant des fragments de restriction terminaux (TRFs) hétérogènes et au moins aussi longs que ceux de la souche sauvage. Un phénomène similaire est observé chez la levure à fission *S. pombe*, où chez des mutants de l'ARN de la télomérase, des survivants à la sénescence peuvent être maintenus par un mécanisme de recombinaison ou une circularisation des chromosomes (Nakamura et al., 1998). La protéine liant les télomères de cette levure, Taz1p, inhibe la recombinaison chez les survivants, affectant donc la survie de ces organismes en absence de la télomérase (Cooper et al.,

1997, Nakamura et al., 1998). Des mécanismes indépendants de la télomérase peuvent aussi exister pour stabiliser la longueur des télomères humains. Reddel et al. (1999) ont montré que plusieurs lignées cellulaires humaines immortalisées et télomérases négatives possédaient des télomères longs et hétérogènes, et qu'un mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT) semblait réguler la taille de télomères individuels.

Implication de la télomérase

Chez l'humain, la majorité des tissus somatiques normaux n'ont pas d'activité télomérase, et leur télomères raccourcissent après chaque ronde de division cellulaire. Au contraire, les cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes T et B activés (Hiyama et al., 1995), les cellules germinales (Wright et al., 1996), les cellules épithéliales en régénération physiologique (Yasumoto et al., 1996), les cellules immortelles et la majorité des cellules primaires de tumeurs (Harley et al., 1994, Kim et al., 1994, Shay et Bacchetti, 1997) possèdent une activité télomérasique. Cette activité est détectée dans 80-90% des tissus tumoraux humains, où les cellules maintiennent stable la longueur de leurs télomères. Dans les tumeurs humaines et les cellules immortalisées, la sous-unité catalytique de la télomérase (hTRT/hEst2p) est surexprimée (Meyerson et al., 1997, Nakamura et al., 1997). De plus, dans des cellules souches humaines, l'activation de la télomérase provoque une extension de la vie cellulaire au delà du point de sénescence prévu et les cellules ne subissent plus de raccourcissement des télomères (Counter et al., 1992, Shay et al., 1993, Counter et al., 1994, Klingelhutz et al., 1994, Bodnar et al., 1998). Dans certains cas,

l'immortalisation et l'activation de la télomérase sont suivies par un allongement des télomères et non seulement une stabilisation (Klingelutz et al., 1994). La corrélation entre l'activation de la télomérase pendant l'immortalisation cellulaire et dans les tumeurs suggère que la télomérase pourrait être requise pour l'immortalité et la croissance tumorale *in vivo* (Harley et al., 1990, Counter et al., 1992, Haley et Kim, 1996).

Par contre, tel n'est pas toujours le cas. Quelques lignées cellulaires immortalisées ne contiennent pas d'activité télomérase et possèdent des télomères anormalement longs (Bryan et Reddel, 1997, Reddel et al., 1999). Également, les cellules hématopoïétiques montrent une perte graduelle de séquences télomériques malgré un faible niveau d'activité télomérase (Vaziri et al., 1993, Vaziri et al., 1994, Counter et al., 1995). Bryan et al (1995) ont montré que chez des fibroblastes humains sans activité télomérase transformés par SV40, seulement 57% des lignées cellulaires immortalisées par le virus subissent une réactivation de la télomérase. Les lignées télomérase- avaient des télomères très longs et hétérogènes, et des hybrides de cellules télomérase- et + entrent en sénescence, suggérant que l'immortalisation nécessite la présence de télomères stables mais que la réactivation de la télomérase n'est pas suffisante pour l'immortalisation ni pour cette stabilité télomérique. Blasco et al (1997) ont montré que chez des souris transgéniques déficientes en ARN de la télomérase et donc en activité télomérasique, les souris sont viables pendant 6 générations. Les cellules télomérase- ont pu être immortalisées en culture par des oncogènes viraux et générer des tumeurs dans les souris nues après transformation. Les télomères ont raccourci de 4.8 ± 2.4 kb par génération. Les souris de la quatrième

génération possédaient des chromosomes sans répétitions télomériques, de l'aneuploïdie, des anomalies chromosomiques et des fusions "end-to-end". Celles de la sixième génération étaient en plus infertiles, avaient une plus forte incidence au cancer et une durée de vie réduite, mais les cellules dérivées de ces souris étaient encore capable de former des tumeurs (Rudolph et al, 1999). Ceci montre que la télomérase est essentielle pour le maintien de la longueur des télomères mais non requise pour l'établissement de lignées cellulaires immortalisées, pour la transformation oncogénique ou pour la formation de tumeurs dans la souris. Ceci suggère que l'activation de la télomérase pendant le développement de tumeurs chez la souris n'est pas une réponse à une longueur courte critique des télomères, mais peut-être qu'elle serait liée à une autre voie qui mènerait à sa sélection pendant la tumorigénèse.

L'ADN polymérase α

L'ADN polymérase α est impliquée dans la réplication comme mentionné précédemment. L'enzyme est constituée de 4 polypeptides, tous essentiels pour la viabilité cellulaire chez la levure (Sugino, 1995): 180, 68, 58 et 48 kDa. La première possède l'activité de polymérisation des déoxynucléotides, communément appelée pol α . Le seconde favorise l'expression de la sous-unité p180 et favorise la localisation nucléaire du complexe (Mizuno et al., 1998). La sous-unité p48 possède l'activité primase de synthèse des amorces d'ARN (Santocanale et al., 1993, Stadlbauer et al., 1994). La fonction de p58 est peu connue, mais il a été suggéré qu'il pourrait servir de lien entre la sous-unité primase et pol α et il semble essentiel pour le transport de p48

au noyau (Mizuno et al., 1996). Carson et Hartwell (1985) ont montré qu'un mutant de la sous-unité pol α (CDC17/POL1) sensible à la température avait des télomères très longs même à la température permissive. Plus récemment, dans une recherche de mutants déficients dans la synthèse de l'ADN chez la levure et ayant des longueurs de télomères atypiques, Adams et Holm (1996) ont identifié deux mutants, *cdc44/rfc1* et *cdc17/poll1*, présentant une augmentation de la taille moyenne des télomères de 2-4 fois par rapport aux souches sauvages après une période de croissance prolongée, tout en ayant un ralentissement de la réplication de l'ADN. Cet allongement ne se produisant pas chez un double mutant *cdc17,tlc1*, la télomérase semble donc être responsable de cette élongation. Il a été montré par Reveal et al. (1997) qu'un oligonucléotide représentant des répétitions télomériques de mammifères peut servir de substrat pour la synthèse du brin complémentaire riche en C par le complexe ADN polymérase α -primase. Ainsi, l'enzyme semble intimement liée au mécanisme de régulation de la longueur des télomères.

Protéines liant les télomères

Des évidences pour la liaison stable de protéines télomériques viennent de l'inspection de la structure globale de la chromatine à l'extrémité des chromosomes. Chez *Tetrahymena thermophila*, les 400 pb terminaux sont enroulés en un large complexe qui ne ressemble pas à la chromatine nucléosomale normale (Blackburn et Chiou, 1981, Budarf et Blackburn, 1986, Cohen et Blackburn, 1998). Les molécules d'ADN dans le macronoyau de *Oxytricha nova* possèdent aussi aux extrémités un complexe ADN-protéines non-nucléosomal (Gottschling et Cech, 1984), et les chromosomes de

levures se terminent avec un large domaine de chromatine résistant aux nucléases couvrant 250 à 400 pb de répétitions télomériques appelé télosome (Wright et al., 1992). Chez les vertébrés, les télomères de 20-150 kb semblent être arrangés en enroulements nucléosomiaux longs, réguliers et rapprochés l'un de l'autre. Par contre, les télomères courts montrent un patron diffus de chromatine (Makarov et al., 1993, Tommerup et al., 1994, Lejnine et al., 1995), qui est dû à la flexibilité réduite de l'ADN télomérique de 6 à 8 nt de répétitions à s'enrouler en nucléosomes, générant des positionnements désordonnés des nucléosomes sur la séquence télomérique (Rossetti et al., 1998). Les nucléosomes télomériques sont ~40 pb plus petits que ceux de la chromatine normale, soit d'une taille de 157 pb (Lejnine et al., 1995 1993, Tommerup et al., 1994).

C'est ainsi que les protéines liant les répétitions de plusieurs organismes ont été identifiées. Les protéines télomériques sont de deux types: celles liant l'extension 3' simple-brin et celles liant les répétitions double-brin des télomères (Greider, 1996).

L'ADN télomérique de levure est enroulé d'une protéine abondante nommée RAP1 (repressor activator protein 1). Des études d'immunofluorescence et de "one-hybrid system" ont localisé RAP1 à l'extrémité des chromosomes (Klein et al., 1992, Bourns et al., 1998), et des anticorps anti-Rap1p ont spécifiquement immunoprécipité des séquences $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ à partir de chromosomes et de plasmides linéaires (Conrad et al., 1990, Wright et al., 1992). RAP1 lie continuellement tout le long de l'ADN double-brin télomérique en moyenne à chaque 18 pb (Gilson et al., 1993). La région minimale de liaison à l'ADN de RAP1 est au centre de la protéine (Henry et al., 1990),

mais n'a pas d'homologie significative de séquence avec des motifs de liaison à l'ADN connus. La protéine contient deux domaines similaires liant l'ADN dans une orientation en tandem, domaines qui sont structurellement reliés à l'homéodomaine et au proto-oncogène Myb, avec certaines particularités dans leur mode de liaison (Konig et al., 1996). RAP1 fonctionne autant comme activateur et répresseur de transcription (Shore, 1994). Des sites de liaison pour RAP1 sont retrouvés dans les promoteurs d'un grand nombre de gènes, incluant les gènes des protéines ribosomales (Huet et al., 1985) et les éléments silenciers des loci HMR et HML (Shore et Nasmyth, 1987, Buchman et al., 1988.). En fait, un des rôles de RAP1 est de recruter, via son domaine C-terminal, les cofacteurs SIR3/SIR4, aidé par des interactions de ces derniers avec les histones et entre elles (Moretti et al., 1994, Buck et Shore, 1995, Cockell et al., 1995, Hecht et al., 1995, Marcand et al., 1996, Moazed et al., 1997, Strahl-Bolsinger et al., 1997), donnant naissance au silence transcriptionnel des gènes adjacents aux télomères et aux "silent-mating type loci" et à la formation d'hétérochromatine. Ce même domaine C-terminal interagit avec les protéines Rif1p (Hardy et al., 1992) et Rif2p (Wotton et Shore, 1997) pour réguler négativement la longueur des télomères. En effet, la perte de l'une ou l'autre des protéines cause un allongement des télomères, un phénotype augmenté par la perte simultanée des deux protéines (Wotton et Shore, 1997). Il a été déterminé que le nombre de complexes Rap1p-répétitions double-brin est compté et va moduler l'allongement (peu de complexes) ou le raccourcissement (trop de complexes) des télomères par un mécanisme de rétroaction négative, impliquant les protéines Rif et/ou les protéines liant le simple-brin télomérique (Marcand et al., 1997). D'autres modèles ont été

proposés, tel que l'interaction des molécules de Rap1p aux deux extrémités d'un long télomère qui formerait une structure secondaire modulant négativement la longueur du télomère (Ray et Runge, 1999).

Deux protéines humaines liant les répétitions télomériques double-brin ont été identifiées. La première, nommée TRF1, a été isolée comme une protéine liant les répétitions double-brin TTAGGG chez les cellules HeLa (Chong et al., 1995). TRF1 est une protéine homodimérique qui possède en C-terminal un domaine hélice-tour-hélice similaire au domaine Myb et à l'homéodomaine "DNA-binding folds" (Bianchi et al., 1997, Smith et de Lange, 1997). Van Steensel et de Lange (1997) ont montré qu'une surexpression de TRF1 provoquait un raccourcissement progressif des télomères sans affecter l'expression de la télomérase, et qu'un mutant dominant négatif de TRF1 auquel il manque le domaine Myb mais possédant le domaine de dimérisation induit l'allongement des télomères tout en inhibant la liaison aux télomères du TRF1 endogène. Ces évidences suggèrent que, comme Rap1p, TRF1 peut réguler négativement la longueur des télomères humains, possiblement en inhibant l'action de la télomérase. La seconde protéine, TRF2, possède aussi un domaine "Myb-like" en C-terminal mais elle diffère de TRF1 car son domaine N-terminal est très basique plutôt qu'acide (Bilaud et al., 1997, Broccoli et al., 1997). TRF2 lie également les répétitions double-brin TTAGGG *in vitro*, et est située au niveau des télomères *in vivo* tout comme TRF1 (Bilaud et al., 1997, Broccoli et al., 1997). Les deux protéines sont exprimées ubiquitairement. Van Steensel et de Lange (1998) ont montré qu'une forme dominante négative de TRF2 induisait la fusion bout-à-bout des chromosomes, et que cette ligation provenait de télomères ayant perdu leur

extension simple-brin. Le mutant induisait également la sénescence chez les cellules transfectées. Les auteurs proposent donc que l'absence de TRF2 sur des télomères trop courts pourraient favoriser la fusion bout-à-bout des chromosomes et la sénescence. Plus récemment, Karlseder et al (1999) ont montré qu'un mutant dominant négatif de TRF2 induisait l'apoptose chez certaines cellules de mammifères, et que cette réponse apoptotique impliquait p53 et la kinase ATM (ataxia telangiectasia), et donc le système d'activation de la machinerie de surveillance des dommages à l'ADN. L'apoptose était directement signalée par le manque de TRF2, possiblement parce que les télomères manquant TRF2 ressemblent à de l'ADN endommagé. Dans certaines cellules, le raccourcissement des télomères signale donc la mort cellulaire plutôt que la sénescence.

Le complexe Ku (~70/85 kDa) humain lie avec haute affinité les extrémités d'ADN, qu'elles soient à bouts francs, en extension 5' ou 3' ou en structure d'épingle, pour jouer son rôle dans la réparation de cassures double-brin dans l'ADN ou favoriser la recombinaison dans la région V(D)J des immunoglobulines. L'homologue chez la levure (yKU70p et yKU80p) a été montré comme essentiel pour la jonction d'extrémités d'ADN non-homologues. Par immunoprécipitation de chromatine, Ku a été montré associé aux télomères de *S. cerevisiae in vivo* (Gravel et al., 1998). Des mutants de Ku chez la levure, en plus d'être déficients dans la réparation de cassures double-brin, ont des télomères anormalement courts, sont déficients en TPE au niveau des télomères uniquement et réduisent la localisation périphérique des télomères dans des foyers communs avec les protéines Sir et Rap1p (Bertuch et Lundblad, 1998, Critchlow et Jackson, 1998, Evans et al., 1998, Laroche et al., 1998, Nugent et al.,

1998, Shore, 1998), suggérant que Ku a un rôle important à jouer au niveau des télomères.

Une des protéines bien caractérisées liant le simple-brin télomérique est celle du protozoaire cilié *Oxytricha nova*. C'est un hétérodimère composé d'une sous-unité α de 56 kD et une sous-unité β de 41 kD (Gottschling et Zakian, 1986, Price et Cech, 1987). La sous-unité α peut lier le simple-brin $(T_4G_4)_n$ d'une manière séquence-spécifique, tout comme son homologue chez *Euplotes* (51 kDa) (Gray et al., 1991, Wang et al., 1992), et un duplexe de α peut également se former sur un substrat simple-brin de manière non-coopérative (Gray et al., 1991). La sous-unité β peut aussi interagir seule mais très faiblement et peu spécifiquement. Le complexe $\alpha:\beta$:ADN forme un complexe ternaire ADN-dépendant très stable et spécifique dans un ratio 1:1:1, formant un télosome protégeant l'extrémité des chromosomes contre la dégradation des nucléases (Gottschling et Cech, 1984, Gottschling et Zakian, 1986, Price et Cech, 1987, Price et Cech, 1989, Raghuraman et Cech, 1989, Fang et Cech, 1993). Le complexe $\alpha:\beta$ requiert un substrat d'ADN déroulé pour la liaison (Raghuraman et Cech, 1990). Récemment, Froelich-Ammon et al. (1998) ont montré que la liaison de la sous-unité β , d'un duplexe de sous-unité α ou la formation du complexe ternaire est capable d'inhiber l'élongation par la télomérase d'un oligonucléotide possédant des répétitions télomériques d'*Oxytricha*. Le complexe ternaire a également cette propriété inhibitrice sur la déoxynucléotidyltransférase terminale, enzyme qui utilise aussi l'extrémité 3' pour ajouter des répétitions de nucléotides. Les auteurs ont conclu que les protéines liant le simple-brin télomérique d'*Oxytricha* inhibaient la télomérase en rendant le substrat inaccessible à l'enzyme.

Une autre protéine, très apparentée avec la protéine liant les télomères de *Euplotes* et avec la sous-unité α de *Oxytricha* (35-36% d'identité en a.a. et 54-56% de similarité dans le domaine de liaison à l'ADN), est aussi présente chez *Euplotes*. Cette protéine, nommée rTP ("replication Telomere Protein" - 53000 Da), lie les répétitions télomériques simple-brin riches en G de *Euplotes* (Carlson et al., 1997), mais rTP a pour caractéristique unique de lier les répétitions double-brin terminales et internes, suggérant un rôle particulier pour la protéine. Des études sur l'expression de rTP ont montré que le niveau de transcription atteint son niveau le plus fort durant les rondes de réplication de l'ADN vers la fin du développement du macronoyau (Skopp et al., 1996), ce qui diffère du patron d'expression de son homologue de 51 kDa chez *Euplotes* (plusieurs stades du développement, incluant la méiose, au temps d'addition de nouveaux télomères, et au travers la période subséquente de la réplication de l'ADN du macronoyau (Price et al., 1994)). Une immunolocalisation de rTP la localise sur les bandes de réplication, endroit visible où se situe la machinerie de réplication dans le macronoyau de *Euplotes* (Olins et Olins, 1994). Même si ces évidences suggèrent un rôle dans la réplication, des évidences plus directes n'ont pas encore été obtenues.

Chez *S. cerevisiae*, quatre gènes ont été identifiés dans une recherche pour des gènes qui influencent la taille des télomères, nommés EST "Ever Shorter Telomere", dont EST1, EST2 (composante catalytique de la télomérase), EST3 (sans fonction connue) et EST4 (Cdc13p). Les cellules limitées pour la protéine essentielle Cdc13p arrêtent dans la phase G2 du cycle cellulaire par un processus de détection des dommages à l'ADN médié par RAD9 (Weinert et Hartwell, 1993). Un allèle muté *cdc13-1* placé à

température permissive montre un léger allongement des TRFs (Garvik et al., 1995, Nugent et al., 1996). De plus, les cellules *cdc13-1* arrêtées à température restrictive contiennent de l'ADN télomérique et de l'ADN adjacent aux télomères sous forme simple-brin, avec le brin riche en C préférentiellement dégradé. Ces données suggèrent que Cdc13p limite la dégradation du brin riche en C qui se produit en fin de phase S (Wellinger et al., 1993b). *In vitro*, Cdc13p est capable de lier des séquences TG₁₋₃ simple-brin. Bourns et al (1998) ont montré par "one-hybrid system" que Cdc13p pouvait s'associer à des répétitions télomériques *in vivo* lorsque situées à l'extrémité des chromosomes, donc potentiellement simple-brin. Cdc13p pourrait empêcher l'arrêt RAD9-médié en masquant l'ADN simple-brin TG₁₋₃ ou en empêchant la dégradation extensive du brin riche en C après la réplication des télomères. Un autre allèle de *cdc13*, *cdc13-2*, provoque le même phénotype que des cellules sans télomérase (Nugent et al., 1996), c.-à-d., un raccourcissement progressif des télomères jusqu'à atteindre une longueur critique où les cellules entrent en sénescence, même si des extraits de cellules *cdc13-2* ont une activité télomérasique normale *in vitro* (Nugent et al., 1996, Lingner et al., 1997a.). Ainsi, les phénotypes d'allongement (*cdc13-1*) et de raccourcissement (*cdc13-2*) des télomères des deux mutants de *cdc13* suggèrent que Cdc13p pourrait affecter négativement et positivement l'accessibilité de la télomérase au substrat simple-brin.

Des délétions du gène *EST1* résultent en un raccourcissement progressif des télomères et de la sénescence, phénotypes indistinguables de ceux d'une souche avec une délétion de la composante ARN de la télomérase ou du double mutant *EST1⁻ TLC1⁻* (Singer et Gottschling, 1994, Virta-Pearlman et al., 1996). Des études ont montré que

Est1p peut être immunoprécipité avec la composante ARN de la télomérase (Lin et Zakian, 1995, Steiner et al., 1996). Lingner et al. (1997) (Lingner et al., 1997a) ont montré par des essais *in vitro* que dans des extraits de souches est1- Δ , est3- Δ ou cdc13-2^{mut}, l'activité télomérasique était encore présente, suggérant que bien que ces gènes soient essentiels à l'activité télomérasique *in vivo*, ils ne sont pas des composants intrinsèques de la télomérase. Est1p est capable de lier spécifiquement des oligonucléotides simple-brin portant des répétitions télomériques riches en G de levure et requiert une extrémité terminale 3' libre (Virta-Pearlman et al., 1996), suggérant que Est1p pourrait médier la reconnaissance de l'extrémité des chromosomes par la télomérase.

Grandin et al (1997) ont découvert une protéine, Stn1, qui interagit avec Cdc13p, l'allèle mutant stn1-13 partage le phénotype de l'allèle cdc13-1 de façon plus dramatique, et la surexpression de Stn1 renverse le phénotype du mutant cdc13-1 au niveau de l'allongement des télomères. Le complexe Cdc13p-Stn1 a donc été proposé comme étant un régulateur négatif de la télomérase (Grandin et al., 1997), où Stn1 bloque et/ou compétitionne l'accès du complexe Est1-télomérase à Cdc13p lié à l'extension simple-brin, empêchant ce dernier de recruter ce complexe via son interaction avec Est1.

HnRNP A1/UP1

Dans une recherche pour des protéines liant les répétitions télomériques simple-brin humaines, Ishikawa et al. (1993) ont purifié un groupe de protéines liant les

répétitions TTAGGG simple-brin qui ont été identifiées comme étant identiques ou très reliées aux hnRNPs A1, A2-B1 (McKay et Cooke, 1992), D et E et à la nucléoline. Peu longtemps après leur synthèse, les précurseurs des ARNm des cellules de vertébrés, nommés ARNs nucléaires hétérogènes (hnRNAs), se combinent avec une série de protéines pour former un large complexe ARN-protéines (Beyer et al., 1977, Economidis et Pederson, 1983, Pullman et Martin, 1983, Wilk et al., 1983, Dreyfuss, 1986), requis pour le fonctionnement correct de la machinerie nucléaire de la maturation de l'ARN (Choi et al., 1986, Sierakowska et al., 1986). Une série majeure de six protéines nucléaires de poids moléculaire allant de 32000-42000 Da, connues comme A1, A2, B1, B2, C1 et C2, font partie de ce complexe (Beyer et al., 1977, Kumar et al., 1986, Kumar et al., 1987).

La mieux caractérisée de ces protéines est hnRNP A1 et consiste en 320 a.a. (34 kDa) (Cobianchi et al., 1986). A1 est organisée en deux domaines, un domaine N-terminal de 196 acides aminés et un domaine C-terminal de 124 acides aminés (Cobianchi et al., 1986, Kumar et al., 1986, Riva et al., 1986). Le domaine C-terminal est très riche en glycines (45%) et une séquence G-N-F/Y-G-G-S/G-R-G est souvent répétée (Cobianchi et al., 1988).

Il a été montré que A1 partage des déterminants antigéniques avec des protéines liant l'ADN simple-brin du thymus de veau (Herrick et al., 1976, Valentini et al., 1984, Planck et Wilson, 1985, Valentini et al., 1985) et des cellules HeLa (Valentini et al., 1985), dont la protéine UP1 (22162 Da). Les résidus 2 à 196 de A1 ont été identifiés comme étant identiques à la protéine UP1 (Williams et al., 1985, Cobianchi et al.,

1986, Riva et al., 1986.). De plus, le groupe de Riva (Pandolfo et al., 1985, Riva et al., 1986) ont partiellement purifié une protéase qui peut cliver spécifiquement A1 *in vitro* pour générer du UPI. Ce dernier possède deux sous-domaines de 92 a.a. homologues entre eux de telle sorte que les résidus 3-93 peuvent être alignés avec 94-194 avec 32% des résidus identiques (Merrill et al., 1987, Merrill et al., 1988). Un domaine de liaison à l'ARN de ~90 résidus homologue à ces sous-domaines a été trouvé chez la poly(A) binding protein de levures (Adam et al., 1986) et maintenant dans plus de 30 autres protéines eucaryotes liant l'ARN. Ce domaine est connu sous le nom de "RNA binding domain" (RBD) (Dreyfuss et al., 1988) ou "RNA recognition motif" (RRM) (Query et al., 1989). À l'intérieur de chaque RRM de A1, deux courtes séquences allant des résidus 54-61, R-G-F-G-F-V-T-Y (RNP-1), et 15-20, L-F-I-G-G-L (RNP-2), sont particulièrement bien conservés parmi la famille des protéines liant l'ARN simple-brin eucaryote (Dreyfuss et al., 1989).

A1 lie coopérativement et très fortement les acides nucléiques simple-brin avec une préférence pour l'ARN simple-brin en comparaison avec l'ADN simple-brin (Nadler et al., 1991, Ishikawa et al., 1993, Abdul-Manan et al., 1996), impliquant une interaction protéine-protéine homotypique médiée par les domaines C-terminaux qui peuvent s'associer (Cobianchi et al., 1988, Cobianchi et al., 1993). La séquence consensus UAGGGA/U a été identifiée pour être fortement liée par A1, de même que les sites d'épissage des pré-ARNms et des séquences dérivées d'introns, mais avec une affinité moindre (Burd et Dreyfuss, 1994). Ishikawa et al. (1993) ont montré que A1 faisait partie de complexes pouvant lier l'équivalent ADN de cette séquence, TAGGGT, qui correspond exactement à la séquence d'une répétition télomérique simple-brin

humaine, TTAGGG. UP1 a précédemment été isolé comme une protéine liant l'ADN simple-brin, mais lie les acides nucléiques de façon non-coopérative (Cobianchi et al., 1988, Cobianchi et al., 1993). UP1 lie directement la séquence des oligonucléotides portant la séquence TTAGGG (LaBranche et al., 1998).

