

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Caractérisation des levures avec des télomères humains et essais de complémentation
entre la télomérase de levure et la télomérase humaine chez *Saccharomyces cerevisiae*

par

Amadou BAH

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie

octobre 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

ISBN: 0-494-05874-9

Our file *Notre référence*

ISBN: 0-494-05874-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Université de Sherbrooke

Caractérisation des levures avec des télomères humains et essais de complémentation entre la télomérase de levure et la télomérase humaine chez *Saccharomyces cerevisiae*

par

Amadou BAH

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

octobre 2004

Les télomères, structures nucléoprotéiques présentes aux extrémités terminales des chromosomes linéaires, ont pour rôle essentiel de maintenir la stabilité des génomes eucaryotes. Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, l'ADN télomérique consiste en la répétition de la séquence irrégulière [TG₁₋₃/C₁₋₃A] alors que [T₂AG₃/C₃TA₂] est l'unité répétitive présente chez la plupart des télomères de cellules de mammifères. La maintenance de ces répétitions télomériques est assurée par une enzyme spécialisée : la télomérase. Cette ribonucléoprotéine, conservée au cours de l'évolution, comprend une unité catalytique associée à une unité ARN où une courte séquence est utilisée comme matrice pour l'ajout de répétitions télomériques spécifiques à l'espèce. *In vitro*, seules ces deux composantes sont essentielles pour l'activité télomérase alors que *in vivo* ce processus est plus complexe et requiert d'autres protagonistes. De précédents travaux ont montré que la simple substitution de la séquence matrice ARN de *S. cerevisiae* par une séquence matrice humaine permettait l'addition de répétitions

télomériques humaines aux extrémités endogènes des chromosomes de levures. Malgré cette transformation, le taux de croissance ainsi que l'expression du nouveau gène dans ces souches dites « humanisées » restent à un niveau comparable à celui de souches non modifiées. Nous avons reproduit ces résultats dans nos souches de levures et procédé à une fine analyse moléculaire de la composition des télomères en fonction de la croissance à long terme de cellules humanisées. Nos investigations montrent un remplacement progressif des répétitions télomériques levures par des répétitions télomériques humaines en fonction du nombre de divisions accumulées par la cellule humanisée, mais ~ 50 pb de répétitions levures internes sont résistantes à un tel remplacement; et les répétitions distales humaines sont sujettes à un haut taux de renouvellement de séquence. Une autre caractéristique importante chez les levures humanisées ayant accumulé un nombre important de générations est la présence de longues extensions télomériques humaines simple brin, substrat idéal pour la télomérase humaine. Basé sur ce résultat et la conservation de nombreuses protéines associées à la télomérase entre la levure et l'humain, nous avons voulu établir un système de télomères humanisés chez la levure dont le maintien serait assuré uniquement par la télomérase humaine. La création d'un tel système d'étude de la télomérase humaine dans un système hétérologue fournirait un outil unique dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui réguleraient la télomérase humaine *in vivo*. Nos résultats montrent que l'expression des deux composantes essentielles de la télomérase humaine chez *S. cerevisiae* permet la synthèse de répétitions humaines *in vitro* et que l'enzyme est correctement localisée au noyau. Néanmoins, aucun ajout de répétitions télomériques humaines n'est détecté *in vivo* due à un défaut d'activité télomérase humaine aux télomères de levure, même après ajout de

deux composantes humaines qui joueraient un rôle dans le recrutement de la télomérase humaine aux télomères. Le remplacement fonctionnel de la télomérase de levure par la télomérase humaine pourrait possiblement se faire par l'ajout de composantes humaines additionnelles, ou reste tout simplement impossible si l'on considère que la régulation de la télomérase et la fonction des télomères sont trop distantes chez ces deux organismes.

La levure humanisée reste tout de même un outil privilégié pour étudier la fonction des télomères et de la télomérase, en particulier les protéines associées aux télomères et les différents modes qui régulent la longueur des télomères.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	I
Liste des illustrations.....	IV
Liste des abréviations.....	VIII
Résumé	
Introduction.....	1
Organisation structurale des télomères.....	2
Fonction des télomères.....	7
Fonction de protection et accès aux télomères.....	7
Réplication complète des chromosomes.....	19
La télomérase.....	22
La télomérase chez l'humain.....	23
hTERT.....	23
hTR.....	26
Fonction des protéines associées à la télomérase.....	28
Régulation de l'activité télomérase.....	29
Mécanisme d'action de la télomérase.....	29
Reconstitution de l'activité télomérase humaine.....	31
La télomérase chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Maintien des télomères en absence de télomérase.....	35
Mutation dans la région matrice de TLC1.....	37
Régulation de la longueur des télomères chez <i>S. cerevisiae</i>	39
Objectif de cette étude et utilité d'un tel modèle.....	42
Matériel et Méthodes.....	44
Souches de levures utilisées et constructions plasmidiques.....	44
Cultures des cellules de levures et perte de plasmides.....	44

Extraction de l'ADN génomique de levure et détection de l'ADN télomérique	45
Clonage des télomères et analyse par séquençage	45
Localisation de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine hTERT par immunofluorescence indirecte.....	45
Expression des protéines humaines et détection de l'activité télomérase humaine chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	46
Oligonucléotides.....	46
Résultats	47
Analyse de la structure terminale des télomères de levures avec une matrice ARN de TLC1 humanisées (TLC1h) et mécanisme de survie	48
Construction d'une souche avec des répétitions télomériques humaines à l'extrémité des chromosomes de levures.....	48
Maintenance des télomères chez les cellules humanisées	55
Analyse à long terme des télomères de souches humanisées	56
Gels de télomères.....	56
Clonage et séquençage des télomères.....	60
Complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure.....	68
Souche et stratégie	68
Reconstitution fonctionnelle d'une télomérase humaine exprimée chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	71
Immunolocalisation de l'unité catalytique de la télomérase humaine :	
hTERT	73
Complémentation.....	75
Discussions et Conclusions	82
Structure terminale des télomères de levures humanisées : vers une explication de l'évolution des télomères.....	82
Mécanisme de survie des levures humanisées.....	85
Protéines associées aux télomères de levures humanisées et régulation de la longueur des télomères	87

La levure humanisée : un modèle pour étudier les fonctions des télomères	93
Complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure	95
Remerciements	99
Liste des références	100
Annexe 1 : Bah et al., 2004	142

LISTES DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : nature des répétitions télomériques chez différents organismes

Tableau 2 : protéines associées à la télomérase et aux télomères chez la levure *S. cerevisiae* et l'humain

Tableau 3 : séquence matrice de la composante ARN de la télomérase chez différents organismes

Tableau 4 : plasmides utilisés dans cette étude

Tableau 5 : oligonucléotides

Tableau 6 : comparaison des extrémités 3' des télomères de levures humanisées

Tableau 7 : analyse moléculaire des résultats de séquençage de levures humanisées

Tableau 8 : séquence consensus levure et transition avec les premières répétitions humaines

Tableau 9 : essais de complémentation entre les sous-unités de la télomérase humaine et de la télomérase de levure

Figure 1 : organisation structurale des télomères chez *S. cerevisiae*

Figure 2 : organisation structurale des télomères chez les mammifères

Figure 3 : les extrémités télomériques ont des extensions riches en G simple brin

Figure 4 : le problème de réplication de la fin des chromosomes

Figure 5 : homologie entre les domaines TERT humain et levure

Figure 6 : structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez les vertébrés

Figure 7 : mécanisme d'action de la télomérase

Figure 8 : humanisation de la matrice ARN de la télomérase de levure

Figure 9: analyse à long terme de la croissance de levures avec une matrice ARN modifiée (TLC1h)

Figure 10 : analyse de la nature et de l'évolution structurale des télomères de levures avec une matrice ARN de *TLC1* humanisée

Figure 11 : vérification de la présence d'une extension télomérique humaine simple brin chez la levure humanisée par traitement à l'Exonucléase I d'*Escherichia coli* (*ExoI*)

Figure 12 : exemples de résultats de séquençage pour deux clones humanisés

Figure 13 : analyse des télomères chez la levure humanisée par séquençage

Figure 14 : modèle d'appariement de la matrice ARN humanisée (*TLC1h*) à son substrat télomérique préférentiel (voir Tableau 7)

Figure 15 : schéma général de l'essai de complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure

Figure 16 : expression des protéines de fusions GST-hTERT et CDC13_{DBD}-hTERT et activité télomérase humaine chez la levure *S.cerevisiae*

Figure 17 : localisation de hTERT par immunofluorescence indirecte chez la levure humanisée

Figure 18 : expression des protéines humaines EST1A et EST1B chez la levure *S. cerevisiae*

Figure 19 : schéma de l'essai de complémentation entre la télomérase humaine et de levure en présence de EST1A et EST1B humain

Figure 20 : organisation structurale des télomères chez la levure humanisée

Figure 21 : chromatine télomérique chez différentes souches de levure

Figure 22 : modes de régulation de la longueur des télomères chez la levure humanisée

Figure 23 : modèle pour les évènements de délétions intrachromatides (TRD)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	anticorps
ALT	alternative lengthening of telomeres
2 μ	deux micron
Ade	adénine
ARS	autonomously replicating sequence
C	cytosine
Cdc13p	cell division control protein13
CEN	centromère
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
Chr. V-R	chromosome V droit
DBD	DNA binding domain
D-loop	displacement loop
ds ou db	double stranded : contrôle double brin
Est	ever short telomeres
Est1p	produit protéique du gène <i>EST1</i>
Est2p	produit protéique du gène <i>EST2</i>
Est3p	produit protéique du gène <i>EST3</i>
Est4p/Cdc13p	produit protéique du gène <i>CDC13</i>
FOA	5-fluoroorotic acid

G	guanine
Gal	galactose
GAL1	promoteur inductible au galactose
Gén.	générations
GFP	green fluorescent protein
Glu	glucose
GST	glutathione S-transferase
HA	influenza hemagglutinin
HIS	histidine
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
hsp90	heat shock protein 90
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
hTR	human telomerase RNA
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
kpb	kilopaires de bases
LEU	leucine
LYS	lysine
MRN	MRE11, RAD50, NBS1
NHEJ	non homologous end joining
nt	nucléotide
OB-fold	oligonucléotide- and oligosaccharide-binding fold
pb	paire de base

Rap1	repressor activator protein 1
Rif	Rap1-interacting factor
RNP	ribonucléoprotéine
RRL	lysate de réticulocytes de lapin
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScRap1p	protéine Rap1 chez <i>S. cerevisiae</i>
snoRNA	small nucleolar ribonucleoprotein
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ss ou sb	single stranded : contrôle simple brin
STARs	sub-telomeric anti-silencing regions
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEP1	telomerase-associated protein 1
t loop	telomere loop
TPE	telomere position effect
TRAP	telomeric repeat amplification protocol
TRD	telomere rapid deletion
TRF	fragment terminal de restriction
TRP	tryptophane
URA	uracile
WT	wild type

INTRODUCTION

Téломère, dont l'origine grecque est « telos » fin et « meros » partie, est un terme défini pour la première fois par le généticien Hermann J. Muller à la fin des années 1930s et requiert toujours toute l'attention du monde scientifique en ce nouveau millénaire. En utilisant *Drosophila melanogaster* comme modèle d'étude, il observa après irradiations aux rayons X que les chromosomes étaient sujets à des cassures menant à des réarrangements chromosomiques (inversions, délétions et translocations) à l'exception des extrémités terminales qui étaient exemptes de telles modifications. Il réalisa ainsi que la stabilité des chromosomes était dépendante d'une structure terminale particulière (Muller 1938). Barbara McClintock confirma les résultats de Muller en proposant qu'une structure amenant la stabilité aux extrémités doit distinguer un chromosome brisé d'un chromosome naturel, concept basé sur l'observation que les chromosomes brisés de *Zea mays* pouvaient fusionner entre eux alors que les fins naturelles des chromosomes étaient assez stables (McClintock 1939, 1941). De nos jours, les télomères sont définis comme des structures protectrices composées d'ADN non codant et de protéines spécialisées, et sont présents uniquement aux extrémités des chromosomes eucaryotes linéaires.

Organisation structurale des télomères

En général, la séquence et l'organisation des télomères est extrêmement conservée chez tous les eucaryotes et peut se diviser en deux domaines structural et fonctionnel : la région sous-télomérique et la région télomérique proprement dite. La première séquence télomérique a été caractérisée chez le cilié *Tetrahymena thermophila* et consiste en la séquence T_2G_4/C_4A_2 répétée des dizaines de fois (Blackburn et Gall 1978). Depuis, les séquences télomériques de différents organismes ont été caractérisées et dans la majorité des cas l'ADN télomérique consiste en des séquences courtes répétées en tandem (Blackburn et Greider, 1995) (tableau 1). Cet ADN est en grande partie sous forme double brin et est polarisé de façon à ce que le brin riche en résidus guanines (G) constitue le brin G-riche orienté de 5' en 3' alors que le brin complémentaire riche en résidus cytosine (C) constitue le brin C-riche orienté de 3' en 5'. Une extension du brin riche en G par rapport au brin riche en C constitue toujours l'extrémité 3' simple brin des chromosomes (figures 1 et 2) et est essentielle pour l'élongation des répétitions riches en G par la télomérase (discuté plus loin). Des organismes éloignés phylogéniquement peuvent avoir la même séquence télomérique, T_2AG_3 chez le Trypanosome et tous les vertébrés, et dans d'autres cas, différents organismes appartenant à une même famille, *Tetrahymena* et *Oxytricha* chez les ciliés, peuvent avoir des séquences télomériques différentes mais celles-ci sont clairement reliées (tableau 1). Le nombre de répétitions aux extrémités chromosomales varie extrêmement entre différents organismes, entre différents télomères d'un même organisme et à l'intérieur d'une même cellule. Chez les mammifères, l'unité télomérique est composée des 6 nucléotides TTAGGG.

Organisme	Séquence	Référence
Ciliés		
<i>Tetrahymena</i>	T ₂ G ₄	(Blackburn et Gall 1978)
<i>Oxytricha</i>	T ₄ G ₄	(Klobutcher et al. 1981)
<i>Euplotes</i>	T ₄ G ₄	(Klobutcher et al. 1981)
Flagellés		
<i>Trypanosoma</i>	T ₂ AG ₃	(Blackburn et Challoner 1984)
Sporozoaires		
<i>Plasmodium</i>	T ₂ [T/C]AG ₃	(Porzi et al. 1985)
Champignons		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆	(Shampay et al. 1984)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T ₂ AC(A)G ₂₋₅	(Sugawara et Szostak 1986)
<i>Candida albicans</i>	ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT	(McEachem et Hicks 1993)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGATTTGATTAGGTATGTGGTGT	(McEachem et Blackburn 1994)
Nématodes		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	T ₂ AG ₂ C	(Cangiano et La Volpe 1993)
Plantes		
<i>Arabidopsis</i>	T ₃ AG ₃	(Richards et Ausubel 1988)
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	T ₂ AG ₃	(Moyzis et al. 1988)
<i>Mus spp.</i>	T ₂ AG ₃	(Kipling et Cooke 1990)
<i>Autres vertébrés</i>	T ₂ AG ₃	(Meyne et al. 1989)

Tableau 1 : nature des répétitions télomériques chez différents organismes (adapté de Henderson, 1995)

Cette séquence, commune à tous les vertébrés, est répétée en tandem des milliers de fois : chez l'humain le duplex ADN [T₂AG₃/C₃TA₂] est d'environ 5-15 kpb alors que chez la souris celui-ci peut atteindre jusqu'à plus de 100 kpb quelque soit la phase du cycle cellulaire (de Lange et al. 1990, Kipling et Cooke 1990, Starling et al. 1990). Concernant les extensions humaines riches en G, celles-ci sont d'environ 75-300 bases à travers le cycle cellulaire (figure 2) (McElligott et Wellinger, 1997; Makarov et al., 1997). Contrairement aux cellules de mammifères, les répétitions télomériques chez la

levure *Saccharomyces cerevisiae* sont constituées d'une séquence irrégulière $T(G)_2$ - $_3(TG)_{1-6}$, communément abrégée TG_{1-3} , et répétée une centaine de fois pour former un télomère d'environ 300 pb (Shampay et al., 1984). Ces cellules acquièrent une courte extension riche en G supérieure ou égale à 30 bases en fin de phase S (Wellinger et al., 1993b). Dans les autres phases du cycle cellulaire cette extension est de 10-15 nt (Larrivée et al. 2004).

Chez l'organisme *Kluyveromyces lactis*, l'unité répétitive télomérique est plus longue alors que chez la drosophile la structure télomérique est complètement différente et consiste en un système d'éléments rétrotransposables (Biessmann et al., 1992).

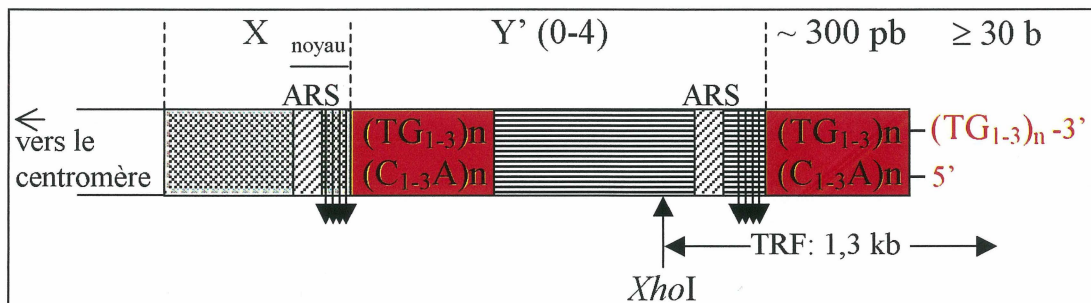
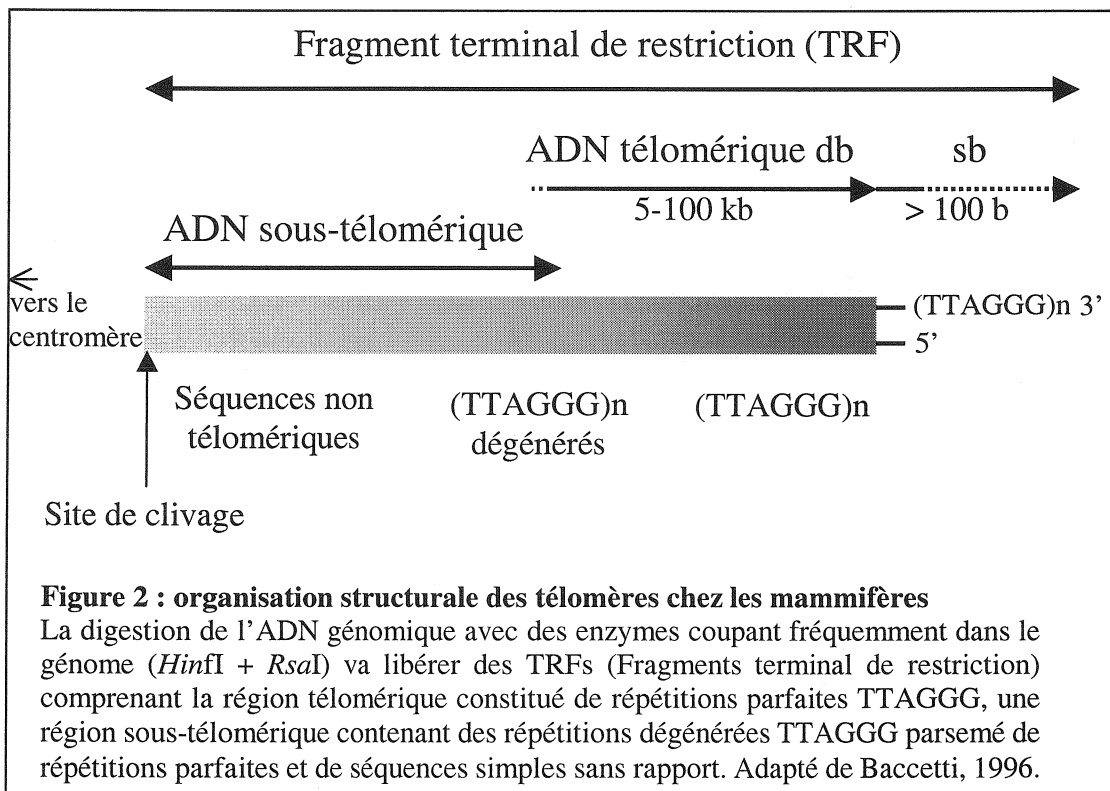


Figure 1 : organisation structurale des télomères chez *S. cerevisiae*

Chaque chromosome commence et fini par des répétitions $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ dont la longueur est d'environ 300 pb. Une courte extension TG_{1-3} qui peut atteindre plus de 30 bases en fin de phase S constitue la fin du chromosome (Wellinger et al. 1993). Environ les 2/3 des télomères comportent 0 à 4 copie de l'élément Y' d'une longueur de 6,7 ou 5,2 kb (Chan et Tye, 1983). Plus à l'intérieur on retrouve l'élément X , (0,3 à 3 kb) dont la séquence est hétérogène, présent sur la plupart des télomères. Des répétitions internes $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ sont fréquemment trouvées entre les Y' ou entre X et Y' (Walmsley et al. 1984). Des répétitions humaines C_3TA_2/T_2AG_3 ou de type T_2AG_3 constituent également les télomères de levure, représentées ici par les flèches verticales dirigées vers le bas. La jonction entre le noyau X , qui contient les répétitions $TTAGGG$ dégénérées et un ARS (Flint et al. 1997), et l'élément Y' est très variable et contient un certain nombre de répétitions humaines. Séquence sous-télomérique distale: Y' , séquence sous-télomérique proximale: après noyau X . L'endonucléase *XhoI* permet d'apprécier la longueur des TRFs en coupant une seule fois dans l'élément Y' , générant ainsi un patron de bandes caractéristique sur gel de télomère (Louis et Haber, 1990) (Cf. figure 10). Adapté de Zakian, 1995.

En direction du centromère on retrouve la région sous-téломérique adjacente aux répétitions télomériques. Chez *S. cerevisiae*, cette région est représentée par les éléments X et Y' (Chan et Tye, 1983) (figure 1) alors que chez l'humain elle consiste en des séquences dégénérées TTAGGG ainsi que des séquences non-télomériques (figure 2). L'élément X, de 0,3 à 3,75 kb est moins conservé que l'élément Y' (Chan et Tye, 1983; Zakian et Blanton, 1988; Biessmann et Mason, 1992). La seule région partagée par tous les chromosomes est un petit élément de 475 pb, nommé noyau X, qui contient une origine de réplication présumée ARS (autonomously replicating sequence) (Louis 1995) et les sites de liaison de deux protéines essentielles, Tbf1p dont la fonction est inconnue



et Abf1p impliquée dans la régulation transcriptionnelle et la réplication (Liu et Tye 1991; Brand et al, 1987). L'élément Y', hautement conservé, est présent jusqu'à 4 copies en tandem sur les deux tiers des télomères et correspond à deux tailles majeures de 5,2 et 6,7 kpb. Des évènements fréquents de recombinaisons homologues et de conversion

génique ont été documentés entre les éléments Y' qui jouent un rôle dans la diffusion et la variabilité de ces séquences sous-téломériques de levure (Louis et Haber, 1990; Louis et Haber, 1992; Louis et Haber, 1990). Le haut degré de recombinaison entre les éléments Y' résulte en un polymorphisme des télomères et est suffisant pour maintenir la fonction des télomères et la viabilité cellulaire lorsqu'un défaut dans la réplication des télomères par la voie de la télomérase est observé (Lundblad et Blackburn, 1993).