Cette propriété de liaison aux acides nucléiques confèrent à A1 et UP1 plusieurs fonctions. UP1 est également nommé "helix-destabilizing protein" de par sa propriété à diminuer le T_m de la double-hélice d'ADN et de l'ARN (Herrick et Alberts, 1976), propriété partagée par protéines procaryotiques liant l'ADN simple-brin, la phage T4 gene 32 et la SSB de *E.coli*, qui jouent un rôle essentiel dans la réplication, la recombinaison et la réparation. UP1 stimule également l'activité de l'ADN polymérase α sur un substrat d'ADN non-spécifique possédant une amorce d'ADN pour la polymérisation (Herrick et al., 1976, Riva et al., 1980). Même si A1 et UP1 peuvent tous deux lier les acides nucléiques simple-brin, seulement UP1 est capable de stimuler l'activité de l'ADN polymérase α (Riva et al., 1980). Il a été souligné que la protéolyse générant UP1 pouvait être un artéfact *in vitro* se produisant lors de la purification de hnRNP A1. Par contre, la capacité unique de UP1 de stimuler la polymérase α et l'observation qu'une diméthylarginine unique dans UP1 se retrouve 2 a.a. en amont du domaine C-terminal (Williams et al., 1985, Kumar et al., 1986,) suggèrent que la protéolyse pourrait être importante *in vivo*. Il a été suggéré que la diméthylarginine au résidu 194 pourrait être un signal de reconnaissance pour une enzyme agissant de manière similaire à la trypsine, qui a été montrée pour copurifier partiellement avec les protéines hnRNP et est capable de cliver du A1 purifié en UP1 (Pandolfo et al., 1985).

À l'opposé d'UPI, A1 quant à lui favorise la renaturation des molécules d'ARN et d'ADN simple-brin (Kumar et Wilson, 1990, Pontius et Berg, 1990, Munroe et Dong, 1992). Cette activité est localisée au domaine C-terminal riche en glycines. La propriété de A1 à s'autoassocier et donc à augmenter la fréquence de rencontre avec des acides nucléiques complémentaires a été suggérée comme formant la base de cette activité (Kumar et Wilson, 1990, Munroe et Dong, 1992). A1 fait la navette continue entre le noyau et le cytoplasme (Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992). Ce transport de A1 requiert un court peptide en C-terminal, nommé M9 (Michael et al., 1995, Siomi et Dreyfuss, 1995, Weighardt et al., 1995), qui interagit spécifiquement avec la transportine, un composant de la voie d'importation protéique médiée par des récepteurs (Pollard et al., 1996). A1 pourrait donc être impliquée dans le transport des ARNm du noyau au cytoplasme. A1 joue aussi un rôle dans l'épissage alternatif des pré-ARNm. Dans des transcrits contenant des sites d'épissage 5' alternatifs, l'augmentation de la concentration du facteur d'épissage SF2/ASF promouvoit l'utilisation du site d'épissage 5' proximal (Ge et Manley, 1990, Krainer et al., 1990). A1 contrecarre cette activité et donc promouvoit le site d'épissage 5' distal *in vitro* et *in vivo* (Mayeda et Krainer, 1992, Mayeda et al., 1993, Cáceres et al., 1994, Yang et al., 1994). A1 est également en mesure de moduler le choix des sites d'épissage 5' en faveur du site distal dans son propre pré-ARNm qui contient un exon alternatif (Blanchette et Chabot, 1997, Chabot et al., 1997, Blanchette et Chabot, 1999).

Récemment, LaBranche et al. (1998) ont montré que A1 était impliquée dans la modulation de la longueur des télomères. Une lignée cellulaire érythroleucémique de souris (CB3) chez qui l'expression de la protéine hnRNP A1 est de 200-500 moins

importante qu'une lignée témoin (CB7) montre des télomères (TRFs) plus courts que ce dernier. Le rétablissement de l'expression de A1 dans les CB3 rétablit la longueur des télomères au niveau de ceux des CB7 au fil des passages cellulaires. Ce phénotype est aussi obtenu lorsque la protéine UP1 est exprimée dans les CB3, ou si UP1 est surexprimé dans des cellules HeLa possédant des télomères courts. L'activité télomérasique étant la même dans des extraits cellulaires issus des lignées ci-haut, et UP1 tout comme A1 liant spécifiquement des répétitions TTAGGG *in vitro*, ceci suggère que les phénotypes observés pourraient être dus à la liaison des protéines sur les télomères. De plus, UP1 est en mesure de repêcher une activité télomérasique *in vitro* au contraire de A1, suggérant que UP1 pourrait avoir un rôle majeur dans le phénotype observé et que la maturation protéolytique de A1 en UP1 pourrait être une étape critique dans la production de facteurs recrutant la télomérase aux extrémités chromosomiques.

À la suite de ces évidences, mes travaux ont porté sur l'identification d'une activité protéolytique *in vitro* et *in vivo* clivant A1 en UP1, basé sur les travaux de Pandolfo et al. (1985). Mes résultats n'ont pas révélé la présence d'une telle activité en extraits nucléaires et dans plusieurs lignées cellulaires. De façon à identifier si la maturation de A1 en UP1 est une étape-clé dans l'allongement télomérique observé, des mutants de A1, où l'arginine 194 doublement méthylée ou l'arginine 196 au site de clivage sont remplacées par des alanines, ont été testées pour leur capacité à promouvoir l'allongement des télomères. Ces mutations n'ont toutefois pas entravé l'action de A1 au niveau des télomères. De plus, des études sur le mode de liaison de UP1 à des répétitions télomériques TTAGGG *in vitro* ont montré que UP1 lie sous forme de

dimère deux séquences TTAGGG, préférentiellement flanquées par des séquences additionnelles. J'ai réalisé également des études sur le mécanisme d'action potentiel de UP1 pour moduler l'allongement de télomères. En utilisant des essais d'activité ADN polymérase α et télomérase *in vitro* sur des répétitions télomériques, A1/UP1 est capable d'inhiber spécifiquement ces deux activités.

2. Matériel et méthodes

Préparations de plasmides

Les techniques de mini-prep et de maxi-prep de *E. coli* transformés ont été réalisées selon Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). La méthode de purification par gradient de chlorure de césium a été utilisée dans la maxi-prep.

Mutagenèse dirigée par oligonucléotides

L'ADNc de la protéine hnRNP A1, nommé fli-2 (Ben-David et al., 1992), a servi de matrice aux différentes étapes de PCR effectuées pour la mutagenèse dirigée. L'oligonucléotide R194S représentant la séquence des acides aminés 191 à 197 de A1 (chevauchant le site de clivage en UPI en position 196) contient une mutation changeant l'acide aminé arginine en position 194 en alanine (fig. 5, A). R194AS représente la séquence complémentaire antisens. La séquence de R196S représente les acides aminés 193 à 199 de A1 dont l'arginine en position 196 a été remplacée par une alanine. R196AS représente la séquence complémentaire antisens. L'oligo UP (Universal Primer; Pharmacia) représente la séquence antisens du promoteur M13 situé dans pK+ Δ XbaI TAG-A1 en C-terminal de A1. L'oligonucléotide T3 (Gibco) correspond à la séquence du promoteur T3 de pK+ Δ XbaI TAG-A1 en direction sens situé en N-terminal de A1. Les réactions de PCR ont toutes été effectuées dans un volume final de 100 μ l comprenant: 4 mM DTT, 250 μ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP (chacun), 3 μ g BSA, 15 pmoles de chaque amorce et 10 μ l 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl; Pharmacia). La matrice d'ADN

(pK+ Δ XbaI TAG-A1) est bouillie 5 minutes, refroidie rapidement sur glace et ajoutée au mélange. 1 μ l de Taq polymérase (Pharmacia) est ajouté et le tout est recouvert de 100 μ l d'huile minérale. 30 cycles de 1 min à 94°C, 2 min à la température d'hybridation et 3 min d'élongation à 72°C ont été effectués suivis de 15 minutes d'élongation additionnelle à 72°C.

Mutant R194: Deux séries de PCR (fig 2) sur le plasmide pK+ Δ XbaI TAG-A1 (10 ng/réaction) ont été effectuées indépendamment: la première utilisant l'amorce R194AS et l'amorce T3 sens pour amplifier la section 5' de A1, à une température d'hybridation de 50 °C; la seconde utilisant l'amorce R194S et l'amorce UP antisens pour amplifier la partie 3' de A1, à une température d'hybridation de 50°C. Les produits sont migrés sur gel d'agarose 0.8% et purifiés par électroélution. 0.5 μ g de chaque produit sont mélangés pour servir de matrice à l'amplification avec les amorces T3 et UP à une température d'hybridation de 53°C pour générer la séquence complète de A1 mutée (figure 2).

Mutant R196: La même procédure a été effectuée mais l'amorce R196S a été utilisée avec UP à une température d'hybridation de 50°C et l'amorce R196AS avec T3 à la même température. Le PCR final a été effectué avec le mélange de 0.5 μ g de chaque produit, à une température d'hybridation de 50°C (figure 2).

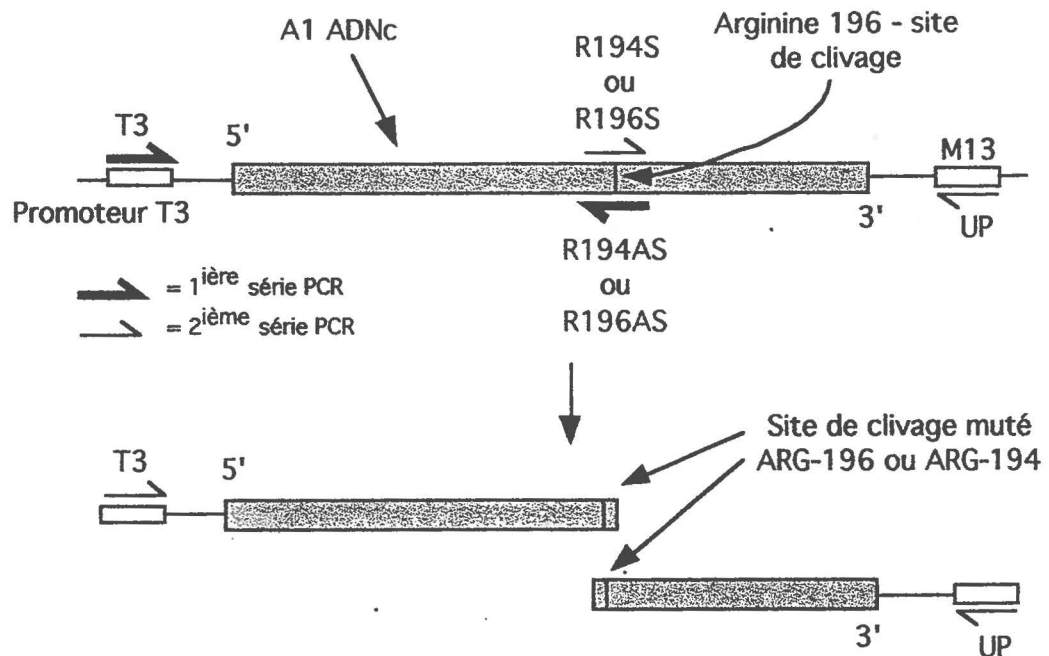


Figure 2. Mutagenèse dirigée par oligonucléotide de l'ADNc de la protéine hnRNP A1 cloné dans le plasmide pK+ Δ XbaI-TAG-A1, au niveau des acides aminés aux abords du site de clivage de A1 en UP1. Les amorces T3 et R19(4 ou 6)AS ont été utilisées ensemble pour la première série de PCR, et UP et R19(4 ou 6)S pour la seconde. L'amplification finale a été réalisée avec les amorces T3 et UP.

Constructions plasmidiques

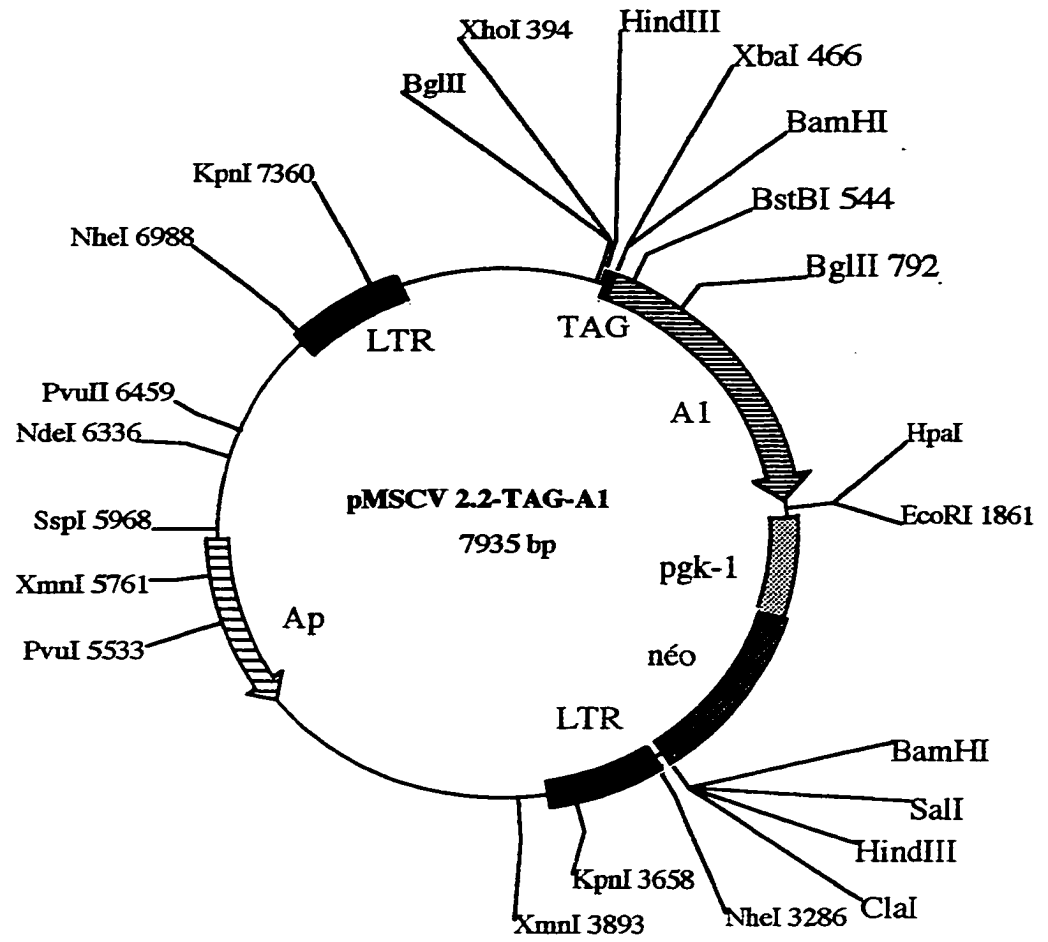
Les digestions par enzymes de restriction, les ligations, l'électrophorèse sur gel d'agarose, les extractions au phénol, phénol-chloroforme et au chloroforme, la transformation plasmidique et l'élution des bandes d'ADN par électroélution en sac à dialyse ont été effectués selon les protocoles de Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Les enzymes utilisées viennent des compagnies Pharmacia et New England Biolabs (pour BstBI). Le tableau 1 montre comment chaque construction a été

réalisée. Le fragment (insert ou vecteur) issu de la digestion du plasmide d'origine ou du produit de PCR et utilisé pour la ligation est indiqué en caractères gras. Le plasmide pMSCV 2.2 TAG-A1 a été utilisé pour l'identification d'une activité protéolytique clivant A1 en UPI *in vivo*. Le fragment TAG-A1 a été cloné dans pK+ Δ XbaI pour réaliser la mutagenèse dirigée par PCR. Chaque produit de PCR issu de la mutagenèse dirigée a été introduit dans le plasmide pK+ Δ XbaI-TAG-A1 pour permettre l'identification par séquençage des clones possédant les mutations désirées. Les clones positifs ont servi à la construction des plasmides pMSCV 2.2 TAG-R1942, R1948 et R1963 pour l'expression *in vivo* des mutants de A1. Les plasmides pGEX-R1942, R1948 et R1963 ont été construits pour la production de protéines recombinantes (voir plus loin).

Tableau 1. Constructions plasmidiques réalisées.

Nom du plasmide final	Insert	Vecteur
pMSCV 2.2 TAG-A1	Plasmide d'origine: pMSCV SB2-A1 Digestion: BstBI - EcoRI Fragments: 1317 pb et trois autres fragments	Plasmide d'origine: pMSCV 2.2 TAG-UP1 Digestion: BstBI - EcoRI Fragments: 577 et 6618 pb
pK+ΔXbaI-TAG-A1 (site XbaI préalablement rempli à la Klenow)	Plasmide d'origine: pMSCV 2.2 TAG-A1 Digestion: XhoI - EcoRI Fragments: 1467 et 6468 pb	Plasmide d'origine: pK+ΔXbaI Digestion: XhoI - EcoRI Fragments: 2931 et 33 pb
pK+ΔXbaI-TAG-A1-R1942 et R1948	Produit de PCR Digestion: BglII - PstI Fragments: 1079 pb	Plasmide d'origine: pK+ΔXbaI-TAG-A1 Digestion: BglII - PstI Fragments: 1079 et 3352 pb
pK+ΔXbaI-TAG-A1-R1963	Produit de PCR Digestion: NdeI - EcoRI Fragments: 1204 pb	Plasmide d'origine: pK+ΔXbaI-TAG-A1 Digestion: NdeI - EcoRI Fragments: 1204 et 3227 pb
pMSCV 2.2 TAG-R1942, R1948 et R1963	Plasmide d'origine: pK+ΔXbaI-TAG-A1-R1942, R1948 et R1963 Digestion: XhoI - EcoRI Fragments: 1467 et 2964 pb	Plasmide d'origine: pMSCV 2.2 TAG-A1 Digestion: XhoI - EcoRI Fragments: 1467 et 6468 pb
pGEX-R1942, R1948 et R1963	Plasmide d'origine: pK+ΔXbaI-TAG-A1-R1942, R1948 et R1963 Digestion: BglII - EcoRI Fragments: 1069 et 3362 pb	Plasmide d'origine: pGEX-A1 Digestion: BglII - EcoRI Fragments: 1069 et 5320 pb

A



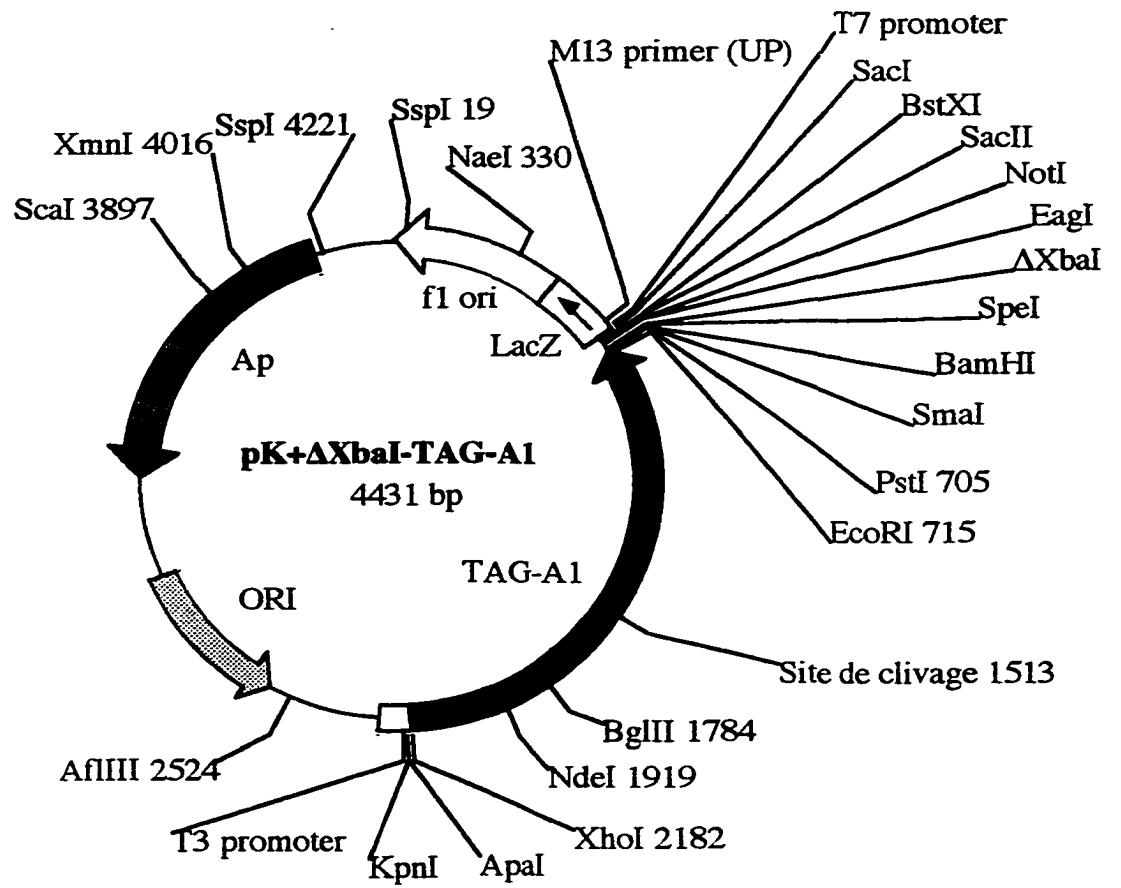
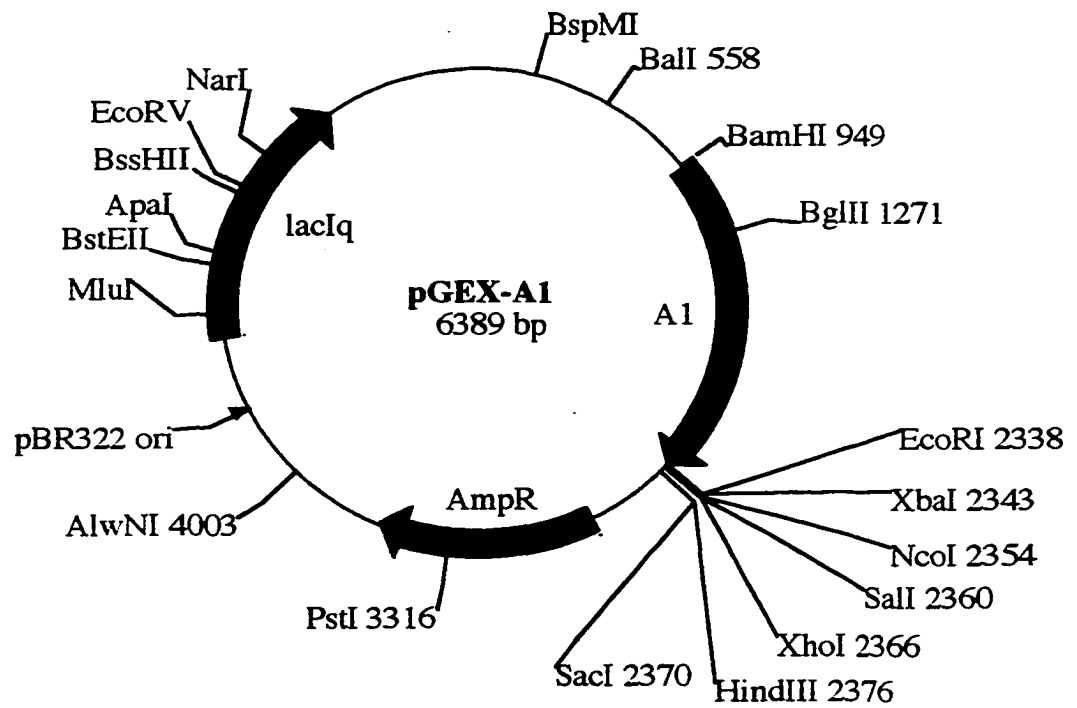
B**C**

Figure 3. Cartes de restriction de clonages effectués. **A**, La construction plasmidique pMSCV 2.2-TAG-A1. Le fragment BglII-EcoRI (1317 pb) du plasmide pMSCV-SB2-A1 est cloné aux sites BglII-EcoRI du plasmide pMSCV 2.2-TAG-UP1. **B**, La construction plasmidique pK+ΔXbaI-TAG-A1. Le fragment XhoI-EcoRI (1467 pb) du plasmide pMSCV 2.2-TAG-A1 est inséré aux sites XhoI-EcoRI du plasmide pK+ΔXbaI. **C**, Le plasmide pGEX-A1. L'ADNc de A1 est inséré aux sites BamHI-EcoRI du plasmide pGEX-KG.

Séquençage

La présence des mutations au site de clivage de A1 en UP1 dans les plasmides pK+ΔXbaI-TAG-A1-R194 et pK+ΔXbaI-TAG-A1-R196, de même que de potentielles mutations ponctuelles causées par la Taq ont été déterminées par séquençage à l'aide de la trousse de séquençage T7 de Pharmacia et selon les instructions qui l'accompagnent. Les oligos R194S-AS et R196S-AS ont été utilisés, de même que quelques autres oligos représentant des sections de l'ADNc de A1. Les séquences ont été séparées sur gel de polyacrylamide 6%/8M urée et révélées par autoradiographie.

Culture de cellules

Les constructions plasmidiques pMSCV 2.2-néo, TAG-A1, R1942, R1948 et R1963 (5μg chacun) ont été transfectées par la méthode du CaPO₄ (Sambrook et al., 1989) dans les cellules GPA préalablement cultivées dans du DMEM 10% sérum. Les GPA sont des fibroblastes qui permettent l'encapsulation des plasmides en rétrovirus

amphotrophique pouvant infecter d'autres cellules lorsque rejetés dans le milieu de culture. Après sélection des cultures stables au G418 (400µg/ml) (cellules ayant intégrées dans leur génome le plasmide pMSCV 2.2 qui possède le gène de résistance à la néomycine/G418), environ 1×10^6 cellules GPA avec leur milieu de culture sont placées sur glace. Le milieu de culture est prélevé et centrifugé pour enlever toute cellule résiduelle. 0.5 ml de milieu et un volume égal de polybrène (SIGMA) sont ajoutés (par pétri de 100 mm) aux cellules à infecter, préalablement cultivées dans du DMEM 10% sérum (sauf pour les CB3, α -MEM 5% sérum), et le tout est incubé 40 minutes à 37°C. Le milieu de culture est enlevé et remplacé par du frais, sans virus ni agent de sélection, puis les cultures sont incubées une nuit à 37°C. Les cultures stables sont alors sélectionnées par ajout de G418.

Les cellules HeLa, MRC5, CB7, WI38, WI38VA13, N2A, NIH, CB3 ont été infectées avec pMSCV2.2-TAG-A1 pour les tests de clivage protéolytique *in vivo*. Les HeLa et CB3 ont été infectées par pMSCV 2.2-néo, TAG-A1, R1942, R1948 et R1963 pour l'expérience des mutants ponctuels.

NIH: cellules embryonnaires de souris

N2A: cellules de neuroblastomes de souris

WI38; cellules embryonnaires diploïdes normales de poumon humain femelle

WI38 VA13: WI38 transformées par le virus SV40

CB7: cellules érythroleucémiques de souris

CB3: cellules érythroleucémiques de souris ayant perdu un allèle de hnRNP A1 et ayant subi une insertion rétrovirale dans l'autre, et donc exprimant 200-500 fois moins de A1 que les CB7

Y79: cellules de rétinoblastomes humains

MRC-5: cellules embryonnaires diploïdes normales de poumon humain mâle

HeLa: cellules de carcinomes épithéloïdes du col de l'utérus.

Extraction et digestion d'ADN génomique

Environ 20×10^6 cellules adhérentes (HeLa) ou en suspension (CB3) sont centrifugées (1800 RPM 2 minutes - Beckman GS-6) et lavées au PBS. Le culot de cellules est resuspendu dans 500 μ l de la solution DNA-A (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl) et le mélange est ajusté à 1% SDS et 100 μ g/ml protéinase K. Après incubation de 3 heures à 37°C avec agitation douce, le lysat est soumis à une extraction au phénol saturé à l'eau, une extraction au phénol-chloroforme et une extraction finale au chloroforme, chacune de 15 min à 37°C avec agitation "end-over" suivie d'une centrifugation de 7 min à 12000 g (IEC). Pour les deux premières extractions, l'interface est prélevée en plus de la phase aqueuse. La dernière phase aqueuse est ajustée à 0.1M NaCl, 2 volumes d'éthanol sont ajoutés et le tout est agité à température pièce jusqu'à ce que l'ADN prenne une consistance blanchâtre. L'ADN est récupéré avec un embout de micropipette, rincé à l'éthanol 70% et séché. L'ADN est resuspendu dans 500-700 μ l TE 10:1 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) et incubé 16 à 18 heures à 37°C.

Cinquante μl d'ADN est digéré par HinfI (24U) et RsaI (30U) dans un volume final de 100 μl pendant 16 à 18 heures à 37°C. Les digestions sont évaluées en qualité et en quantité d'ADN sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (Sambrook et al., 1989).

Gel de télomères et hybridation in-gel

L'ADN génomique digéré est migré à 650 V/H pour 15 heures sur gel d'agarose 0.5% (polymérisé au moins 2 heures), où le tampon TBE 1X lors de la migration est au niveau du gel et ne le recouvre pas. Le gel est séché à 60°C pendant 1½ heure, dénaturé pendant 15 minutes avec agitation dans 1.5 M NaCl-0.5 M NaOH et neutralisé 10 minutes dans 1.5 M NaCl-0.5 M Tris-HCl pH 8.0. Le gel est placé dans un sac à hybridation et mis en présence de 5 ml de solution d'hybridation (5X SSC, 1X Pwash [0.5 mM PPI, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5], 5X Denhart's, 39 nM rATP, 330 μg sperme de saumon dénaturé) pour chasser les bulles. Le 5 ml est enlevé et la sonde radioactive ($(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$) diluée dans 20 ml de solution d'hybridation est ajoutée au sac, lequel est scellé et incubé 16 à 18 heures à 37°C. Le gel est alors lavé 2 fois 1½ heure dans 0.24X SSC, puis révélé par autoradiographie.

Clivage à la trypsine *in vitro*

Les clivages à la trypsine effectués sur A1 et ses mutants ont été réalisés comme suit. 58 pmoles de GST-A1 ou des mutants GST-R1942, GST-R1948 et GST-R1963 ont été incubés à 23°C de 0 à 30 minutes avec 8 ng de trypsine (SIGMA) dans un volume final de 17 μl contenant 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 mM EDTA. Un échantillon est

récolté à toutes les 10 minutes pour chacune et 17 μ l de colorant Laemmli 2X (Sambrook et al., 1989) est ajouté. Les produits de clivage sont visualisés par SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (Sambrook et al., 1989).

Les clivages effectués pour la comparaison de l'efficacité de coupure en présence ou en absence d'extraits nucléaires ont été réalisés de la façon suivante. 33 pmoles de GST-A1 est incubée à 23°C 25 minutes avec 40, 50 ou 66.6 ng de trypsine dans un volume final de 14 μ l contenant 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 mM EDTA et 10 μ l d'extraits nucléaires HeLa ou 10 μ l de tampon D (20 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 20% glycérol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT). La réaction est arrêtée par ajout de 14 μ l de colorant Laemmli 2X et les produits de clivages sont séparés par SDS-PAGE et visualisés par immunobuvardage avec un anticorps anti-GST.

Mesure de l'activité protéolytique *in vitro*

L'expérience est a été réalisée selon Pandolfo et al. (1985) et modifiée comme suit. 80ng à 4 μ g de protéine recombinante GST-A1 est incubée en présence d'extraits nucléaires de 15 à 30 heures à 30°C dans 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM Na₂S₂O₅ et 5% glycérol. Un volume égal de colorant Laemmli 2X est ajouté pour arrêter la réaction, et les produits sont séparés par SDS-PAGE et visualisés par immunobuvardage avec un anticorps anti-GST.

Les extraits nucléaires HeLa, HeLa S100, Y79, MRC5, CB7, WI38, VA13, N2A, CB3 et DP27 ont été testés dans l'essai, dans des quantités variant de 10 à 100 μ l. Un extrait nucléaire HeLa concentré sur microcolonne Microcon-3 (Amicon) a également

été utilisé, de même que les fractions d'une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par étape de 10% de l'extrait nucléaire HeLa.

Immunobuvardage

Les échantillons protéiques sont séparés par SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989) sur gel de polyacrylamide 29:1 et transférés électrophorétiquement à 70 volts pour 5.8 heures à 4°C sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham LIFE Science). La membrane est rincée au TBS (Tris-buffered saline: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl) et bloquée 1^{1/2} heure à 4°C dans du TBST (TBS + 0.05% Tween 20), 5% lait en poudre, à 0.178 ml/cm² de membrane. Après deux lavages rapides et deux lavages de 15 minutes au TBST, la membrane est incubée 1^{1/2} heure à température pièce sous légère agitation avec l'anticorps désiré, dilué dans du TSBT-lait en poudre (0.036 ml de tampon par cm² de membrane): anti-TAG c-myc/Ab-1 1 µg/ml (Calbiochem), anti-GST 0.1 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Inc), CC3 anti-ARN polymérase II 1/1000 (Chabot et al., 1995), sérum anti-snRNPs Y12 1/100. Après les mêmes lavages que précédemment, la membrane est mise en contact pendant 1 heure à température pièce sous légère agitation avec un Ig anti-souris couplé à la peroxidase de raifort (Amersham) dilué dans du TSBT-lait en poudre à 1/3000 (0.036 ml de tampon par cm² de membrane). La membrane est ensuite lavée et les protéines détectées par chimioluminescence avec le système de détection ECL d'Amersham.

Purification d'oligonucléotides

Trente μg d'oligonucléotide est bouilli 3 minutes et mis sur un gel d'acrylamide:bisacrylamide 38:2 12%/7 M urée/20% formamide pré-migré 15 minutes à 350 volts et migré à ce même voltage. La bande correspondant à l'oligo est identifiée par "UV shadowing" sur plaque de TLC et coupée du gel (Sambrook et al., 1989). L'oligo est élué de l'acrylamide par écrasement de la bande (Sambrook et al., 1989) et agitation pendant 1 heure en présence de 400 μl NaOAc 0.3 M/0.2% SDS. L'acrylamide est centrifugé 7 minutes à 12 000 g, l'oligo présent dans le surnageant est isolé par précipitation à l'éthanol et resuspendu dans 10 μl de TE 10:1. La quantité d'ADN est dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

Marquage d'oligonucléotides

Cinq pmoles d'oligonucléotide sont phosphorylés à l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase selon la méthode de Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989), avec 5 μl [γ - ^{32}P]ATP (Amersham) pour 40 minutes à 37°C dans un volume final de 50 μl . Les produits marqués sont purifiés sur colonne MicroSpin G-25 (Pharmacia). Les oligonucléotides utilisés dans les essais de gels de retardement sont préalablement purifiés sur gel avant le marquage. Pour le marquage de sondes d'hybridation, 80 pmoles d'oligonucléotides sont marqués dans 80 μl volume final avec 5 μl [γ - ^{32}P]ATP, sans purification subséquente sur microcolonne.

Gel de retardement

Les oligonucléotides marqués à l'extrémité 5' sont incubés 30 minutes à 30°C avec différentes quantités de protéines dans un volume final de 10 µl comprenant 10 mM Hepes pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 µg poly (dIdC)•(dIdC) (Pharmacia). Les échantillons sont placés sur un gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant pré-chauffé à 200V pour 30 minutes et migré à 115V.

Protéines recombinantes

Une colonie de bactéries BL21 transformées avec les constructions pGEX est piquée et mise en culture dans 2 ml de bouillon LB avec ampicilline (1 mg/ml) 16 heures à 37°C avec agitation. Ce 2 ml est ajouté à 200 ml de LB ampicilline et le tout est incubé à 37°C jusqu'à une densité optique (D.O.) de 0.5 à 0.8 (600 nm). 40 µl d'IPTG 500 mM est ajouté et l'incubation est continuée pour 4 heures. La culture est centrifugée 10 minutes à 3500 RPM (Sorvall RC-5B), le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec 50 ml de phosphate buffer saline (PBS). Après centrifugation, le culot est conservé à -80°C pour la nuit. 10 ml de PBS est ajouté sur le culot congelé pour une décongélation à température pièce. Le culot est ensuite resuspendu par vortex, puis 20 µl de PMSF 0.5 M dans l'isopropanol et 50 µl de DTT 1 M sont ajoutés. La suspension est soniquée 4 minutes avec alternance 30 secondes de sonication - 30 secondes sur glace à 70% output power (Virsonic 50 -Virtis). Le sonicat est ajusté à 1% Triton X-100 et le tout est incubé à température pièce 30 minutes avec légère agitation. Le lysat est centrifugé 10 minutes à 10000 RPM à 4°C,

le surnageant est recueilli et 500 μ l de billes Glutathione-Séphadex (Pharmacia) 50% "slurry" dans du PBS est ajouté, suivi d'une incubation d'une heure à température pièce. Les billes sont centrifugées et lavées 5 fois au PBS. L'élution est faite par la solution suivante: 20 mM Glutathione réduit (Pharmacia), 120 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl (pH 9.5 pour GST-A1 et mutants de A1, pH 7.5 pour GST-UP1), 2 μ l PMSF 0.5 M et 1 μ l DTT 1 M par 5 ml de solution. Un ml du tampon d'élution est ajouté aux billes et le tout est incubé 1 à 3 heures à température pièce avec légère agitation. Les billes sont centrifugées à 12000 g 5 à 10 secondes, le surnageant est récupéré, correspondant à l'élution #1. Le processus est répété une deuxième fois, et billes et éluats sont conservés à -80°C. La concentration en protéine est déterminée par comparaison visuelle avec des quantités connues d'albumine sérique bovine (BSA) par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 9% (29:1) coloré au bleu de Coomassie (Laemmli, 1970). Cette méthode d'évaluation peut être sujette à l'erreur due à l'approximation visuelle et ne tient pas compte du pourcentage de protéines actives dans la préparation.

Les protéines GST-UP1 Δ 1 (G-UP1 Δ 1) et GST-UP1 Δ 2 (G-UP1 Δ 2) ont été produites par Sophie Dupuis.

Essai d'activité télomérasique *in vitro*:

L'essai d'activité télomérasique *in vitro* développé chez *Tetrahymena* (Greider et Blackburn, 1987) et l'humain (Morin, 1989) a été adapté de la façon suivante. Des oligonucléotides purifiés (10 pmoles) sont ajoutés à 0 à 160 pmoles de protéines (G-UP1, UP1, G-UP1 Δ 2, G-UP1 Δ 1, GP32, GST-A1), 1 μ l [α -³²P]dGTP (3000Ci/mmol; Amersham) et 5 μ l de TélomixB (200 mM Tris-HCl pH 8.2, 20 mM dATP, 20 mM dTTP, 4 μ M dGTP, 4 mM MgCl₂, 8 mM EGTA, 8 mM DTT, 1 μ l RNAGuard [Pharmacia], 4 mM spermidine, 0.4 mM spermine) pour un volume final de 10 μ l. Une quantité égale d'extrait HeLa S100 est ajoutée et le mélange est incubé 1 heure à 30°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 25 μ l de RNase mix (20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mg/ml RNase A) et incubation pendant 15 minutes à 37°C. Après traitement à la protéinase K pendant 15 min à 37°C (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5% SDS, 0.3 mg/ml protéinase K [Pharmacia] pour 25 μ l par réaction), les produits d'extension sont purifiés par 2 extractions au phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Les produits sont fractionnés sur un gel de polyacrylamide 8%/7 M urée.

Pour vérifier si l'effet de UP1 est observé avant et/ou après l'attachement de la télomérase sur l'oligonucléotide, la réaction est incubée dans le télomixB sans dNTPs pour 10 minutes à 30°C sans UP1. Les dNTPs sont alors ajoutés pour débiter l'élongation par la télomérase avec ou sans l'addition de UP1 et le mélange est incubé à 30°C pour un 60 minutes additionnel.

Dans les expériences de compétition, 40 pmoles de l'oligonucléotide TS8A ou MS2 sont incubés avec 60 pmoles de la protéine UP1 pour 15 minutes à 25°C. L'extrait S100 est alors ajouté et incubé pour un autre 15 minutes à température pièce. L'oligonucléotide matrice, [α -³²P]dGTP et le télomixB sont alors inclus au mélange pour débiter la réaction.

Pour tester si la réaction est dépendante de l'ARN, un pré-traitement à la RNase de l'extrait S100 est fait. L'extrait est ajusté à 0.25 mg/ml RNase A et 10 μ l de cet extrait traité est utilisé dans l'essai.

Essai TdT *in vitro*

L'essai a été réalisé selon Froelich-Ammon et al. (1998). 0.83 pmoles d'oligonucléotide (TS10 ou TS) est ajouté à 0-40 pmoles de la protéine UP1, gp32, G-UP1 Δ 2 ou G-UP1 Δ 1 dans le tampon TdT 1X (LIFE and TECHNOLOGIES) et le mélange est incubé à 4°C 16 à 18 heures ou 1 heure à 30°C. La TdT (5U; Pharmacia) et 0.5 μ l de [α -³²P]dTTP (400 Ci/mmol; Amersham) sont ajoutés pour un volume final de 40 μ l, et le tout est incubé pour une heure additionnelle à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 200 μ l de solution stop (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.6% SDS, et 0.1 mg/ml protéinase K) et une incubation subséquente de 2 heures à 45°C. Les produits d'extension sont purifiés par 2 extractions au phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol, puis fractionnés sur gel de polyacrylamide 8%/7 M urée.

Essai de l'ADN polymérase α/δ *in vitro*

L'essai a été réalisé selon le protocole de Riva et al. (Riva et al., 1980). Deux μg de poly (dA-dT)•poly (dA-dT) (Pharmacia) est ajouté à 0.5 μl [α - ^{32}P]dTTP (3000 Ci/mmol; Amersham) et 0-1.2 nmoles de GST-UP1 dans 5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 100 μM dATP, 20 μM dTTP et la mélange est incubé 5 minutes sur glace. 1 μl d'extrait nucléaire HeLa est ajouté pour un volume final de 50 μl et incubé 1 heure à 37°C. Les nucléotides marqués incorporés sont évalués par précipitation au TCA (Sambrook et al., 1989).

Essai ADN polymérase α *in vitro*:

L'essai de Reveal et al. (1997) a été utilisé pour étudier l'activité de l'ADN polymérase α . Brièvement, l'oligonucléotide TS10 (5 pmoles) préalablement purifié sur gel est incubé 60 minutes à 37°C dans 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 et 7.5 mM DTT en présence de: rATP, rCTP, UTP, dATP, dCTP et dTTP (1 mM chacun), [α - ^{32}P]dCTP (3 μCi , 30 μM) et 1 μl extrait nucléaire (NE) HeLa préalablement dialysé contre le tampon de réaction (250 μl NE 2 heures contre 500 ml de tampon avec un changement de tampon après 1 heure). La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 mM EDTA et le volume réactionnel est complété à 200 μl avec de l'eau. Un volume d'acétate d'ammonium 5 M est ajouté, suivi d'une extraction au phénol-chloroforme. 100 μg de glycogène et 1 ml d'éthanol 100% sont ajoutés pour précipiter l'ADN, et les produits sont récoltés par centrifugation à 12000 g pendant 20 minutes, séchés et resuspendus dans 5 μl de colorant formamide (100% formamide déionisée, 0.1%

bromophénol bleu, 0.1% xylène cyanol et 10 mM EDTA). Les produits sont séparés sur gel d'acrylamide (38:2) 20%/7 M urée, et visualisés par autoradiographie sur film XAR (KODAK).

Lorsque des protéines sont incorporées à l'essai, elles sont incubées avec l'oligo, les dNTPs et le [α - 32 P]dCTP pendant 30 minutes à 30°C. Les rNTPs et l'extrait HeLa sont ensuite ajoutés pour débiter la polymérisation. Pour les tests d'inhibition par l'anticorps anti-ADN polymérase α , celui-ci (ou l'anticorps contrôle anti-GST) est mis en présence de l'extrait nucléaire sur glace pendant 30 minutes. Les autres composants de la réaction sont ensuite ajoutés à ce mélange pour débiter la polymérisation. L'extrait nucléaire CB3 et l'extrait post-cytoplasmique HeLa S100 ont également été utilisés dans les essais, sans être dialysés.

Pour les tests de compétition, les oligonucléotides Tel2, Ne4 ou des quantités croissantes de TS10 ont été inclus en même temps que le TS10 initial dans le mélange réactionnel. L'oligonucléotide C5, servant d'amorce d'ADN, a lui aussi été ajouté simultanément à TS10.

Purification d'anticorps anti-ADN polymérase α

L'hybridome SJK-132-20, qui produit un anticorps anti-ADN polymérase α neutralisant l'activité de cette dernière (Tanaka et al., 1982), a été obtenu de American Type Cell Culture collection. L'hybridome est cultivé en suspension dans du DMEM jusqu'à 50-60% de confluence. 150 ml de milieu contenant l'anticorps est récupéré

après centrifugation des cellules à 1800 RPM 2 minutes dans une centrifugeuse Beckman GS-6. La purification de l'anticorps a été effectuée selon Tanaka et al. (Tanaka et al., 1982) avec de légères modifications. Le milieu de culture est directement passé sur une microcolonne de protéine A-Sépharose CL-4B (Pharmacia) de 750 μ l de lit, préalablement équilibrée avec du PBS, à un débit d'environ 2 cm/minute. 10 volumes de PBS sont ensuite passés sur la colonne et l'anticorps est élué par 3.5 ml de 50 mM NaOAc pH 4.0, 150 mM KCl en 12 fractions de 300 μ l. Le contenu en protéine de chaque fraction est vérifié par Bradford (40 μ l du 300 μ l), et les fractions contenant des protéines sont alors rassemblées et dialysées contre 750 ml de 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.2, 150 mM NaCl 16 à 18 heures suivi d'un autre 750 ml pour 2.5 heures. Le 1 ml dialysé est récupéré et concentré sur microcolonne Microcon-100 (Amicon) jusqu'à un volume de 100 μ l. La concentration et la pureté de l'anticorps est vérifié par SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie.

Oligonucléotides

Tel2: GGTTAGGGTTAGGGTTAG

Tel3: GGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG

Tel4: GGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG

Tel6: GGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG

R194S: TCCAGTCAGGCAGGTCGCAGT

R194AS: ACTGCGACCTGCCTGACTGGA

R196AS: AGAACCACTGGCACCTCTCTG

R196S: CAGAGAGGTGCCAGTGGTTCT

TS10: (TTAGGG)₁₀

TS8A: (TTAGGG)₈TGAAGAAAATTAG

T3 primer: ATTAACCCTCACTAAAG

(C3TA2)₃: CCCTAACCCCTAACCCCTAA

C5: CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA

MS2: TGCTAGGATCCGGAGGCCTCGCGATAGTAGATGCCGGAGTTTGC

AT2: GGTCCTGTGATCCGGTAGGGTTAGGGTTAGGGT

VT3R2: TAGGGTTAGGGTTAGGGTGGTCCTGTGATCCGG

TS1: AATCCGTCGAGTAGGGTT

TS: AATCCGTCGAGCAGAGTT

Universal Primer (UP): GTAAAACGACGGCCAGT

3. Résultats

A. La maturation de A1 en UP1: une étape importante pour moduler l'allongement des télomères?

A1 et UP1 peuvent tous deux promouvoir l'allongement des télomères dans les cellules CB3 et HeLa (LaBranche et al., 1998). Certaines évidences ont montré que UP1 pouvait être généré à partir de protéines hnRNPs purifiées, par une activité protéolytique clivant à la manière de la trypsine (Pandolfo et al., 1985, Riva et al., 1986). Nous avons tenté de savoir si l'activité de A1 sur les télomères nécessite une conversion en UP1. Trois études ont été réalisées afin de répondre à cette question.

1. Activité protéolytique *in vitro*

Les expériences de Pandolfo et al. (1985) ont identifié une activité de clivage protéolytique qui génère des protéines de poids moléculaires de 22-28 kDa (dont UP1) à partir d'une population purifiée de protéines hnRNPs (dont A1). Nous avons tenté de monter un test d'activité protéolytique similaire en utilisant la protéine recombinante GST-A1 (58 kDa) incubée en extrait nucléaire pour une longue période. Les produits de clivage de GST-A1 peuvent être mimés par clivage protéolytique partiel à la trypsine, générant une protéine de ~48 kDa comigrant avec GST-UP1, visualisée par SDS-PAGE et immunobuvardage avec un anticorps anti-GST (fig. 4A, pistes 13 et 14; fig. 4B, pistes 1 et 2). Différents types et quantités d'extraits nucléaires ont été utilisés, en combinaison avec des quantités variables de GST-A1, pour des périodes d'incubation variant de 15 à 30 heures (fig. 4 et résultats non montrés).

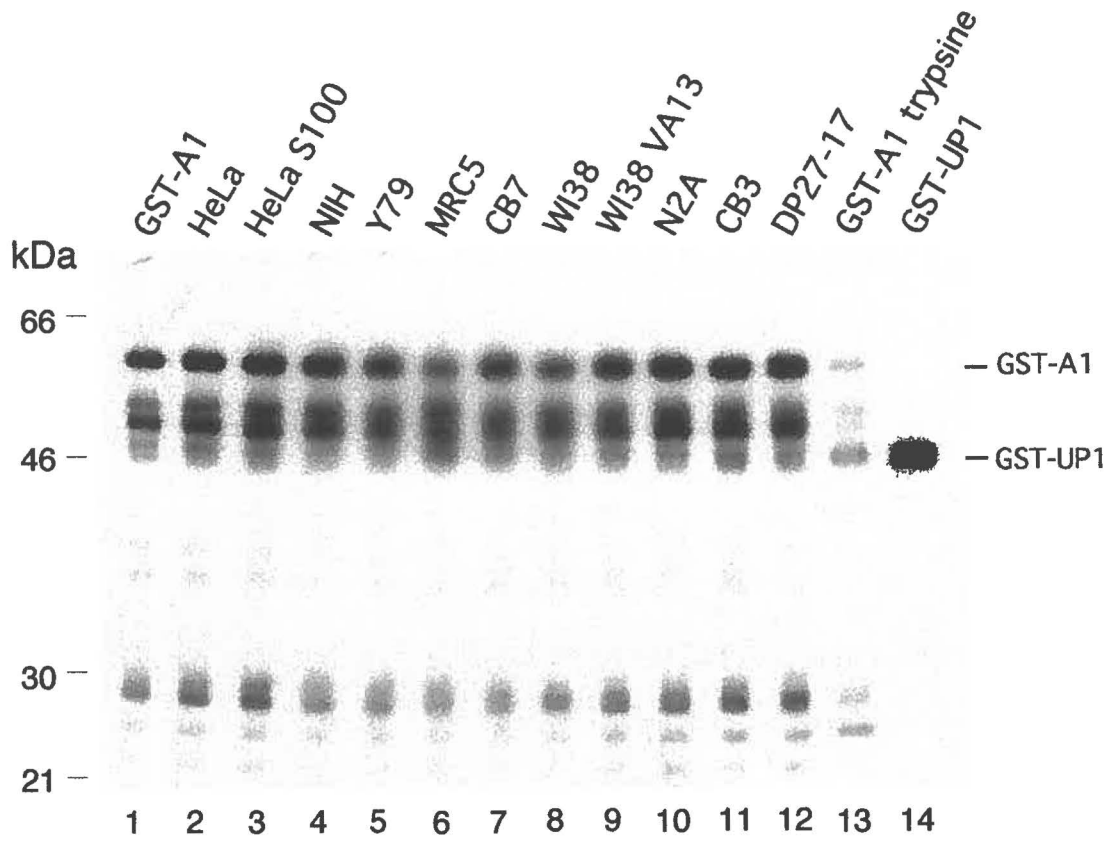
Aucune augmentation dans la quantité de la protéine à 48 kDa n'a pu être détectée, ni de diminution parallèle de la quantité de GST-A1. Un exemple de résultats est montré à la figure 4A (pistes 2 à 12). De façon à vérifier si les extraits nucléaires contenaient une activité pouvant inhiber le clivage de la protéine recombinante (par exemple la grande quantité de protéines présentes dans l'extrait pouvant servir de substrats à un faible taux d'activité protéolytique) une coupure partielle à la trypsine de GST-A1 a été réalisée en présence d'extraits nucléaires HeLa (fig. 4B). Le clivage de GST-A1 en absence d'extrait est complet (100%) à 40 ng de trypsine (piste 2), mais seulement ~40% de clivage est observé en présence d'extraits à 67 ng de trypsine (piste 7), suggérant qu'une faible activité de clivage dans l'extrait pourrait être inhibée par des composants de l'extrait.