Les répétitions irrégulières TG₁₋₃/CA₁₋₃ sont trouvées entre les éléments Y' et séparent les éléments X et Y', ce qui démontre que la séquence en elle seule ne constitue pas un télomère. À la jonction entre les éléments X-Y' et les répétitions TG₁₋₃ se trouvent des séquences apparentées aux répétitions télomériques humaines (TTAGGG)_n où au moins une répétition est parfaite. Cette séquence retrouvée chez plusieurs organismes dont tous les vertébrés, est aussi le site de liaison de la protéine Tbf1, produit du gène essentiel *TBF1* (discuté plus loin). Cette protéine lie les copies TTAGGG adjacentes aux éléments X et sûrement les copies adjacentes aux Y' (Brigati et al., 1993). Les répétitions internes de type TTAGGG et l'élément ARS constitueraient une frontière aux échanges de séquences entre les domaines sous-télomériques distaux et proximaux de levure (Flint et al. 1997). En effet, l'élément X est une barrière à la recombinaison car la délétion de cet élément résulte en une augmentation de l'échange entre les séquences sous-télomériques proximales et distales (Flint et al. 1997). Une étude comparative entre les télomères humains et de levure a montré que la structure générale des régions sous-télomériques de levure ressemblent étroitement aux séquences sous-télomériques humaines (Flint et al. 1997). Les fonctions des régions sous-télomériques restent encore inconnues mais un chromosome de levure sans région sous-télomérique peut se répliquer,

ségréger et recombinaison en mitose et méiose aussi bien qu'un télomère pourvu de cette région. Donc leur présence n'est pas nécessaire pour la fonction des télomères. Néanmoins, les régions sous-télomériques semblent interagir de façon fonctionnelle avec les télomères pour étendre et consolider les fonctions essentielles des extrémités des chromosomes (Fourel et al, 1999).

Fonctions des télomères

La fonction essentielle des télomères est la préservation de l'intégrité des génomes eucaryotes (Zakian, 1989). En effet, ils distinguent les extrémités chromosomales des bris ADN double brin et préviennent ainsi leurs dégradations et leurs fusions bout à bout (Zakian, 1989). Ils participent aussi dans le couplage et le mouvement des chromosomes à la mitose et à la méiose assurant ainsi une préservation des chromosomes à chaque division cellulaire (Chikashige et al., 1994; Dernburg et al., 1995).

Fonction de protection et accès aux télomères

Chez la levure *S. cerevisiae* ou l'humain, la plus grande partie de l'ADN télomérique (région sous-télomérique) est agencée en nucléosomes résistants aux méthylases et seulement la partie la plus distale (répétitions télomériques) est sous une conformation de chromatine non-nucléosomale nommée télosome résistante aux nucléases (Wright et al. 1992; Tommerup et al. 1994; Lejnine et al. 1995).

La chromatine télomérique est constituée de protéines spécialisées que l'on peut classer en trois groupes : les protéines liant la partie double brin de l'ADN télomérique, les protéines recrutées aux télomères par le biais d'interactions protéine-protéine et finalement les protéines liant l'extension terminale riche en G (tableau 2). Toutes ces protéines jouent un rôle dans l'homéostasie des télomères et dans l'accès de la télomérase au substrat télomérique.

Rap1p chez la levure *S. cerevisiae* (Conrad et al., 1990), TRF1 et TRF2 chez l'humain (Chong et al. 1995; Broccoli et al., 1997) et Taz1p chez *Schizosaccharomyces pombe* (Cooper et al., 1997) sont les protéines les mieux caractérisées liant l'ADN double brin à des séquences spécifiques.

Chez la levure *S. cerevisiae* **Rap1** (repressor activator protein 1) est la protéine télomérique par excellence et joue un rôle central dans l'homéostasie des télomères. Cette protéine est impliquée dans la transcription de nombreux gènes chez la levure et a deux fonctions au niveau des télomères : la régulation de la longueur des télomères (discuté plus loin) et la répression transcriptionnelle des gènes localisés près des télomères communément appelé TPE (Telomere position effect) (voir Tham et Zakian, 2002 pour une revue) (Gottschling et al., 1990). Rap1p lie spécifiquement le duplex TG₁₋₃/C₁₋₃A par l'intermédiaire de ces deux domaines de type Myb au centre de la protéine (Conrad et al. 1990; Wright et Zakian, 1995; Gilson et al., 1993, König et al., 1996). Ce domaine de liaison à l'ADN est hautement conservé et composé de répétitions en tandem du motif hélice-tour-hélice. Rap1p joue un rôle négatif dans la régulation de la longueur des télomères en recrutant les protéines **Rif1** et **Rif2** (Rap1-interacting factors) en sa partie C-

terminale (discuté plus loin) et serait également impliqué dans l'établissement et la maintenance du TPE en recrutant les protéines **Sir3** et **Sir4** par ce même domaine.

Facteurs	Levure	Humain	Fonctions et interactions
Composantes essentielles de la télomérase	TLC1	TR	sous-unité ARN
	Est2	TERT	sous-unité transcriptase inverse
Facteurs accessoires de la télomérase	Est1, Est3	EST1A, EST1B	S'associe avec la télomérase (Sc, Hs)
	Est1		Lient l'ARN TLC1 (Sc)
Facteurs liant l'extension G-riche	Est4/Cdc13	POT1	Lient l'ADN simple brin (Sc, Hs) Interagit avec TRF1, TIN2, tankyrase 1 (Hs)
		hnRNPA1	Lie ADN simple brin (Hs)
	Est1		composante de la télomérase (Sc)
	Rfa1, Rfa2	RPA70, RPA32/34	Lient ADN simple brin (Sc, Hs)
Protéines liant le duplex télomérique	Rap1	TRF1	Lient les télomères (Sc, Hs) régulation de la longueur des télomères (Sc, Hs)
	Tbf1	TRF2	liaison aux télomères (Sc, Hs); rôle dans t-loops (Hs)
Protéines télomériques recrutées aux télomères par le biais d'interaction protéine-protéine	Rif1, Rif2		Longueur des télomères, recruté par Rap1 (Sc)
		RAP1	Recruté par TRF2 (Hs)
		TANK1, TANK2	Lient TRF1 (Hs)
		TIN2	Lient TRF1 (Hs)
	Stn1, Ten1		Recrutés par Cdc13; protection terminale (Sc)
	Sir3, Sir4		Composants des complexes silencieux aux locus du mating type et aux télomères (Sc)
Autres	Ku70/80	Ku70/86	Sous-unités du complexe Ku liant les télomères et impliqués dans le NHEJ et la méiose (Sc, Hs) Localisation des télomères (Sc, Hs)
			Ku lie l'ARN TLC1 (Sc)
			S'associe avec la télomérase (Hs)
	Mre11/Rad50/Xrs2	MRE11/RAD50/NBS1	Localisation des télomères (Hs) Activité nucléase (Sc, Hs) Activité hélicase (Hs)

Tableau 2 : protéines associées à la télomérase et aux télomères chez la levure *S. cerevisiae* et l'humain (adapté de Vega et al., 2003)
* voir texte pour plus de détails et références. Sc, *S. cerevisiae*; Hs *Homo sapiens*

L'activité déacétylase de **Sir2p** permet la dissémination de la chromatine silencieuse aux nucléosomes avoisinants de la région sous-télomérique par la liaison des protéines Sir3 et Sir4 aux queues N-terminales des histones H3 et H4 hypoacétylés (Suka et al., 2002). Sir2p est également impliqué dans le silençage transcriptionnel aux locus *HML* et *HMR* du mating type par le même processus. L'hétérodimère Ku est aussi

impliqué dans la dissémination des protéines Sir en s'associant à Sir4p contrairement à son association aux extrémités chromosomales (discuté plus loin).

La délétion de certains gènes non essentiels comme *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70) ou *HDF2* (yKu80) abolie quasiment le TPE tout comme la délétion de la partie C-terminale de Rap1p requise pour la liaison de Sir3p et Sir4p. Le TPE diminue aussi en fonction qu'on s'éloigne de l'extrémité télomérique ce qui corrèle avec une diminution de la concentration des protéines Sir. L'acétylation des histones constituerait la transition entre l'hétérochromatine et l'euchromatine (Suka et al., 2002). Chez les cellules de mammifères des évidences montrent la présence de TPE (Baur et al., 2001).

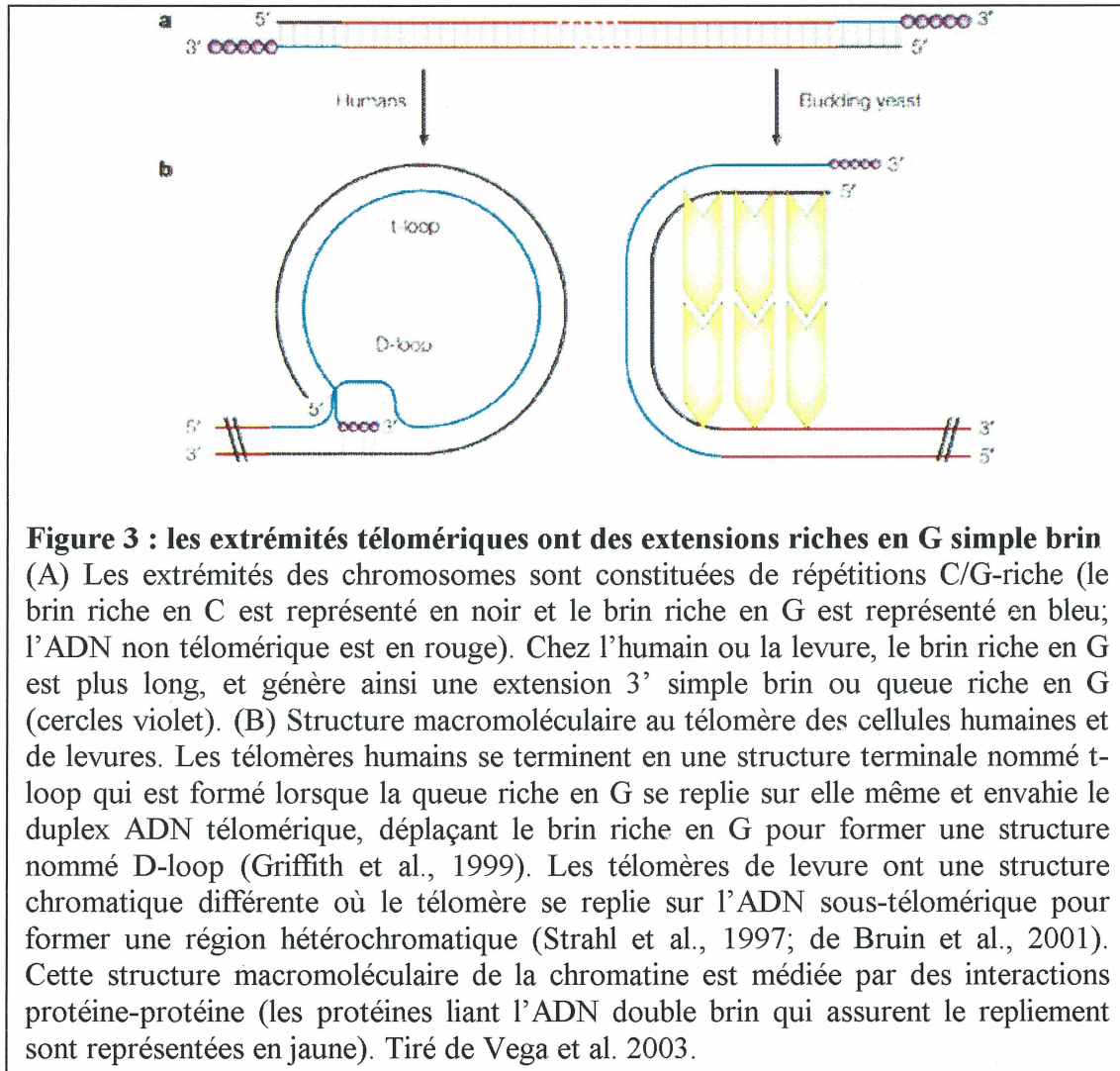
Chez les cellules humaines, **TRF1** semble être l'homologue fonctionnel de Rap1p chez *S. cerevisiae* (tableau 2). TRF1 lie par son domaine de type Myb tout le long du duplex télomérique humain *in vitro* sous forme de dimères (domaine de dimérisation) (Chong et al., 1995; Bianchi et al., 1997; Bianchi et al., 1999) et régule négativement la longueur des télomères comme Rap1p (Ancelin et al., 2002). De plus, la surexpression de TRF1 résulte en la diminution graduelle des télomères alors que la surexpression d'une forme déficiente de TRF1 dans son domaine de liaison enlève TRF1 endogène des télomères et conduit à une augmentation de la longueur des télomères (van Steensel et de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000). Ces modifications dans l'homéostasie des télomères sont indépendants des changements dans l'activité télomérase *in vitro* ce qui indique que TRF1 jouerait un rôle en régulant l'accès de la télomérase aux télomères.

TRF2, tout comme TRF1, lie le duplex télomérique T₂AG₃/C₃TA₂ et sa surexpression mène à une diminution de la longueur des télomères (Broccoli et al., 1997; Smogorzewska et al., 2000). La surexpression d'une version dominante négative de

TRF2 résulte en la perte des molécules TRF2 liées aux télomères et mène à une perte des extensions riches en G simple brin et une augmentation dramatique des fusions bout à bout (van Steensel et al., 1998).

Des études de microscopie électronique supportent le modèle dans lequel les télomères de mammifères se replieraient sur eux-mêmes et formeraient des boucles à l'extrémité (figure 3) (Griffith et al. 1999). Dans une large boucle, l'extension riche en G simple brin forme une structure en lasso nommée t-loop (telomere-loop) en envahissant le duplex ADN. Ce repliement serait facilité par la liaison de TRF1 le long du duplex ADN. La taille des t-loops s'échelonne de 0.3 kpb chez les trypanosomes à plus de 30 kpb chez les cellules de souris (Griffith et al., 1999; Munoz-Jordan et al., 2001; Murti et Prescott, 1999). Le déplacement de cette extension simple brin induit son invasion à une région double brin homologue et sa liaison complémentaire à un des deux brins. Cette structure nommée D-loop (displacement-loop) est assurée par TRF2 dont la localisation est concentrée à cette jonction. La perte des extensions riches en G observée dans les cellules exprimant la forme dominante négative de TRF2 peut être la conséquence de la perte de t-loop. TRF2 joue donc un rôle crucial dans la protection terminale des télomères qui peut être essentielle pour la fonction de stabilité des télomères humains. Le rôle de cette architecture est de séquestrer l'extrémité 3' simple brin en créant une structure qui est distincte d'un ADN terminal brisé (de Lange, 2002). De cette façon, l'extension riche en G reste inaccessible aux activités qui pourraient agir aux extrémités de l'ADN comme les points de contrôle de dommage à l'ADN, les enzymes de réparation de l'ADN et la télomérase (Griffith et de Lange, 1999; Greider, 1999). Bien que les t-loops n'aient pas été détectés chez la levure, les télomères de *S. cerevisiae* ont une organisation

macromoléculaire différente où le télomère se replierait sur l'ADN sous-télomérique sans invasion de l'extension simple brin (figure 3) (Strahl-Bolsinger et al., 1997), courbure sûrement médiée par Rif1p et Rif2p qui lient Rap1p et les protéines Sir stabiliseraient la structure en liant à l'hétérodimère Ku, Rap1p, et les histones des nucléosomes (Dubois et al., 2000). En contraste avec les télomères de mammifère, la perte de la structure en



boucle assurée par Rap1p chez la levure n'affecte pas le taux de perte des chromosomes, suggérant ainsi que le repliement des télomères chez la levure n'est pas essentiel pour la stabilité génomique (de Bruin et al., 2000).

Les protéines liant le duplex télomérique recrutent des protéines additionnelles qui sont requises pour la fonction normale des télomères. Chez les cellules humaines, TRF1 interagit avec un certain nombre de protéines toutes localisées aux télomères comme **PINX1** (Pin2-interacting protein X1; Zou et Lu, 2001) inhibiteur de l'activité télomérase *in vitro*; **TIN2** (TRF1-interacting nuclear protein 2; Kim et al., 1999), **tankyrase 1 et 2** (Smith et al., 1998) et l'hétérodimère **Ku** (Hsu et al., 2000) qui tous les trois régulent l'accès de la télomérase aux télomères. Le complexe TRF1 est impliqué dans la régulation de la longueur des télomères en inhibant la télomérase en cis.

TRF2 interagit avec l'orthologue humain de Rap1 de levure : **hRAP1**. Bien que RAP1 ait un domaine de liaison à l'ADN de type Myb, contrairement à Rap1p il ne lie pas directement l'ADN télomérique (Li et al. 2000). RAP1 est localisé aux télomères *in vivo* seulement en présence de TRF2 et serait un régulateur négatif de la longueur des télomères en agissant à travers l'interaction avec des protéines additionnelles encore non identifiées (Li et al. 2000).

L'hétérodimère Ku, hautement conservé, lie avec beaucoup d'affinité les extrémités double brin, indépendamment de leur séquence ou structure et joue un rôle crucial dans la réparation des bris ADN double brin via le NHEJ chez la levure et les mammifères (Jones et al. 2001) et protège les télomères de la recombinaison homologue.

Chez *S. cerevisiae*, **yKu70** et **yKu80** sont associés aux télomères *in vivo* (Gravel et al., 1998). Des cellules délétées pour Ku ont de multiples défauts au niveau des télomères notamment une réduction de leur longueur (Porter et al., 1996), de longues extensions riches en G simple brin (Gravel et al., 1998; Polotnianka et al., 1998), une expression altérée des gènes proximaux aux télomères (Gravel et al., 1998; Boulton et

Jackson, 1996, Laroche et al., 1998) et une augmentation de la recombinaison télomère-télomère à température restrictive (Polotnianska et al., 1998). Ku interagit avec la tige boucle de la composante ARN de la télomérase TLC1 (Stellwagen et al., 2003; Peterson et al., 2001) et la délétion de ce motif mène à une diminution de la longueur des télomères (Peterson et al., 2001). Dans une souche où Ku n'est plus capable de lier la tige boucle de TLC1 mais conserve sa liaison à l'ADN, la protection terminale des chromosomes et la réparation de l'ADN sont normales, mais l'addition des répétitions télomériques levures est compromise (Stellwagen et al., 2003). Donc Ku70/80 promouvoit l'accès de la télomérase aux télomères par son habilité à lier la tige boucle de TLC1 (Stellwagen et al., 2003; Peterson et al., 2001). Chez l'humain, l'hétérodimère **Ku70/86** est aussi associé aux télomères mais à travers l'interaction avec TRF1 (Hsu et al., 2000). Bien qu'il n'ait pas été démontré que Ku interagit avec hTR, la composante ARN de la télomérase humaine, l'hétérodimère Ku immunoprécipite avec l'unité catalytique de la télomérase TERT (Chai et al., 2002). La fonction de Ku aux télomères humains n'a pas encore été décrite mais il semblerait que Ku jouerait le rôle de protection et de maintien des télomères de mammifère (Hsu et al., 2000; Bailey et al., 1999, Samper et al., 2000, Espejel et al., 2002, d'Adda di Fagagna et al., 2001).

La protéine **Tbf1p** (TTAGGG-repeat binding factor 1), encodée par le gène *TBF1*, essentiel pour la croissance mitotique, est capable de lier spécifiquement les répétitions télomériques humaines double brin des chromosomes de levure. En effet, des répétitions TTAGGG ou des versions permutées de cette séquence sont présentes à haute densité dans les portions proximales des éléments X et Y' qui séparent l'ADN télomérique des éléments sous-télomériques (figure 1). Ces régions sont liées par Tbf1p

in vitro. (Brigati et al. 1993; Liu et Tye, 1990; Fourel et al., 1999). Son domaine de liaison à l'ADN a des similarités avec celui de Taz1p chez *Schizosaccharomyces pombe*, TRF1 et TRF2 chez les vertébrés et leur haut degré de similarité les identifient comme les membres d'un groupe distinct des répétitions Myb, la famille « telobox » (Bilaud et al., 1996; Bilaud et al., 1997; Brun et al., 1997). D'après Koering et al., Tbf1p lie la séquence consensus « TAGGGTTAG », identique au site de liaison du domaine telobox de TRF1. Les domaines telobox de Tbf1p, TRF1, TRF2 et Taz1p montrent une haute affinité dans la liaison des répétitions de type TTAGGG *in vivo* mais pas pour les répétitions irrégulières TG₁₋₃ de *S. cerevisiae* (Bilaud et al., 1996; Vassetzky et al., 1999; Brun et al., 1997). Récemment, il a été démontré chez *S. cerevisiae*, où l'humanisation de la séquence matrice de *TLC1* permet l'ajout de répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure, que Tbf1p pouvait lier les répétitions humaines terminales (Alexander et Zakian, 2003) et pourrait contribuer ainsi au maintien des télomères humains chez la levure. Entre autre, il a été proposé que Tbf1p jouerait un rôle aux télomères en neutralisant le TPE et plus généralement le silençage transcriptionnel médié par les protéines Sir. En effet, les régions sous-télomériques contenant les sites Tbf1p exhibent des activités de silençage nommées STARs (sub-telomeric anti-silencing regions) (Fourel et al., 1999). Lorsque lié à l'ADN, Tbf1p reconstituerait les activités STARs en bloquant la propagation de la chromatine silencieuse; ainsi les STARs formeraient des frontières pour limiter le TPE et/ou protégeraient les télomères de l'influence des éléments sous-télomériques (Fourel et al., 1999).

Les extrémités 3' sortantes des télomères de différents organismes sont liées spécifiquement par des protéines spécialisées comme Cdc13p chez *S. cerevisiae* et POT1

chez la levure de fission *S. pombe* et l'humain. Celles-ci jouent un rôle dans la protection terminale des télomères et contribuent à l'accès de la télomérase au substrat télomérique.

Cdc13p lie spécifiquement l'extrémité 3' simple brin TG₁₋₃ (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996) à travers son domaine de liaison à l'ADN simple brin de haute affinité, et est localisé aux télomères *in vivo* (Bourns et al., 1998, Tzukamoto et al., 2001). Cette protéine a aussi de l'affinité pour les séquences télomériques humaines simple brin *in vivo* bien que 10 fois plus faible par rapport aux répétitions TG₁₋₃ de levure (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996, Alexander et Zakian, 2003). Cdc13p a pour fonction la protection terminale des chromosomes et est requis pour la réplication des télomères en tant que régulateur positif ou négatif de la télomérase en fournissant une plateforme protéique pour le recrutement d'autres complexes protéiques (Pennock et al., 2001). Sa fonction au sein de l'holoenzyme télomérase est discutée plus loin. La perte de fonction de *CDC13* dans une souche portant la mutation Cdc13-1 est accompagnée d'une dégradation immédiate et extensive du brin riche en C des télomères. Les longues extensions 3' simple brin qui en résultent activent le point de contrôle RAD9 et induisent un arrêt dans la phase G2 du cycle cellulaire (Garvik et al., 1995). Ces résultats suggèrent que la liaison de Cdc13p aux extrémités protège les termini d'une dégradation non régulée. Cette activité de dégradation jouerait un rôle durant la réplication normale des télomères (Wellinger et al., 1996), en exposant une région simple brin et assurant ainsi un substrat pour la liaison de Cdc13p. Sachant que l'extension riche en G présente aux télomères de levure est supérieure ou égale à 30 nucléotides durant la phase S (Wellinger et al., 1993), il est possible que des complexes protéiques se forment sur l'extension télomérique simple brin, assurant les fonctions séparées de protection terminale et

réplication. Également Cdc13p promouvoit la synthèse du brin riche en C en recrutant l'ADN polymérase α aux télomères (Qi et Zakian, 2000).

Stn1p « suppressor of *cdc* thirteen 1 » et **Ten1p** « protein involved in Telomeric pathways in association with Stn, number 1 », toutes deux interactives avec Cdc13p, seraient les effecteurs premiers de la protection terminale des chromosomes en assurant une activité spécifique qui préviendrait la dégradation des extrémités chromosomales (Grandin et al., 2001; Grandin et al., 1997; Pennock et al., 2001). La fusion DBD_{CDC13}-STN1 est suffisante pour sauver la létalité d'une souche *cdc13 Δ* , et permet ainsi la protection terminale (Pennock et al., 2001). La réplication des télomères est toujours défectueuse dans cette souche mais peut être restaurée en délivrant la télomérase aux télomères avec une fusion DBD_{CDC13}-télomérase (Pennock et al., 2001). L'analyse d'allèles ayant une mutation *ten1* démontre que Ten1p est nécessaire pour la régulation de la longueur des télomères et la protection terminale des télomères (Grandin et al., 2001). Ces complexes CDC13-STN1-TEN1 et l'holoenzyme télomérase fournissent alors des fonctions enzymatiques et/ou d'autres fonctions qui sont nécessaires pour la protection terminale et la réplication des télomères.

Une protéine liant l'ADN télomérique simple brin a été récemment identifiée chez *Schizosaccharomyces pombe* : spPot1 ou « protection of telomeres » nom basé sur le fait que la délétion du gène *pot1+* mène à une dégradation rapide des télomères. Les survivants de cette perte de télomère ont des chromosomes circularisés qui ont perdu tout ADN télomérique. spPot1 est donc essentiel pour la protection des extrémités chromosomales (Baumann et Cech, 2001). Des orthologues chez la plante *Arabidopsis*, la souris et l'humain et d'autres eucaryotes ont été identifiés par similarité de séquence avec

TEBP α d'*Oxytricha nova*, protéine associée à l'extension simple brin dans cet organisme (Baumann et Cech, 2001).

hPot1 a deux domaines importants requis pour sa fonction : un domaine N-terminal OB-fold (oligonucleotide- and oligosaccharide-binding fold) pour la liaison à l'ADN simple brin (Baumann et Cech, 2001; Mitton-Fry et al., 2002), et un domaine d'interaction protéique qui permet sa localisation aux télomères en s'associant avec le complexe TRF1 (Loayza et de Lange, 2003). L'association de POT1 aux télomères est supportée par sa colocalisation avec TRF2 et RAP1 (Baumann et al., 2002). POT1 est donc un bon candidat pour fournir un lien entre TRF1 sur le duplex télomérique et l'extension 3' où la télomérase agit. hPOT1 lie uniquement les répétitions télomériques humaines simple brin TTAGGG. La surexpression d'une version mutante de POT1 déléetée en son domaine OB résulte en une élongation rapide des télomères (Loayza et de Lange, 2003). Ces observations impliquent que POT1, en concert avec TRF1, inhibe la longueur des télomères en limitant l'accessibilité des télomères à la télomérase. En contraste, une autre étude montre que la surexpression de POT1 résulte en une augmentation de la longueur des télomères dépendante de la télomérase, ce qui suggère que POT1 est un régulateur positif de la télomérase (Colgin, 2003). Les transcrits POT1 sont sujets à l'épissage alternatif. Ces variants hPOT1 auraient des fonctions distinctes *in vivo* puisqu'ils interagissent différemment avec l'ADN télomérique (Baumann et al., 2002).

D'autres protéines comme Est1 (Sc), Rfa (Sc) et RPA (Hs), EST1A (Hs), et hnRNPA1 (Hs) sont connues pour lier l'ADN télomérique simple brin (tableau 2). Celles-ci font partie intégrante de l'holoenzyme télomérase ou associées à la télomérase,

et jouent un rôle dans la régulation et l'accès de la télomérase aux télomères (discuté plus loin).

Réplication complète des chromosomes

La réplication des chromosomes pose un problème spécial pour les cellules. Les polymérase à ADN conventionnelles utilisent une amorce ARN pour initier la synthèse de l'ADN de 5' en 3'. Après la dégradation de la dernière amorce ARN, un trou de 8-12 bases est créé à l'extrémité 5' du brin retardé (Olovnikov, 1971; Watson, 1972) générant ainsi une courte extension riche en G potentiellement reconnue et liée par des protéines spécialisées. Sans un système pour remplir ce trou, il y aurait un raccourcissement inévitable des chromosomes à travers les étapes successives de réplication qui mènera à l'instabilité génomique voire la mort cellulaire due aux télomères trop courts pour continuer d'assurer leur fonction de protection terminale des chromosomes : c'est ce qui est communément appelé « the end replication problem ». En effet, une diminution des télomères est observé chez les cellules normales de mammifères lors de la progression des divisions cellulaires (de Lange et al., 1990; Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990; Lindsey al., 1991) et ce raccourcissement agirait comme une horloge moléculaire qui définirait l'historique de réplication des cellules (Harley et al., 1992; Wright et Shay, 1992).

Les cellules eucaryotes ont donc conçues au moins deux voies pour répondre à cette perte d'information génétique due à la réplication incomplète des chromosomes. Un moyen peu fréquent est la recombinaison des télomères (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999) (discuté plus loin), et un mécanisme plus courant

pour la conservation des télomères est l'addition *de novo* d'ADN télomérique par la télomérase (discuté plus loin) (Nugent et Lundblad, 1998). L'extrémité chromosomale qui est générée par la polymérase du brin retardé finira en une courte extension riche en G due à l'enlèvement de la dernière amorce ARN alors que pour le brin avancé, celui-ci est supposée finir en un bout franc, dépourvu donc d'extension riche en G. Cependant, la télomérase a besoin d'une courte extension riche en G simple brin pour allonger les télomères. Chez la levure et les mammifères, la régénération des extensions riches en G aux extrémités chromosomales qui sont répliquées par le brin avancé a lieu par un mécanisme indépendant de la télomérase (McElligott et Wellinger, 1997; Wellinger et al., 1996; Dionne et Wellinger, 1996; Hemann et Greider, 1999). Chez la levure, les extensions riches en G sont probablement générées par une dégradation régulée du brin riche en C en fonction du cycle cellulaire (Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b; Wellinger et al., 1996). Finalement, la synthèse du brin riche en C par la machinerie de réplication conventionnelle a lieu de façon concomitante avec, ou peu de temps après, l'élongation de l'extension riche en G par la télomérase (Diede et Gottschling, 1999, Dionne et Wellinger, 2000). Les chromosomes sont ainsi complètement répliqués (figure 4).

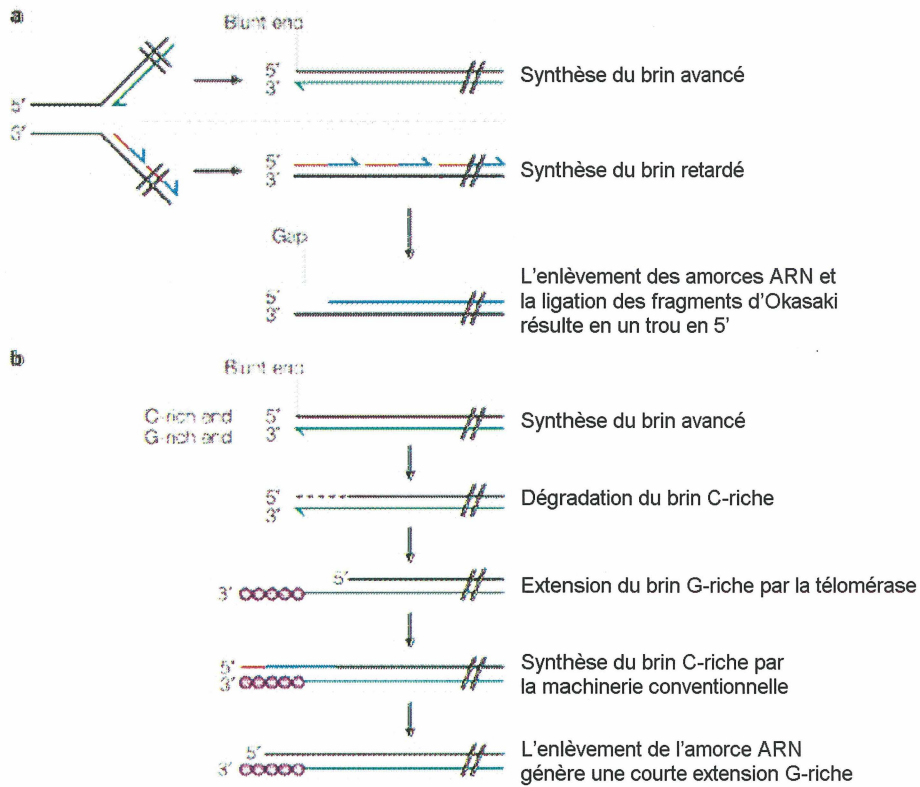


Figure 4 : le problème de répllication de la fin des chromosomes

Les ADN polymérases conventionnelles synthétisent l'ADN dans la direction 5'→3' et requièrent une amorce ARN (rouge) pour l'initiation de la synthèse. Le brin avancé peut être synthétisé en continu (vert) alors que le brin retardé est synthétisé en courts fragments d'Okasaki (bleu). Après extension, les ARN sont enlevés et les trous remplis par l'ADN polymérase. L'enlèvement de la dernière amorce ARN à l'extrémité 5' génère un trou de 8-12 bases. Un défaut dans le remplissage de ce trou mènera à une petite perte d'ADN à chaque étape de répllication de l'ADN (Figure a). Une exonucléase spécifique au brin riche en C va générer des extensions riches en G à chacune des extrémités où la télomérase va allonger les télomères. La synthèse du brin riche en C se fera finalement par les ADN polymérase α et δ et l'enlèvement de la dernière amorce ARN résultera en une courte extension riche en G (cercles violet), structure adéquate pour la protection terminale des chromosomes (Figure b). Adapté de Vega et al., 2003.

La télomérase

La télomérase est une molécule constituée d'une protéine à activité transcriptase inverse, d'une composante ARN fonctionnelle qui sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique à l'extrémité 3' des chromosomes, et de protéines associées à ces deux éléments. La fonction de cette ribonucléoprotéine télomérase est la synthèse *de novo* de l'ADN télomérique de façon à compenser la perte de séquence qui a lieu durant la réplication semi-conservative de l'ADN.

Depuis sa première découverte chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Greider et Blackburn, 1985), la télomérase a été identifiée chez différents organismes, notamment les mammifères, les plantes et la levure (tableau 3).

Organisme	Séquence télomérique (5' vers 3')	Séquence matrice ARN (3' vers 5')	Longueur de l'ARN (nt)	Référence
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	CAACCCCAA	159	(Greider et Blackburn, 1989)
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190	(Shippen-Lentz et Blackburn, 1990)
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190	(Lingner et al. 1994; Melek et al. 1994)
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	CUAACCCU AAC	451	(Feng et al., 1995)
<i>Mus spp.</i>	TTAGGG	CCUAACCCU	451	(Blasco et al., 1995)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₄₋₆	CACCACCCACACAC	~ 1300	(Singer et Gottschling, 1994)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGATTTGATT- AGGTATGTGGTGT	UCAAUCCGUACACCA AUACCUAAUCAA	~ 1300	(McEachern et Blackburn, 1994)

Tableau 3 : séquence matrice de la composante ARN de la télomérase chez différents organismes

La télomérase est active dans les cellules germinales et les cellules souches, mais serait réprimée chez la plupart des cellules somatiques humaines durant le développement (Blackburn et al., 1992; Wright et al., 1996) jusqu'à ce que dernièrement Masutomi et al. en prouvent le contraire. En effet, en utilisant un anticorps monoclonal qui reconnaît la forme catalytiquement active de la protéine hTERT (discuté plus loin), ce groupe a pu démontrer que hTERT était exprimée dans les cellules normales humaines en phase S, et

résultait en l'expression de télomérase. La perturbation de l'activité télomérase altère le potentiel prolifératif et réplcatif de ces cellules normales humaines sans affecter le taux de raccourcissement des télomères. Ces résultats indiquent donc que la régulation de hTERT et de la télomérase sont des processus dynamiques même chez les cellules normales humaines et suggèrent que la maintenance active des télomères est nécessaire pour la prolifération normale des cellules humaines.

L'activité télomérase est répertoriée dans la plupart des lignées cellulaires immortalisées et dans environ 85% des cellules cancéreuses (Counter et al., 1992; Kim et al., 1994; Shay et Wright, 1996; Shay et Bacchetti, 1997). hTERT a été identifiée comme la composante catalytique de la télomérase (discuté plus loin) et est le facteur limitant pour son activité (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Nakamura et al., 1998; Harrington et al., 1997). L'induction de hTERT empêche la sénescence et prolonge la durée de vie des cellules normales humaines primaires, et l'expression de hTERT en combinaison avec deux oncogènes résulte en la conversion tumorigénique directe des cellules normales humaines (Bodnar et al., 1998; Hahn et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc que hTERT joue un rôle important dans la sénescence cellulaire et la tumorigénèse et dès lors pourrait être la cible pour des méthodes qui préviendraient ces deux évènements.

1. La télomérase chez l'humain

hTERT

La composante catalytique de la télomérase humaine hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (Meyerson et al., 1997; Kilian et al., 1997; Nakamura et al., 1997)

est le facteur limitant pour la régulation de l'activité télomérase; le niveau d'expression de hTERT change proportionnellement avec le niveau d'activité télomérase.

L'analyse de la famille protéique TERT d'organismes distants au niveau de l'évolution révèle une organisation structurale conservée, qui peut être grossièrement divisée en 4 domaines fonctionnels : un domaine N-terminale, un domaine de liaison à l'ARN, le domaine transcriptase inverse (RT) contenant 7 motifs RT conservés et un domaine C-terminale faiblement conservée (figure 5). La portion N-terminale est nécessaire pour la maintenance des télomères et la viabilité *in vivo* mais dispensable pour l'activité télomérase *in vitro* (Armbruster et al., 2001; Friedman et Cech, 1999). Le domaine DAT (Dissociates Activities of Telomerase) de hTERT permettrait le recrutement de la télomérase aux télomères (Armbruster et al., 2003) qui pourrait être un mécanisme de régulation de la longueur des télomères (Armbruster et al., 2001). La région s'étendant du domaine linker jusqu'au motif T est nécessaire pour la liaison spécifique de hTR par hTERT (Beattie et al., 2000; Bachand et Autexier, 2001; Lai et al., 2001; Armbruster et al., 2001; Bryan et al., 2000). Chez *S. cerevisiae* une région similaire moins définie est impliquée dans la liaison de Tlc1 (Friedman et Cech, 1999). Les 7 motifs RT des TERT sont similaires aux RT virales et des substitutions d'acides aminés au sein des motifs transcriptase inverse mènent au raccourcissement des télomères et à la sénescence chez la levure, indiquant que ces motifs sont importants pour la catalyse de l'élongation des télomères. Comme le N-terminus, le domaine C-terminale de hTERT est essentiel pour l'activité enzymatique alors que chez la levure celui-ci est dispensable. La région C-terminale de hTERT interagit avec les protéines 14-3-3 qui assurent la localisation nucléaire de hTERT (Seimiya et al., 2002) néanmoins, la protéine hTERT

contient en elle-même un domaine de localisation nucléolaire qui la localise au nucléole (Etheridge et al., 2002; Yang et al., 2002). La co-localisation de la composante ARN de la télomérase hTR (discuté plus loin) avec hTERT au sein du nucléole supporte la possibilité que le nucléole pourrait être le site de biogenèse de la ribonucléoprotéine télomérase.

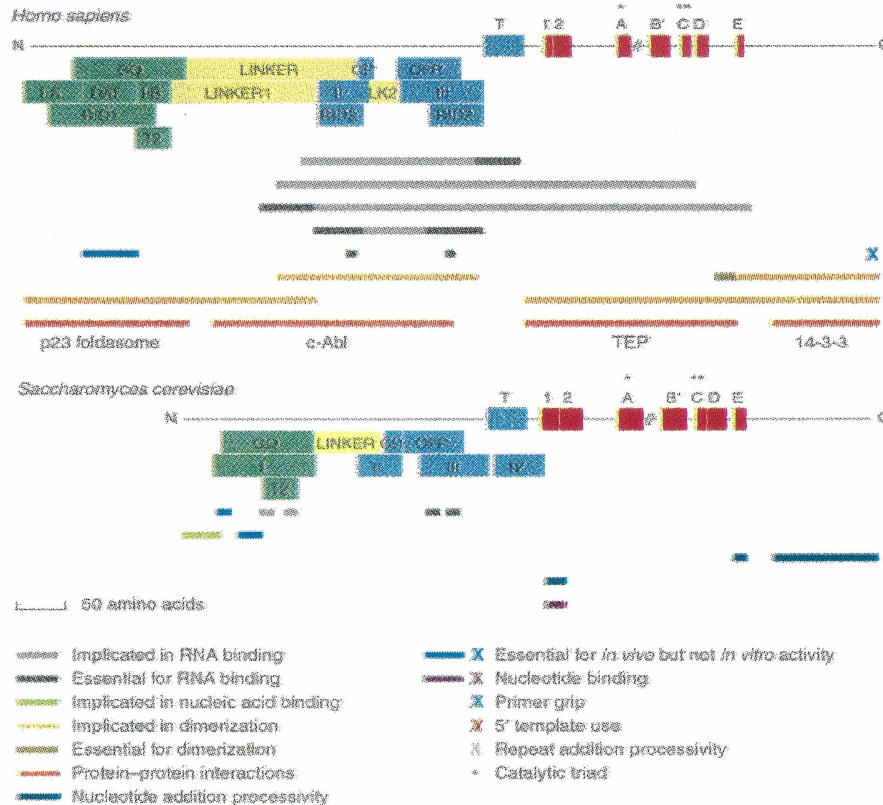


Figure 5 : homologie entre les domaines TERT humain et levure

Organisation structurale et fonctionnelle proposée des domaines de TERT chez l'humain (haut-Homo sapiens) et la levure (bas-S. cerevisiae). Domaine N-terminal (vert), domaine de liaison à l'ARN (bleu), domaine reverse transcriptase (RT) (rouge), domaine C-terminal comprenant la région entre le domaine RT "E" et le C-terminus. Les régions définies comme de liaisons sont représentées en jaune. Tiré de Kelleher et al., 2002.

Un certain nombre de protéines sont connues pour s'associer à hTERT comme TEP1, p23 et hsp90, 14-3-3, Ku70/86 (Beattie et al., 2000; Holt et al., 1999; Seimiya et

al., 2000; Chai et al., 2002) et joueraient un rôle dans l'assemblage et la conformation du complexe RNP, la localisation nucléaire de la télomérase et l'accès de la télomérase aux télomères.

hTR

La composante ARN (451 nt) de la télomérase humaine hTR (human telomerase RNA) (Feng et al., 1995) fournit la matrice pour la transcription inverse et spécifie la synthèse de la séquence ADN télomérique. hTR est hautement exprimée dans tous les tissus indépendamment de l'activité télomérase. hTR a une structure secondaire assez conservée avec les ARNs de la télomérase d'une variété d'espèces de vertébrés, indiquant un rôle important de la structure ARN dans la fonction télomérase (figure 6) (Chen et al., 2000). La structure secondaire prédite contient 4 éléments fonctionnels conservés, incluant un domaine pseudoknot (CR2/CR3), un domaine CR4/CR5, un domaine comprenant la boîte H/ACA (CR6/CR8), et un domaine CR7. Les domaines conservés au sein de la molécule hTR sont des sites de reconnaissance pour des protéines liant hTR. Le motif H/ACA ressemble à la boîte H/ACA des snoRNA et est lié par 4 protéines – dyskerin, hGAR1, hNOP10 et hnRNP2 (Mitchell et al., 1999; Dragon et al., 2000; Pogacic et al., 2000; Dez et al., 2001) – qui sont impliquées dans la stabilité, la maturation et la localisation de l'ARN. D'autres protéines comme TEP1, hnRNP C1/C2 et hnRNP A1/UP1, La, hStau et L22 (Harrington et al., 1997; Pogacic et al., 2000; Ford et al., 2000; Fiset et Chabot, 2001; Ford et al., 2001; Le et al., 2000) interagissent avec hTR et participeraient, en plus des fonctions mentionnées ci-dessus, dans l'accès de la télomérase aux télomères. Deux régions au sein de hTR interagissent avec hTERT (Mitchell et Collins, 2000).

Minimum Consensus Vertebrate Telomerase RNA

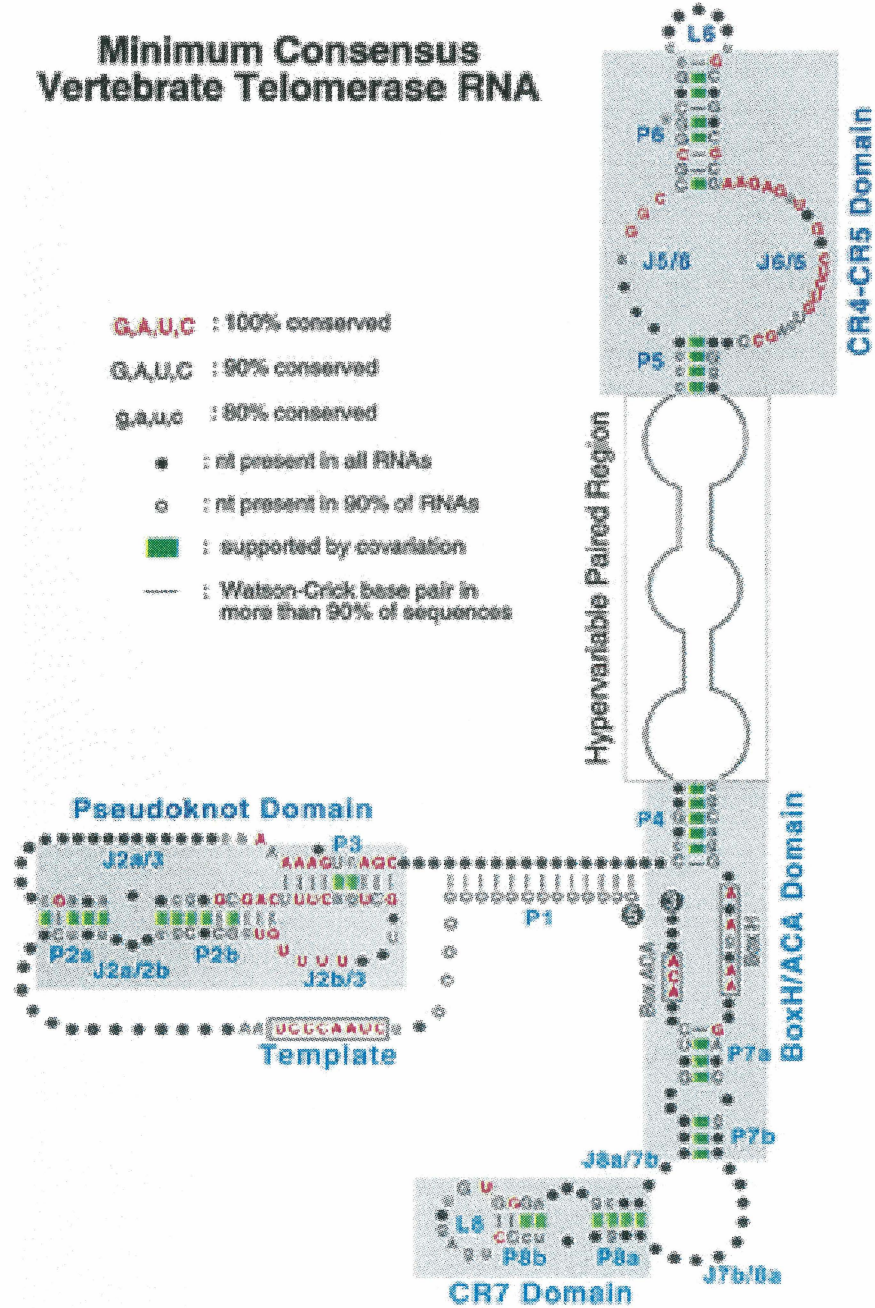


Figure 6 : structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez les vertébrés

Tiré de Chen et Greider, 2000.

La région matrice de l'ARN de la télomérase des vertébrés s'échelonne entre 8-11 nt. 8 nt dans la région matrice sont absolument conservés parmi tous les ARN de la télomérase de vertébré connu. Les 6 premiers nucléotides conservés de la matrice hTR, 5'-CUAACC-3', servent comme matrice pour la polymérisation de l'ADN, tandis que les 2 autres nucléotides conservés, 5'-CU-3', à l'extrémité 3' de la matrice sont nécessaires pour l'alignement au télomère durant la translocation. Les 4 bases adjacentes aux 8 nt essentiels ne sont pas conservées chez toutes les séquences de vertébrés, néanmoins lorsque ces résidus sont complémentaires à la séquence du télomère ils augmentent la processivité de la télomérase (Chen et Greider, 2003).