2. Activité protéolytique *in vivo*

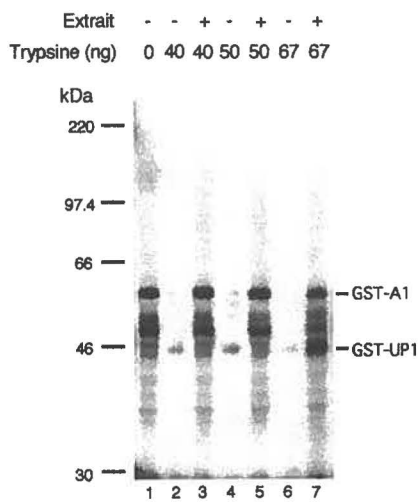
Nous avons tenté de vérifier si l'activité protéolytique pouvait être détectée *in vivo*. Pour ce faire, nous avons transfecté le plasmide pMSCV2.2-TAG-A1, codant pour l'ADNc de A1 avec en N-terminal un épitope TAG, dans une lignée cellulaire (GPA) permettant l'encapsidation rétrovirale d'ADN transfecté. Les virus isolés ont servi à l'infection de huit lignées cellulaires transformées et non-transformées. La présence des protéines TAG-A1 (~37 kDa), et potentiellement TAG-UP1 (~27 kDa), est déterminée par immunobuvardage avec un anticorps anti-TAG après un certain nombre de passages cellulaires post-sélection. Chez les 8 lignées analysées, toutes expriment la protéine TAG-A1, se manifestant par une intensification de la bande (X) comigrant avec TAG-A1 dans les contrôles néo (fig. 4C, pistes 2 à 15). Les anticorps

monoclonaux contre des épitopes de *c-myc* humain montrent souvent des réactivités croisées avec une douzaine de protéines nucléaires et cytoplasmiques, allant de 32 à 120 kDa (Giallongo et al., 1983, Beimling et al., 1985, Evan et Hancock, 1985, Gazin et al., 1986, Naoe et al., 1989, Gibson et al., 1992.). Par contre, aucune lignée ne montre une bande comigrant avec la protéine TAG-UP1 (piste 16). Cinq des lignées (CB3, N2A, NIH, HeLa, GPA) ont été retestées après un plus grand nombre de passages et aucune n'a révélé la présence de TAG-UP1 (données non montrées). La faible bande semblant comigrer avec TAG-UP1 dans la lignée WI38 VA13 (piste 13) n'est qu'un artefact dû à la mauvaise révélation du Western Blot, car une expérience subséquente avec le même échantillon n'a pas révélé la présence de cette bande (données non montrées).

A



B



C

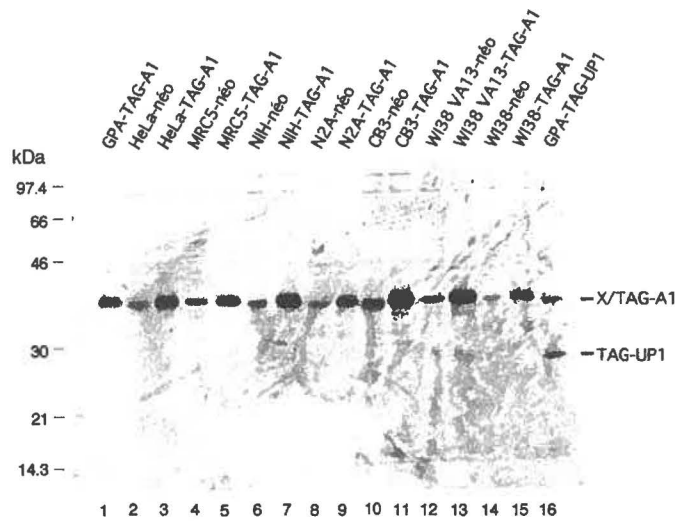


Figure 4. Essai de clivage de A1 en UP1 *in vitro* et *in vivo*. (A) La protéine GST-A1 n'est pas clivée en GST-UP1 *in vitro* en présence d'extrait nucléaire. GST-A1 (50 pmoles, piste 1) est incubée pendant 15 heures avec 10 μ l des différents extraits nucléaires (pistes 2 à 12) ou soumise à une coupure partielle à la trypsine (piste 13). Un dixième de la réaction (5 pmoles de GST-A1) est mise sur gel. Piste 14, 5 pmoles de GST-UP1. Les produits sont révélés par SDS-PAGE et immunobuvardage avec un anticorps anti-GST. B, L'extrait nucléaire inhibe le clivage protéolytique de GST-A1 par la trypsine. La présence d'extrait nucléaire HeLa (10 μ l) avec la protéine GST-A1 (33 pmoles) est identifiée. Des quantités croissantes de trypsine (40, 50, 67 ng) sont ajoutées à GST-A1 et au mélange extrait-GST-A1 (pistes 2 à 7). C, La protéine TAG-A1 n'est pas clivée en TAG-UP1 *in vivo*. Huit lignées cellulaires sont infectées avec les virus produits par les cellules GPA codant et exprimant la protéine TAG-A1 (37 kDa) ou seulement le vecteur (néo) (pistes 1 à 15). La lignée GPA-TAG-UP1 transfectée avec le plasmide pMSCV-TAG-UP1 exprime la protéine TAG-UP1 (27 kDa - piste 16). Une bande (X) comigre avec TAG-A1 dans les contrôles néo. Les protéines sont révélées par SDS-PAGE et immunobuvardage avec un anticorps anti-TAG.

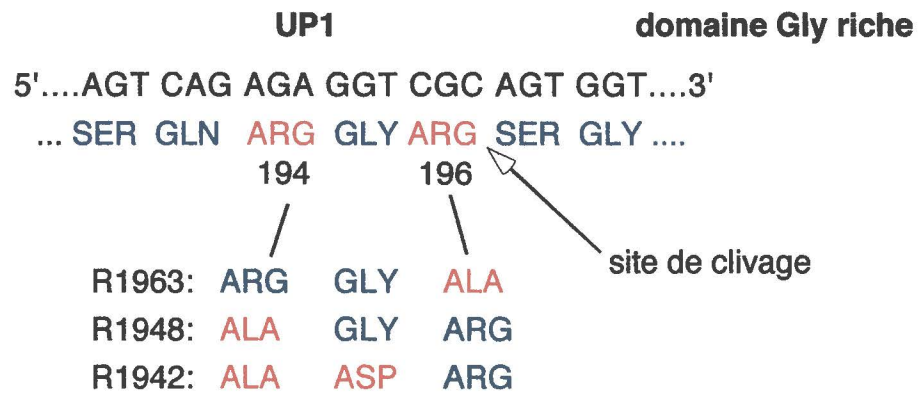
3. Mutations ponctuelles au site de clivage

L'arginine 194 (ARG-194) située deux a.a. en amont du site de clivage de A1 en UP1 subit une modification post-traductionnelle inhabituelle, c.-à-d., une double méthylation (Williams et al., 1985, Kumar et al., 1986.). De plus, l'arginine directement au site de clivage (ARG-196) subit une méthylation simple. Il a été proposé que ces événements constituent des signaux pour stimuler la conversion de A1 en UP1. Des mutants ponctuels de A1 ont donc été créés à ces positions, dans le but d'entraver la maturation potentielle de A1 en UP1 et de connaître son implication dans la modulation de la longueur des télomères. L'ARG-194 (R1948) ou l'ARG-196 (R1963) ont été remplacées chacune par une alanine (fig. 5A). Une seconde mutation issue de l'infidélité de la Taq polymérase a été créée dans un mutant de l'ARG-194, où la glycine 195 (GLY-195) est mutée en acide aspartique (R1942) (fig. 5A). Des protéines de fusion pour chacun des mutants ont été générées et testées en clivage protéolytique partiel à la trypsine *in vitro* pour leur résistance à la coupure. Les mutants GST-R1942 (fig. 5B, pistes 6 à 9) et GST-R1963 (pistes 14 à 17) ont montré une diminution de l'efficacité de clivage par rapport à GST-A1 (pistes 2 à 5), et GST-R1948 (pistes 10 à 13). De plus, le clivage du double mutant R1942 génère une bande migrant légèrement plus haut que GST-UP1 (comparer piste 1 avec pistes 6 à 9). Ainsi, pour certains des mutants, l'activité de coupure semble partiellement entravée par rapport à A1, et semble même se situer en C-terminal du site de clivage normal pour le mutant R1942, suggérant que les a.a. flanquant le site de coupure peuvent moduler l'efficacité de clivage.

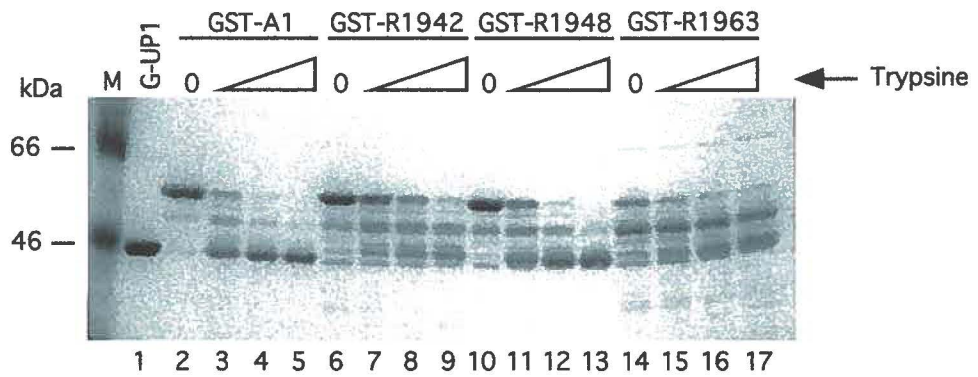
Les plasmides pMSCV-TAG-néo, A1, R1942, R1948 et R1963 ont été transfectés dans les cellules GPA et les virus isolés ont servi à l'infection de cellules HeLa et CB3. Des prélèvements d'ADN génomique ont été effectués au fil des passages cellulaires et la longueur des fragments de restriction terminaux (TRFs) a été analysée par hybridation "in-gel" avec la sonde $(C_3TA_2)_5$. Les cellules HeLa infectées seulement avec le vecteur (néo) ont montré une augmentation de la taille des télomères de 3.5 à 6 kb après 14 passages (fig. 5C, comparer piste 1 avec pistes 5 à 7), quoique inférieure à l'augmentation générée par l'expression de A1 (3.5 à 9 kb, pistes 2 à 4). Chaque mutant a engendré une augmentation pratiquement identique à celle du contrôle néo, soit de 3.5 à 7 kb (pistes 8 à 16). Dans les CB3, après 18 passages, les cellules infectées avec néo montrent également une légère hausse de la taille des TRFs de 7 à 8 kb (fig. 5D, comparer piste 1 à pistes 6 à 9), mais A1 produit une augmentation légèrement supérieure et équivalente à celle provoquée par les trois mutants, soit de 3 à 9 kb (pistes 2 à 5 et 11 à 21). Ainsi, ces résultats suggèrent que chez les cellules HeLa, les mutations semblent réduire la capacité de A1 à stimuler l'allongement télomérique, suggérant que la maturation de A1 en UP1 pourrait être entravée. Par contre, l'expression des protéines A1 mutantes dans les cellules HeLa (fig. 5E) est plus faible que l'expression de A1 (pistes 1 à 5). Bien que la quantité d'extrait du mutant R1963 dans les cellules HeLa semble moindre que les autres en se basant sur la détection d'une protéine de snRNPs révélées par l'anticorps Y12 (fig. 5E), ce mutant montre une expression plus faible même après ajustement de la quantité d'extraits (données non montrées). Chez les CB3 (pistes 6 à 10), aucune différence d'expression entre les protéines mutantes et la protéines A1 n'est observée.

La bande comigrant avec TAG-A1 en figure -4C (X) n'apparaît pas ici car celle-ci n'est révélée que par une surexposition du Western Blot ce qui n'a pas été nécessaire ici. Ces résultats suggèrent que l'expression des protéines mutantes dans les cellules CB3 est capable de promouvoir une augmentation significative de la taille des télomères. L'incapacité d'observer cet effet dans les cellules HeLa pourrait être due à la plus faible expression des protéines mutantes. Étant donné que les cellules HeLa produisent de grandes quantités de A1 de façon endogène (ce qui n'est pas le cas pour les CB3 qui sont déficientes en A1), il pourrait être plus difficile d'observer dans les cellules HeLa un effet positif lorsque les concentrations des protéines mutantes sont réduites.

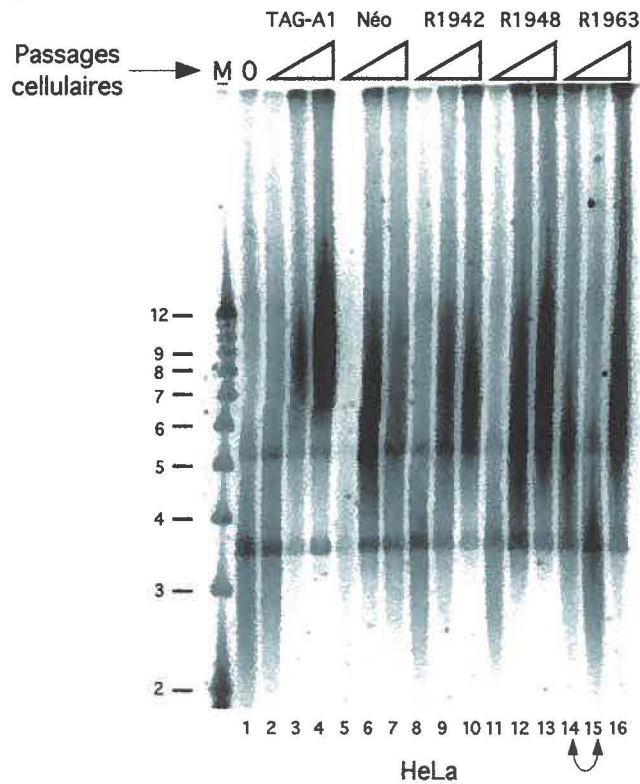
A



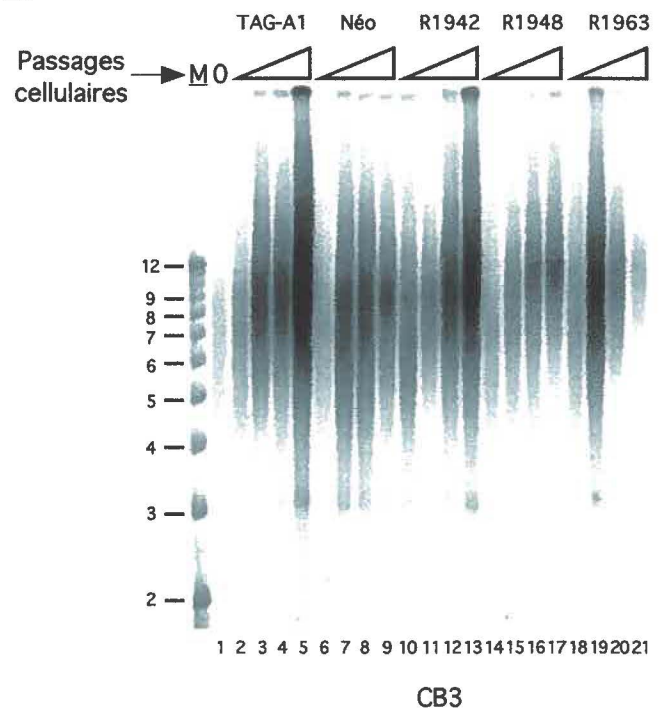
B



C



D



E

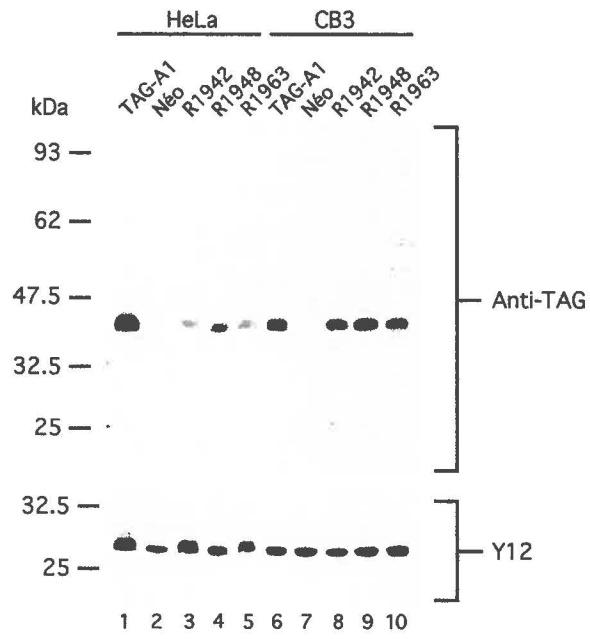


Figure 5. La conversion de A1 en UPI ne serait pas nécessaire pour son activité sur les télomères. **A**, Mutations ponctuelles de hnRNP A1 à l'arginine 196, l'arginine 194 et aux résidus arginine 194 et glycine 195. **B**, Clivage protéolytique partiel à la trypsine de GST-A1 (pistes 2 à 5) et de ses mutants ponctuels au site de clivage (pistes 6 à 17). Les protéines (3.5 μ g) sont incubées de 0 à 30 minutes en présence de trypsine (8 ng) et des échantillons sont pris à 10, 20 et 30 minutes. Piste 1, la protéine GST-UP1 (3 μ g). Les produits de clivage sont séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. **C**, Effet des mutations ponctuelles sur l'allongement des télomères chez les cellules HeLa. Des prélèvements d'ADN génomique ont été récoltés à 3, 9 et 14 passages cellulaires. Les prélèvements à 3 et 9 passages du mutant R1963 ont été inversés sur gel, la piste 14 correspondant à 9 passages et la piste 15 à 3 passages. L'ADN digéré par *Hinf*I et *Rsa*I est séparé sur gel d'agarose 0.5%, dénaturé et hybridé directement dans le gel avec une sonde $(C_3TA_2)_3$ marquée en 5' au ^{32}P . M = marqueur de poids moléculaire (kb). **D**, Les mutations ponctuelles au site de clivage de A1 en UPI n'entravent pas l'activité de A1 sur les télomères des cellules CB3. Des prélèvements d'ADN génomique ont été récoltés à 3, 9, 14 et 18 passages cellulaires. **E**, L'expression des protéines mutantes est plus faible que celle de TAG-A1 dans les cellules HeLa (pistes 1 à 5) mais pas dans les CB3 (pistes 6 à 10). Les lysats totaux de chaque échantillon ont été séparés par SDS-PAGE et la présence des protéines est révélée par immunobuvardage avec un anticorps anti-TAG. En bas, la membrane a été réhybridée par l'anticorps Y12 qui reconnaît la protéine B' commune aux snRNPs.

B. Liaison de A1/UP1 aux répétitions télomériques

LaBranche et al (1998) ont montré que des protéines A1 et UP1 recombinantes (GST-A1 et GST-UP1) lient des oligonucléotides possédant au moins deux répétitions télomériques humaines TTAGGG de façon spécifique. Des oligos portant des répétitions TTGGGG et TTTGGG sont moins efficacement liés par ces protéines. Dans le but d'appuyer les évidences de liaison spécifique et de préciser davantage le mode de liaison de A1/UP1 au niveau des répétitions télomériques, des études supplémentaires ont été réalisées.

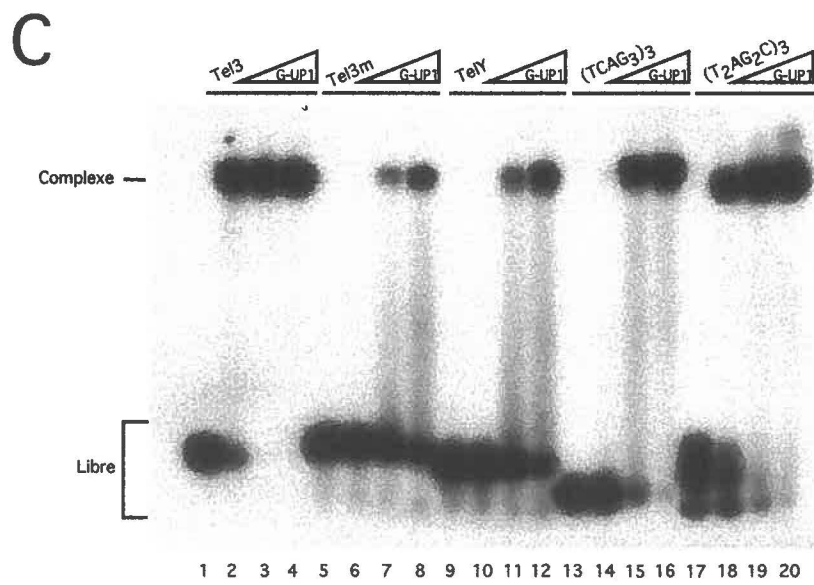
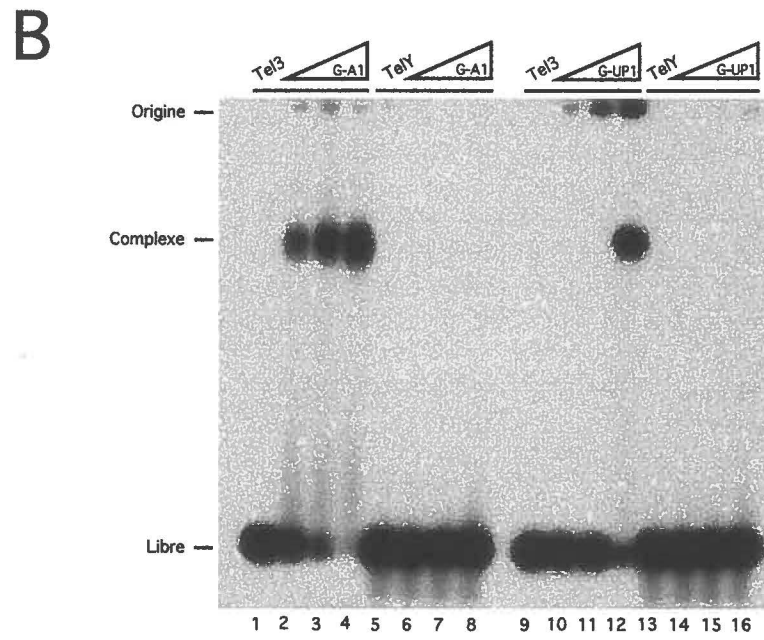
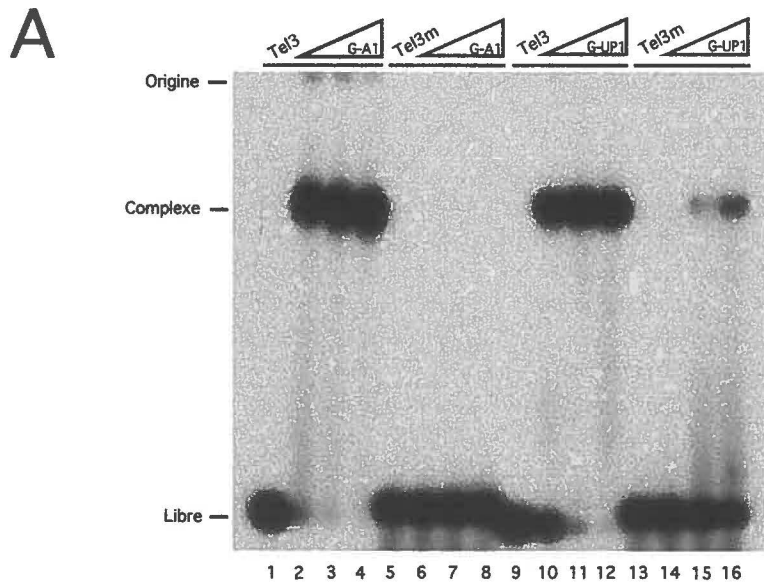
La spécificité de séquences de liaison de GST-A1/GST-UP1 a été étudiée par des gels de retardement utilisant des oligos marqués contenant des répétitions normales (Tel3), mutées TTTGGG (Tel3m) et 22 nu de répétitions télomériques simple-brin de levures (TelY). Les complexes sont visualisés après fractionnement sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. GST-A1 ne lie pas du tout les oligos Tel3m et TelY (fig. 6A et B, pistes 5 à 8). G-UP1 quant à lui ne lie que très faiblement Tel3m (fig. 6A, pistes 13 à 16), et ne lie pas TelY à ces concentrations (fig. 6B, pistes 13 à 16). La figure 6C montre l'affinité moindre de G-UP1 pour les deux oligos par rapport à Tel3 (pistes 1 à 12). À l'opposé de la figure 6B (pistes 13-16) où G-UP1 ne lie pas TelY, G-UP1 lie faiblement cet oligo à la figure 6C à des quantités de protéines similaires. Deux préparations différentes de protéines G-UP1 ont été utilisées pour effectuer les gels de retardement des figures 6B et 6C, et la préparation utilisée pour la figure 6C a une affinité un peu plus forte que celle de la figure 6B (comparer la liaison à l'oligo Tel3). Ceci suggère que la plus forte affinité a permis la liaison à TelY. G-UP1 montre une

liaison réduite à l'oligo (TCAG₃)₃ (pistes 13 à 16), tandis que G-UP1 lie avec une bonne affinité l'oligo (T₂AG₂C)₃ (pistes 17 à 20). Ces résultats appuient la spécificité de liaison observée par LaBranche et al. (1998). Par contre, ces observations divergent de celles de Burd et Dreyfuss (1994) et Abdul-Manan et Williams (1996). Ces derniers ont montré que la liaison de A1 à l'équivalent ARN de répétition télomérique, UUAGGG, demeure forte malgré l'introduction de mutations dans cette séquence. La plus haute affinité de A1 pour l'ARN simple-brin versus l'ADN simple-brin (Nadler et al., 1991, Ishikawa et al., 1993, Abdul-Manan et al., 1996) pourrait expliquer cette différence, corroboré par les observations qu'une seule séquence UAG^G/_AGU peut être liée par A1 ou UP1 (Burd et Dreyfuss, 1994, Chabot et al., 1997, Blanchette et Chabot, 1999), alors qu'une seule séquence TAGGGT ne l'est pas (LaBranche et al., 1998). Nos résultats sont compatibles avec ceux obtenus par Ishikawa et al. (1993) qui montrent que des ribooligonucléotides portant des mutations à l'un ou l'autre des deux derniers nucléotides de la séquence UUAGGG forment des complexes avec une fraction protéique comprenant UP1, de manière équivalente à des oligos portant la séquence non-mutée.

Dans le contexte naturel, les extrémités simple-brin télomériques forment une extension 3' de 50-150 nt. Une autre forme de spécificité de liaison des protéines A1/UP1 pour les répétitions télomériques pourrait alors se manifester par la position, en 5' ou en 3', des séquences TTAGGG liées sur un oligonucléotide. De façon à établir si ces protéines vont lier de façon plus efficace des répétitions télomériques dans leur contexte naturel, deux oligonucléotides, possédant des séquences TTAGGG en 3' (AT2) ou en 5' (VT3R2) mais dont le reste de la séquence est identique (voir

p.56-57), ont été utilisés dans une expérience de gel de retardement en compétition (fig. 6D). Lorsque AT2 est lié à 100% par GST-UP1 (comparer piste 11 avec 12), l'ajout de quantités croissantes de VT3R2 compétitionne moins bien la liaison que l'addition de AT2 (pistes 13 à 20). À l'inverse, lorsque G-UP1 est liée à VT3R2 à 100% (comparer pistes 1 et 2), AT2 compétitionne mieux la liaison que VT3R2 (pistes 3 à 10). Ainsi, même si les répétitions TTAGGG situées en 5' ou en 3' d'un oligo peuvent être liées par GST-UP1, ce dernier lie de façon plus efficace les répétitions en position 3', similaire à leur position naturelle *in vivo*.

Une seule séquence TAGGGT ne peut être liée par GST-UP1 sur un oligonucléotide (LaBranche et al., 1998). Un minimum de deux répétitions TAGGGT sont nécessaires pour permettre la liaison. Nous avons tenté de savoir si ces séquences TAGGGT doivent être contiguës pour assurer la liaison de GST-UP1. Pour ce faire, une série d'oligonucléotides possédant de 0 à 6 nucléotides séparant deux séquences TAGGGT ont été utilisés dans une expérience de gel de retardement avec GST-UP1 (fig. 6E). La présence de 3 ou 6 nt entre les séquences TAGGGT n'influence aucunement la liaison de GST-UP1 par rapport aux séquences directement contiguës (comparer pistes 1 à 4 avec 13 à 20), alors qu'une séparation de 1 et 2 nt nuit fortement à la liaison (pistes 5 à 12).



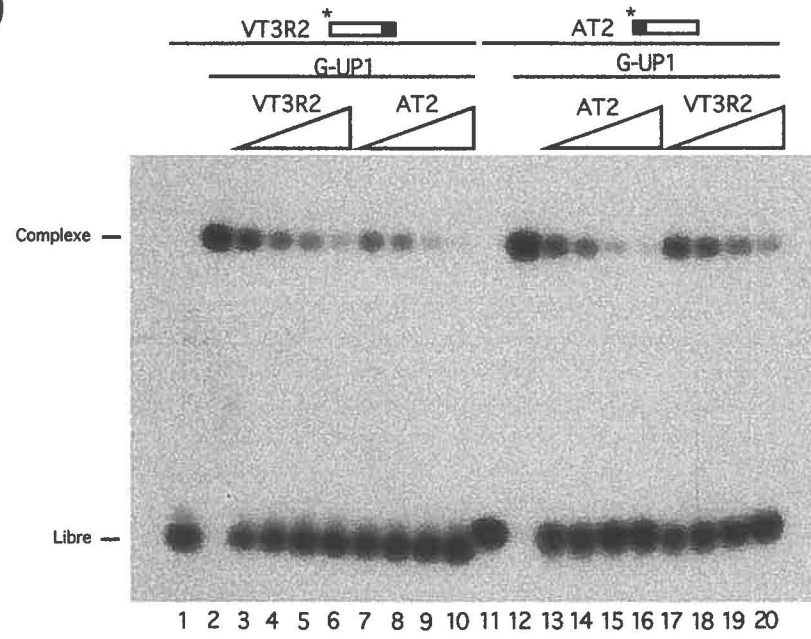
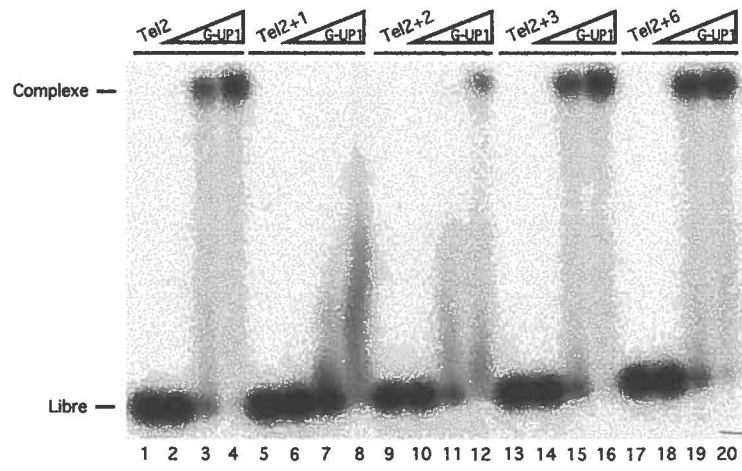
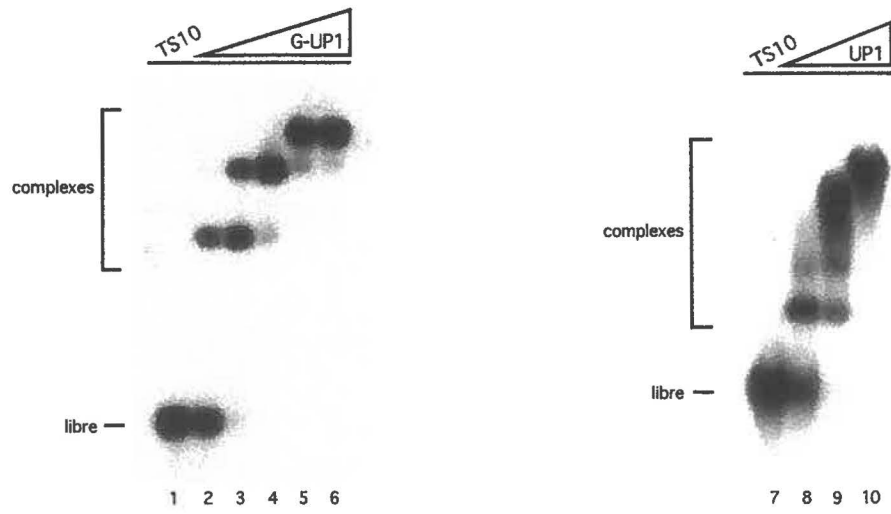
D**E**

Figure 6. Spécificité de liaison de A1/UP1 aux répétitions télomériques. Tous les gels de retardement ont été effectués avec des oligonucléotides simple-brin radiomarqués au ^{32}P en 5', et les complexes sont fractionnés sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant. La position des complexes et des oligonucléotides libres est indiquée. **A**, ~100 nmoles de l'oligo Tel3 (possédant 3 répétitions TAGGGT) ou Tel3m (possédant 4 répétitions TTTGGG) est incubé avec 1.66, 4.16 et 8.33 pmoles de GST-A1 ou 2, 5 et 10 pmoles de GST-UP1 (G-UP1). **B**, L'oligo TelY (22 nt de répétitions télomériques de levure *S. cerevisiae*) ou Tel3 sont utilisés (~100 nmoles chacun) pour les essais de liaison. Des quantités de 0.83, 1.66 et 2.5 pmoles de GST-A1 ou 1, 2 et 3 pmoles de G-UP1 ont été utilisées. **C**, Les oligos mutés $(\text{TCAG}_3)_3$ et $(\text{T}_2\text{AG}_2\text{C})_3$ (~100 nmoles chacun) ont été comparés avec Tel3, Tel3m et TelY pour la liaison à G-UP1 (1, 2 et 4 pmoles). **D**, Gel de retardement en compétition pour la préférence liaison à des répétitions télomériques en position 5' ou 3'. Une pmole des oligos VT3R2 ou AT2 est mis en présence de 3 pmoles de GST-UP1 avec des quantités croissantes de compétiteur froid (6.25, 12.5, 25 et 50 pmoles) comme indiqué. Le rectangle ouvert représente des répétitions télomériques et le rectangle fermé des séquences non-télomériques. L'astérisque indique la position du marquage au ^{32}P . **E**, Effet de la distance entre les répétitions TAGGGT sur la liaison de GST-UP1. Des quantités croissantes de GST-UP1 (0, 0.5, 1 et 2 pmoles) sont incubés avec chaque oligo (~100 nmoles) comme indiqué. Le nombre de nucléotide entre les répétitions est indiqué par la mention +1, +2, +3 et +6 suite au nom de l'oligo.

La plupart des expériences précédentes ont été effectuées avec des oligonucléotides relativement courts (18-36 nt). De façon à se rapprocher un peu plus de la liaison à une extension télomérique simple-brin naturelle (50-150 nt), un oligonucléotide (TS10) de 60 nt possédant 10 répétitions TTAGGG contiguës, et donc 9 sites de liaison pour A1, a été utilisé pour tester la liaison des protéines GST-UP1 et UP1. GST-UP1 forme avec TS10 trois complexes distincts (fig. 7A, pistes 1 à 6). Pour la protéine UP1 sans le domaine GST, un complexe majeur est formé à faible concentration de protéines, plusieurs complexes intermédiaires sont observés en augmentant la concentration, et un seul complexe distinct est formé à la plus forte concentration de UP1 (pistes 7 à 10). La présence du domaine GST semble donc affecter la structure des complexes formés sur un grand oligonucléotide. De façon à élucider comment le domaine GST peut influencer la liaison, de plus petits oligos ont été utilisés pour la liaison de UP1 en comparaison avec GST-UP1. UP1 lie avec une affinité beaucoup moindre que GST-UP1 un oligo ne possédant que deux sites de liaison pour A1/UP1 (Tel2)(fig. 7B, pistes 1 à 7). Comme les domaines GST peuvent former des dimères (Tudyka et Skerra, 1997), il est possible que les molécules d'UP1 s'associent à l'oligo sous forme de dimère et que la dimérisation des domaines GST stabilise le complexe, ce qui ne se produit pas avec UP1. La formation d'un seul complexe stable de G-UP1 avec un oligo portant 3 sites de liaison (LaBranche et al., 1998) appuie l'hypothèse de la liaison sous forme de dimère à deux sites de liaison. Sur ce même oligo (Tel3), UP1 lie en un seul complexe avec une affinité un peu plus forte que sur Tel2 mais encore nettement inférieure à la liaison de G-UP1 (données non montrées), suggérant que la présence d'une séquence adjacente non-liée pourrait

aider à stabiliser un potentiel dimère. Avec un oligo portant 4 sites de liaison (Tel4), UP1 et GST-UP1 forment tous deux un seul complexe, avec une affinité légèrement supérieure pour GST-UP1 (fig. 7B, pistes 8 à 14). La présence d'un seul complexe de GST-UP1 sur Tel4 suggère que, malgré la présence de 4 sites de liaison, un seul dimère peut lier l'oligo, et qu'ainsi les domaines GST pourraient interférer avec la liaison d'un autre dimère adjacent au premier. Le complexe formé par UP1 sur Tel4 suggère encore ici qu'une plus grande quantité de séquences adjacentes aux sites de liaison aide à stabiliser un dimère de UP1 sur l'oligo, sans toutefois permettre la liaison de deux dimères car leur proximité pourrait rendre leur association à l'oligo instable. Finalement, un oligo possédant 6 répétitions TAGGGT est lié avec sensiblement la même affinité par UP1 et GST-UP1, menant à la formation de deux complexes avec l'oligo (pistes 15 à 21). La présence de doublets de séquences TAGGGT séparés par d'autres séquences pourrait favoriser une liaison stable de deux dimères de UP1 ou de GST-UP1, laissant assez d'espace aux dimères de UP1 pour lier l'oligo en évitant des encombrements entre les domaines GST (voir figure 8). Le même principe semble être respecté pour la liaison de GST-UP1 à TS10, c.-à-d., la nécessité de conserver des séquences entre les complexes pour éviter l'interférence des domaines GST ne permet la formation que de 3 complexes (figure 8). Des dimères de UP1 pourraient se lier de façon stable à TS10 seulement sur les répétitions qui sont internes, où la dernière et la première répétition ne sont jamais utilisées pour la liaison.

A



B

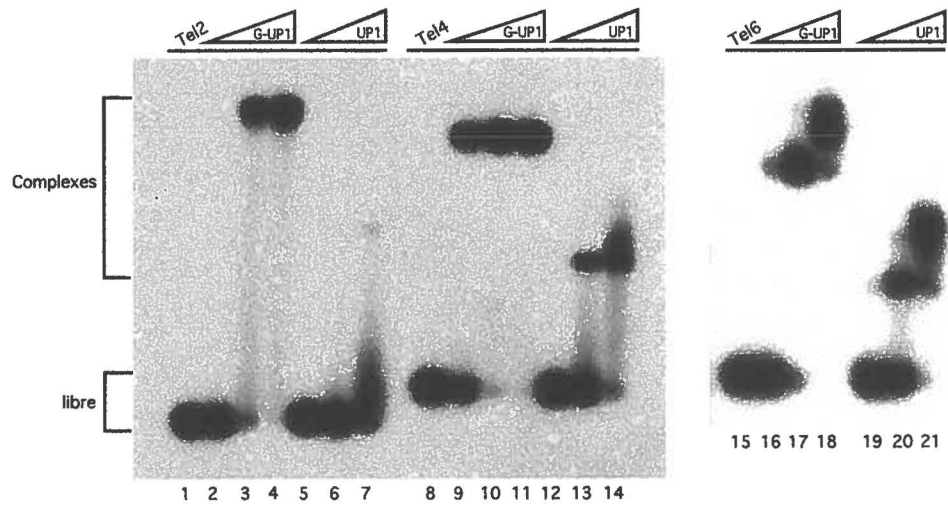
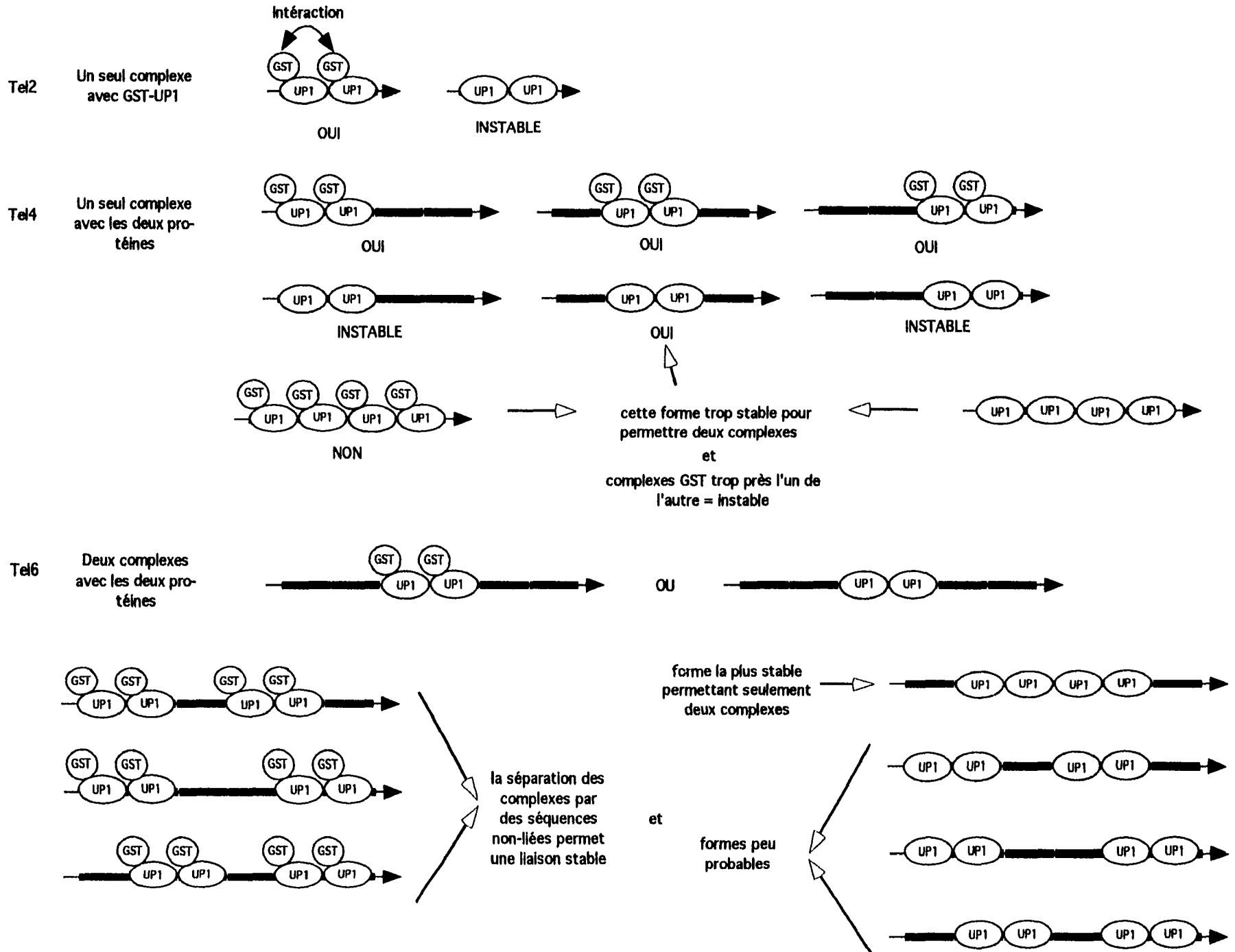
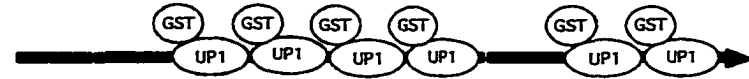
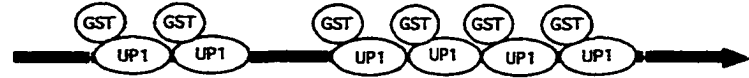
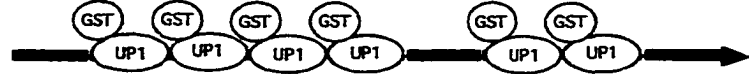
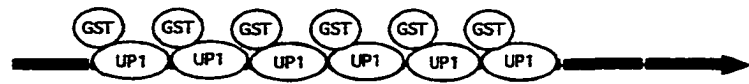


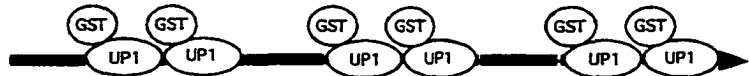
Figure 7. Différence de liaison de GST-UP1 et UP1 à des oligonucléotides possédant des répétitions télomériques. Tous les gels de retardement ont été effectués avec des oligonucléotides simple-brin radiomarqués au ^{32}P en 5', et les complexes sont fractionnés sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant. La position des complexes et des oligonucléotides libres est indiquée. **A,** Cinq pmoles de l'oligo TS10 est incubé avec 0, 2.5, 5, 10, 20 et 40 pmoles de GST-UP1 (pistes 1 à 6) ou 0, 10, 20, 40 pmoles de UP1 (pistes 7 à 10). **B,** Des quantités de 0.5, 1 et 2 pmoles de GST-UP1 ou 0, 1 2 et 4 pmoles de UP1 sont incubées avec les oligos Tel2, Tel4 ou Tel6 (~100 nmoles chacun).



TS10
Trois complexes
avec les deux pro-
téines



↑
Improbables
car inter-
férence des
domaines
GST



↑
Formes les
plus stables



Liaison d'un
autre dimère
instable

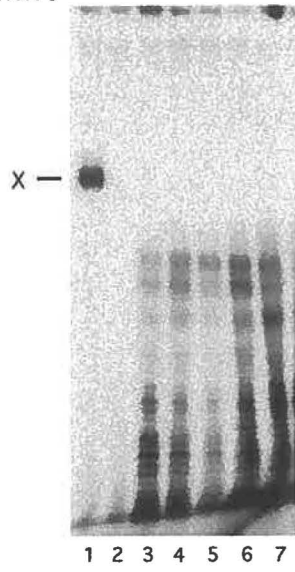
Figure 8. Modèle de liaison de UP1 et GST-UP1 aux oligonucléotides Tel2, Tel4, Tel6 et TS10. La nécessité d'avoir un minimum de deux sites de liaison à A1/UP1, l'influence des domaines GST et l'effet des séquences adjacentes aux sites de liaison ont été considérés dans l'établissement du modèle.

C. A1/UP1 inhibe l'activité de l'ADN polymérase α

L'activité de l'ADN polymérase α sur un substrat poly dA/dT ou pBR322 partiellement dégradé à l'exonucléase III de *E. coli* est stimulée par du UP1 purifié (Herrick et al., 1976, Riva et al., 1980). Nous avons répété cette expérience en utilisant du poly dA/dT comme substrat et un extrait nucléaire HeLa comme source d'enzyme. La protéine recombinante GST-UP1 est en mesure de stimuler l'activité d'incorporation d'environ 2 fois à un ratio ADN:protéines de 1:15 (données non montrées). Pour vérifier l'effet d'UP1 dans un contexte plus télomérique, nous avons utilisé le test d'activité de l'ADN polymérase α développé par Reveal et al. (1997). Ces derniers ont montré que l'ADN polymérase α peut synthétiser le brin complémentaire d'un oligonucléotide possédant des répétitions télomériques. Dans cet essai, l'oligo TS10 incubé avec un extrait nucléaire HeLa sert de substrat à la synthèse du brin complémentaire riche en C, générant des produits de taille inférieure à la taille de l'oligo (60 nt). Les produits obtenus sont dépendants de la présence de TS10, des rNTPs, des dNTPs, mais indépendants de la présence de rGTP et de dGTP (fig. 9A, pistes 1 à 3, et données non montrées). Le complexe ADN polymérase α -primase est directement responsable de cette activité car cette activité est dépendante des rNTPs, et elle est inhibée par un anticorps monoclonal anti-ADN polymérase α (données non montrées). Lorsque l'oligonucléotide $(C_3TA_2)_5$ (C5) est incorporé à l'essai pour servir d'amorce à la synthèse, la réaction devient indépendante des rNTPs (fig. 9B, piste 2) et n'est plus inhibée par l'anticorps anti-pol α (données non montrées), suggérant une polymérisation issue des ADN polymérases δ et ϵ .

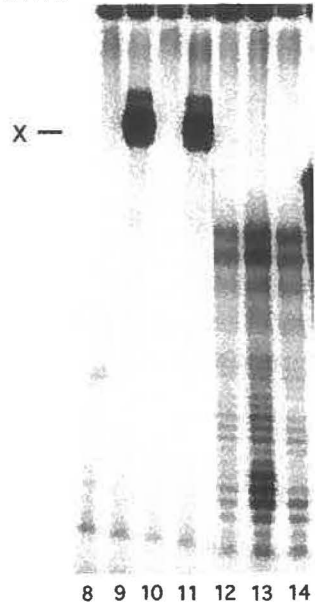
D

G-UP1 (pmoles)	0	0	0	5	50	50	50
TS10 (pmoles)	5	0	5	5	5	10	25
rNTPs	-	+	+	+	+	+	+



E

	Tel2		Ne4		Control	
TS10	-	+	-	+	+	+
rNTPs	+	-	+	-	+	+



TS10					
HeLa			Tel2		
CB3	S100	HeLa	CB3	S100	S100

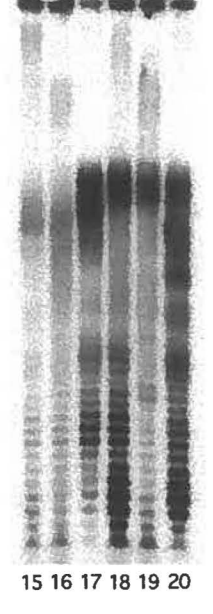


Figure 9. Influence de A1/UP1 sur l'activité de l'ADN polymérase α *in vitro*. **A**, GST-UP1 inhibe l'activité ADN polymérase α rNTP-dépendante. Les rNTPs (rATP, rCTP, UTP) et/ou l'oligo TS10 (5 pmoles) sont inclus dans la réaction comme indiqué. Un produit (X) inconnu apparaît avec n'importe quel oligo lorsqu'on omet les rNTPs de la réaction. Des concentrations croissantes (20-100 pmoles) de GST-UP1 sont pré-incubées avec TS10 avant la réaction (pistes 4 à 8), de même que 40 pmoles des protéines GST-UP1 (G-UP1), UP1, GST ou GST-A1 (pistes 9 à 13). **B**, GST-UP1 n'inhibe pas la synthèse rNTP-indépendante. Dix pmoles de l'oligo C5 complémentaire à TS10 sont ajoutés à la réaction. Des quantités croissantes de UP1, suffisantes pour inhiber la réaction rNTP-dépendante, n'ont pas d'effet sur la synthèse rNTP-indépendante (pistes 5 à 7). **C**, L'activité inhibitrice de G-UP1 est proportionnelle à la liaison de la protéine à l'oligo substrat en gel de retardement (5 pmoles de TS10). **D**, L'effet de UP1 sur la polymérisation est médié par une liaison au substrat. À des concentrations de GST-UP1 partiellement inhibitrices (comparez piste 5 avec 3 et 4), la quantité du substrat TS10 est progressivement augmentée (5 à 25 pmoles - pistes 5 à 7). Cinquante pmoles de l'oligo Tel2 (lié par GST-UP1) ou Ne4 (non-lié par GST-UP1) sont incubées en présence de TS10 dans la réaction sans ajout exogène de GST-UP1 (pistes 8 à 14). **E**, inhibition de la polymérisation par la protéine A1 endogène. Un extrait nucléaire HeLa (possédant un haut niveau de A1), HeLa S100 (niveau moyen de A1) ou CB3 (faible niveau de A1) sont utilisés dans la réaction où un excès de Tel2 (50 pmoles) est co-incubé avec le substrat TS10 (pistes 18 à 20).