Fonction des protéines associées à la télomérase

Les protéines associées à la télomérase sont impliquées dans différents processus et pourraient être requises pour l'activité totale et la fonction biologique de l'enzyme. En effet, contrairement à la sous-unité régulable hTERT, TEP1, hTR, hsp90, p23, et la dyskerin restent à des niveaux hauts et inchangés à travers la modulation. Des expériences utilisant des oligonucléotides antisens contre ces cinq composantes montrent que l'inhibition de n'importe qu'elle d'entre-elles résulte en une réduction de l'activité télomérase, suggérant ainsi que chaque sous-unité de la télomérase est nécessaire pour la pleine activité de l'enzyme. On peut donc supposer que lorsque hTERT est exprimée, toutes les autres sous-unités de la télomérase peuvent être assemblées pour former une holoenzyme hautement active (Chang et al., 2002).

Régulation de l'activité télomérase

Différents modes régulent l'activité télomérase. Le promoteur de hTERT contient des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription qui pourraient être impliqués dans sa régulation. L'abondance de ces sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription suggère que la régulation de l'expression de hTERT peut être sujette à de multiples niveaux de contrôle par différents facteurs dans des contextes cellulaires différents (Cong et al., 1999). Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour être impliqués dans l'expression du gène *hTERT* en activant ou réprimant sa transcription (Wang et al., 1998; Misiti et al., 2000, Cong et Bacchetti, 2000). La régulation transcriptionnelle de *hTERT* est le principal niveau de contrôle dans la régulation de l'activité télomérase. Cependant, l'épissage alternatif (Ulaner et al., 2000), résultant en la production de formes inactives ou dominante négatives de hTERT (Cerezo et al., 2002; Colgin et al., 2000; Yi et al., 2000), et des modifications post-translacionnelles de la protéine hTERT (revue dans Cong et al., 2002) pourraient être des niveaux de contrôle supplémentaires de l'activité télomérase.

Mécanisme d'action de la télomérase

Durant le processus d'extension des télomères, la télomérase utilise de façon répétée la même petite région au sein de sa composante ARN comme modèle pour la synthèse d'ADN. Cela requière une réaction cyclique représentée à la figure 7 qui peut se résumer en 3 étapes : appariements au simple brin télomérique riche en G, polymérisation, et translocation ou désappariement. Bien que les mécanismes qui assurent cette réaction cyclique soient peu connus, il est clair que des changements dans

les propriétés biochimiques de la télomérase durant la réaction cyclique ont lieux aux transitions entre les différents états (Kelleher et al., 2002).

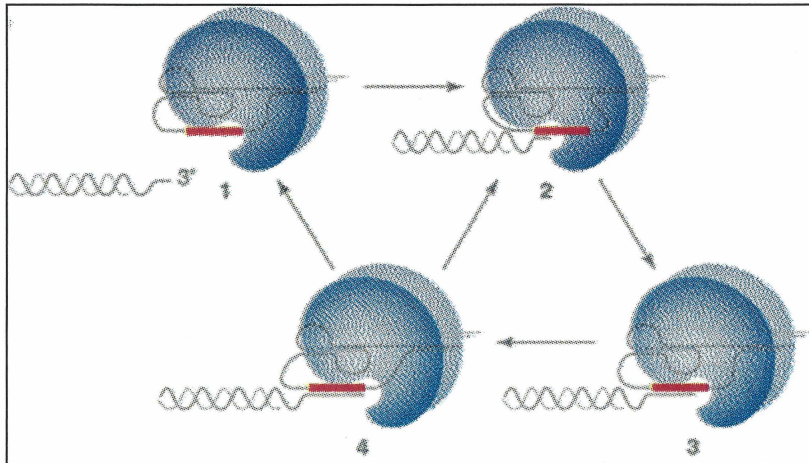


Figure 7 : mécanisme d'action de la télomérase

Différents états de la réaction sont représentés. La liaison au télomère implique l'appariement avec la matrice ARN (état 2). À chaque cycle de transcription inverse, une répétition télomérique est ajoutée (état 3). La frontière 5' de la matrice est la position où le substrat télomérique soit se dissocie (état 4 à 1) ou transloque (état 4 à 2) à l'autre extrémité de la matrice. Les composantes protéiques de la télomérase sont représentées en bleues et la région matrice de l'ARN en rouge. Tiré de Kelleher et al., 2002

Des études indiquent que le complexe télomérase humain agirait sous forme de multimères. En effet, la masse moléculaire native de l'enzyme recombinante correspondrait à un dimère, où chaque complexe télomérase serait constitué de 2 molécules ARN

interdépendantes qui coopèrent entre elles (un hétérodimère télomérase contenant une matrice ARN WT et l'autre mutante est inactif par comparaison avec un homodimère WT) (Wenz et al., 2001; Tesmer et al., 1999), et au moins deux sous-unités hTERT (deux fragments hTERT inactifs séparément peuvent se compléter fonctionnellement entre eux pour reconstituer une activité télomérase) (Moriarty et al., 2002; Ambruster et al., 2001; Beattie et al., 2001; Arai et al., 2002; Wenz et al., 2001; Huard et al., 2003). Les modèles proposés qui pourraient expliquer les rôles biologiques et enzymatiques de la dimérisation de la télomérase sont revus dans Kelleher et al., 2002.

Reconstitution de l'activité télomérase humaine

La reconstitution de l'activité télomérase humaine a été rapportée dans différents systèmes. L'addition de hTR transcrit *in vitro*, à des extraits de cellules télomérase négative exprimant hTERT, reconstitue une activité télomérase humaine (Tesmer et al., 1999). L'expression de hTERT en présence de hTR recombinant dans un lysat de réticulocyte de lapin (RRL) reconstitue une RNP télomérase qui est catalytiquement active *in vitro* (Weinrich et al; 1997; Beattie et al., 1998; Bachand et Autexier, 1999). Une télomérase humaine fonctionnelle peut aussi être reconstituée *in vitro* en co-exprimant hTERT et hTR chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bachand et Autexier, 1999). Bachand et al. en 2000 ont démontré également que une RNP télomérase humaine fonctionnelle pouvait être reconstituée chez la levure *S. cerevisiae* par l'expression bicistronic de hTERT et hTR, où hTERT et hTR sont exprimés à partir de la même molécule ARN en *cis*.

Ces études suggèrent que hTR et hTERT sont les composantes minimales requises pour l'activité télomérase *in vitro* (Masutomi et al., 2000). Le mécanisme moléculaire par lequel hTERT et hTR sont assemblés en une RNP fonctionnelle *in vivo* et *in vitro* reste inconnu.

2. La télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, au moins 5 gènes sont requis pour la voie de réplication des télomères par la télomérase (Nugent et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996; Singer et Gottschling, 1994). *TLC1* et *EST2* encodent respectivement pour la sous-unité ARN et la transcriptase inverse de la

téломérase (Singer et Gottschling, 1994; Counter et al., 1997; Lingner et al., 1997). De plus, la téломérase de levure contient au moins deux protéines accessoires, Est1p, Est3p (Hugues et al., 2000; Lendvay et al., 1996; Lin et Zakian, 1995; Steiner et al., 1996). Est4p/Cdc13p, une protéine essentielle qui lie le simple brin télomérique TG₁₋₃, joue un rôle crucial dans l'accès de la téломérase à son substrat chromosomale en interagissant directement avec Est1p. Les déficiences dans une ou chacune d'entre elles mènent au même phénotype *est* (ever shortening telomeres), c.a.d un raccourcissement progressif des télomères menant éventuellement à la mort cellulaire (Nugent et Lundblad, 1998). *In vitro* l'activité téломérase est présente dans des extraits de levure où *est1*, *est3* et *cdc13-2^{est}* sont mutés malgré le fait que ces souches ont un sérieux défaut dans la réplication des télomères comme dans les souches *est2-Δ* ou *tlc1-Δ* (Lendvay et al., 1996; Lingner et al., 1997), seul *EST2* et *TLC1* sous forme d'un complexe stable sont essentielles; alors que *in vivo*, ces 5 gènes sont requis pour l'activité enzymatique (Singer et Gottschling, 1994; Lingner et al., 1997; Cohn et Blackburn, 1995).

L'ARN *Tlc1* est présent sous deux formes distinctes chez la levure : un transcrit polyadénylé d'une durée de vie courte [*poly(A)*⁺ *Tlc1*] et une forme plus abondante et plus stable [*poly(A)*⁻ *Tlc1*], laquelle est dérivée de la forme *poly(A)*⁺ (Chapon et al., 1997). L'élongation des télomères par la téломérase a lieu par transcription inverse d'une petite partie de la composante ARN de la téломérase où 5'-CACCACACCCACACAC-3' est la séquence utilisée comme matrice, complémentaire aux répétitions télomériques de levure (Singer et Gottschling, 1994). Toutes modifications au sein de cette séquence matrice vont modifier la nature des répétitions télomériques ajoutées aux extrémités endogènes des chromosomes ainsi que des perturbations de l'activité enzymatique

(discuté plus loin). La surexpression de *TLC1* cause une diminution de la longueur des télomères et supprime la répression transcriptionnelle aux télomères (Singer et Gottschling, 1994); la perte de *TLC1* cause une diminution progressive des télomères (3 pb par génération, sénescence à 70-90 Gén.) et une diminution graduelle du taux de croissance et de la viabilité (Singer et Gottschling, 1994).

Cdc13p et Est1p lient l'ADN télomérique simple brin mais avec une moindre affinité pour Est1p (Nugent et al., 1996; Virta-Pearlman et al., 1996; Lin et Zakian, 1996). Il a été proposé que Est1p et Cdc13p agiraient comme co-médiateur de l'accès de la télomérase aux télomères. Est1p est impliquée seulement dans la voie de la télomérase en liant Tlc1 et en assurant l'accès de la télomérase aux télomères (Evans et Lundblad, 1999; Virta-Pearlman et al., 1996; Zhou et al., 2000), alors que Cdc13p a une fonction essentielle aux télomères en protégeant les extrémités chromosomales (Garvik et al., 1995), et en jouant un rôle dans la réplication des télomères (Nugent et al., 1996) (discuté plus haut). Est3p est une composante de la télomérase chez *S. cerevisiae* mais sa fonction au sein du complexe est toujours inconnue (Hugues et al., 2000).

L'action de la télomérase aux télomères est limitée en fonction du cycle cellulaire, indiquant qu'une modification dans la structure des télomères serait requise pour l'action de la télomérase (Marcand et al., 1999; Diede et Gottschling, 1999; Taggart et al., 2002; Smith et al., 2003). Les composantes de l'holoenzyme télomérase Est2p, Tlc1, Est1p et Est3p formeraient un complexe qui agirait tardivement durant la réplication des chromosomes (fin de phase S) à travers le recrutement par Cdc13p (Evans et Lundblad, 1999; Qi et Zakian, 2000; Pennock et al., 2001; Taggart et Zakian, 2002). Est1p, Est2p, et Cdc13p sont associés aux télomères en fin de phase S. Néanmoins, Est2p, mais pas Est1p

lie aussi les télomères avant la fin de la phase S. Dans l'allèle Cdc13-2, où un défaut dans le recrutement de la télomérase est observé mais où l'activité télomérase est normale *in vitro*, Est1p et Est2p sont encore associés aux télomères. Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel Est1p est un activateur de la télomérase régulé en fonction du cycle cellulaire qui se lie à un complexe inactif Est2p-TLC1 lié aux télomères en fin de phase S et par la suite interagit avec Cdc13p lié à l'extension riche en G. Cette interaction change l'état de Est2p, dont la liaison aux télomères est maximale en fin de phase S, et résulte en l'activation de la télomérase pour la synthèse *de novo* d'ADN télomérique (Taggart et Zakian, 2002).

Les télomères de souches *cdc13-Δ* exprimant la protéine de fusion Cdc13-Est1p sont plus long que des cellules WT ce qui démontre que l'augmentation de l'association entre Cdc13p et la télomérase contribue à l'augmentation de la longueur des télomères (Evans et Lundblad, 1999). Également la fusion Cdc13_{DBD}-Est1p augmente la longueur des télomères en déjouant la sénescence de souche Cdc13-2 et en délivrant la télomérase aux télomères. La nécessité de Est1p dans la maintenance des télomères peut être surpassée en fusionnant Cdc13p à Est2p (Evans et Lundblad, 1999). Cela supporte l'hypothèse que la fonction essentielle de *S. cerevisiae* Est1p est de promouvoir l'accès de la télomérase aux télomères.

RPA (replication protein A) est une protéine de liaison à l'ADN simple brin impliquée dans les processus de réplication, recombinaison, transcription, point de contrôle du cycle cellulaire, maintenance des télomères et la réparation de l'ADN (Longhese et al., 1994; Wold, 1997; Smith et al., 2000). Schramke et al. ont démontré en 2004 que RPA régule l'action de la télomérase durant le cycle cellulaire en facilitant

spécifiquement la liaison de Est1p aux télomères en fin de phase S. Le rôle de RPA dans le chargement de Est1p aux télomères serait conservé en fonction de l'évolution : RPA et Est1p sont tous deux présents aussi bien chez l'humain que les cellules de levures (tableau 2) (Wold, 1997; Reichenbach et al., 2003; Snow et al., 2003).

Comme chez l'humain, des évidences supporteraient l'idée que la télomérase de levure contiendrait plus que un site actif par complexe RNP télomérase. Au moins deux molécules ARN interagissant de façon fonctionnelle seraient présentes et toutes deux agiraient comme matrice pour la polymérisation de l'ADN, mais l'implication directe de Est2p dans de telles interactions n'a pas été évoquée (Prescott et Blackburn, 1997). En accord avec cette étude, les travaux de Dandjinou et al. (en préparation) laisseraient supposer que d'après la structure secondaire de TLC1 que deux molécules ARN pourraient possiblement interagir entre elles.

Maintien des télomères en absence de télomérase

Des mécanismes indépendants de la télomérase pour la maintenance des télomères existent chez les organismes qui normalement privilégient la voie de la télomérase. Des télomères qui ont été allongés à travers des mécanismes impliquant la recombinaison homologue dépendante du gène *RAD52* émergent chez les cellules de *S. cerevisiae* et *K. lactis* dépourvues d'une ou plusieurs composantes de la télomérase et qui survivent au delà de la phase de sénescence cellulaire (Lundblad et Blackburn 1993; McEachern et Blackburn, 1996; Teng et Zakian, 1999) : ces cellules sont nommées « survivants ».

Deux types de survivants, dont la structure des télomères diffère de celle de cellules WT, ont été décrits basé sur le profil des fragments produits après digestion avec l'enzyme de restriction *XhoI* (Lundblad et Blackburn, 1993; Teng et Zakian, 1999). Les survivants de type I ont une duplication en tandem de l'élément sous télomérique Y' et de courtes répétitions terminales C₁₋₃A/TG₁₋₃, alors que les survivants de type II sont caractérisés par une amplification faible des éléments Y' et de très longues tractes terminales d'ADN C₁₋₃A/TG₁₋₃. Ces deux types de survivants sont observés dans des souches *tlc1*, *est2*, *est3*, et *est4*, et requiers tous deux la présence continue de Rad52p (Teng et Zakian, 1999). En contraste avec les survivants de type I, qui souvent peuvent revenir en un profil de type II d'ADN télomérique, le profil de type II des télomères est persistant à travers les générations. La maintenance de l'ADN télomérique chez les survivants de type II par recombinaison télomère-télomère dépendante de *RAD52* est un mécanisme aussi efficace que la télomérase, néanmoins après réintroduction d'une télomérase fonctionnelle, les télomères de types II retournent progressivement à leurs longueurs WT d'origine, suggérant que l'expression de la télomérase supprimerait la recombinaison entre télomères (Teng et Zakian, 1999).

La structure des télomères chez les survivants de type II de *S. cerevisiae*, très longs et hétérogènes, est similaire à celle décrite chez les cellules humaines qui maintiennent leurs télomères par une voie indépendante de la télomérase nommée ALT (alternative lengthening of telomeres) (Bryan et al., 1995; Bryan et al., 1997). Contrairement à la levure, chez les cellules humaines l'activité ALT et la télomérase peuvent coexister. En effet, l'expression d'une télomérase exogène dans les cellules de type ALT est compatible avec l'activité continue ALT, bien que l'activité télomérase

allonge les télomères les plus courts (Cerone et al., 2001; Ford et al., 2001; Grobelny et al., 2001; Perrem et al., 2001).

Mutations dans la région matrice de TLC1

Des mutants de la matrice ARN de la télomérase ont été exprimés et caractérisés chez les levures bourgeonnantes, les cellules de mammifères, et chez *Tetrahymena* (Blackburn et al., 2000). De telles séquences mutées causent une nette augmentation ou diminution de la longueur des télomères (Yu et al., 1990; Singer et Gottschling, 1994; McEachern et Blackburn, 1995; Prescott et Blackburn 1997b, 2000) et, dans certains cas, des fusions télomériques menant à des ségrégations aberrantes des chromosomes (Yu et al., 1990; Kirk et al., 1997; Smith et Blackburn, 1999; McEachern et al., 2000a). Certaines séquences matrices altérées chez *Tetrahymena* et *S. cerevisiae* causent aussi de mauvaises incorporations de bases et également d'autres défauts dans les activités enzymatiques de la télomérase *in vitro* et *in vivo* (Yu et Blackburn, 1991; Gilley et al., 1995; Gilley et Blackburn, 1996; Prescott et Blackburn, 1997).

Des souches de levure *S. cerevisiae* avec une mutation de 2 bases au sein de la séquence matrice 3'-CACACACCCggACCAC-5' utilisent cette séquence pour l'incorporation de répétitions modifiées aux télomères nouvellement formés; les télomères de ces souches sont un peu plus courts et plus hétérogènes en longueur par rapport aux souches isogéniques non modifiées (Singer et Gottschling, 1994).

Une modification de 3 bases dans la région matrice de *TLC1* chez *S. cerevisiae*, 3'-CACACgugCACACCAC-5' *tlc1-476gug*, abolit complètement l'activité enzymatique

in vitro et *in vivo*, les télomères de telles souches diminuent au cours des divisions et ceci mène à la sénescence cellulaire (Prescott et Blackburn, 1997). Des mutations ponctuelles simples ou doubles, toujours au sein des mêmes trois bases mutées 476gug, préservent l'activité télomérase *in vitro* suggérant que l'abolition d'activité au sein du triplet mutant gug résulte de l'effet combiné de toutes les 3 substitutions (Prescott et Blackburn, 2000).

Ces deux études montrent que la séquence matrice au sein de l'ARN *TLC1* ne fournit pas seulement les bases utilisées par la télomérase pour diriger la synthèse *de novo* d'ADN télomérique mais contribue aussi aux propriétés enzymatiques.

Plus récemment, toutes les combinaisons de mutants possibles, toujours au sein de cette même région 474 à 476 de la séquence matrice, ont été réalisées (Lin et al., 2004). Le phénotype télomérique varie en fonction du type de mutations, de très court à très long, et les souches modifiées incorporent les mutations de la matrice aux télomères ainsi que des bases non attendues. Malgré que les taux de croissances et profils télomériques varient extrêmement en fonction des mutations dans *tlc1*, la séparation et la ségrégation des chromosomes sont toujours aberrantes. Les souches avec une matrice ARN modifiée montrent des défauts dans la séparation des chromatides sœurs aux télomères, suggérant l'activation d'un point de contrôle du cycle cellulaire. Celui-ci est unique et distinct de ceux activés par la délétion de la télomérase ou les dommages à l'ADN (Lin et al., 2004).

Finalement, une étude assez originale rapporte la présence de télomères humains chez la levure. En effet, la substitution complète des 16 bases de la séquence matrice de *TLC1* par une séquence matrice humaine (figure 8) permet l'addition de répétitions télomériques humaines aux extrémités endogènes des chromosomes de levure, et ce sans

affecter la viabilité cellulaire ni le taux de croissance de ces cellules avec une télomérase modifiée : on dit que les télomères de ces levures sont humanisées (Henning et al., 1998).

En plus de ces propriétés de séquence matrice et enzymatique, la matrice ARN de la télomérase affecte aussi la régulation de la longueur des télomères.

Régulation de la longueur des télomères chez *S. cerevisiae*

La longueur des télomères de cellules exprimant la télomérase est maintenue constante à l'intérieur d'une fenêtre étroite (revue dans McEachern et al., 2000), résultat d'un équilibre précis entre les activités d'élongations et de raccourcissements des télomères, où différents protagonistes dans plusieurs mécanismes non mutuels interviennent.

La séquence matrice de l'ARN de la télomérase dirige normalement la synthèse des répétitions télomériques, lesquelles contiennent des sites spécifiques de liaison à l'ADN pour des protéines impliquées dans la régulation de la longueur des télomères et leurs protections. Ces protéines correspondent à Rap1p chez les levures bourgeonnantes *S. cerevisiae* et *K. lactis* (Krauskopf et Blackburn, 1998), Taz1p chez *S. pombe* (Cooper et al., 1997), et TRF1 chez les cellules de mammifères (Smogorzewska et al., 2000), qui se lient au duplex ADN télomérique de façon séquence spécifique. Dès lors, tout changement au sein de la séquence matrice peut avoir une influence directe sur la liaison de ces protéines et de ce fait peut influencer la longueur des télomères et leur intégrité.

Chez la levure, la liaison spécifique de Rap1p à la séquence télomérique consensus R^C/_AAYCCRYNCAYY toutes les 18 bp permet l'assemblage d'un complexe

macromoléculaire protéine-ADN qui contrôle l'accessibilité des nucléases, de la télomérase, et des protéines impliquées dans la recombinaison et la réparation de l'ADN. Cette structure protège les télomères de la dégradation et de l'élongation non contrôlée et maintient une distribution précise de la longueur des télomères qui est spécifique à une espèce et spécifique à une souche (Hardy et al., 1992; Kyrion et al., 1992; Marcand et al., 1997; Wotton et Shore, 1997; Krauskopf et Blackburn, 1998; Smith et Blackburn, 1999).

Le nombre de molécules Rap1p assemblé à un télomère soit 10 à 20 molécules, et plus spécifiquement les parties C-terminales de Rap1p, est compté et maintenu activement à une valeur moyenne constante : c'est le mécanisme prévalent de mesure de la longueur des télomères par comptage des molécules Rap1p (Marcand et al., 1997). Le modèle proposé est un système rétroactif dans lequel un télomère lié par un nombre juste voire en léger excès de molécules Rap1p est dans un état qui prévient l'élongation des télomères, possiblement par l'assemblage d'une structure qui inhibe la liaison de la télomérase ou son activité; quand la dégradation ou la réplication incomplète de ce télomère cause la perte d'un voire plusieurs sites de liaison Rap1p, la chromatine télomérique change pour un nouvel état qui permet son élongation; l'élongation des télomères restore le ou les sites de liaison Rap1p manquant, et le télomère retourne à son état de répression initial. De cette façon, l'homéostasie entre l'addition et la perte de séquence télomériques peut être établie (Marcand et al., 1997). Ce modèle est en accord avec l'élongation extensive des télomères (et une distribution hautement hétérogène des tailles des télomères) observée chez les cellules où Rap1p est dépourvu de son domaine C-terminale (*rap1^t* allèles) (Kyrion et al., 1992).

Les molécules Rap1p interagissant avec les protéines Sir, impliquées dans l'établissement du silençage, ne sont pas prises en compte par le mécanisme de mesure de la longueur des télomères (Marcand et al., 1997). Les complexes Sir-Rap1 sont restreints du côté centromérique du télomère là où les nucléosomes sont rencontrés en premier, laissant les molécules Rap1p plus distales libres d'interagir avec Rif1p et Rif2p pour réguler la longueur des télomères (voir discussion). La délétion de Rif1p ou Rif2p résulte en l'augmentation de la longueur des télomères alors que la délétion des deux résulte en une augmentation dramatique de la longueur des télomères et ce dans un contexte où les cellules expriment la télomérase (Sussel et Shore, 1991; Kyrion et al., 1992).

Dans un second mécanisme, la protéine Cdc13p liant le simple brin télomérique, recrute de multiples complexes, lesquels agissent pour maintenir une balance entre l'élongation et la perte des répétitions télomériques au niveau de l'extension 3' terminale (Chandra et al., 2001; Grandin et al., 2000, Grandin et al., 2001; Lustig, 2001; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000).

En plus de ces deux mécanismes, une autre voie impliquée dans la régulation négative de la longueur des télomères a été révélée dans le contexte où les télomères sont anormalement longs. Ce processus, nommé TRD (telomere rapid deletion) est capable de façon efficace de ramener les télomères trop allongés à une taille proche de la normale dans un événement de délétion intrachromatide en une seule étape impliquant l'extension 3' simple brin distale et la portion double brin proximale des télomères (Lustig, 2003). Ce processus est conservé à travers l'évolution.

Un certain nombre de gènes sont requis pour le TRD : *RAD52*, essentiel pour la plupart des recombinaisons mitotiques et toutes les recombinaisons méiotiques, *SIR3* pour le maintien de la précision du TRD en assurant le rassemblement des télomères en groupes, le complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) qui permet l'invasion de l'extension 3' simple brin, l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui fait partie du capuchon télomérique protège les télomères contre des processus potentiellement nuisibles comme des recombinaisons fortuites et dégradations terminales. La fréquence des évènements TRD à un télomère individuel dépend des longueurs des autres télomères dans la cellule (Li et Lustig, 1996). Les cellules qui contiennent un nombre élevé de télomères de longueur WT ont une augmentation correspondante de délétions complètes. Finalement, le TRD est un mécanisme qui agit de concert avec d'autres éléments impliqués dans le système de mesure de la longueur des télomères pour atteindre et maintenir l'homéostasie. En particulier, le mécanisme de comptage via Rap1p, et l'homéostasie via Cdc13p maintiennent la longueur des produits TRD. La partie C-terminale de Rap1p est essentielle pour le mécanisme de comptage via Rap1p, mais dispensable pour le TRD, suggérant que ces deux processus sont distincts d'un point de vue mécanistique (Lustig, 2003).

Objectif de cette étude et utilité d'un tel modèle

L'activation de la télomérase conduit à l'immortalisation des cellules de mammifères en culture et est aussi une propriété générale des cellules tumorales humaines (Counter et al., 1992; de Lange, 1994). Dès lors, la télomérase est donc

considérée comme une cible privilégiée pour le développement de drogues pour la thérapie du cancer. Pour cette raison il est essentiel d'élucider comment cette enzyme est régulée.

Pour apporter notre contribution sur ce sujet, nous nous sommes proposés d'étudier la régulation de la télomérase humaine dans un système génétique attractif : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la modification de la télomérase de levure permet d'obtenir des télomères humains dans ce même organisme (on dit que les levures sont humanisées) (Henning et al., 1998) et, l'activité télomérase humaine peut être reconstituée chez la levure (Bachand et Autexier, 1999).

Basé sur ces deux principales investigations, nous verrons dans le cadre de ce mémoire nos avancements dans l'expression d'une télomérase humaine fonctionnelle qui maintiendrait les télomères chez la levure humanisée en l'absence de la télomérase de levure, question qui n'a été abordée par aucun groupe à date.

L'expression fonctionnelle d'une télomérase humaine agissant aux extrémités des chromosomes chez la levure *S. cerevisiae* fournirait des outils biochimiques et génétiques avantageux pour étudier la fonction de la télomérase humaine dans un système hétérologue.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de levures utilisées et constructions plasmidiques

Pour la description des souches de levures utilisées pour la survie à long terme (RWY12 *tlc1::LEU2*) ou l'étude de complémentation (BY4705 *est2::HIS3*, *tlc1::KanMX4*) se référer à l'annexe 1. Le tableau 4 ci-dessous résume toutes les constructions plasmidiques utilisées dans chacune de ces études.

PLASMIDE	GENE EXPRIMÉ	PROMOTEUR	MARQUEUR DE SÉLECTION	TYPE	RÉFÉRENCE
pTLC1TRP	TLC1	TLC1	Tryptophane	CEN	Bah et al., 2004
pTLC1hTRP	TLC1	TLC1	Tryptophane	CEN	Bah et al., 2004
pEST2-LYS2	EST2	EST2	Lysine	CEN	Bah et al., 2004
p413-hTR	hTR	GAL1	Adénine	CEN	Bachand & Autexier 1999
p413-hTR-ADE2	hTR	GAL1	Adénine	CEN	Bah et al., 2004
pRS422-hTR	hTR	GAL1	Adénine	2 μ	Bah et al., 2004
pEGKT-hTERT	hTERT	GAL1	Uracil	2 μ	Bachand & Autexier 1999
pEGKT/hTERT-hTR cis	hTERT-hTR	GAL1	Uracil	2 μ	Bachand et al. 2000
p426/CDC13 _{DBD} -hTERT	CDC13 _{DBD} -hTERT	GAL1	Uracil	2 μ	Bah et al., 2004
p425-HA2-hEST1A	hEST1A	GAL1	Leucine	2 μ	Bah et al., 2004
p424-HA2-hEST1B	hEST1B	GAL1	Tryptophane	2 μ	Bah et al., 2004

Tableau 4 : plasmides utilisés dans cette étude

Cultures des cellules de levures et perte de plasmides

Les cellules ont été cultivées sur milieux synthétiques (YC) solides ou liquides dépourvus de certains aminoacides de façon à maintenir la sélection de un, voire plusieurs plasmides, ou d'un gène marqueur au niveau du génome. Par exemple la souche

RWY12 a été cultivée sur milieu synthétique YC-LEU-TRP Glc (additionné de 2% glucose) pour maintenir la sélection *tlc1::LEU2* et le plasmide pTLC1(h)TRP.

Dans l'étude de complémentation, la perte de plasmide(s) a été conditionnée en cultivant les cellules en milieu synthétique liquide en présence de la ou les aminoacides requis pour la perte. Par exemple pour la souche BY4705 *est2::HIS3*, *tlc1::KanMX4* comprenant les plasmides pTLC1TRP, pEST2-LYS2, p413-hTR-ADE2 et pEGKT-hTERT, initialement cultivée sur milieu YC-HIS-TRP-LYS-ADE-URA Glc ou Gal, la perte des plasmides portant les gènes de la télomérase de levure a été induite en cultivant ces cellules sur milieu liquide YC-HIS-ADE-URA Gal (donc en présence de TRP et LYS); la présence de galactose induisant l'expression de hTR et hTERT. Après vérification de la perte de pTLC1TRP et pEST2-LYS2 sur milieux YC-HIS-ADE-URA-TRP Glc et YC-HIS-ADE-URA-LYS Glc respectivement, la survie a été observée par restriages successifs de ces cellules sur milieu solide YC-HIS-ADE-URA Gal.

Extraction de l'ADN génomique de levure et détection de l'ADN télomérique

Se référer à l'annexe 1.

Clonage des télomères et analyse par séquençage

Se référer à l'annexe 1. Une description détaillée de la méthode est en préparation (LeBel et al., 2004)

Localisation de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine hTERT par immunofluorescence indirecte

Se référer à l'annexe 1.

**Expression des protéines humaines et détection de l'activité télomérase humaine
chez la levure *S. cerevisiae***

Se référer à l'annexe 1.

Oligonucléotides

NOM	SÉQUENCE 5' vers 3'
(C ₃ TA ₂) ₃	CCCTAACCCCTAACCCCTAA
(C ₃ TA ₂) ₄	CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA
(C ₃ TA ₂) ₅	CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA
(T ₂ AG ₃) ₃	TTAGGGTTAGGGTTAGGG
C ₁₋₃ A	CCCACCACACACACCCACACCC
DIIV-I	GTGAGCGGATAACAATTCACACAGTCTAGATGTCCGAATTGATCCCAGAGTAG
dG ₁₈ - <i>Bam</i> HI	CGGGATCCG ₁₈
Y'GT40	GGTCAGAAAGCCGGGTAAGGTATGACAGCGAGAGTAGAGG

Tableau 5 : oligonucléotides

RÉSULTATS

Des travaux antérieurs ont montré que la substitution de la région matrice du gène TLC1 de levure 5' –CACCACACCCACACAC– 3' (TLC1wt) (16 nt) par la séquence matrice 5' –CCUAACCCUAACCCUAACC– 3' (TLC1h) (19 nt) (figure 8) résultait en l'incorporation de répétitions humaines C₃TA₂/T₂AG₃ à la place des répétitions levure C₁-₃A/TG₁₋₃ à l'extrémité des chromosomes de levure (Henning et al, 1998, Alexander et al. 2003, Brevet et al. 2003). Constituées de séquences télomériques mixtes, ces levures

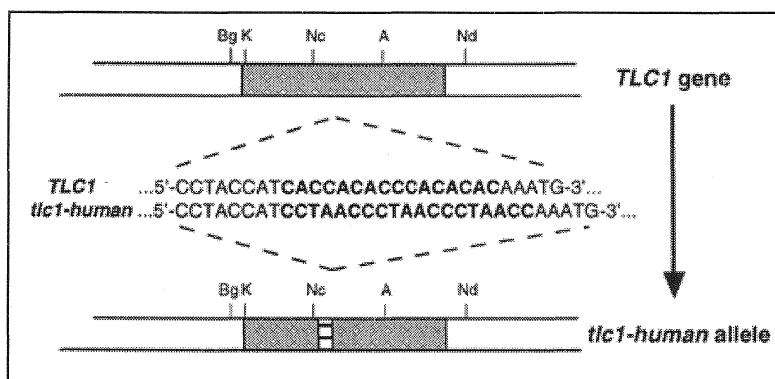


Figure 8 : Humanisation de la matrice ARN de la télomérase de levure

La région matrice du gène *TLC1* de levure présente sur le plasmide pTLC1 (5' –...CACCACACCCACACAC...– 3') a été modifiée par amplification avec des amorces PCR qui contiennent une séquence complémentaire aux répétitions télomériques humaines (5' –...CCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCAATG– 3'). Ce produit PCR a été digéré et utilisé pour remplacer le fragment de pTLC1 pour finalement donner le plasmide pTLC1h. Ce dernier plasmide fut utilisé pour créer pTLC1hTRP (voir Matériel et Méthodes de l'annexe 1). La région hachurée en horizontal correspond à la séquence matrice humaine nouvellement insérée. Tiré de Henning et al., 1998.

nommées humanisées possèdent des télomères courts mais stables et préservent un taux de croissance comparable à celui de cellules n'ayant pas subi de modification de la séquence matrice.

Nous avons approfondis ces travaux

en effectuant dans un premier temps une caractérisation plus détaillée des levures avec

une matrice ARN humanisée (TLC1h) et dans un second temps, étant donné que les sous unités de la télomérase humaine peuvent être exprimées et assemblées sous forme de RNP pour reconstituer une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure, nous vérifieront si les composantes limitantes pour l'activité télomérase humaine (hTERT et hTR) sont capables de remplacer EST2 et TLC1h chez les cellules de levures humanisées et de maintenir leurs télomères.

Analyse de la structure terminale des télomères de levures avec une matrice ARN de TLC1 humanisées (TLC1h) et mécanisme de survie

- a) Construction d'une souche avec des répétitions télomériques humaines à l'extrémité des chromosomes de levures

L'organisation structurale des télomères de levures humanisées et la longévité de telles cellules ont été étudiées chez la souche RWY12 (*Mata*, *ura3-52*, *lys 2-801*, *ade2-101*, *trp1-Δ1*, *his3-Δ200*, *leu2-Δ1*, *tlc1::LEU2*, VR-ADE2-T, pAZ1 (*TLC1*, *URA3*)).

Cette souche, dont le gène *TLC1* a été invalidé au niveau du génome par le marqueur nutritionnel LEU2, comporte une copie du gène *TLC1* sur le plasmide pAZ1 (marqueur URA3) pour assurer le maintien des télomères et donc prévenir la sénescence cellulaire qui serait observée après 80 Gén. due à son absence (Singer et Gottschling, 1994). Cette souche a été transformée parallèlement avec pTLC1hTRP (séquence matrice humaine) et pTLC1TRP (séquence matrice levure) (tableau 4). Cette dernière constituera la souche isogénique contrôle où la seule différence réside au niveau de la séquence matrice ARN de *TLC1*. Les cellules contenant ces plasmides ont été striées sur milieu 5-

FOA de façon à perdre le plasmide pAZ1. En effet, le 5-FOA peut se convertir en un intermédiaire toxique pour les cellules qui expriment le gène *URA3*. Celles-ci vont donc se débarrasser du plasmide pAZ1 pour empêcher cette action. Dès lors, une composante ARN unique (pTLC1hTRP ou pTLC1TRP) est présente et utilisable par la cellule. Ces cellules sont dépourvues de croissance lorsque cultivées sur milieu sans uracile, ce qui représente la perte de pAZ1 (données non montrées).

Un clone ayant une séquence matrice non modifiée (WT), contenant pTLC1TRP comme seule composante ARN de la télomérase, et trois clones humanisés (Ha, Hb et Hc) contenant pTLC1hTRP comme seule composante ARN de la télomérase, ont été striés sur milieu sélectif YC-LEU-TRP jusqu'à 150 Gén. (~20 Gén. par strie soit 10^6 cellules par colonie) pour vérifier leur survie. Aucun phénotype de sénescence n'est observé, les cellules humanisées sont viables et n'ont pas de défaut de croissance par rapport aux cellules WT (figure 9, 150 Gén.). L'ADN génomique de ces différents clones a été isolé à différents temps de croissance, digéré avec l'enzyme de restriction *XhoI* et

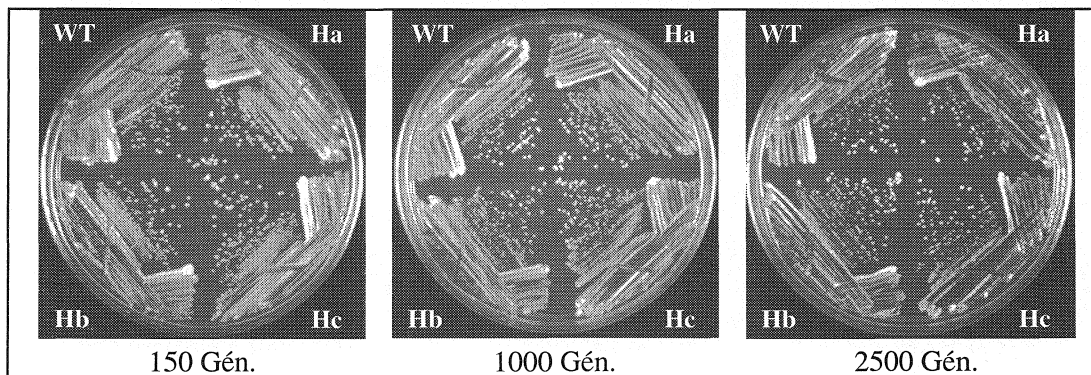
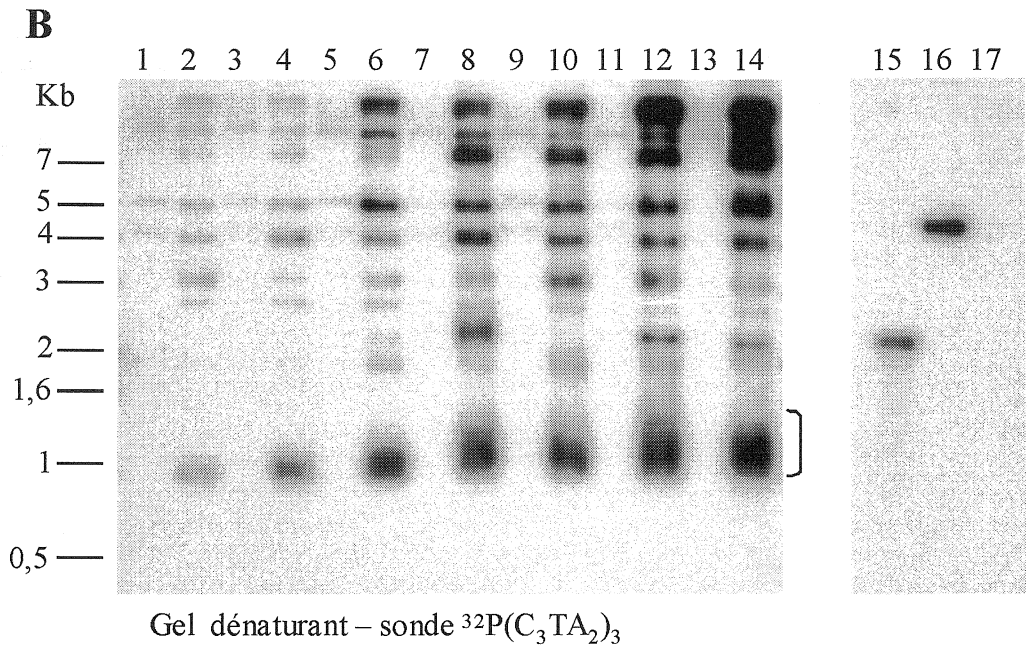
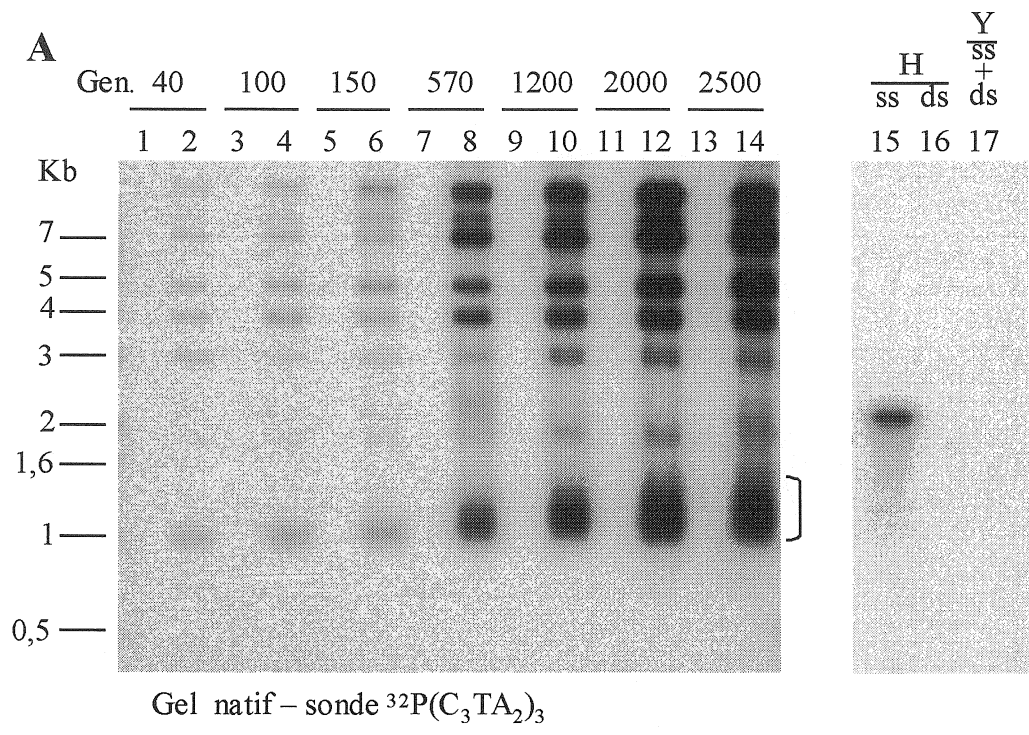


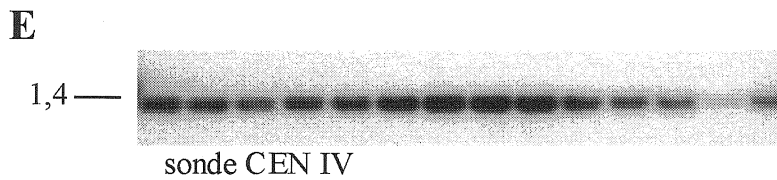
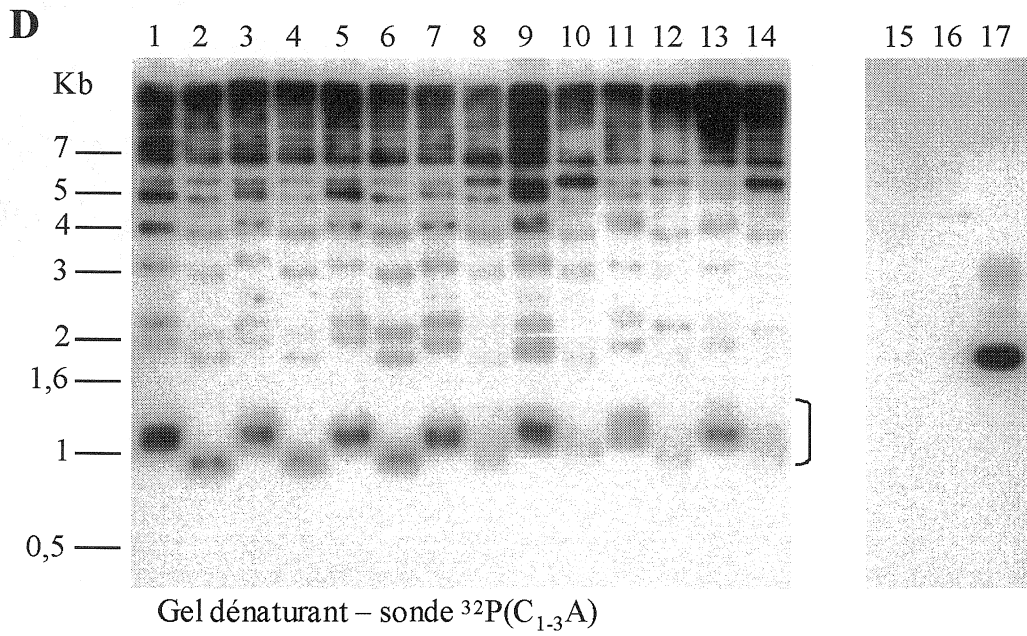
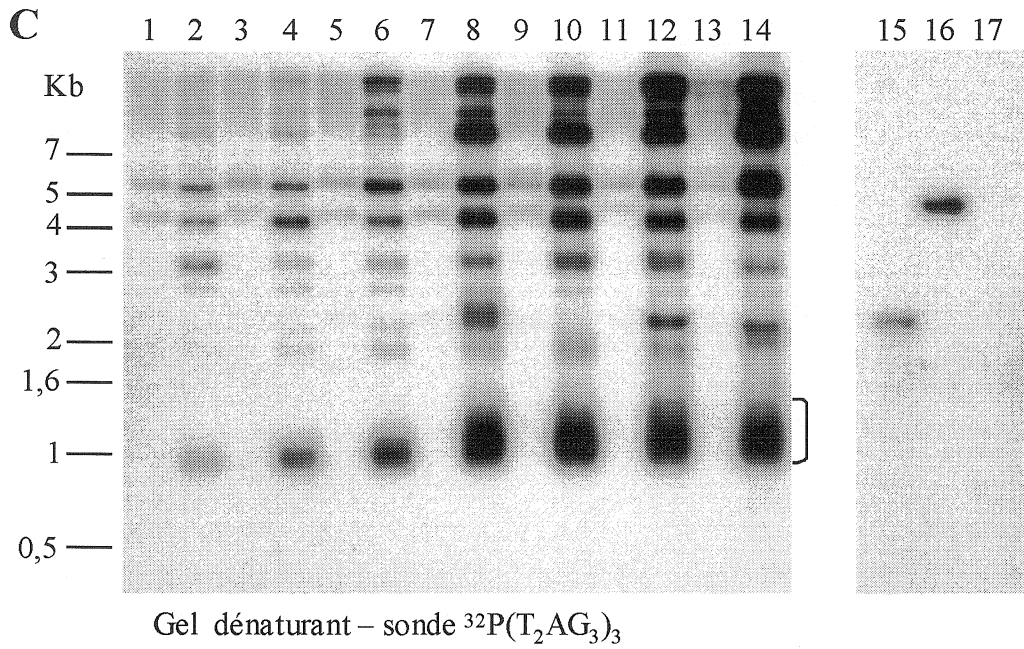
Figure 9 : Analyse à long terme de la croissance de levure avec une matrice ARN modifiée (TLC1h)