L'ajout de quantités croissantes de la protéine GST-UP1 au test d'activité inhibe la synthèse rNTPs-dépendante issue de la pol α (fig. 9A, pistes 4 à 8) mais pas la synthèse rNTPs-indépendante des polymérases δ et ϵ (fig. 9B, pistes 5 à 7). Il y a une parfaite corrélation entre les quantités de GST-UP1 qui lient TS10 et les quantités nécessaires pour inhiber la réaction (fig. 9C). Cette inhibition se produit également en présence de quantités similaires de UP1 sans le domaine GST, GST-A1, T4 gene 32 (gp32), SSB et UP1 Δ 2 (A, pistes 11 et 13 et données non montrées), ce dernier étant une version de UP1 sans le domaine RRM2 (fig. 11A).

De façon à confirmer que l'inhibition observée est bel et bien due à la liaison de GST-UP1 à TS10, et en même temps d'infirmer que nos préparations de protéines contiennent un inhibiteur non-spécifique de l'ADN polymérase α , nous avons effectué les expériences suivantes. Dans des conditions où la réaction est partiellement inhibée par UP1 (fig. 9D, pistes 3 à 5), l'augmentation de la quantité du substrat TS10 relève l'inhibition et stimule même la réaction (pistes 4 et 5), suggérant que l'enzyme est toujours disponible et active pour la synthèse sur un substrat additionnel. Dans la réaction normale sans addition de G-UP1, l'ajout d'un excès de l'oligonucléotide Tel2, possédant des sites de liaison pour A1/UP1 et qui est lié *in vitro* par ces protéines, stimule l'activité de la polymérase (fig. 9D, comparer piste 12 à 13), alors qu'un oligo sans site de liaison et non lié par G-UP1 n'a aucun effet sur la synthèse (comparer piste 12 à 14). Ceci suggère qu'un facteur dans l'extrait nucléaire, potentiellement la grande quantité de la protéine A1 normalement présente dans l'extrait, pourrait être en mesure d'inhiber la réaction, et que l'ajout du compétiteur à la liaison de la protéine sur TS10 relève cette inhibition. Pour confirmer cette dernière hypothèse, l'expérience

précédente a été répétée dans différents types d'extraits: un extrait nucléaire HeLa, qui contient un fort niveau de A1; un extrait HeLa S100, qui possède une quantité modérée de A1; et un extrait nucléaire CB3, qui contient un niveau très faible de A1. L'ajout de Tel2 dans la réaction avec l'extrait nucléaire HeLa a de nouveau stimulé la réaction, a modérément stimulé dans l'extrait HeLa S100 et n'a pas stimulé dans l'extrait CB3 (fig 9E, comparer pistes 15 à 17 avec 18 à 20). Ces résultats suggèrent que l'inhibition endogène est proportionnelle à la quantité de A1 dans l'extrait.

D. A1 et UPI inhibent l'activité télomérasique

Comme la télomérase utilise comme substrat des répétitions télomériques simple-brin liées par A1/UP1, nous avons voulu vérifier l'influence de UPI sur l'activité télomérasique *in vitro*. Pour ce faire, nous avons utilisé un essai d'activité télomérase conventionnel ne faisant pas appel au PCR. Cet essai a été développé par Greider (1987) et Morin (1989), et nous utilisons comme substrat l'oligo TS10 qui contient 10 répétitions télomériques humaines TTAGGG. L'oligo est incubé dans un extrait HeLa S100, en présence ou non de la protéine recombinante UPI ayant perdu le domaine GST. Les produits d'élongation sont visualisés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Des produits correspondant à l'ajout de multiples répétitions télomériques par le télomérase sur TS10 sont observés, symbole d'une haute processivité de l'enzyme (fig. 10A, piste 1). Cette activité est complètement inhibée lorsque l'extrait S100 est préalablement traité à la RNase A (piste 2), suggérant que l'activité est ARN-dépendante et donc issue de la télomérase. Lorsque la protéine UPI est ajoutée en concentrations croissantes, nous observons une réduction dans la quantité de produits

(pistes 3 à 5) à des quantités de UP1 qui saturent l'oligo en formant des complexes (fig. 10B, pistes 1 à 4). La protéine GST-A1 a le même effet que UP1 (fig. 10A, pistes 6 à 8), mais la protéine du phage T4 gene 32 (gp32) liant le simple-brin est moins inhibitrice que UP1 (pistes 9 à 11), malgré qu'elle lie l'oligo TS10 de façon aussi efficace que UP1 à ces concentrations (fig. 10B, pistes 5 à 7).

Il a été proposé par Froelich-Ammon et al. (1998) que la pré-incubation d'un oligonucléotide possédant des répétitions télomériques d'*Oxytricha* avec la télomérase et en absence de dNTPs permettait la liaison de la télomérase au substrat en absence de synthèse active. De plus, l'hétéroduplexe α - β serait en mesure de déplacer la télomérase en place sur le substrat pour inhiber son activité (Froelich-Ammon et al., 1998). Dans un contexte similaire, UP1 est toujours capable d'inhiber l'activité télomérique lorsque l'extrait S100 est pré-incubé avec l'oligo TS10 avant l'ajout de dNTPs (fig. 10A, pistes 12 à 14). Par contre, on ne peut être certain, sans évidence directe, que la télomérase est bel et bien liée au substrat et déplacée par UP1 dans cette condition. La liaison au substrat pourrait être très transitoire en absence synthèse active (sans dNTPs) et ainsi UP1 pourrait encore lier le substrat pour compétitionner la liaison de la télomérase et inhiber son activité.

De façon à vérifier si la présence de sites de liaison pour A1/UP1 est nécessaire pour l'effet de UP1 sur l'activité télomérique, un oligonucléotide (TS) ne possédant pas de séquences TTAGGG mais qui est substrat pour la télomérase a été mis en présence de UP1 et l'activité télomérique est mesurée. UP1 n'a que très peu d'effet sur les courts produits d'élongation de la télomérase sur TS (fig. 10C, pistes 1 et 2), suggérant

une dépendance des séquences TAGGGT pour l'inhibition. Par contre, comme l'ajout de répétitions TAGGGT par la télomérase crée des sites de liaison pour UP1, et qu'il a été montré qu'au moins deux répétitions TAGGGT sont nécessaires pour la liaison stable de UP1 (LaBranche et al., 1998), les longs produits d'élongation possédant deux répétitions sont légèrement inhibés par UP1 (fig. 10C, pistes 1 et 2; +20), corroborant la dépendance aux répétitions TAGGGT pour l'effet d'UP1. Une version modifiée de TS à laquelle une séquence TAGGGT est présente à l'extrémité 3' (TS1) montre une inhibition plus importante des courts produits que TS en présence de UP1 (+14; pistes 3 et 4), suggérant que la présence du site supplémentaire a accéléré la liaison de UP1 et donc l'inhibition après ajout de répétitions par la télomérase.

Pour appuyer la dépendance des répétitions TAGGGT pour l'inhibition de l'activité télomérique par UP1, une quantité suffisante de UP1 pour provoquer l'inhibition a été pré-incubée avec l'oligo TS8A avant d'être incorporé dans l'essai télomérase. TS8A possède des sites de liaison et est lié par UP1 mais représente un très mauvais substrat pour la télomérase (fig. 10D, pistes 1 et 2 et données non montrées). Dans ces conditions, la pré-incubation avec TS8A est en mesure de rétablir partiellement les produits d'extension de TS10 par la télomérase (pistes 5 à 8), ce qu'un oligo sans sites de liaison et non-lié par UP1 (MS2) n'est pas capable de faire (pistes 9 et 10). Ce dernier n'est pas non plus un substrat pour la télomérase (pistes 3 et 4).

De façon à investiguer le mode d'inhibition par UP1 de l'activité télomérase, les molécules d'UP1 auxquelles il manque soit le domaine RRM1 (G-UP1Δ1) ou RRM2 (G-UP1Δ2) (fig. 11A) ont également été testées. Bien que la protéine recombinante

G-UP1Δ2 lie l'oligo TS 10 aussi bien que UP1 (données non montrées), elle n'est pas en mesure d'inhiber son extension par la télomérase (fig. 10E, comparer pistes 4 et 5 avec 1 à 3). UP1Δ1, qui ne lie pas ou très peu TS10, n'a pas d'effet sur l'activité télomérasique (données non montrées).

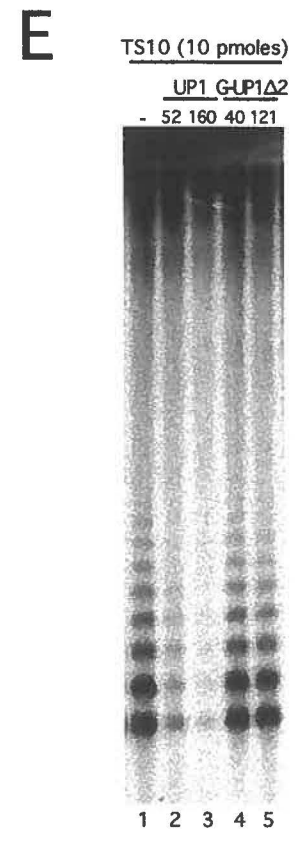
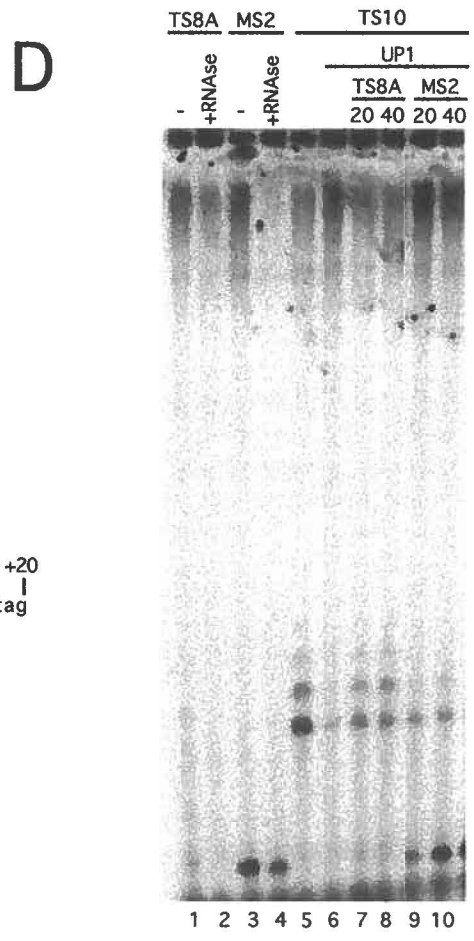
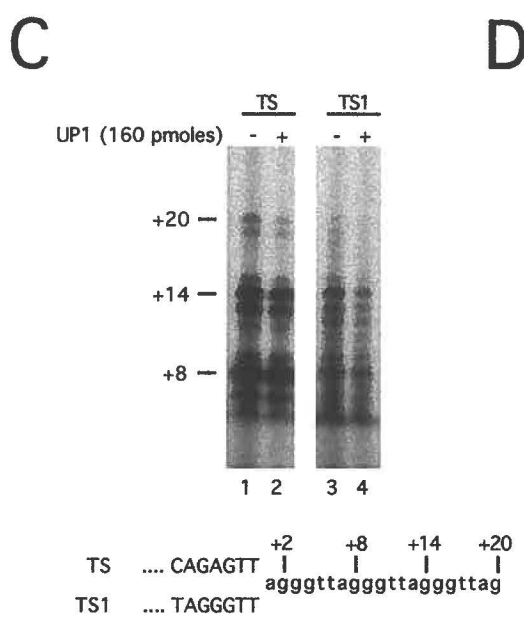
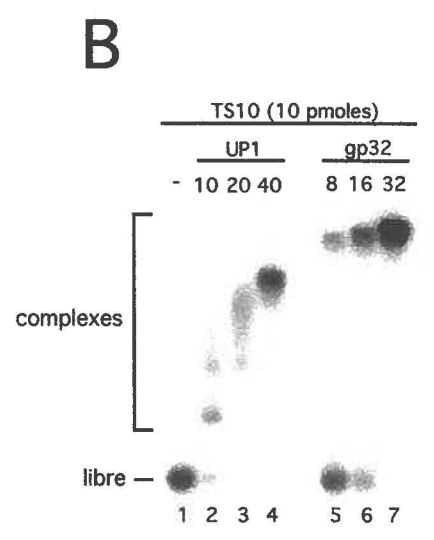
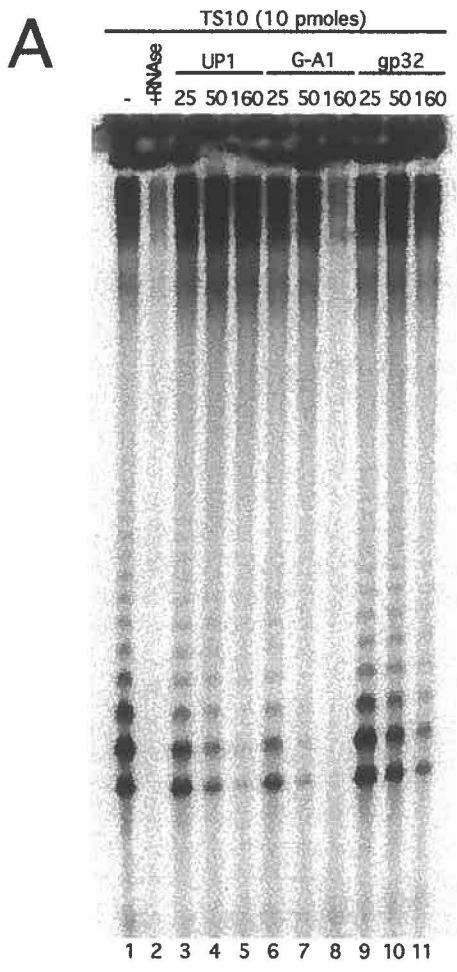
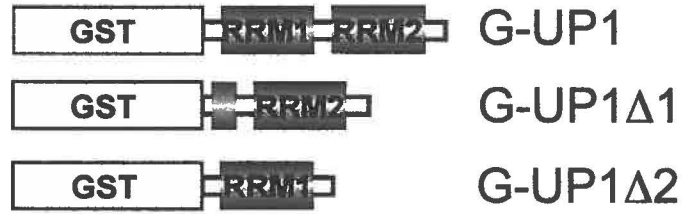


Figure 10. Influence de UP1/A1 sur l'activité télomérasique *in vitro*. **A**, UP1 et GST-A1 inhibent l'activité télomérase. La réaction contenant 10 pmoles de TS10 incubés avec l'extrait HeLa S100 est inhibée par pré-traitement de l'extrait à 0.25 mg/ml de RNase A (piste 2). Vingt-cinq, 50 et 160 pmoles de UP1, GST-A1 et gp32 sont pré-incubées avec TS10 avant la réaction (pistes 3 à 11). TS10 pré-incubé avec l'extrait S100 avant l'ajout d'UP1 et des dNTPs permet encore l'inhibition de la réaction par UP1 (pistes 12 à 14). **B**, Gel de retardement avec UP1 et gp32 sur 10 pmoles d'oligo TS10. Des quantités similaires de UP1 et gp32 sont incubées avec TS10 et les complexes sont séparés sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. **C**, Dépendance des sites de liaison à A1/UP1 pour l'inhibition sur de courts oligonucléotides. Dix pmoles de TS ou TS1 sont incubés avec 160 pmoles de UP1 avant le début de la réaction. L'extrémité 3' correspondant à l'extension par la télomérase est inscrite au bas en minuscule, alors que la séquence 3' de l'oligo est inscrite en majuscule. Les produits correspondants sont inscrits à gauche. **D**, L'inhibition par UP1 de l'activité télomérasique est médiée par une liaison au substrat TS10. L'activité normale inhibée par UP1 (pistes 5 et 6) est partiellement rescapée par une pré-incubation de UP1 (60 pmoles) avec 20-40 pmoles de l'oligo TS8A (pistes 7 et 8), mais pas avec l'oligo MS2 (pistes 9 et 10). Quarante pmoles de TS8A ou MS2 sont mis en présence d'un extrait S100 pré-traité ou non à la RNase A 0.25 mg/ml (pistes 1 à 4). **E**, À l'opposé de l'inhibition générée par UP1 (pistes 1 à 3), G-UP1 Δ 2 n'affecte pas l'activité télomérasique à des concentrations similaires (pmoles) (pistes 4 et 5).

La déoxynucléotidyltransférase terminale (TdT) est une enzyme qui ajoute une chaîne de nucléotides à l'extrémité 3' d'une molécule d'ADN simple-brin. Ainsi, nous avons évalué la capacité d'UP1 à influencer l'activité de cette enzyme qui utilise le même substrat que la télomérase. L'oligonucléotide TS10 ou TS pré-incubé avec les protéines UP1, gp32, G-UP1Δ1 ou G-UP1Δ2 est mis en contact avec la TdT et du dTTP radiomarké. L'addition de nucléotides aux oligos est visualisée sur gel de polyacrylamide dénaturant, où un patron de bandes en échelle est observé, correspondant à chacun des nucléotides ajoutés à l'oligo (fig. 11B, pistes 1 et 8). À faible concentration de UP1, la protéine entraîne la formation de produits d'extension plus longs sur TS10 et TS (pistes 2 et 9). La propriété de UP1 à favoriser dénaturation des acides nucléiques pourrait empêcher la nouvelle extension de T de venir s'apparier avec l'oligo substrat, augmentant ainsi la processivité de l'enzyme. Des concentrations plus fortes de UP1 inhibent complètement l'extension de TS10 par la TdT (pistes 3 et 4). Cet effet est beaucoup moins dramatique sur TS (fig. 11B, pistes 10 et 11), où le niveau d'activité redevient à peu près semblable à celui en absence de UP1. La protéine gp32 inhibe l'allongement des deux oligos par la TdT (fig. 11B, pistes 5 à 7 et 12 à 14). La protéine G-UP1Δ2 inhibe l'activité TdT sur TS10 (pistes 19 à 21), mais G-UP1Δ1 (fig. 11A) n'a que très peu d'effet sur cette activité (fig. 11B, pistes 22 à 24). Ainsi, bien que les protéines G-UP1Δ2 et gp32 inhibent peu ou pas l'activité télomérase, elles inhibent très efficacement l'activité TdT qui utilise le même substrat, suggérant que le mécanisme par lequel ces protéines affectent l'activité télomérase n'est pas le même que pour leur effet sur la TdT.

A



B

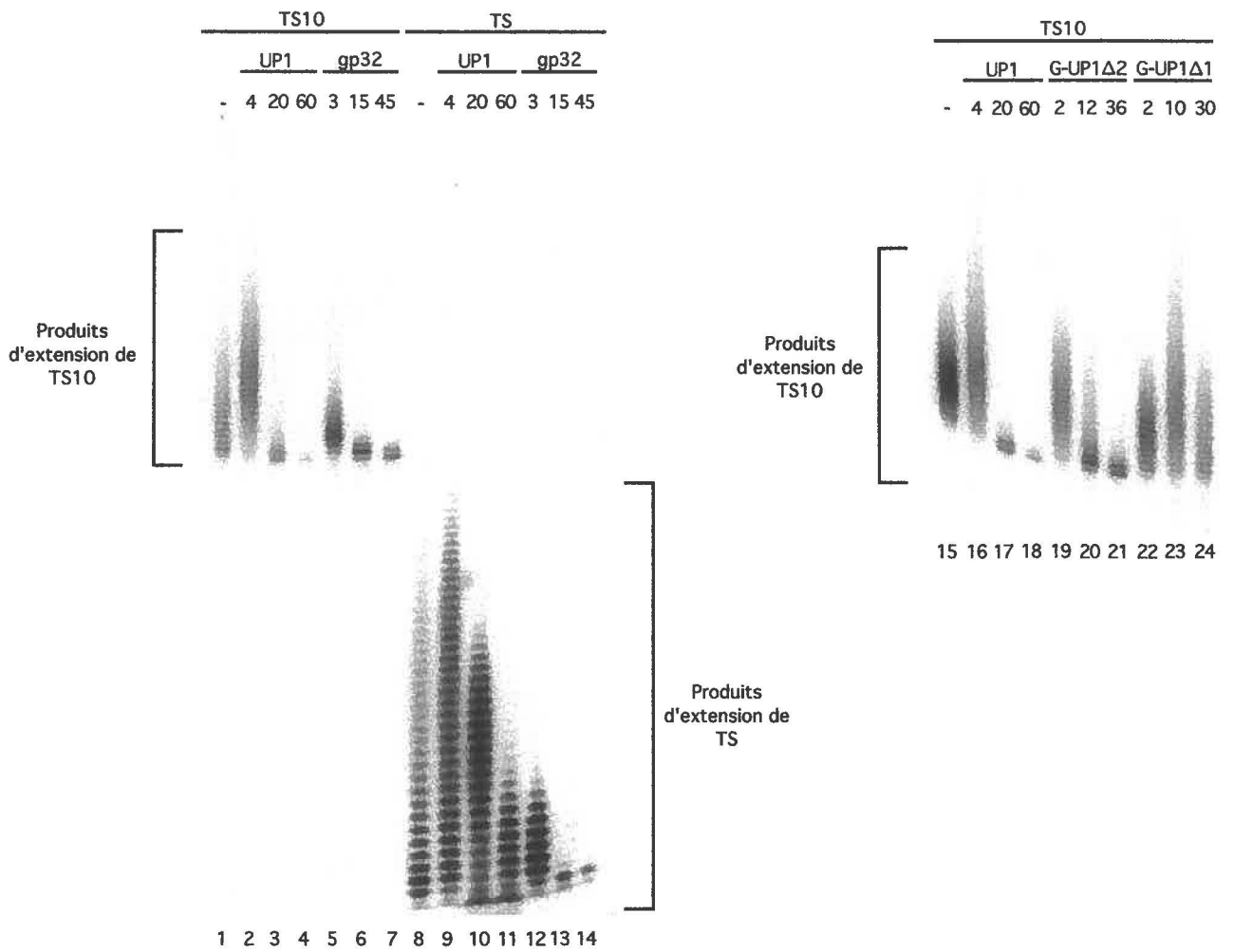


Figure 11. UP1 inhibe l'activité TdT. A, Représentation schématique de la protéine G-UP1 et deux de ses dérivés, les protéines G-UP1Δ1 (possédant seulement le RRM2) et G-UP1Δ2 (possédant seulement le RRM1). B, 0.83 pmoles de TS10 ou TS sont pré-incubées avec des quantités croissantes (3.5, 5 et 50 pmoles) de UP1, gp32, G-UP1Δ1 ou G-UP1Δ2 avant l'ajout de la TdT et de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$. Les produits d'extension par TS10 et TS sont séparés sur gel de polyacrylamide 8% dénaturant. Les produits d'extension sur TS10 et TS sont indiqués.

4. Discussion et Conclusion

Notre laboratoire (LaBranche et al., 1998) a montré que A1 et son domaine N-terminal UP1 promouvoient l'allongement des télomères *in vivo*. A1 et UP1 étant en mesure de s'associer spécifiquement *in vitro* à des oligonucléotides portant des répétitions télomériques humaines, ceci suggère que leur mode de régulation peut provenir de leur liaison aux télomères *in vivo*. Comme seulement UP1 peut recruter la télomérase, et qu'une activité protéolytique produisant UP1 à partir de A1 a été identifiée par Pandolfo et al. (1985), il est possible que la maturation de A1 en UP1 soit une étape importante dans la modulation de la longueur des télomères. Au cours de mes travaux, nous avons voulu vérifier si le passage de A1 en UP1 était bel et bien une étape clé dans le rôle de A1 au niveau des télomères. Pour ce faire, nous avons d'abord tenté d'identifier *in vitro* et *in vivo* l'activité protéolytique préalablement isolée par Pandolfo et al. De plus, comme A1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles aux abords du site de clivage de A1 en UP1, nous avons tenté d'entraver l'une de ses modifications (la méthylation) de façon à vérifier si son absence pouvait influencer la conversion de A1 en UP1 *in vitro*, et par le fait même influencer l'effet de A1 au niveau des télomères *in vivo*. Nos résultats suggèrent que la maturation de A1 en UP1 ne semble pas déterminante quant à l'effet sur les télomères. Nous avons investigué davantage sur la spécificité de liaison de A1/UP1 sur les répétitions télomériques *in vitro*, où ces protéines semblent préférer les séquences TAGGGT lorsque situées en position 3' d'une molécule simple-brin, et donc dans un contexte naturel. Des études comparatives des complexes formés par les protéines recombinantes GST-UP1 et UP1 sur des oligos télomériques suggèrent que ces

protéines lient sous forme de dimère à un minimum de deux séquences TAGGGT, préférentiellement lorsque celles-ci sont flanquées par des séquences adjacentes. Finalement, nous avons adressé l'effet des protéines recombinantes A1 et UP1 dans différents processus impliqués dans la synthèse des télomères. Entre autre, ces protéines préviennent l'extension par la télomérase et la synthèse d'ADN du brin retardé *in vitro*.