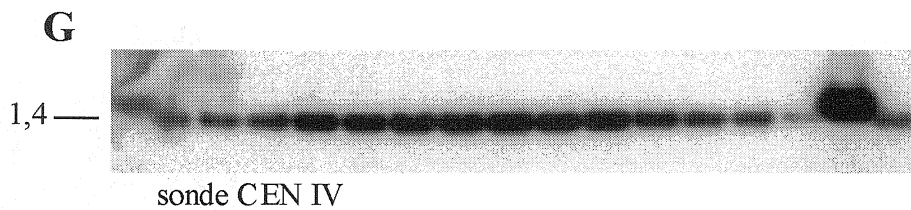
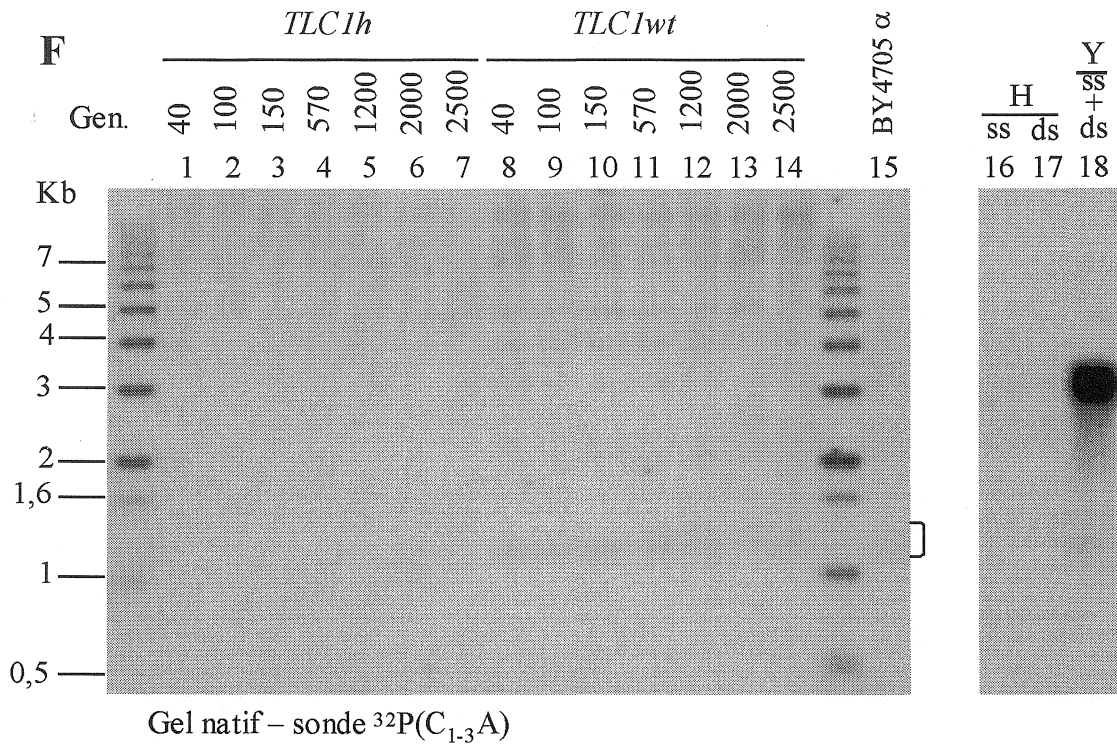
La souche RWY12 (*tlc1::LEU2*) transformée soit avec la construction pTLC1TRP ou pTLC1hTRP a été cultivée et restrie sur milieu sélectif YC-LEU-TRP Glc. Une souche contrôle, comprenant la matrice ARN de *TLC1* non modifiée (TLC1wt), et trois souches humanisées (Ha, Hb et Hc – TLC1h) avec la matrice ARN de *TLC1* humaine, ont été analysées. Représenté ici les générations 150, 1000 et 2500. L'ADN génomique de ces souches a été extrait à différents intervalles pour analyse de l'ADN télomérique par différentes techniques.

analysé sur gel. Cette digestion génère un patron de bandes télomériques caractéristique lorsque hybridé avec une sonde télomérique riche en C, en coupant une fois dans la région sous télomérique Y', élément conservé et présent sur la majorité des télomères; libérant ainsi un fragment terminal de restriction (TRF) de ~1,2 kb chez les cellules de type sauvage, où ~300 pb correspondent aux répétitions télomériques terminales proprement dites (voir figure 1). De nombreux autres TRFs de plus grande taille sont aussi détectés et correspondent aux télomères dépourvus d'éléments Y'. L'hybridation avec la sonde télomérique humaine $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ montre la présence d'ADN télomérique humain simple brin et double brin, et ce seulement pour les clones exprimant pTLC1hTRP (figure 10A, 10B, et 10C pistes 2, 4 et 6). Néanmoins, les TRFs chez les cellules humanisées sont plus courts (~ 1,0 kb) par rapport aux cellules non modifiées (~ 1,2 kb) (figure 10D), ce qui peut se traduire par une diminution télomérique net de 100-200 pb en l'espace de 150 Gén. L'intensité du signal spécifique pour les répétitions télomériques humaines semble augmenter avec le nombre de génération, ce qui suggère une augmentation de la quantité d'ADN télomérique humain (discuté plus loin).

L'analyse du TPE (Telomeric Position Effect) dans nos souches humanisées est un autre moyen d'apprécier la structure terminale des télomères. Le TPE se définit par la capacité qu'a un télomère (hétérochromatine télomérique) d'une souche sauvage à réprimer fortement un gène avoisinant. La souche RWY12 possédant le gène *ADE2* adjacent au télomère du bras droit du chromosome V (VR-*ADE2*-T), le niveau de transcription de ce gène a été suivi. Les souches exprimant soit pTLC1hTRP (100 Gén.)







ou soit pTLC1TRP (40 Gén.) ont été étalées sur un milieu sélectif (YC-LEU-TRP, low ADE) contenant une concentration faible en adénine (10 mg/L). L'expression du gène *ADE2* se traduira par une coloration blanche des colonies alors que la répression de celui-ci se manifestera par des colonies rouges. Donc le pourcentage de colonies rouges par rapport aux colonies blanches a été estimé et les résultats indiquent une légère diminution du TPE : ~66% pour la souche humanisée contre ~94% pour la souche isogénique sauvage, autrement dit, il y a une légère augmentation de la transcription du gène *ADE2* chez les levures humanisées (Clair et Wellinger, données non publiées).

Figure 10: Analyse de la nature et de l'évolution structurale des télomères de levures avec une matrice ARN de *TLC1* humanisée

L'ADN génomique de souches exprimant soit la composante ARN non modifiée (*TLC1wt*) ou soit une composante ARN humanisée (*TLC1h*) a été isolé après avoir cultivé ces cellules au nombre de générations indiqué (clone WT ou Ha de 40 à ~2500 Gén.). L'ADN a été ensuite digéré avec l'enzyme de restriction *XhoI*, séparé sur 0.75% TBE-Agarose gel et analysé dans un premier temps dans des conditions non dénaturantes (hybridation directe dans le gel ou In Gel, Dionne et Wellinger, 1996). Pistes 1, 3, 5, 7, 9, 11 et 13 : souche exprimant le plasmide pTLC1TRP. Pistes 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14 : souche exprimant le plasmide pTLC1hTRP. (A) Le gel non dénaturant a été d'abord hybridé avec une sonde télomérique humaine radiomarquée $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$. (B) Le même ADN montré en A) a été ensuite dénaturé, transféré sur membrane Hybond-N+ et hybridé de nouveau avec la sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$. (C) Après déshybridation de la sonde en B), l'ADN a été hybridé avec la sonde complémentaire de $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$: $^{32}\text{P}(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$. (D) La sonde en C) a été détachée par lavages et l'ADN fut hybridé avec une sonde télomérique de levure $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$. (E) Finalement, après lavage de la sonde en D), l'ADN a été réhybridé avec une sonde centromérique spécifique à la région CEN4 pour évaluer la quantité d'ADN chargée dans chaque piste. Le même profil de bandes télomériques a été observé chez les clones RWY12 Hb et Hc lors de l'hybridation avec la même série de sondes (données non montrées). (F) Analyse de l'ADN (identique aux figures A à E) dans des conditions non dénaturantes en hybridant avec une sonde télomérique de levure $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$. Pistes 1-7 : souche humanisée exprimant pTLC1hTRP. Pistes 8-14 : souche sauvage exprimant pTLC1TRP. Piste 15 : ADN génomique dérivé d'une souche sauvage haploïde. (G) L'ADN mentionné en F) a été dénaturé, transféré sur membrane Hybond N+ et hybridé avec la sonde centromérique CEN IV pour vérifier la quantité d'ADN chargée par piste. Les pistes 15-17 des gels A à E et les pistes 16-18 des gels F et G correspondent aux pistes contrôles d'hybridation : 6 ng de pTLC1hTRP linéarisé avec *NsiI* et dénaturé (H, ss) ou non dénaturé (H, db); le plasmide pMW55 linéarisé avec *BamHI* comprenant 55 pb de répétitions télomérique levure (Sikorski et Hieter, 1989), et l'ADN simple-brin de phagemide dérivé de pGT55 comprenant une séquence GT-riche de 55 nt correspondent respectivement aux contrôles d'hybridation pour l'ADN télomérique de levure simple-brin et double-brin (Y, sb+db). L'échelle de poids moléculaire de 1 kb est représentée à gauche des gels (Kb). L'accolade représente les fragments terminaux de restriction (TRFs).

En résumé, ces résultats nous dévoilent que les cellules avec une matrice ARN humanisée sont capables d'ajouter des répétitions télomériques humaines à l'extrémité endogènes des chromosomes de levure sans affecter la viabilité de ces cellules, leurs télomères sont courts mais stables et semblent acquérir de plus en plus de répétitions humaines à travers le nombre de générations. Finalement, la présence de ces répétitions télomériques humaines diminue le TPE.

b) Maintenance des télomères chez les cellules humanisées.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les cellules peuvent maintenir leurs télomères par deux mécanismes indépendants : un mode prévalent dépendant de la synthèse *de novo* d'ADN télomérique par la télomérase, et un mode plus rare basé sur la recombinaison des télomères. Chez les mammifères, les cellules sont capables d'utiliser de façon concomitante ces deux mécanismes de maintien des télomères sans affecter leur croissance ni leur viabilité (Cerone et al. 2001; Perrem et al., 2001) tandis que chez la levure seulement un mode à la fois peut être utilisé du fait que l'expression de la télomérase inhibe la voie de maintenance des télomères par recombinaison (Teng et Zakian 1999, Lundblad et Blackburn 1993). Pour déterminer quel est le mode emprunté par les levures humanisées pour le maintien de leurs télomères, la perte du plasmide exprimant l'ARN de la télomérase de levure, pTLC1hTRP, a été tentée. Ces travaux montrent que la maintenance des télomères dans les cellules humanisées est dépendante de la télomérase seulement (données non montrées). Des résultats similaires ont été observés avec la souche BY4705 utilisée dans l'étude de complémentation (discuté plus

loin) et sont en accord avec de précédents travaux (Alexander et Zakian, 2003; Brevet et al., 2003).

c) Analyse à long terme des télomères de souches humanisées

Les levures avec une matrice ARN humanisée sont viables et semblent acquérir de plus en plus d'ADN télomérique humain lorsque le nombre de générations augmente (figure 10B, pistes 2, 4 et 6). Intrigués par ces résultats, nous avons poursuivi la croissance de nos cellules jusqu'à ~2500 Gén. (soit 125 restriages si l'on considère que une colonie fait 20 Gén., et soit une période de 375 jours pour atteindre ce nombre de générations si l'on considère que une colonie réalise 20 Gén. en 3 jours d'incubation à 30 °C) pour répondre aux deux questions suivantes :

- le mécanisme de survie des cellules humanisées sera-t-il toujours dépendant de la télomérase de levure (*TLC1h* et *EST2*) aux générations tardives?
- les télomères des cellules humanisées pourront-ils devenir totalement humains?

Pour mener à bien ces deux investigations, l'ADN génomique de cellules sauvage et humanisée a été isolé à différents intervalles et analysé par deux techniques différentes mais complémentaires : gel de télomères et clonage/séquençage des télomères.

i. Gels de télomères :

Les différents clones analysés précédemment à 150 Gén. (figure 9, clone WT, Ha, Hb et Hc 150 Gén.) ont été restriés jusqu'à 2500 Gén. Aucun de ces clones n'est entré en sénescence et aucun défaut de croissance n'a été observé pour les trois clones humanisés (Ha, Hb et Hc) comparativement au clone WT (figure 9, 1000 et 2500 Gén.). A ce point

ci on peut tout de même noter que la vitesse de croissance est ralentie entre 2000 et 2500 Gén. aussi bien pour les trois clones humanisés que pour le clone WT. L'ADN génomique des clones WT et Ha a été extrait à un nombre égal de générations (40, 100, 150, 570, 1200, 2000 et 2500 Gén.), digéré avec *XhoI* et analysé dans des conditions natives ou dénaturantes sur gel en hybridant avec des sondes télomériques de différentes natures. En premier lieu, l'hybridation avec la sonde télomérique humaine $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ a permis la détection de l'ADN télomérique humain simple brin (figure 10A, piste 15). La présence d'extensions télomériques humaines simple brin est révélée seulement chez le clone Ha et ces extensions augmentent en longueur et en intensité en fonction du nombre de générations (figure 10A, pistes 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14).

De précédents travaux, basés sur la technique d'hybridation dans le gel non dénaturant avec des sondes télomériques humaines de différentes longueurs ($^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_4$ et $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_5$) et en augmentant progressivement la température de lavage, ont montré que l'extension 3' chez une souche humanisée à 100 Gén. était supérieure à 24 nt (Bah et al., 2004). Dès lors on peut donc supposer qu'aux générations avancées l'extension télomérique humaine $(\text{T}_2\text{AG}_3)_n$ est relativement longue. Le signal observé est spécifique aux extensions terminales humaines car lorsque ce même ADN fut traité à l'Exonucléase I d'*E. coli* (*ExoI*), enzyme qui catalyse la dégradation d'ADN simple brin dans la direction 3' vers 5', et hybridé avec la sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$, le signal est aboli (figure 11).

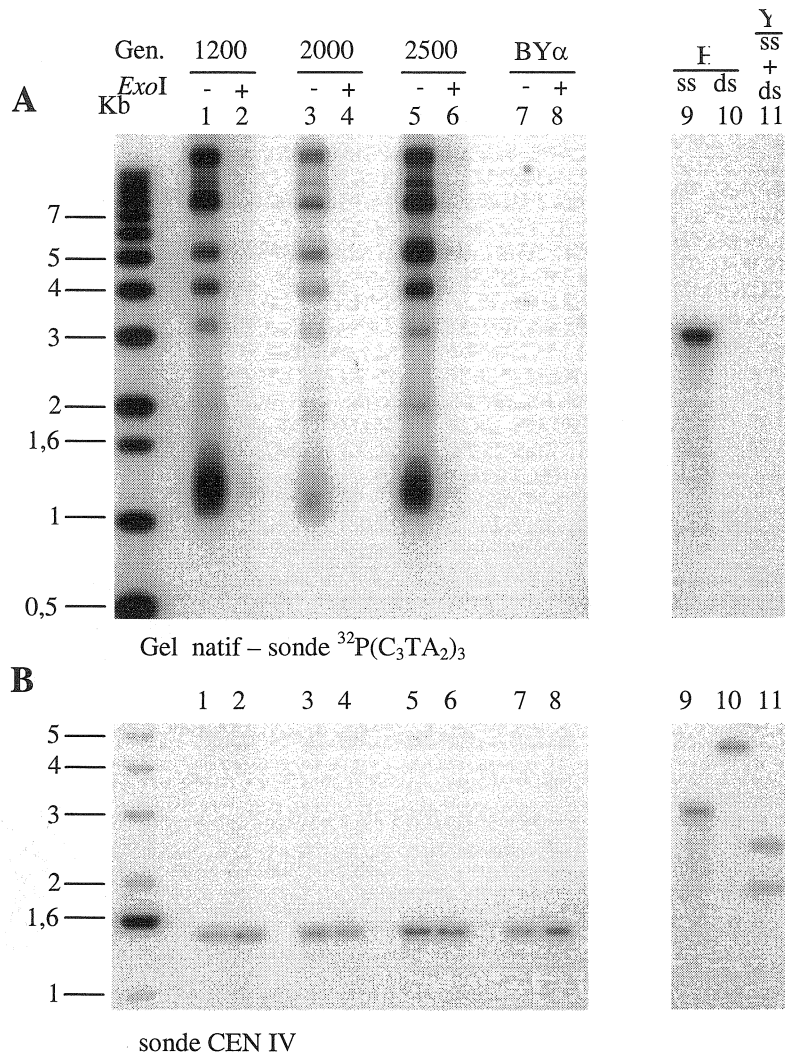


Figure 11 : Vérification de la présence d'une extension télomérique humaine simple brin chez la levure humanisée par traitement à l'Exonucléase I d'Escherichia coli (*ExoI*)

L'ADN provenant de la souche RWY12 (clone Ha) a été de nouveau isolé après avoir atteint le nombre de générations désiré et fut parallèlement traité ou non à l'Exonucléase I d'E. coli (*ExoI*), digéré par *XhoI* puis ensuite séparé sur 0.75% TBE-agarose gel comme mentionné à la figure 10. Pistes 1 et 2 : Ha à 1200 Gén. non traité et traité par *ExoI*; Pistes 3 et 4 : Ha à 2000 Gén. non traité et traité par *ExoI*; Pistes 5 et 6 : Ha à 2500 Gén non traité et traité par *ExoI*; Pistes 7 et 8 : BY4705 α non traité et traité par *ExoI*; pistes 9-11 : contrôles d'hybridation (humain et levure) identiques à la figure 10. (A) Hybridation In-Gel dans des conditions non dénaturantes avec la sonde [^{32}P](C₃TA₂)₃ pour détecter les extensions télomériques humaines simple-brin. (B) Après avoir été dénaturé et transféré sur membrane Hybond N+, l'ADN a été hybridé avec une sonde radiomarquée CEN IV pour apprécier la quantité d'ADN chargée par piste.

Pour vérifier si des répétitions télomériques levures font parties de ces extensions, le même ADN a été soumis à l'hybridation dans le gel non dénaturant avec une sonde télomérique levure spécifique pour le brin riche en G : $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$. Un faible signal est discernable pour l'ADN dérivé de cellules WT (figure 10F, pistes 8-14) (un 22 mer – oligonucléotide $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$ – a été utilisé pour révéler les extensions télomériques TG_{1-3} de 10-15 nt) alors que pour l'ADN dérivé de cellules humanisées un tel signal n'est plus perceptible (figure 10F, pistes 1-7) due à la quasi absence d'extensions 3' levure (voir section clonage et séquençage des télomères). Chez les levures humanisées, l'extension télomérique terminale est exclusivement humaine à travers les générations.

Suite à ces analyses dans des conditions natives, l'ADN du gel représenté à la figure 10A a été dénaturé et hybridé avec la sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ puis $^{32}\text{P}(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$, après lavage de la sonde riche en C, pour détecter la quantité total d'ADN télomérique humain du brin riche en G et riche en C respectivement (figures 10B et 10C). Dans les deux cas, les TRFs de la souche humanisée sont courts mais stables par rapport à une souche WT, et plus hétérogènes aux générations tardives. L'augmentation de l'intensité du signal corrèle avec l'augmentation du nombre de générations ce qui reflète une augmentation de l'ADN télomérique humain. La détection des deux brins indique que les télomères des souches humanisées sont correctement répliqués. La faible hybridation de la sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ ou $^{32}\text{P}(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ avec l'ADN dérivé de cellules WT correspond aux quelques répétitions télomériques humaines présents à la jonction des régions sous télomériques (figure 10C, bandes inférieures à 7 Kb) ou encore aux autres répétitions ou séquences apparentées présentent à travers le génome (figure 10C, bandes supérieures à 7 Kb).

Après déshybridation de la sonde $^{32}\text{P}(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$, l'ADN a été hybridé avec la sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$ pour détecter spécifiquement toutes les répétitions télomériques levures (figure 10D, piste 17). La présence de répétitions levures est détectée aussi bien au niveau de l'ADN dérivé de cellules WT que de cellules humanisées néanmoins, pour cette souche humanisée on observe une diminution progressive nette de l'intensité du signal lorsque le nombre de générations augmente (figure 10D, pistes 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14); toutefois, aux générations tardives, il reste une quantité infime de répétitions télomériques levures. Les TRFs des cellules humanisées sont maintenus aux alentours de 1,0 kb contre ~1,2 kb chez la souche isogénique contrôle. En dernier lieu, l'hybridation avec la sonde centromérique CEN IV indique qu'une quantité égale d'ADN génomique a été chargée par piste (figure 10E et 10G).

En résumé, ces résultats d'hybridations suggèrent fortement que chez les levures humanisées il y a un remplacement progressif des répétitions télomériques levures par des répétitions humaines en fonction du nombre de générations, et cette évolution a été observée par un autre groupe mais non examinée en détail (Brevet et al., 2003). De plus, l'humanisation des télomères ne semble pas être complète même après 2500 Gén. Afin d'apprécier de plus près l'évolution des télomères chez les cellules humanisées, on a donc eu recours à la technique de clonage et séquençage des télomères.

ii. Clonage et séquençage des télomères

La souche RWY12 contient une séquence sous-télomérique qui est unique à travers le génome (VR-ADE2-T). Nous avons pris avantage de cet élément pour adapter la technique de clonage et séquençage des télomères décrite par Forstemann et al. afin

d'analyser la longueur des télomères dans notre souche humanisée RWY12 et d'apprécier la nature des différentes séquences télomériques. Cette technique rapide repose sur trois étapes principales qui sont l'addition d'une queue poly-C à l'extension terminale du brin riche en G par la «terminal deoxynucleotidyl transferase» (TdT) en présence de dCTP, l'amplification spécifique du brin télomérique G riche avec une amorce complémentaire à la queue poly-C (dG₁₈*Bam*HI) et une amorce spécifique pour la séquence distale au gène sous-télomérique *ADE2* (DIAV-I) puis, le clonage/séquençage des télomères (figure 12A). En effet, cette méthode nous permet de suivre l'évolution d'un seul télomère, celui du chromosome V droit marqué *ADE2*, du au fait que l'amplification PCR est dépendante uniquement de la présence du gène *ADE2*. Néanmoins la distinction entre les séquences télomériques simple brin et double brin ne peut se faire par l'intermédiaire de cette approche.

Les mêmes ADN dérivés de cellules humanisées et analysés à la figure 10, ont été utilisés dans cette investigation. Deux résultats typiques obtenus suite au séquençage sont illustrés à la figure 12B et 12C. La même procédure de dénombrement des répétitions télomériques a été employée pour les autres clones séquencés aux différentes générations. Le résumé de ces résultats de séquençage est représenté à la figure 13A, et la figure 13B est la compilation sous forme de graphique de ces résultats. De 40 à 150 Gén., deux populations de télomères sont présentes : télomères constitués exclusivement de répétitions levures et télomères mixtes constitués de répétitions humaines et levures. On peut noter que pour les télomères mixtes, les répétitions humaines sont toujours distales par rapport aux répétitions levures, la longueur des télomères est maintenue stable aux alentours $\sim 150 \pm 50$ nt alors que pour les télomères seulement TG₁₋₃ on observe une

diminution progressive de la longueur en fonction du nombre de générations (barres blanches) pour ne laisser place qu'à des télomères mixtes (barres composites) aux générations suivantes (figure 13 B – 570, 1200 et 2500 Gén.).

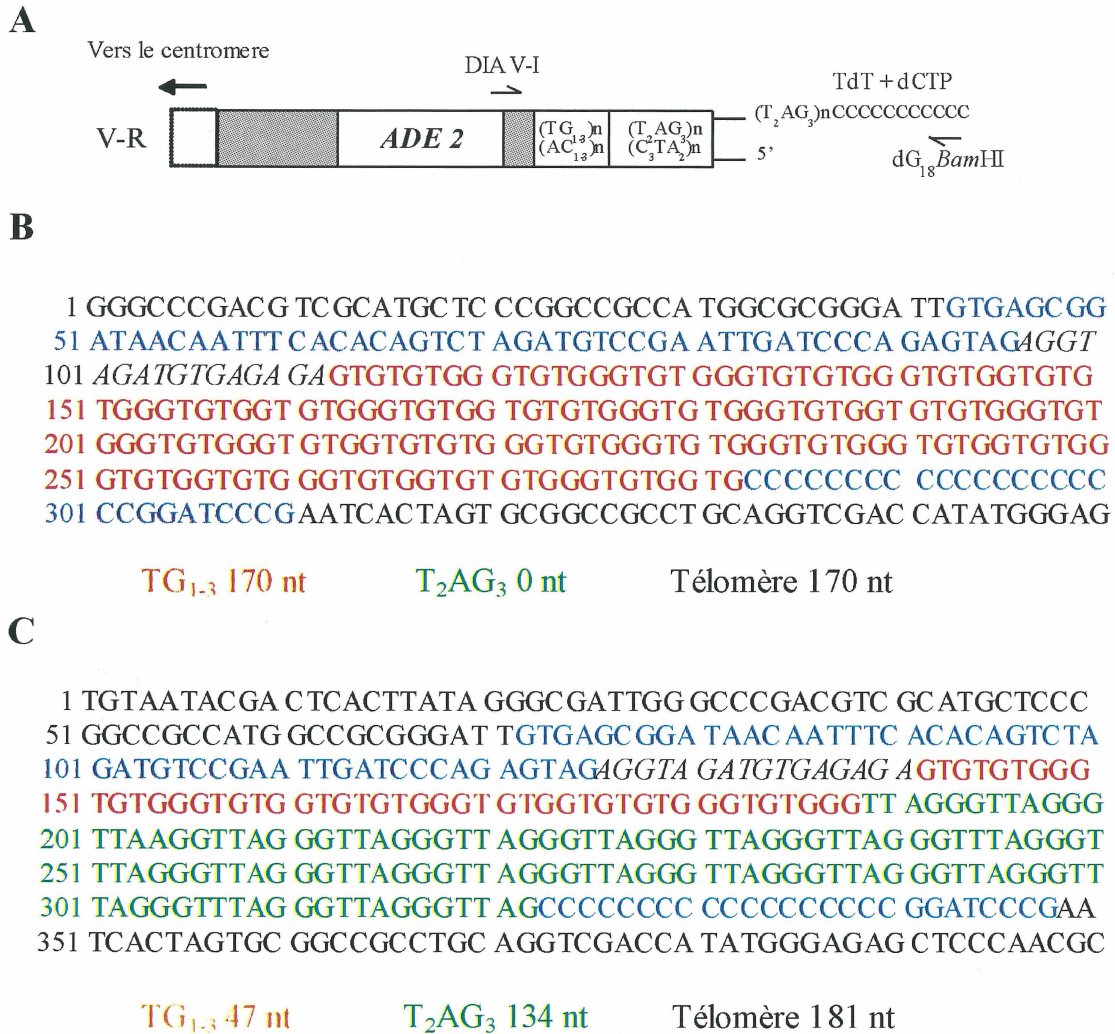


Figure 12 : Exemples de résultats de séquençage pour deux clones humanisés

(A) Schéma décrivant la nature du télomère, chromosome V-R marqué ADE2 de la souche RWY12, qui a été ciblé pour l'amplification (ici télomère avec une extension 3' humaine), les amorces utilisées (DIA V-I et dG₁₈BamHI) et l'extrémité 3' talonnée d'une queue polyC (TdT + dCTP). (B) Télomère constitué exclusivement de répétitions télomériques levures (clone Ha à 40 Gén.). (C) Télomère constitué de répétitions télomériques levures et humaines (clone Ha à 2500 Gén.). Dans la direction 5' vers 3', représenté en noir : vecteur pGEM-T, en bleu : amorces DIA V-I et dG₁₈-BamHI, en italique : partie du chromosome V-R, en rouge : répétitions levures TG_{1.3}, en vert : répétitions humaines T₂AG₃. Le nombre de nucléotides levures (TG_{1.3}) versus le nombre de nucléotides humains (T₂AG₃) s'il y a lieu, ainsi que la longueur total du télomère sont représentés.

Les répétitions levures TG_{1-3} diminuent progressivement pour atteindre une longueur critique de 47 nt à 2500 Gén. et à l'inverse, les répétitions humaines $(T_2AG_3)_n$ augmentent graduellement (figure 13B).

A

nombre de générations	télomères constitués	télomères constitués des		
	seulement de séquence TG_{1-3} (nt)	séquences		longueur des télomères (nt)
		TG_{1-3} (nt) + T_2AG_3 (nt)		
40G	171 ± 13 (6/9)	129 ± 38	40 ± 5	169 ± 39 (3/9)
100G	96 ± 15 (5/14)	103 ± 14	43 ± 29	146 ± 26 (9/14)
150G	71 ± 14 (4/10)	90 ± 3	57 ± 29	147 ± 28 (6/10)
570G	0 (0/7)	87 ± 6	45 ± 31	131 ± 29 (7/7)
1200G	0 (0/7)	59 ± 5	124 ± 19	182 ± 22 (7/7)
2500G	0 (0/10)	47 ± 2	128 ± 36	175 ± 36 (10/10)

B

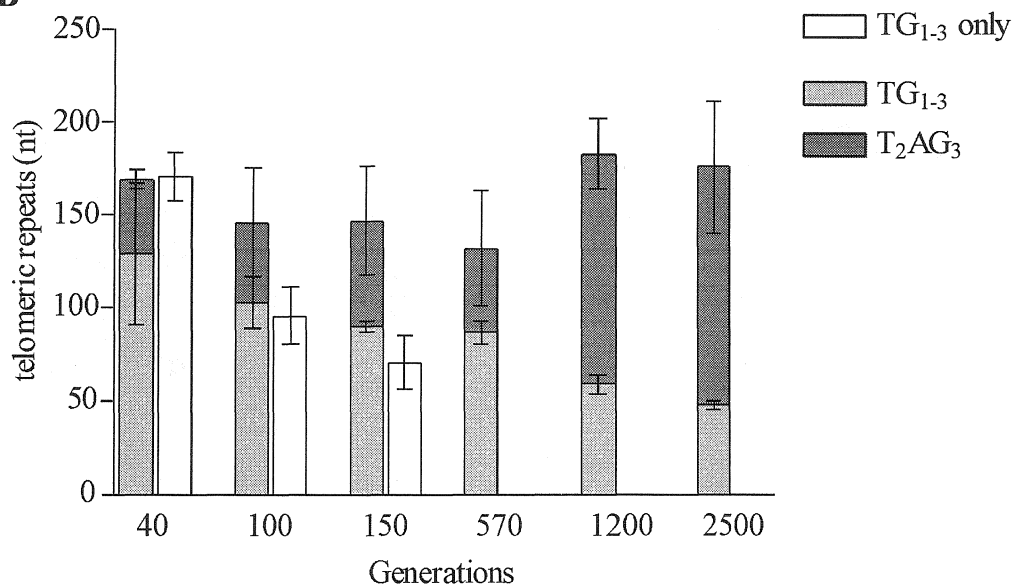


Figure 13 : Analyse des télomères chez la levure humanisée par séquençage

(A) Pour chaque génération indiquée (1^{ère} colonne), 3 réactions PCR indépendantes ont été effectuées. L'ADN amplifié a été ensuite cloné dans un vecteur T (pGEM-T – Promega) et plusieurs clones indépendants ont été séquencés après avoir vérifié sur gel la présence d'un insert. Le tableau résume les résultats de la longueur des différents types de télomères (moyenne ± déviation standard). Entre parenthèses, le nombre de clones obtenus pour chaque type de télomères (TG_{1-3} seulement ou mixte TG_{1-3} + T_2AG_3) par rapport au nombre total de clones séquencés pour une génération donnée. La longueur des télomères (dernière colonne de droite) est calculée seulement pour les clones contenant les séquences télomériques mixtes. (B) Compilation graphique des résultats présentés en A) : barres blanches : télomères constitués uniquement de séquences levures; barres composites : télomères constitués de répétitions télomériques levures et humaines.

Nous avons ensuite procédé à l'analyse de l'extrémité 3' pour les 56 clones séquencés où les 20 derniers nucléotides levures présents avant la fin du chromosome ou à la transition des répétitions levures et humaines s'il y a lieu (télomères mixtes), ont été comparés en fonction du nombre de génération (tableau 6).

Chez les télomères constitués purement de répétitions levures, on n'observe pas de préférence pour un G ou un T à la dernière position 3' ni un motif de séquence conservé pour ces 20 derniers nt (télomères TG₁₋₃ à 40, 100 et 150 Gén.). Concernant les télomères mixtes, on retrouve plusieurs motifs de séquence conservés : la plupart sont spécifiques à une génération donnée (ex. séquence en vert à 1200 Gén.) alors que la séquence « ...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG - rouge » est distribuée à travers toutes les générations chez un, plusieurs, voire tous les télomères d'une même génération, et est représentée uniquement chez les télomères mixtes. D'après le tableau 7 qui récapitule les différents motifs de séquences répertoriés ainsi que leur fréquence d'apparition, cette dernière est la plus représentée (21 fois sur 41 télomères mixtes séquencés) et cela est probablement due aux deux triplets de G qui conférerait la stabilité de l'appariement ARN/ADN (discuté plus loin). Par alignement des 5 motifs de séquences, on peut assumer que « ...GTGGG » est la séquence consensus levure qui précède toujours les répétitions humaines (tableau 8).

Pour le passage aux répétitions humaines (télomères mixtes), seuls les premiers nucléotides sont représentés (tableau 6). En général, les premiers nucléotides humains ajoutés sont « *TTAGGG...* », mais dans certains cas on observe une base supplémentaire « *GTTAGGG...* » voire deux dans de très rares cas « *GGTTAGGG...* » tableaux 6 et 8).

Génération	Télomère	Numéro de séquence	Dernières répétitions TG ₁₋₃	Transition	
40	TG ₁₋₃	1	...TGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTG	-	
		5	...GTGTGGTGTGTGTGGGTGTG	-	
		6	...GTGGTGTGTGTGGGTGTGTG	-	
		7	...TGTGGGTGTGGGTGTGTGTGT	-	
		9	...GTGTGGTGTGGGTGTGGTGT	-	
		14	...GGTGTGGTGTGTGTGGGTGT	-	
40	TG ₁₋₃ +	2	...GTGTGGGTGTGGTGTGTGGG	GTTAGGG	
	T ₂ AG ₃	8	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		11	...GTGTGGGTGTGGTGTGTGGG	TTAGGG	
100	TG ₁₋₃	20	...TGGGTGTGGGTGTGGTGTGT	-	
		25	...GTGGTGTGGGTGTGGGTGTG	-	
		27	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	-	
		30	...GGTGTGGTGTGTGGGTGTGG	-	
		146	...GGGTGTGGGTGTGGTGTGTG	-	
	100	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	17	...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG
			18	...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG
			19	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			22	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			23	...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			26	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			28	...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG
			145	...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG
			147	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
150	TG ₁₋₃	31	...GTGGTGTGTGGGTGTGGTGG	-	
		32	...TGGGTGTGGGTGTGGTGTGT	-	
		35	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	-	
		39	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTG	-	
	150	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	33	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			34	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
			37	...GTGTGGGTGTGGTGTGTGGG	TTAGGG
			38	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG
150	T ₂ AG ₃	40	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		44	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
570	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	49	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
		50	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG	
		51	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
		118	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
		119	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
		120	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
1200	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	122	...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	TTAGGG	
		58	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	GTTAGGG	
		59	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		61	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		62	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		125	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG	
2500	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	126	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		127	...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		64	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		69	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		71	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		72	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
2500	TG ₁₋₃ + T ₂ AG ₃	75	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		89	...TGGTGTGGGTGTGGTGGG	TTAGGG	
		149	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		150	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	
		151	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	GTTAGGG	
		152	...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	TTAGGG	

Tableau 6 : Comparaison des extrémités 3' des télomères de levure humanisée

Les 20 dernières répétitions levures (TG₁₋₃), avant la fin du chromosome ou avant la transition avec les répétitions humaines, sont représentées pour les 56 clones séquencés de la figure 13. Les résultats sont présentés en fonction du nombre de divisions cellulaires et de la nature des répétitions télomériques.

Pour comprendre l'origine de ces bases supplémentaires, la séquence matrice de TLC1h a été appariée au substrat télomérique levure le plus représenté, dans notre cas « ...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG » (figure 14A). L'allongement à 4 G

20 dernières répétitions TG ₁₋₃	Fréquence
...GTGTGGTGTGTGGGTGTGGG	21
...TGTGGTGTGGGTGTGGTGGG	6
...GGGTGTGGTGTGTGGGTGGG	6
...TGTGTGGGTGTGGGTGTGGG	5
...GTGTGGGTGTGGTGTGTGGG	3
/41*	

Tableau 7 : Analyse moléculaire des résultats de séquençage de levures humanisées

Fréquence d'apparition des différents motifs de séquences levures utilisés pour l'appariement de la matrice ARN humanisée de TLC1.

Consensus	Transition	Fréquence
.....GTGGG	<i>TTAGGG</i>	32
	<i>GTTAGGG</i>	7
	<i>GGTtaggg</i>	2
		/41*

Tableau 8 : Séquence consensus levure et transition avec les premières répétitions humaines

* nombre total de clones séquencés possédant des télomères mixtes (41 au total).

« ...GTGGGGTtaggg... »

peut être généré s'il y a appariement des 2 derniers G de la séquence « ...TGGG » avec les 2 derniers C de la matrice ARN TLC1h (figure 14B). Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux (Henning et al. 1998). Plus rarement, un allongement jusqu'à 5 G

« ...GTGGGGGGTtaggg... »

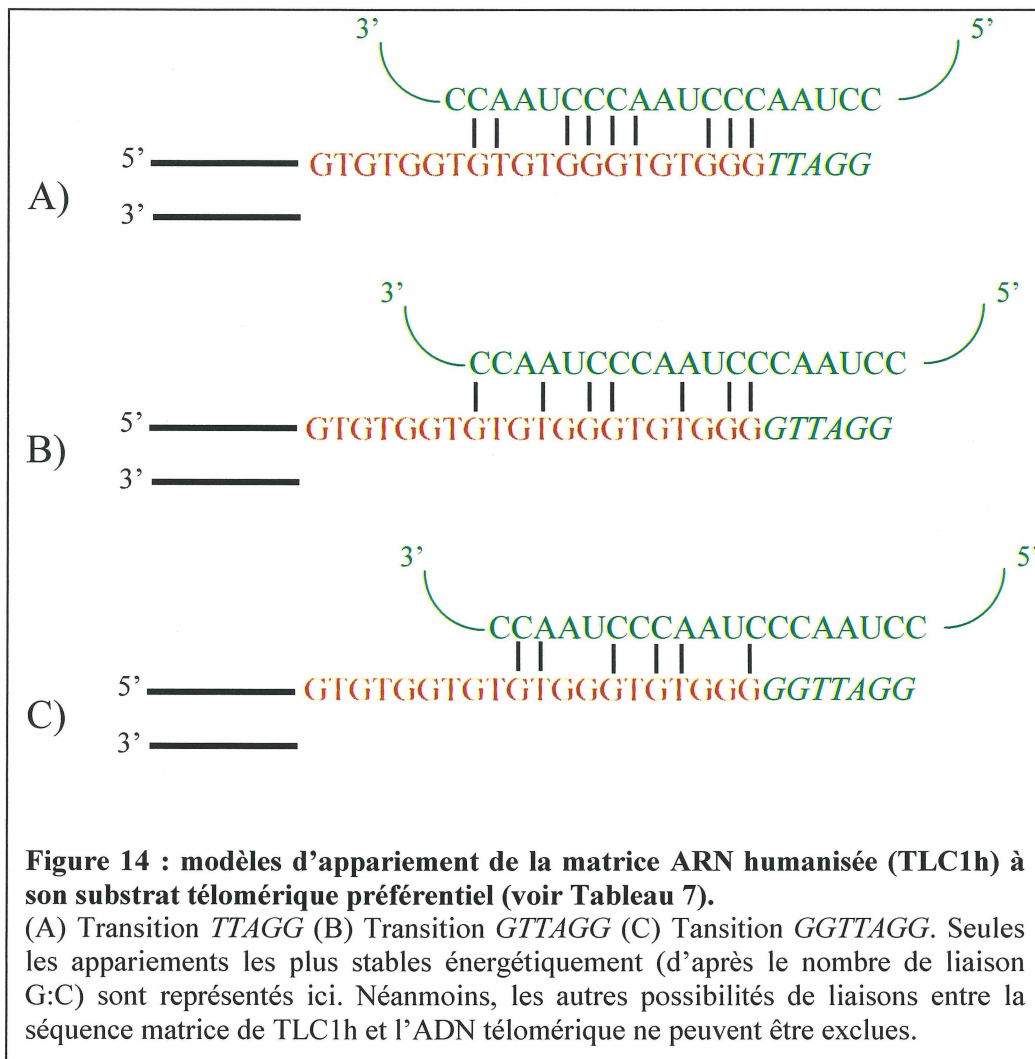
peut avoir lieu si le dernier G de la séquence « ...TGGG » s'apparie avec le dernier C de la

matrice ARN TLC1h (figure 14C). Ces appariements entre la matrice de TLC1h et son substrat nous montrent que le ou les G supplémentaires font parties intégrantes des répétitions humaines.

Finalement, l'alignement des répétitions levures pour les 56 télomères séquencés, en utilisant le logiciel MacVector, a révélé que le bloc télomérique levure de 47 nt à 2500 Gén. est identique aux générations inférieures autrement dit cette séquence est invariable

quel que soit le nombre de générations effectués par les cellules humanisées (données non montrées).

En résumé, les résultats de cette analyse à long terme des télomères de levures humanisées nous permettent de supposer que leur mode de survie est toujours dépendant de la télomérase (pTLC1hTRP + pEST2-LYS2) aux générations avancées car aucun évènement de recombinaison n'est observé, ni au niveau des gels de télomères et ni au



niveau des séquençages. Les techniques d'hybridation dans le gel et de clonage/séquençage des télomères nous ont permis toutes deux d'apprécier la quantité et la nature des répétitions télomériques chez les cellules humanisées. Avec ces deux

approches différentes nous avons démontré qu'en fonction du nombre de générations accomplis par les cellules humanisées, il y avait une perte progressive des répétitions levures qui était contrebalancé par une augmentation progressive des répétitions humaines. L'humanisation de ces télomères est donc graduelle mais non complète car un seuil critique de répétitions levures de 47 nt est protégé de l'action de la télomérase « humanisée ». Néanmoins d'un point de vue structural, la présence d'une extension télomérique humaine simple brin confère un substrat idéal pour l'action de la télomérase humaine.

Complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure

On vient de voir que des levures avec des télomères humanisés peuvent être générées par simple modification de la séquence matrice de *TLC1*. Basé sur cette caractéristique importante, nous allons vérifier si la télomérase humaine représentée par ses sous-unités centrales *hTERT* et *hTR*, est en mesure d'utiliser ce substrat télomérique humain et de compléter une souche humanisée dépourvue des sous-unités centrales de la télomérase de levure, *EST2* et *TLC1*.

a) Souche et stratégie

Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé la souche diploïde BY4705 [*Mata/Mata*, *ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG*, *his3Δ200/his3Δ200*, *leu2Δ0/leu2Δ0*, *lys2Δ0/lys2Δ0*, *met15Δ0/met15Δ0*, *trp1Δ63/trp1Δ63*, *ura3Δ0/ura3Δ0*] (Brachmann et al. 1998) du fait de la disponibilité de ses nombreux marqueurs nutritionnels de sélection.

Dans cette souche, les gènes *TLC1* et *EST2* furent remplacés par les marqueurs *KanMx4* (gène qui confère la résistance à la drogue G418) et *HIS3* (gène codant pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de l'histidine) respectivement (voir Matériel et Méthodes de l'annexe 1 pour la description des délétions). Ces délétions ont été vérifiées par analyse de l'ADN (données non montrées). Ces cellules ont ensuite été sporulées en les cultivant dans des conditions trophiques peu favorables. Cette action va permettre à la cellule d'entrer en méiose et donner naissance à quatre spores haploïdes ou tétrade, contenues dans un asque. Suite à la sporulation, la microdissection de plusieurs tétrades a permis l'isolement de souches haploïdes où les gènes *TLC1* et *EST2* sont remplacés par *KanMx4* et *HIS3* respectivement dans le génome. Pour prévenir la sénescence de ces cellules qui surviendrait aux alentours de 50-70 Gén. suite à la perte de ces deux gènes, la souche haploïde a été transformée avec les plasmides pTLC1TRP ou pTLC1hTRP et pEST2-LYS2 pour assurer sa survie. L'analyse par hybridation directe dans le gel a confirmé la présence de répétitions télomériques humaines simple brin et double brin pour les souches contenant pTLC1hTRP avec un TRF maintenu à ~1,0 kb, alors que pour la souche isogénique contenant pTLC1TRP, les télomères sont constitués purement de répétitions télomériques levures et le TRF est maintenu à ~1,2 kb (données non montrées).

Ayant confirmé la construction de nos différentes souches, les plasmides de levure exprimant les composantes centrales de la télomérase humaine, *hTERT* et *hTR*, furent transformés (figure 15). A cette étape ci, nous avons une souche, WT ou humanisée, où *TLC1* et *EST2* endogènes sont absents et où les deux formes de télomérase, levure et humaine, sont présentes sur plasmides.

BY4705 α *est2::HIS3 tlc1::KanMx4*

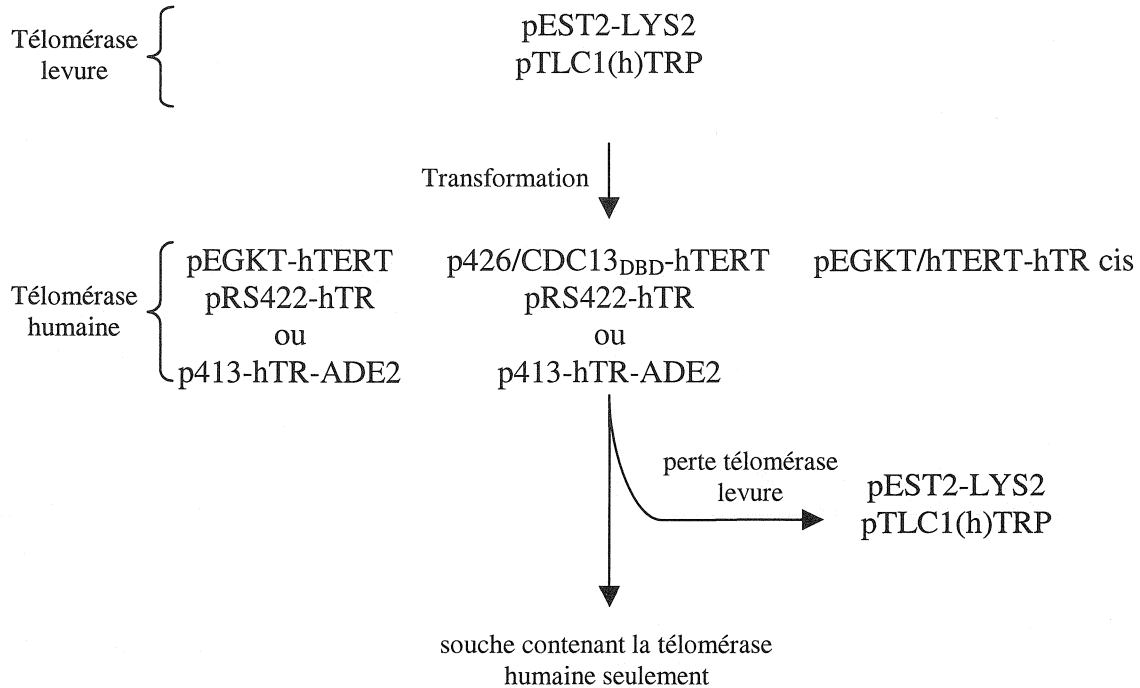


Figure 15 : Schéma général de l'essai de complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure

La souche de départ BY4705 α *est2::HIS3, tlc1::KanMx4* comprenant les plasmides de la télomérase de levure pEST2-LYS2 et pTLC1(h)TRP, a été transformée avec les plasmides de la télomérase humaine suivants : pRS422-hTR ou p413-hTR-ADE2 + pEGKT-hTERT ou p426/CDC13_{DBD}-hTERT ou pEGKT/hTERT-hTR cis. Ces cellules ont été cultivées en milieu liquide YC-HIS-(ADE)-URA Gal de façon à conditionner la perte des plasmides exprimant la télomérase de levure, pEST2-LYS2 et pTLC1(h)TRP, et surexprimer les sous-unités de la télomérase humaine TR, TERT, CDC13_{DBD}-hTERT et TERT-TR cis. Ces cellules ont été ensuite étalées sur le même milieu de sélection et la perte des plasmides pEST2-LYS2 et pTLC1(h)TRP a été vérifiée en striant en parallèle les colonies sur YC-HIS-(ADE)-URA-LYS Glc et YC-HIS-(ADE)-URA-TRP Glc pour vérifier la perte de pEST2-LYS2 et pTLC1(h)TRP respectivement; le milieu YC-HIS-(ADE)-URA Glc a été utilisé comme contrôle de croissance. Les clones contenant seulement les plasmides exprimant la télomérase humaine ont été finalement restreints sur milieu sélectif YC-HIS-(ADE)-URA Gal pour vérifier la survie en absence de télomérase de levure. Cf. tableau 4 pour les marqueurs nutritionnels de sélection présents sur chaque plasmide.