Maturation de A1 en UP1

La protéine recombinante GST-A1 n'est pas clivée en GST-UP1 par incubation en extraits nucléaires *in vitro*. Ces résultats contrastent avec les évidences de Pandolfo et al. (1985) chez qui l'incubation prolongée d'une population purifiée de protéines hnRNPs en présence d'extrait nucléaire était capable de générer des protéines plus courtes (incluant UP1) liant le simple-brin d'ADN (ssDBPs). Parce que les clivages *in vitro* ont été réalisés avec des protéines recombinantes n'ayant pas subi de modifications post-traductionnelles comme les protéines utilisées par Pandolfo et al., il est possible que l'absence de modifications (aux abords du site de clivage) puissent influencer l'activité de clivage. Les modifications pourraient moduler l'interaction avec les acides nucléiques et/ou avec d'autres protéines, de même que d'entraîner des changements dans la protéine qui la rend plus sensible au clivage. Rajpurohit et al. (1994) ont montré que la méthylation de hnRNP A1 *in vitro* réduisait l'efficacité de clivage protéolytique partiel à la trypsine et l'affinité de A1 pour les acides nucléiques. Cobianchi et al. (1993) ont montré que la phosphorylation de A1 inhibait complètement sa capacité à promouvoir la renaturation des acides nucléiques. De

plus, la coupure protéolytique partielle à la trypsine de la protéine A1 purifiée donne un patron de digestion différent lorsque la protéine est liée à l'ADN, suggérant que la liaison peut exposer de nouveaux sites de clivages (Valentini et al., 1984). Ainsi, l'effet des modifications post-traductionnelles pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pu détecter d'activité protéolytique. Ces hypothèses sont présentement en investigation. Nous avons réalisé un clivage partiel à la trypsine de A1 *in vitro* lorsque lié à l'ADN, sans voir de changements au patron de coupure initial, mais encore une fois l'absence de modifications a pu jouer sur le mode de liaison de A1. Finalement, si l'activité protéolytique est compartimentalisée dans le noyau ou régulée selon le cycle cellulaire en coordination avec ses substrats, la présence d'une quantité importante de protéines maintenant en contact direct avec la protéase dans les extraits pourrait monopoliser l'activité protéolytique et la rendre moins disponible pour le substrat exogène qu'est notre protéine recombinante. Notre expérience de clivage partiel à la trypsine en présence d'extraits nucléaires semblent appuyer cette hypothèse, où le clivage est réduit considérablement lorsqu'en présence d'extrait. Par contre, des expériences de clivage *in vitro* où les extraits totaux ou nucléaires ont été faits de manière identique à Pandolfo et al. n'ont pas révélé d'activité protéolytique sur la protéine A1 endogène (Chabot et Bolduc, résultats non publiés). Cette dernière hypothèse est donc peu envisageable.

Pandolfo et al. (1985) ont suggéré que UP1 pouvait être issu d'un clivage de A1 se produisant *in vitro* lors de la purification de ces protéines ce qui, malgré l'isolation d'une activité de clivage, reste toujours une hypothèse plausible. L'absence de clivage protéolytique de la protéine TAG-A1 *in vivo* (en présence de modifications post-

traductionnelles) appuie cette dernière hypothèse. Par contre, les ssDBPs (voir p. 97) n'ont été originellement isolées en grande quantités que dans le thymus de veau (Herrick et Alberts, 1976, Valentini et al., 1984), étant à un niveau très faible dans les cellules HeLa (Valentini et al., 1985). Ainsi, il est possible que nous n'avons pu détecter la présence de TAG-UP1 de par une activité protéolytique qui est très faible ou très bien régulée et qui ne produit que peu de clivage dans les lignées cellulaires utilisées. De plus, dans le thymus de veau, la stabilité des ssDBPs est peut-être accrue dans ce tissu, ce qui pourrait ne pas être le cas dans les lignées cellulaires testées. GST-UP1 peut en effet être clivé davantage par la trypsine en produits plus courts (figure 4). La protéine pourrait donc rester trop peu longtemps dans la forme TAG-UP1 *in vivo* pour pouvoir être détectée.

Nous avons adressé directement l'effet d'une modification post-traductionnelle de A1, la méthylation, sur la maturation de A1 en UP1 et si celle-ci a un rôle à jouer dans la modulation de la longueur des télomères. Des mutations ponctuelles ont été effectuées à la diméthylarginine (ARG-194) située deux a.a. en amont du site de clivage (ARG-196), et à cette dernière arginine elle-même simplement méthylée. Ces mutations ont légèrement entravé le clivage protéolytique partiel à la trypsine *in vitro*. Comme ces mutants n'ont pas subi de modifications post-traductionnelles, l'influence des mutations sur le clivage à la trypsine ne peut se manifester qu'au niveau de la nature propre des a.a.. En mutant l'arginine cible (ARG-196), l'arginine 194 la plus à proximité pourrait être utilisée pour pallier à la mutation R1963, ce qui expliquerait l'absence d'une différence importante dans l'efficacité de clivage à la trypsine *in vitro*. Par contre, le double-mutant R942, où un acide aspartique remplace la glycine, subit

un clivage se situant plus en amont de la position normale. L'efficacité de clivage à la trypsine étant très significativement entravée en général lorsque l'arginine cible est à proximité d'un résidu acide, la mutation pourrait nuire au clivage par l'enzyme à l'arginine 196 ou 194 et ainsi un site cryptique de clivage (arginine 205, 217, 224) pourrait être utilisé. Ce mutant offrait donc un bon potentiel inhibiteur de la maturation A1 en UP1.

Nous n'avons pas constaté de différences au niveau de l'allongement des télomères stimulé par l'expression de TAG-A1 ou des mutants. Le plus faible allongement médié par les mutants chez les cellules HeLa ne semble pas significatif, étant donné la plus faible expression des protéines mutantes par rapport à A1. Nous devons alors questionner la réelle nécessité de la maturation de A1 en UP1 pour leur effet sur les télomères. Cet événement pourrait ne pas être essentiel, étant donnée que A1 partage avec UP1 des effets au niveau de la modulation de la réplication des télomères (voir plus loin), mis à part le recrutement de la télomérase. Par contre, les clivages des mutants *in vitro* nous montrent que la trypsine peut utiliser des sites de clivages cryptiques lorsque le site normal est absent ou non disponible. L'hypothétique protéase pourrait agir de même et générer une forme de UP1 légèrement différente à partir de A1, qui aurait par contre le même effet que la protéine normale sur l'allongement des télomères. De plus, on ne peut exclure que d'autres modifications post-traductionnelles aux abords du site de clivage (phosphorylation, ADP-ribosylation) peuvent entraver plus radicalement la maturation. Ces événements peuvent également modifier la structure de A1, ce qui par le fait même pourrait entraîner des changements dans les propriétés de ses différentes domaines, sans

nécessité d'avoir un clivage en UP1 proprement dit pour obtenir des activités différentes. Ces études sont en cours.

Liaison de A1/UP1 aux répétitions télomériques

A1 et UP1 lient spécifiquement des oligonucléotides portant des séquences télomériques TAGGGT dans leur contexte naturel, c.-à-d., à l'extrémité 3' de l'ADN simple-brin. Malgré l'absence d'évidences de liaison de ces protéines sur l'extension simple-brin des télomères *in vivo*, cette spécificité de liaison *in vitro* supporte l'hypothèse que A1 ou une forme de A1 peut lier les télomères *in vivo* pour y jouer un rôle. De plus, la spécificité de A1/UP1 pour les répétitions télomériques diverge de celle pour l'ARN, suggérant que la liaison de A1/UP1 aux télomères pourrait avoir une réelle implication dans la modulation de la longueur des télomères.

Un modèle de liaison de UP1 aux oligonucléotides Tel2, Tel4, Tel6 et TS10 est proposé en figure 8. Bien que des études précédentes ont suggéré que UP1 ne lie pas avec coopérativité des polynucléotides (Cobianchi et al., 1988, Nadler et al., 1991), nos résultats suggèrent qu'il pourrait en être autrement lorsque des sites de liaison à haute affinité sont présents. UP1 possède une légère activité de renaturation des brins d'ADN (Mayeda et al., 1994), suggérant que cette coopérativité est possible. Des résultats du laboratoire ont montré que la présence de seulement le RRM1 permettait encore une liaison à TS10, et de façon aussi efficace qu'UP1. Des études précédentes ont également montré que un seul des RRMs peut interagir avec les acides nucléiques à un temps donné (Casas-Finet et al., 1991). La cristallographie de UP1 a

montré que les RRM_s sont orientés de façon anti-parallèle (Shamoo et al., 1997, Xu et al., 1997). Plus récemment, Ding et al. (1999) ont crystallographié la molécule d'UP1 liée à 12 nucléotides de séquences télomériques humaines simple-brin d(TTAGGG)₂. La structure du cocrystal a révélé que les RRM_s d'une même protéine peuvent lier deux brins séparés d'ADN simple-brin orientés de façon anti-parallèle. De plus, la liaison de deux protéines UP1 à deux séquences d(TTAGGG)₂ permet des interactions protéines-protéines et donc la formation d'un dimère d'UP1, alors que ce dernier, en absence d'ADN, cristallise sous forme de monomère (Shamoo et al., 1997, Xu et al., 1997). Il est par contre curieux qu'un seul site de liaison (TAGGGT) à A1/UP1 soit présent dans la séquence utilisée et liée par UP1 (Ding et al., 1999), alors qu'il a été montré que deux séquences TAGGGT sont nécessaires pour la liaison stable des protéines A1/UP1 *in vitro* (LaBranche et al., 1998). Toutefois, avec cette évidence d'une liaison coopérative de séquences TTAGGG adjacentes par deux protéines impliquant chez chacune un RRM différent, l'interaction d'une seule molécule de A1/UP1 avec deux répétitions TAGGGT adjacentes semble donc improbable. La nécessité de posséder des séquences additionnelles adjacentes aux deux sites liés pour une interaction stable de UP1 réduit le nombre de molécules pouvant s'associer aux 50-150 pb d'extension 3' aux télomères. Ainsi, la quantité de UP1 nécessaire pour moduler la longueur des télomères pourrait être faible, ou bien l'activité qui modifierait A1 (clivage, modifications post-traductionnelles) pourrait être faible ou transitoire, et ainsi serait difficile à détecter.

A1/UP1 dans la protection et le maintien de l'extension 3'

La présence d'une extension du brin G-riche à l'extrémité des télomères est un phénomène conservé entre les différentes espèces. Avoir une extension simple-brin semble être important, car seulement cette forme peut servir de substrat à la télomérase (Lee, 1993, Lingner, 1996). De plus, des études récentes ont montré que l'expression d'une forme dominante négative de TRF2, protéine liant l'ADN télomérique double-brin chez l'humain, entraîne la perte des extensions simple-brin, couplée à la fusion bout-à-bout des chromosomes et l'apoptose (van Steensel et al., 1998, Karlseder et al., 1999). Ainsi, maintenir l'extension simple-brin des télomères semble être critique pour préserver l'intégrité chromosomale. Les protéines liant ces répétitions simple-brin peuvent contribuer à ce rôle rempli par les extensions 3'. Les sous-unités α/β de *Oxytricha* protègent ces extensions contre la dégradation par les nucléases et inhibent *in vitro* l'activité de la télomérase (Gottschling et Cech, 1984, Gottschling et Zakian, 1986, Price et Cech, 1987, Price et Cech, 1989, Raghuraman et Cech, 1989, Fang et Cech, 1993, Froelich-Ammon et al., 1998). Les protéines Cdc13p et Est1p liant l'ADN simple-brin télomérique de la levure *S. cerevisiae* modulent également l'action de la télomérase (Nugent et al., 1996, Grandin et al., 1997, Lingner et al., 1997a). La liaison de A1/UP1 aux répétitions télomériques simple-brin dans leur contexte naturel peut donc refléter un moyen de maintenir et de préserver l'intégrité des extensions G-riche (figure 12). La propriété de A1/UP1 à prévenir l'action du complexe ADN polymérase α /primase et de la télomérase, impliquées dans la réplication des télomères, de même que l'activité d'autres polymérases, peut aider à protéger l'extrémité des télomères contre des mécanismes de surveillance détectant

des dommages à l'ADN et des cassures double-brin. A1/UP1 a également montré une activité de protection des répétitions simple-brin G-riches contre les nucléases *in vitro* (Dupuis et Chabot, données non montrées), appuyant l'idée de l'implication de ces protéines dans la formation d'un cap protecteur à l'extrémité des chromosomes. La capacité de UP1 à recruter la télomérase (LaBranche et al., 1998) pourrait refléter la propriété de la télomérase à faire partie de ce cap protecteur. Chez la levure, l'interaction de la télomérase avec la protéine Est1p qui elle lie les répétitions télomériques simple-brin (Lin et Zakian, 1995, Steiner et al., 1996, Virta-Pearlman et al., 1996), et l'interaction stable de la télomérase avec des répétitions télomériques simple-brin (Prescott et Blackburn, 1997) suggèrent que tel pourrait être le cas.

A1/UP1 est capable par sa liaison de moduler les activités répliquant les télomères. Cette propriété pourrait refléter un état où la cellule doit maintenir et protéger l'extrémité de ses chromosomes via ce cap. Par contre, tout juste après la réplication des télomères, l'extension 3' générée par le "end-replication problem" et/ou par de potentielles exonucléases pourrait être libre des protéines A1/UP1 et ainsi permettre alors l'action de la télomérase et de l'ADN polymérase α (figure 12). Les nouveaux sites de liaison à A1/UP1, issus de la synthèse par la télomérase, pourraient alors être liés par ces protéines, reformant le cap protecteur et permettant de maintenir de longues extensions 3' présentes à l'extrémité des chromosomes de mammifères. Adams et Holm (1996) ont montré qu'un mutant de la polymérase α chez la levure *S. cerevisiae* possédait des télomères plus longs que la souche sauvage, et que cet allongement était médié par la télomérase. Il est alors possible qu'une inhibition similaire de la polymérase α , via les protéines A1/UP1 liées aux répétitions

synthésisées par la télomérase, puisse stimuler l'action de cette dernière. Ainsi, les différentes propriétés de A1/UP1 pourraient aider à la fois à la protection et la réplication des télomères.

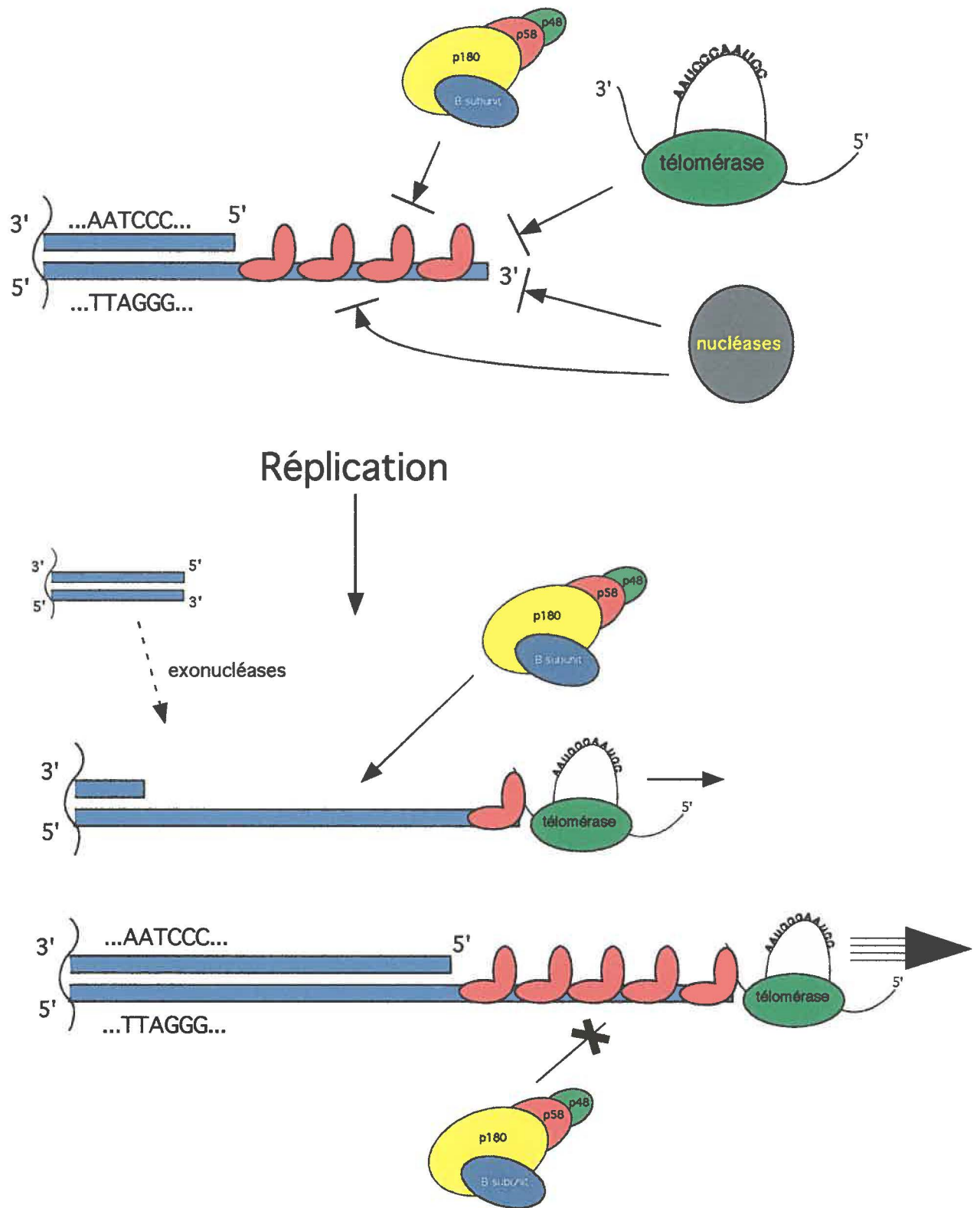


Figure 12. Modèle du maintien des extensions simple-brin par A1/UP1.

5. Remerciements

Je tiens à remercier les Drs Mario Chevrette, Raymund Wellinger et Benoit Chabot d'avoir accepté de constituer le jury de mon mémoire. Je remercie tout spécialement Benoit Chabot de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise. Je remercie également le FCAR-FRSQ pour l'octroi d'une bourse de maîtrise.

6. Références

Abdul-Manan, N., O'Malley, S. M. & Williams, K. R. Origins of binding specificity of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *Biochemistry* **35**, 3545-3554 (1996).

Adam, S. A., Nakagawa, T., Swanson, M. S., Woodruff, T. K. & Dreyfuss, G. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* **6**, 2932-2943 (1986).

Adams, A. K. & Holm, C. Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 4614-4620 (1996).

Agard, D. A. & Sedat, J. W. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* **302**, 676-681 (1983).

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10114-10118 (1992).

Autexier, C. & Greider, C. W. Boundary elements of the *Tetrahymena* telomerase RNA template and alignment domains. *Genes Dev* **9**, 2227-2239 (1995).

Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S. & Greider, C. W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* **56**, 645-650 (1996).

Badaracco, G., Valsasnini, P., Foiani, M., Benfante, R., Lucchini, G. & Plevani, P. Mechanism of initiation of *in vitro* DNA synthesis by the immunopurified complex between yeast DNA polymerase I and DNA primase. *Eur J Biochem* **161**, 435-440 (1986).

Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O. & Harrington, L. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr Biol* **8**, 177-180 (1998).

Beimling, P., Benter, T., Sander, T. & Moelling, K. Isolation and characterization of the human cellular myc gene product. *Biochemistry* **24**, 6349-6355 (1985).

Ben-David, Y., Bani, M. R., Chabot, B., De Koven, A. & Bernstein, A. Retroviral insertions downstream of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene in erythroleukemia cells: evidence that A1 is not essential for cell growth. *Mol Cell Biol* **12**, 4449-4455 (1992).

Bertuch, A. & Lundblad, V. Telomeres and double-strand breaks: trying to make ends meet. *Trends Cell Biol* **8**, 339-342 (1998).

Beyer, A. L., Christensen, M. E., Walker, B. W. & LeStourgeon, W. M. Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* **11**, 127-138 (1977).

Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de Lange, T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* **16**, 1785-1794 (1997).

Biessmann, H., Champion, L. E., O'Hair, M., Ikenaga, K., Kasravi, B. & Mason, J. M. Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J* **11**, 4459-4469 (1992a).

Biessmann, H., Kasravi, B., Bui, T., Fujiwara, G., Champion, L. E. & Mason, J. M. Comparison of two active HeT-A retroposons of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **103**, 90-98 (1994).

Biessmann, H., Mason, J. M., Ferry, K., d'Hulst, M., Valgeirsdottir, K., Traverse, K. L. & Pardue, M. L. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell* **61**, 663-673 (1990).

Biessmann, H., Valgeirsdottir, K., Lofsky, A., Chin, C., Ginther, B., Levis, R. W. & Pardue, M. L. HeT-A, a transposable element specifically involved in "healing" broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **12**, 3910-3918 (1992b).

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C. E., Laroche, T. & Gilson, E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**, 236-239 (1997).

Blackburn, E. H. & Challoner, P. B. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **36**, 447-457 (1984).

Blackburn, E. H. & Chiou, S. S. Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2263-2267 (1981).

Blackburn, E. H. & Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* **120**, 33-53 (1978).

Blackburn, E. H., Greider, C. W., Henderson, E., Lee, M. S., Shampay, J. & Shippen-Lentz, D. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome* **31**, 553-560 (1989).

Blanchette, M. & Chabot, B. A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *RNA* **3**, 405-419 (1997).

Blanchette, M. & Chabot, B. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J* **18**, 1939-1952 (1999).

Blasco, M. A., Lee, H.-W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A. et Greider, C. W. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34 (1997).

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. & Wright, W. E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352 (1998).

Bourns, B. D., Alexander, M. K., Smith, A. M. & Zakian, V. A. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres *in vivo*. *Mol Cell Biol* **18**, 5600-5608 (1998).

Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B. et al. Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* **6**, 69-76 (1997).

Brown, W. R. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* **338**, 774-776 (1989).

Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bachetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* **14**, 4240-4248 (1995).

Bryan, T. M., Marusic, L., Bacchetti, S., Namba, M. & Reddel, R. R. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet* **6**, 921-926 (1997).

Bryan, T. M. & Reddel, R. R. Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells. *Eur J Cancer* **33**, 767-773 (1997).

Bryan, T. M., Sperger, J. M., Chapman, K. B. & Cech, T. R. Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8479-8484 (1998).

Buchman, A. R., Lue, N. F. & Kornberg, R. D. Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **8**, 5086-5099 (1988).

Buck, S. W. & Shore, D. Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev* **9**, 370-384 (1995).

Budarf, M. L. & Blackburn, E. H. Chromatin structure of the telomeric region and 3'-nontranscribed spacer of *Tetrahymena* ribosomal RNA genes. *J Biol Chem* **261**, 363-369 (1986).

Burd, C. G. & Dreyfuss, G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J* **13**, 1197-1204 (1994).

Burgers, P. M. Saccharomyces cerevisiae replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* **266**, 22698-22706 (1991).

Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M. & Krainer, A. R. Regulation of alternative splicing *in vivo* by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**, 1706-1709 (1994).

Carlson, D. L., Skopp, R. & Price, C. M. DNA-Binding properties of the replication telomere protein. *Biochemistry* **36**, 15900-15908 (1997).

Carson, M. J. & Hartwell, L. CDC17: an essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell* **42**, 249-257 (1985).

Casas-Finet, J. R., Karpel, R. L., Maki, A. H., Kumar, A. & Wilson, S. H. Physical studies of tyrosine and tryptophan residues in mammalian A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. Support for a segmented structure. *J Mol Biol* **221**, 693-709 (1991).

Chabot, B., Bisotto, S. & Vincent, M. The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* **23**, 3206-3213 (1995).

Chabot, B., Blanchette, M., Lapierre, I. & La Branche, H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol* **17**, 1776-1786 (1997).

Choi, Y. D., Grabowski, P. J., Sharp, P. A. & Dreyfuss, G. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing. *Science* **231**, 1534-1539 (1986).

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. et al. A human telomeric protein. *Science* **270**, 1663-1667 (1995).

Chung, H. M., Shea, C., Fields, S., Taub, R. N., Van der Ploeg, L. H. & Tse, D. B. Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of telomeres and mini-chromosomes. *EMBO J* **9**, 2611-2619 (1990).

Cobianchi, F., Calvio, C., Stoppini, M., Buvoli, M. & Riva, S. Phosphorylation of human hnRNP protein A1 abrogates *in vitro* strand annealing activity. *Nucleic Acids Res* **21**, 949-955 (1993).

Cobianchi, F., Karpel, R. L., Williams, K. R., Notario, V. & Wilson, S. H. Mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex protein A1. Large-scale overproduction in *Escherichia coli* and cooperative binding to single-stranded nucleic acids. *J Biol Chem* **263**, 1063-1071 (1988).

Cobianchi, F., SenGupta, D. N., Zmudzka, B. Z. & Wilson, S. H. Structure of rodent helix-destabilizing protein revealed by cDNA cloning. *J Biol Chem* **261**, 3536-3543 (1986).

Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyrion, G., Liu, C., Lustig, A. J. & Gasser, S. M. The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a

multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J Cell Biol* **129**, 909-924 (1995).

Cohen, P. & Blackburn, E. H. Two types of telomeric chromatin in *Tetrahymena thermophila*. *J Mol Biol* **280**, 327-344 (1998).

Cohn, M., McEachern, M. J. & Blackburn, E. H. Telomeric sequence diversity within the genus *Saccharomyces*. *Curr Genet* **33**, 83-91 (1998).

Collins, K., Kobayashi, R. & Greider, C. W. Purification of *Tetrahymena* telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* **81**, 677-686 (1995).

Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo*: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**, 739-750 (1990).

Cooper, J. P., Nimmo, E. R., Allshire, R. C. & Cech, T. R. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**, 744-747 (1997).

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. & Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**, 1921-2929 (1992).

Counter, C. M., Botelho, F. M., Wang, P., Harley, C. B. & Bacchetti, S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* **68**, 3410-3414 (1994).

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. & Bacchetti, S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* **85**, 2315-2320 (1995).

Counter, C. M., Hahn, W. C., Wei, W., Caddle, S. D., Beijersbergen, R. L., Lansdorp, P. M. et al. Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14723-14728 (1998).

Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N. & Weinberg, R. A. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9202-9207 (1997).

Critchlow, S. E. & Jackson, S. P. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **23**, 394-398 (1998).

Danilevskaya, O., Slot, F., Pavlova, M. & Pardue, M. L. Structure of the *Drosophila* HeT-A transposon: a retrotransposon-like element forming telomeres. *Chromosoma* **103**, 215-224 (1994).

Danilevskaya, O. N., Petrov, D. A., Pavlova, M. N., Koga, A., Kurenova, E. V. & Hartl, D. L. A repetitive DNA element, associated with telomeric sequences in

Drosophila melanogaster, contains open reading frames. *Chromosoma* **102**, 32-40 (1992).

de Lange, T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J* **11**, 717-724 (1992).

Ding, J., Hayashi, M. K., Zhang, Y., Manche, L., Krainer, A. R. & Xu, R. M. Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev* **13**, 1102-1115 (1999).

Dionne, I. & Wellinger, R. J. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13902-13907 (1996).

Dornreiter, I., Erdile, L. F., Gilbert, I. U., von Winkler, D., Kelly, T. J. & Fanning, E. Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J* **11**, 769-776 (1992).

Dreyfuss, G. Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 459-498 (1986).

Dreyfuss, G., Choi, Y. D. & Adam, S. A. The ribonucleoprotein structures along the pathway of mRNA formation. *Endocr Res* **15**, 441-474 (1989).

Dreyfuss, G., Swanson, M. S. & Pinol-Roma, S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci* **13**, 86-91 (1988).

Economidis, I. V. & Pederson, T. Structure of nuclear ribonucleoprotein: heterogeneous nuclear RNA is complexed with a major sextet of proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1599-1602 (1983).

Eder, P. S., Walder, R. Y. & Walder, J. A. Substrate specificity of human RNase H1 and its role in excision repair of ribose residues misincorporated in DNA. *Biochimie* **75**, 123-126 (1993).

Evan, G. I. & Hancock, D. C. Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei: p62c-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins. *Cell* **43**, 253-261 (1985).

Evans, S. K., Sistrunk, M. L., Nugent, C. I. & Lundblad, V. Telomerase, Ku, and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* **107**, 352-358 (1998).

Fang, G. & Cech, T. R. The beta subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G- quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **74**, 875-885 (1993).

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P. et al. The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241 (1995).

Froelich-Ammon, S. J., Dickinson, B. A., Bevilacqua, J. M., Schultz, S. C. & Cech, T. R. Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev* **12**, 1504-1514 (1998).

Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S. & Yanagida, M. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**, 961-976 (1993).

Gandhi, L. & Collins, K. Interaction of recombinant *Tetrahymena* telomerase proteins p80 and p95 with telomerase RNA and telomeric DNA substrates. *Genes Dev* **12**, 721-733 (1998).

Garvik, B., Carson, M. & Hartwell, L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**, 6128-6138 (1995).

Gazin, C., Rigolet, M., Briand, J. P., Van Regenmortel, M. H. & Galibert, F. Immunochemical detection of proteins related to the human c-myc exon 1. *EMBO J* **5**, 2241-2250 (1986).

Ge, H. & Manley, J. L. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA *in vitro*. *Cell* **62**, 25-34 (1990).

Giallongo, A., Appella, E., Ricciardi, R., Rovera, G. & Croce, C. M. Identification of the c-myc oncogene product in normal and malignant B cells. *Science* **222**, 430-432 (1983).

Gibson, A. W., Ye, R., Johnston, R. N. & Browder, L. W. Multiple antigens recognized by anti-c-myc antibodies in human cells and *Xenopus* oocytes. *Biochem Cell Biol* **70**, 998-1005 (1992).

Gilson, E., Muller, T., Sogo, J., Laroche, T. & Gasser, S. M. RAP1 stimulates single-to double-strand association of yeast telomeric DNA: implications for telomere-telomere interactions. *Nucleic Acids Res* **22**, 5310-5320 (1994).

Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D. & Gasser, S. M. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol* **231**, 293-310 (1993).

Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H. & Gasser, S. M. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**, 1349-1363 (1996).

Gotta, M., Strahl-Bolsinger, S., Renauld, H., Laroche, T., Kennedy, B. K., Grunstein, M. et al. Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *EMBO J* **16**, 3243-3255 (1997).

Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. & Zakian, V. A. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-762 (1990).

Gottschling, D. E. & Cech, T. R. Chromatin structure of the molecular ends of *Oxytricha* macronuclear DNA: phased nucleosomes and a telomeric complex. *Cell* **38**, 501-510 (1984).

Gottschling, D. E. & Zakian, V. A. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* **47**, 195-205 (1986).

Grandin, N., Reed, S. I. & Charbonneau, M. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**, 512-527 (1997).

Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. & Wellinger, R. J. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**, 741-744 (1998).

Gray, J. T., Celander, D. W., Price, C. M. & Cech, T. R. Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell* **67**, 807-814 (1991).

Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B. & DePinho, R. A. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-1730 (1998).

Greider, C. W. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* **65**, 337-365 (1996).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**, 405-413 (1985).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898 (1987).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337 (1989).

Hammond, P. W., Lively, T. N. & Cech, T. R. The anchor site of telomerase from *Euplotes aediculatus* revealed by photo-cross-linking to single- and double-stranded DNA primers. *Mol Cell Biol* **17**, 296-308 (1997).

Hardy, C. F., Balderes, D. & Shore, D. Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein RAP1 with effects on both transcriptional activation and silencing. *Mol Cell Biol* **12**, 1209-1217 (1992).

Harley, C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**, 271-282 (1991).

Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).

Harley, C. B. & Kim, N. W. Telomerase and cancer. *Important Adv Oncol*, 57-67 (1996).

Harley, C. B., Kim, N. W., Prowse, K. R., Weinrich, S. L., Hirsch, K. S., West, M. D., Bacchetti, S., Hirte, H. W., Counter, C. M., Greider, C. W. et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 307-315 (1994).

Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M. & Allsopp, R. C. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* **27**, 375-382 (1992).

Harley, C. B. & Villeponteau, B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 249-255 (1995).

Harrington, L., Hull, C., Crittenden, J. & Greider, C. Gel shift and UV cross-linking analysis of *Tetrahymena* telomerase. *J Biol Chem* **270**, 8893-8901 (1995).

Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B. Arruda, I. & Robinson, M. O. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**, 973-977 (1997a).

Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D. S., Mar, V. Bass, M. B. & Robinson, M. O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* **11**, 3109-3115 (1997b).

Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K. & Allshire, R. C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868 (1990).

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M. & Grunstein, M. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592 (1995).

Henderson, E. R. & Blackburn, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* **9**, 345-348 (1989).

Henry, Y. A., Chambers, A., Tsang, J. S., Kingsman, A. J. & Kingsman, S. M. Characterisation of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Res* **18**, 2617-2623 (1990).

Herrick, G. & Alberts, B. Nucleic acid helix-coil transitions mediated by helix-unwinding proteins from calf thymus. *J Biol Chem* **251**, 2133-2141 (1976).

Herrick, G., Delius, H. & Alberts, B. Single-stranded DNA structure and DNA polymerase activity in the presence of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus. *J Biol Chem* **251**, 2142-2146 (1976).

Hiraoka, Y., Henderson, E. & Blackburn, E. H. Not so peculiar: fission yeast telomere repeats. *Trends Biochem Sci* **23**, 126 (1998).

Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S. & Yamakido, M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* **155**, 3711-3715 (1995).

Huet, J., Cottrelle, P., Cool, M., Vignais, M. L., Thiele, D., Marck, C., Buhler, J. M., Sentenac, A. & Fromageot, P. A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *EMBO J* **4**, 3539-3547 (1985).

Ishikawa, F., Matunis, M. J., Dreyfuss, G. & Cech, T. R. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)n. *Mol Cell Biol* **13**, 4301-4310 (1993).

Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**, 1321-1325 (1999).

Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E.L., Reddel, R. R. & Jefferson, R. A. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* **6**, 2011-2019 (1997).

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015 (1994).

Kipling, D. & Cooke, H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402 (1990).

Kipling, D., Wilson, H. E., Thomson, E. J. & Cooke, H. J. YAC cloning *Mus musculus* telomeric DNA: physical, genetic, in situ and STS markers for the distal telomere of chromosome 10. *Hum Mol Genet* **4**, 1007-1014 (1995).

Klein, F., Laroche, T., Cardenas, M. E., Hofmann, J. F., Schweizer, D. & Gasser, S. M. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol* **117**, 935-948 (1992).

Klingelutz, A. J., Barber, S. A., Smith, P. P., Dyer, K. & McDougall, J. K. Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells. *Mol Cell Biol* **14**, 961-969 (1994).

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P. & Prescott, D. M. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3015-3019 (1981).

Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. & Rhodes, D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* **85**, 125-136 (1996).

Krainer, A. R., Conway, G. C. & Kozak, D. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* **62**, 35-42 (1990).

Kramer, K. M. & Haber, J. E. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev* **7**, 2345-2356 (1993).

Kumar, A., Sierakowska, H. & Szer, W. Purification and RNA binding properties of a C-type hnRNP protein from HeLa cells. *J Biol Chem* **262**, 17126-17137 (1987).

Kumar, A., Williams, K. R. & Szer, W. Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* **261**, 11266-11273 (1986).

Kumar, A. & Wilson, S. H. Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1. *Biochemistry* **29**, 10717-10722 (1990).

LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M. R., Wellinger, R. J. & Chabot, B. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet* **19**, 199-202 (1998).

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

Laroche, T., Martin, S. G., Gotta, M., Gorham, H. C., Pryde, F. E., Louis, E. J. et al. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**, 653-656 (1998).

Lee, M. S. & Blackburn, E. H. Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Mol Cell Biol* **13**, 6586-6599 (1993).

Lejnine, S., Makarov, V. L. & Langmore, J. P. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2393-2397 (1995).

Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B. & Lundblad, V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**, 1399-1412 (1996).

Lin, J. J. & Zakian, V. A. An *in vitro* assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* **81**, 1127-1135 (1995).

Lindsey, J., McGill, N. I., Lindsey, L. A., Green, D. K. & Cooke, H. J. *In vivo* loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* **256**, 45-48 (1991).

Lingner, J. & Cech, T. R. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10712-10717 (1996).

Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R. & Lundblad, V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for *in vitro* yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11190-11195 (1997a).

Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lunblad, V. & Cech, T. R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567 (1997b).

Lipps, H. J. *In vitro* aggregation of the gene-sized DNA molecules of the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 4104-4107 (1980).

Longhese, M. P., Plevani, P. & Lucchini, G. Replication factor A is required *in vivo* for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol* **14**, 7884-7890 (1994).

Luderus, M. E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F. & de Lange, T. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* **135**, 867-881 (1996).

Lundblad, V. & Blackburn, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**, 347-360 (1993).

Lundblad, V. & Szostak, J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-643 (1989).

Maga, G. & Hubscher, U. DNA polymerase epsilon interacts with proliferating cell nuclear antigen in primer recognition and elongation. *Biochemistry* **34**, 891-901 (1995).

Makarov, V. L., Hirose, Y. & Langmore, J. P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**, 657-666 (1997).

Makarov, V. L., Lejnine, S., Bedoyan, J. & Langmore, J. P. Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* **73**, 775-787 (1993).

Manuelidis, L. & Borden, J. Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* **96**, 397-410 (1988).

Marcand, S., Buck, S. W., Moretti, P., Gilson, E. & Shore, D. Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap 1 protein. *Genes Dev* **10**, 1297-1309 (1996).

Marcand, S., Gilson, E. & Shore, D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**, 986-990 (1997).

Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J. P. & Blasco, M. A. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10471-10476 (1998).

Mason, J. M. & Biessmann, H. The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet* **11**, 58-62 (1995).

Mayeda, A., Helfman, D. M. & Krainer, A. R. Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* **13**, 2993-3001 (1993).

Mayeda, A. & Krainer, A. R. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**, 365-375 (1992).

Mayeda, A., Munroe, S. H., Caceres, J. F. & Krainer, A. R. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *EMBO J* **13**, 5483-5495 (1994).

McClintock, B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**, 405-416 (1939).

McClintock, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**, 234-282 (1942).

McEachern, M. J. & Blackburn, E. H. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3453-3457 (1994).

McElligott, R. & Wellinger, R. J. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* **16**, 3705-3714 (1997).

McKay, S. J. & Cooke, H. hnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat $(TTAGGG)_n$. *Nucleic Acids Research* **20**, 6461-6464 (1992).

Merrill, B. M., Lopresti, M. B., Stone, K. L. & Williams, K. R. Amino acid sequence of UP1, an hnRNP-derived single-stranded nucleic acid binding protein from calf thymus. *Int J Pept Protein Res* **29**, 21-39 (1987).

Merrill, B. M., Stone, K. L., Cobianchi, F., Wilson, S. H. & Williams, K. R. Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem* **263**, 3307-3313 (1988).

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D. A. & Weinberg, R. A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795 (1997).

Meyne, J., Ratliff, R. L. & Moyzis, R. K. Conservation of the human telomere sequence $(TTAGGG)_n$ among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7049-7053 (1989).

Michael, W. M., Choi, M. & Dreyfuss, G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-422 (1995).

Mizuno, T., Ito, N., Yokoi, M., Kobayashi, A., Tamai, K., Miyazawa, H. & Hanaoka, F. The second-largest subunit of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex facilitates both production and nuclear translocation of the catalytic subunit of DNA polymerase alpha. *Mol Cell Biol* **18**, 3552-3562 (1998).

Mizuno, T., Okamoto, T., Yokoi, M., Izumi, M., Kobayashi, A., Hachiya, T., Tamai, K., Inoue, T. & Hanaoka, F. Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *J Cell Sci* **109**, 2627-2636 (1996).

Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J. & Johnson, A. D. Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2186-2191 (1997).

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L. & Shore, D. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**, 2257-2269 (1994).

Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521-529 (1989).

Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratcliff, R. L. & Wu, J.-R. A highly conserved repetitive DNA sequence,

(TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6622-6626 (1988).

Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *The Collecting Netwoods Hole* **13**, 181-198 (1938).

Munroe, S. H. & Dong, X. F. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 catalyzes RNA:RNA annealing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 895-899 (1992).

Murante, R. S., Henricksen, L. A. & Bambara, R. A. Junction ribonuclease: an activity in Okazaki fragment processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2244-2249 (1998).

Murray, A. W. & Szostak, J. W. Construction and behavior of circularly permuted and telocentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **6**, 3166-3172 (1986).

Nadler, S. G., Merrill, B. M., Roberts, W. J., Keating, K. M., Lisbin, M. J., Barnett, S. F., Wilson, S. H. & Williams, K. R. Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions. *Biochemistry* **30**, 2968-2976 (1991).

Nakamura, T. M., Cooper, J. P. & Cech, T. R. Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* **282**, 493-496 (1998).

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B. & Cech, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959 (1997).

Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A. & Ishikawa, F. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* **88**, 875-884 (1997).

Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T. & Ishikawa, F. Telomerase activation by hTRT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* **18**, 65-68 (1998).

Naoe, T., Nozaki, N., Yamada, K., Okazaki, T., Nakayama, E., Kurosawa, Y. & Shiku, H. Diversity of cellular molecules in human cells detected by monoclonal antibodies reactive with c-myc proteins produced in Escherichia coli. *Jpn J Cancer Res* **80**, 747-753 (1989).

Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F. & Lundblad, V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**, 249-252 (1996).

Nugent, C. I., Bosco, G., Ross, L. O., Evans, S. K., Salinger, A. P., Moore, J. K., Haber, J. E. & Lundblad, V. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**, 657-660 (1998).

Olins, D. E. & Olins, A. L. The replication band of ciliated protozoa. *Int Rev Cytol* **153**, 137-170 (1994).

Olovnikov, A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **201**, 1496-1499 (1971).

Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**, 181-190 (1973).

Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Pillus, L. & Gasser, S. M. The positioning of yeast telomeres depends on SIR3, SIR4, and the integrity of the nuclear membrane. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 733-746 (1993).

Pandolfo, M., Valentini, O., Biamonti, G., Morandi, C. & Riva, S. Single stranded DNA binding proteins derive from hnRNP proteins by proteolysis in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **13**, 6577-6590 (1985).

Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-732 (1992).

Planck, S. R. & Wilson, S. H. Native species of helix destabilizing protein-1 in mouse myeloma identified by antibody probing of Western blots. *Biochem Biophys Res Commun* **131**, 362-369 (1985).

Pluta, A. F., Dani, G. M., Spear, B. B. & Zakian, V. A. Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1475-1479 (1984).

Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. & Dreyfuss, G. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-994 (1996).

Pontius, B. W. & Berg, P. Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8403-8407 (1990).

Prescott, D. M. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev* **58**, 233-267 (1994).

Prescott, J. & Blackburn, E. H. Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* **11**, 2790-2800 (1997).

Price, C. M., Adams, A. K. & Vermeesch, J. R. Accumulation of telomerase RNA and telomere protein transcripts during telomere synthesis in *Euplotes*. *J Eukaryot Microbiol* **41**, 267-275 (1994).

Price, C. M. & Cech, T. R. Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev* **1**, 783-793 (1987).

Price, C. M. & Cech, T. R. Properties of the telomeric DNA-binding protein from *Oxytricha nova*. *Biochemistry* **28**, 769-774 (1989).

Prowse, K. R. & Greider, C. W. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4818-4822 (1995).

Pullman, J. M. & Martin, T. E. Reconstitution of nucleoprotein complexes with mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core proteins. *J Cell Biol* **97**, 99-111 (1983).

Query, C. C., Bentley, R. C. & Keene, J. D. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* **57**, 89-101 (1989).

Raghuraman, M. K. & Cech, T. R. Assembly and self-association of *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes. *Cell* **59**, 719-728 (1989).

Raghuraman, M. K. & Cech, T. R. Effect of monovalent cation-induced telomeric DNA structure on the binding of *Oxytricha* telomeric protein. *Nucleic Acids Res* **18**, 4543-4552 (1990).

Rawlins, D. J. & Shaw, P. J. Localization of ribosomal and telomeric DNA sequences in intact plant nuclei by in-situ hybridization and three-dimensional optical microscopy. *J Microsc* **157**, 83-89 (1990).

Ray, A. & Runge, K. W. The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Mol Cell Biol* **19**, 31-45 (1999).

Reddel, R. R., Bryan, T. M. & Murnane, J. P. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry (Mosc)* **62**, 1254-1262 (1997).

Reveal, P. M., Henkels, K. M. & Turchi, J. J. Synthesis of the mammalian telomere lagging strand *in vitro*. *J Biol Chem* **272**, 11678-11681 (1997).

Richards, E. J. & Ausubel, F. M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**, 127-136 (1988).

Riva, S., Clivio, A., Valentini, O. & Cobianchi, F. DNA binding proteins from calf thymus with an enhanced ability to stimulate DNA polymerase alpha *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 1053-1062 (1980).

Riva, S., Morandi, C., Tsoulfas, P., Pandolfo, M., Biamonti, G., Merrill, B. et al. Mammalian single-stranded DNA binding protein UP I is derived from the hnRNP core protein A1. *EMBO J* **5**, 2267-2273 (1986).

Rossetti, L., Cacchione, S., Fua, M. & Savino, M. Nucleosome assembly on telomeric sequences. *Biochemistry* **37**, 6727-6737 (1998).

Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C. & DePinho, R. A. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**, 701-712 (1999).

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2^è éd. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Sandell, L. L. & Zakian, V. A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**, 729-739 (1993).

Santocanale, C., Foiani, M., Lucchini, G. & Plevani, P. The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis. *J Biol Chem* **268**, 1343-1348 (1993).

Sen, D. & Gilbert, W. Novel DNA superstructures formed by telomere-like oligomers. *Biochemistry* **31**, 65-70 (1992).

Shamoo, Y., Krueger, U., Rice, L. M., Williams, K. R. & Steitz, T. A. Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nat Struct Biol* **4**, 215-222 (1997).

Shampay, J. & Blackburn, E. H. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 534-538 (1988).

Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-157 (1984).

Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787-791 (1997).

Shay, J. W., Wright, W. E., Brasiskyte, D. & Van der Haegen, B. A. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human

mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* **8**, 1407-1413 (1993).

Sheen, F. M. & Levis, R. W. Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12510-12514 (1994).

Shippen-Lentz, D. & Blackburn, E. H. Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Mol Cell Biol* **9**, 2761-2764 (1989).

Shore, D. Telomeres—unsticky ends. *Science* **281**, 1818-1819 (1998).

Shore, D. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet* **10**, 408-412 (1994).

Shore, D. & Nasmyth, K. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**, 721-732 (1987).

Siegal, G., Turchi, J. J., Myers, T. W. & Bambara, R. A. A 5' to 3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9377-9381 (1992).

Sierakowska, H., Szer, W., Furdon, P. J. & Kole, R. Antibodies to hnRNP core proteins inhibit *in vitro* splicing of human beta-globin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* **14**, 5241-5254 (1986).

Singer, M. S. & Gottschling, D. E. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404-409 (1994).

Siomi, H. & Dreyfuss, G. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**, 551-560 (1995).

Skopp, R., Wang, W. & Price, C. rTP: a candidate telomere protein that is associated with DNA replication. *Chromosoma* **105**, 82-91 (1996).

Smith, S. & de Lange, T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet* **13**, 21-26 (1997).

Stadlbauer, F., Brueckner, A., Rehfuss, C., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Forster, V., Tseng, B. Y. & Nasheuer, H. P. DNA replication *in vitro* by recombinant DNA-polymerase-alpha-primase. *Eur J Biochem* **222**, 781-793 (1994).

Starling, J. A., Maule, J., Hastie, N. D. & Allshire, R. C. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* **18**, 6881-6888 (1990).

Steiner, B. R., Hidaka, K. & Futcher, B. Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2817-2821 (1996).

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. & Grunstein, M. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**, 83-93 (1997).

Sugino, A. Yeast DNA polymerases and their role at the replication fork. *Trends Biochem Sci* **20**, 319-323 (1995).

Sundquist, W. I. & Klug, A. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* **342**, 825-829 (1989).

Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**, 245-255 (1982).

Tanaka, S., Hu, S. Z., Wang, T. S. & Korn, D. Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* **257**, 8386-8390 (1982).

Tommerup, H., Dousmanis, A. & de Lange, T. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* **14**, 5777-5785 (1994).

Tsurimoto, T. & Stillman, B. Replication factors required for SV40 DNA replication *in vitro*. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* **266**, 1950-1960 (1991).

Tudyka, T. & Skerra, A. Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **6**, 2180-2187 (1997).

Turchi, J. J., Huang, L., Murante, R. S., Kim, Y. & Bambara, R. A. Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9803-9807 (1994).

Valentini, O., Biamonti, G., Mastromei, G. & Riva, S. Structural and functional heterogeneity of single-strand DNA-binding proteins from calf thymus. *Biochimica et Biophysica Acta* **782**, 147-155 (1984).

Valentini, O., Biamonti, G., Pandolfo, M., Morandi, C. & Riva, S. Mammalian single-stranded DNA binding proteins and heterogeneous nuclear RNA proteins have common antigenic determinants. *Nucleic Acids Res* **13**, 337-346 (1985).

Van der Ploeg, L. H., Liu, A. Y. & Borst, P. Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. *Cell* **36**, 459-468 (1984).

van Steensel, B. & de Lange, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-743 (1997).

van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-413 (1998).

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B. & Lansdorp, P. M. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9857-9860 (1994).

Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D. & Harley, C. B. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* **52**, 661-667 (1993).

Virta-Pearlman, V., Morris, D. K. & Lundblad, V. Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev* **10**, 3094-3104 (1996).

Vourc'h, C., Taruscio, D., Boyle, A. L. & Ward, D. C. Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res* **205**, 142-151 (1993).

Waga, S., Bauer, G. & Stillman, B. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* **269**, 10923-10934 (1994).

Waga, S. & Stillman, B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* **369**, 207-212 (1994).

Walker, C. L., Cargile, C. B., Floy, K. M., Delannoy, M. & Migeon, B. R. The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6191-6195 (1991).

Wang, S. S. & Zakian, V. A. Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* **345**, 456-458 (1990).

Wang, W., Skopp, R., Scofield, M. & Price, C. Euplotes crassus has genes encoding telomere-binding proteins and telomere-binding protein homologs. *Nucleic Acids Res* **20**, 6621-6629 (1992).

Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**, 197-201 (1972).

Weighardt, F., Biamonti, G. & Riva, S. Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J Cell Sci* **108**, 545-555 (1995).

Weinert, T. A. & Hartwell, L. H. Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics* **134**, 63-80 (1993).

Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., Taylor, R. D., Carlos, R., Andrews, W. H., Wright, W. E., Shay, J. W., Harley, C. B. & Morin, G. B. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nature Genetics* **17**, 498-502 (1997).

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. Origin activation and formation of single-strand TG₁₋₃ tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**, 4057-4065 (1993a).

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. Saccharomyces Telomeres acquire single-strand TG₁₋₃ tails in late S phase. *Cell* **72**, 51-60 (1993b).

Wilk, H. E., Angeli, G. & Schafer, K. P. *In vitro* reconstitution of 35S ribonucleoprotein complexes. *Biochemistry* **22**, 4592-4600 (1983).

Williams, K. R., Stone, K. L., LoPresti, M. B., Merrill, B. M. & Planck, S. R. Amino acid sequence of the UPI calf thymus helix-destabilizing protein and its homology to an analogous protein from mouse myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5666-5670 (1985).

Williamson, J. R., Raghuraman, M. K. & Cech, T. R. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* **59**, 871-880 (1989).

Wotton, D. & Shore, D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 748-760 (1997).

Wright, J. H., Gottschling, D. E. & Zakian, V. A. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* **6**, 197-210 (1992).

Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. & Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**, 173-179 (1996).

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. & Shay, J. W. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**, 2801-2809 (1997).

Xu, R. M., Jokhan, L., Cheng, X., Mayeda, A. & Krainer, A. R. Crystal structure of human UPr1, the domain of hnRNP A1 that contains two RNA-recognition motifs. *Structure* **5**, 559-570 (1997).

Yang, X., Bani, M. R., Lu, S. J., Rowan, S., Ben-David, Y. & Chabot, B. The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6924-6928 (1994).

Yasumoto, S., Kunimura, C., Kikuchi, K., Tahara, H., Ohji, H., Yamamoto, H., Ide, T. & Utakoji, T. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* **13**, 433-439 (1996).

Yu, G. L. & Blackburn, E. H. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* **67**, 823-832 (1991).

Zahler, A. M. & Prescott, D. M. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Res* **16**, 6953-6972 (1988).

Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R. & Prescott, D. M. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**, 718-720 (1991).

Zlotkin, T., Kaufmann, G., Jiang, Y., Lee, M. Y., Uitto, L., Syvaioja, J., Domreiter, I., Fanning, E. & Nethanel, T. DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular- DNA replication. *EMBO J* **15**, 2298-2305 (1996).