Dès lors, l'essai de complémentation peut être envisagé et consiste en la capacité qu'a une cellule, contenant la télomérase humaine mais ayant perdu la télomérase levure, à croître au delà du point de sénescence qui est observé pour une cellule normale de levure dépourvue de télomérase. Cet échappement à la sénescence répllicative serait l'effet de l'allongement des télomères par la télomérase humaine qui ajouterait des répétitions C_3TA_2/T_2AG_3 . Mais avant d'entreprendre l'essai de complémentation proprement dit, nous devons nous assurer de la fonctionnalité de la télomérase humaine présente sous forme de plasmides dans nos levures, et de sa localisation cellulaire.

b) Reconstitution fonctionnelle d'une télomérase humaine exprimée chez la levure *S. cerevisiae*

Nous avons d'abord examiné par immunobuvardage si la protéine de la télomérase humaine, hTERT, pouvait être exprimée chez la levure. Ces tests ont été effectués sur des extraits protéiques totaux de cellules cultivées en milieu contenant du galactose car les gènes encodant pour la télomérase humaine ont tous été clonés dans des vecteurs d'expression levure sous le contrôle d'un promoteur GAL1 (P_{GAL1}) (tableau 4). Une bande de masse moléculaire de ~150 kDa est détectée pour les levures exprimant les protéines de fusion GST-hTERT et CDC13_{DBD}-hTERT en hybridation avec un anticorps anti-hTERT (figure 16B, pistes 2' et 3') comparativement à la souche n'exprimant aucune forme de hTERT (figure 16B, piste 1'). La croissance de ces mêmes cellules dans des conditions de répression (glucose) n'induit pas l'expression des différentes formes protéiques de hTERT (données non montrées) ce qui démontre la spécificité du système d'expression.

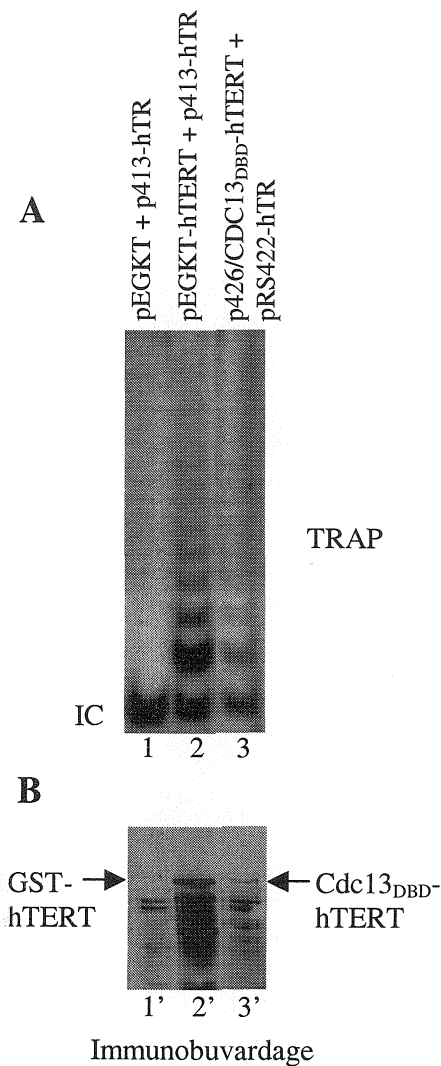


Figure 16 : expression des protéines de fusions GST-hTERT et CDC13_{DBD}-hTERT et activité télomérase humaine chez la levure *S.cerevisiae*.

(A) L'essai TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) a été utilisé pour détecter l'activité télomérase humaine *in vitro* à partir d'extraits protéiques totaux dérivés de souches de levures exprimant les plasmides mentionnés. Piste 1 : contrôle négatif, cellules YPH499 exprimant pEGKT (vecteur vide) + p413-hTR (Bachand et Autexier, 1999); piste 2 : contrôle positif, cellules YPH499 exprimant pEGKT-hTERT + p413-hTR (Bachand et Autexier, 1999); piste 3 : cellules BY4705 *tlc1::KanMx4, est2::HIS3* exprimant p426/CDC13_{DBD}-hTERT + pRS422-hTR + pEST2-LYS2 + pTLC1TRP. IC : contrôle interne d'amplification utilisé pour quantifier l'activité télomérase. (B) La détection des protéines GST-hTERT et CDC13_{DBD}-hTERT (~150 kDa chacune) a été réalisée par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-hTERT. Ces extraits protéiques sont dérivés des mêmes cellules mentionnées en A).

Ces résultats nous ont été communiqués par nos collaborateurs F. Bachand & C. Autexier. Note : L'essai TRAP ne peut être effectué seulement chez les cellules de levure avec les télomères naturels car l'étape d'amplification des produits nouvellement ajoutés par la télomérase humaine utilise une amorce [³²P](C₃TA₂)₃ spécifique aux répétitions humaines. La souche, dont la télomérase levure est humanisée, ne peut donc pas être utilisée dans cet essai.

Ensuite, les mêmes extraits cellulaires, où hTERT et hTR ont été exprimés dans un milieu contenant du galactose, ont été soumis à l'essai TRAP ou « Telomeric Amplification Protocol ». Cet essai isotopique est utilisé pour détecter l'activité télomérase *in vitro* (Bachand et Autexier, 1999; Autexier et al. 1996) et comprend deux étapes : dans un premier temps la télomérase ajoute un certain nombre de répétitions télomériques (TTAGGG)_n à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide qui imite un substrat

télomérique, et dans la seconde étape les produits qui ont subi une extension sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques, générant ainsi une échelle de produits qui augmente de 6 bases en 6 bases à partir de l'oligonucléotide. La quantification de l'activité télomérase est possible avec le contrôle interne d'amplification (IC). L'activité télomérase humaine est détectable dans les extraits avec GST-hTERT + hTR et CDC13_{DBD}-hTERT + hTR (figure 16A, pistes 2 et 3) alors qu'aucun produit d'amplification télomérique n'est visible pour l'extrait GST + hTR (figure 16A, piste 1). Bien que les signaux ne soient pas très forts, il faut noter que les essais ont été effectués dans des extraits cellulaires totaux comparativement à de précédentes analyses (Bachand et Autexier, 1999; Bachand et al. 2000). De plus, l'analyse montre que CDC13_{DBD}-hTERT est moins exprimé que GST-hTERT chez la levure (figure 15B).

En conclusion, les résultats présentés à la figure 16 démontrent que l'activité télomérase humaine peut être reconstituée spécifiquement en co-exprimant CDC13_{DBD}-hTERT et hTR. Pour la souche contenant la construction pEGKT-hTERT, la capacité à exprimer GST-hTERT et reconstituer une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure a déjà été confirmée (Bachand et Autexier, 1999).

c) Immunolocalisation de l'unité catalytique de la télomérase humaine : hTERT

Chez les cellules de mammifères il a été démontré que la télomérase était localisée au niveau nucléolaire, lieu suggéré d'assemblage des sous-unités hTERT et hTR sous forme de RNP (Etheridge et al., 2002; Yang et al. 2002) et d'action au niveau de l'ADN télomérique. Nous avons analysé la localisation cellulaire de la protéine hTERT

chez la levure afin de nous assurer que celle-ci est bien située au niveau de son substrat :
les extrémités des chromosomes.

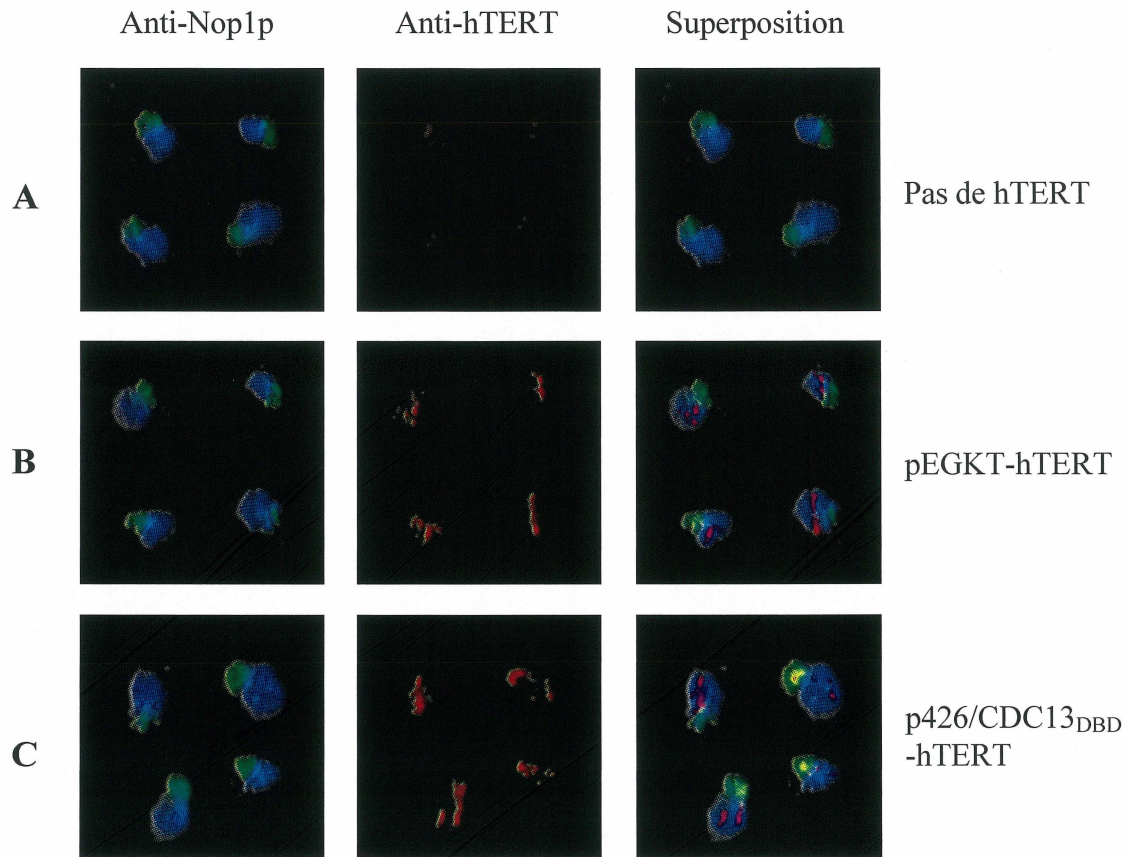


Figure 17 : Localisation de hTERT par immunofluorescence indirecte chez la levure humanisée

Pour chaque panneau, le nucléole est représenté en vert par la détection de la protéine nucléolaire Nop1p avec un AC monoclonal de souris Anti-Nop1p et un AC secondaire Anti-souris (Oregon Green); le noyau est représenté en bleu par coloration au DAPI; les protéines de fusion GST-hTERT* et CDC13_{DBD}-hTERT* sont représentées en rouge par détection avec un AC polyclonale de lapin anti-hTERT et un AC secondaire anti-lapin (Texas Red). En (A), souche contrôle n'exprimant aucune forme de hTERT (BY4705 *est2Δ/tlc1Δ* avec pTLC1hTRP, pEST2-LYS2 et pRS422-hTR); (B) même souche qu'en A) plus le plasmide pEGKT-hTERT; (C) même souche qu'en A) plus le plasmide p426/CDC13_{DBD}-hTERT. Pour chaque souche, 4 cellules ont été sélectionnées et représentées ici. Des résultats identiques ont été observés avec les mêmes souches mais exprimant TLC1wt (données non montrées).

*Ces protéines ont été induites en cultivant les cellules dans un milieu sélectif avec 2% de galactose (YC-HIS-TRP-LYS-ADE-URA Gal).

Par immunofluorescence directe, la transformation transitoire d'un plasmide de levure exprimant la protéine hTERT fusionnée à une étiquette GFP en sa partie N-terminale nous montre que dans ces cellules de levure vivantes, GFP-hTERT est localisée

au noyau (données non montrées). La localisation des protéines de fusion hTERT chez la levure humanisée a aussi été observée par immunofluorescence indirecte en utilisant un AC polyclonale anti-hTERT (figure 17). Les protéines GST-hTERT et CDC13_{DBD}-hTERT sont localisées au nucléole et nucléoplasme comme déterminé par co-localisation avec la protéine nucléolaire Nop1 et par co-localisation avec le noyau identifié ici par coloration au DAPI respectivement (figures 17B et 17C). Pour le contrôle négatif où aucune forme de hTERT n'est exprimée, on observe un très faible signal dans cette souche avec l'anticorps anti-hTERT (figure 17A).

En assumant que l'ARN hTR est associée à son partenaire hTERT, ces résultats suggèrent que les composantes de la télomérase humaine peuvent s'associer sous forme d'un complexe RNP actif qui est localisé au niveau du nucléoplasme chez la levure.

d) Complémentation

La complémentation des composantes centrales de la télomérase de levure (*EST2* et *TLC1*) par les composantes correspondantes humaines (*hTERT*, *hTR*) s'est effectuée en parallèle dans une souche ayant des télomères naturels et une souche humanisée. Ces souches, dépourvues des gènes encodant la télomérase de levure au génome, contiennent au départ ces quatre gènes sur plasmides (figure 15). Une complémentation fonctionnelle se traduira par une survie des cellules (WT ou humanisées) assurée par l'ajout de répétitions C₃TA₂/T₂AG₃ par la télomérase humaine lors de la perte de la télomérase de levure et ce au delà du point de sénescence. Il est à noter que la surexpression de hTERT et hTR est induite en présence de galactose due au P_{GAL1}. Les résultats des différents essais de complémentations sont résumés au tableau 9.

Plasmides présents dans la souche WT	Perte de plasmides	Survie (Gén.)	Plasmides présents dans la souche humanisée	Perte de plasmides	Survie (Gén.)
TLC1WT, EST2, hTR, hTERT	aucun	>150	TLC1h, EST2, hTR, hTERT	aucun	>150
aucun	hTR, hTERT, TLC1WT, EST2 (tous)	mort 70~90	aucun	hTR, hTERT, TLC1h, EST2 (tous)	mort < 20
TLC1WT, EST2	hTR, hTERT	>150	TLC1h, EST2	hTR, hTERT	>150
TLC1WT	hTR, hTERT, EST2	mort 70~90	TLC1h	hTR, hTERT, EST2	mort < 20
EST2	hTR, hTERT, TLC1WT	mort 70~90	EST2	hTR, hTERT, TLC1h	mort < 20
TLC1WT, hTERT	hTR, EST2	mort 70~90	TLC1h, hTERT	hTR, EST2	mort < 20
EST2, hTR	hTERT, TLC1WT	mort 70~90	EST2, hTR	hTERT, TLC1h	mort < 20
hTR, hTERT†‡	TLC1WT, EST2	mort 70~90	hTR, hTERT†‡	TLC1h, EST2	mort < 20
TLC1WT, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	aucun	>150	TLC1h, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	aucun	>150
hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT†‡	TLC1WT, EST2	mort 70~90	hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT†‡	TLC1h, EST2	mort < 20
TLC1WT, EST2, pEGKT/hTERT-hTR	aucun	>150	TLC1h, EST2, pEGKT/hTERT-hTR	aucun	>150
pEGKT/hTERT-hTR†‡	TLC1WT, EST2	mort 70~90	pEGKT/hTERT-hTR†‡	TLC1h, EST2	mort < 20

Tableau 9 : Essais de complémentation entre les sous-unités de la télomérase humaine et de la télomérase de levure

Les cellules BY4705 (2n) délétées au niveau du génome des gènes *TLC1* et *EST2* essentiels pour l'activité télomérase levure *in vivo*, ont été transformées avec les gènes correspondant sous forme de plasmides (*TLC1* ou *TLC1h* : p*TLC1*(h)TRP; *EST2* : p*EST2*-LYS2) afin de maintenir la survie. Suite à la sporulation, les cellules haploïdes délétées pour *TLC1* et *EST2* ont été transformées par leur homologues humains présents également sur plasmides (hTR : pRS422-hTR ou p413-hTR-ADE2; hTERT : pEGKT-hTERT ou p426/CDC13_{DBD}-hTERT ou pEGKT/hTERT-hTR cis). Finalement, la complémentation des sous-unités de la télomérase levure par les sous-unités humaines correspondantes peut être évaluée après la perte de différents plasmides suivi de l'estimation de la survie des cellules après restriage sur milieu sélectif. Le tableau de gauche résume les résultats de complémentation avec la souche dont la matrice ARN de *TLC1* est inchangée (*TLC1wt*), et à droite ceux de la souche avec la matrice ARN de *TLC1* humanisée (*TLC1h*).

† L'essai de complémentation a été réalisé dans ces mêmes cellules en ajoutant les orthologues humains de *S. cerevisiae* Est1p, hEST1A et hEST1B, dont les gènes présents sur plasmides sont sous le contrôle d'un promoteur galactose (hEST1A : p425-HA2-hEST1A; hEST1B : p424-HA2-hEST1B). Voir figures 15 et 19 pour une description de la méthode.

‡ L'expression des différentes composantes de la télomérase humaine (TERT, TR, TERT-TR cis, EST1A et EST1B) est induite en cultivant les cellules dans un milieu sélectif contenant du galactose.

Les souches qui contiennent les deux systèmes de télomérase sont capables de survivre et la présence de la télomérase humaine ne compromet en rien la survie des cellules (tableau 9). Ces souches seront considérées comme un contrôle positif. Les souches contenant initialement pTLC1TRP et ayant perdu les quatre plasmides montrent le phénotype de sénescence attendu aux alentours de ~70 Gén. et servent comme contrôle négatif (tableau 9). Pour les souches humanisées contenant initialement pTLC1hTRP avant la perte de plasmides, nous sommes dans l'incapacité d'obtenir des colonies ayant perdues les gènes des sous-unités de la télomérase de levure (tableau 9). L'arrêt de croissance a lieu en dessous de 20 Gén. Cette mort précoce est probablement attribuable aux télomères déjà courts dans cette souche (figure 10) et sûrement à une perte accélérée des répétitions télomériques humaines. Cette déficience de croissance chez les levures humanisées en l'absence de pTLC1hTRP et/ou pEST2-LYS2 a déjà été observée chez la souche humanisée RWY12 (données non montrées). Concernant les autres combinaisons de plasmides, la perte d'une des composantes de la télomérase levure entraîne la sénescence quelque soit le type de souche (tableau 9). À cette étape ci on peut conclure que les composantes *hTERT* et *hTR* en elles seules ne sont pas en mesure d'assurer la survie d'une souche dépourvue de télomérase levure. Ce résultat était prévisible du fait que d'autres protéines sont connues pour jouer un rôle dans la régulation de la télomérase chez la levure. Nous avons donc anticipé cette difficulté en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de Cdc13p (CDC13_{DBD}) avec hTERT en N-terminale de façon à forcer le recrutement de la télomérase humaine aux télomères (p426/CDC13_{DBD}-hTERT). En effet, cette idée est tirée du fait que l'action de la télomérase de levure aux télomères est indépendante de co-facteurs additionnels comme Est1p lorsque Est2p est fusionné au

CDC13_{DBD} (Evans et Lundblad, 1999). Nous avons donc utilisé la construction p426/CDC13_{DBD}-hTERT dont la fonctionnalité a été vérifiée : lorsque transformée dans une souche Cdc13-1, cette construction abolie l'effet de thermosensibilité qui est normalement observé chez ces cellules cultivées à température restrictive (données non montrées). On peut donc indirectement assumer que CDC13_{DBD}-hTERT est ciblé aux télomères et malgré cela, même si hTERT est concentré vers son substrat télomérique par l'intermédiaire de CDC13_{DBD}, aucune polymérisation n'est observée ce qui se traduit par une absence de complémentation (tableau 9).

Également, nous avons testé la construction pEGKT/hTERT-hTR *cis* décrite par Bachand et al., 2000. Ce plasmide, haute copie (2 μ) et sous le contrôle P_{GAL1} (tableau 4), permet la reconstitution fonctionnelle d'une télomérase humaine *in vivo* chez la levure en exprimant hTERT et hTR à partir de la même molécule ARN (*cis*). Cette construction facilite l'assemblage de la RNP télomérase humaine comme observé dans les essais d'activité télomérase où l'expression de GST-hTERT-hTR en *cis* améliore de façon significative l'activité télomérase humaine par rapport à l'expression de GST-hTERT et hTR sur deux plasmides différents. Cependant, la construction pEGKT/hTERT-hTR *cis* n'est pas en mesure de compléter nos deux souches de la même manière que les essais précédents (tableau 9).

Finalement, la caractérisation de deux orthologues présumés de *S. cerevisiae* Est1p, EST1A et EST1B humain, a été récemment rapportée (Snow et al., 2003; Reichenbach et al., 2003). Ces deux protéines sont associées avec l'activité télomérase humaine dans les extraits cellulaires humains et la coopération de hEST1A et hTERT permet l'allongement des télomères lorsque toutes deux surexprimés (Reichenbach et al.,

2003). Ces deux nouveaux protagonistes pourraient être les éléments clés d'une complémentation réussie en recrutant la télomérase humaine aux télomères de levure.

Nous avons donc cloné hEST1A et hEST1B dans deux vecteurs d'expression de levure

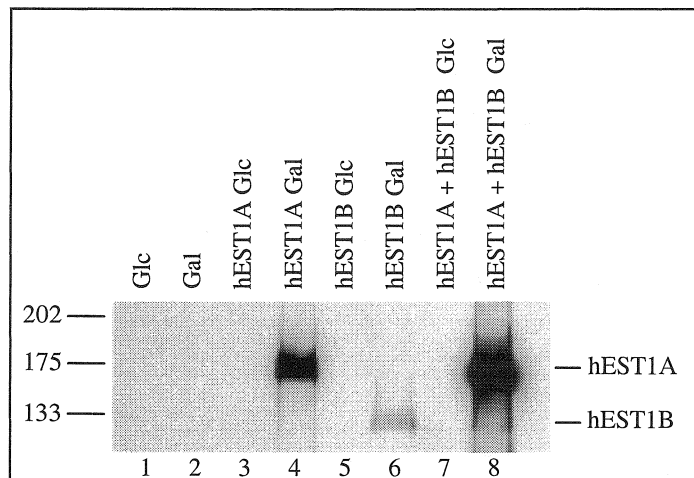


Figure 18 : Expression des protéines humaines EST1A et EST1B chez la levure *S. cerevisiae*

Les protéines HA2-hEST1A et HA2-hEST1B, chacune avec deux étiquettes HA en leur partie N-terminale, ont été révélées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA à partir d'extraits protéiques totaux dérivés de cellules de levure cultivées en présence de glucose ou galactose. Pistes 1 et 2 : souche vide BY4705 *tlc1::KanMx4/TLC1, est2::HIS3/EST2* cultivée dans un milieu avec glucose (Glc) ou galactose (Gal); pistes 3 et 4 : BY4705 avec p425-HA2-hEST1A Glc ou Gal; pistes 5 et 6 : BY4705 avec p424-HA2-hEST1B Glc ou Gal; pistes 7 et 8 : BY4705 avec p425-HA2-hEST1A et p424-HA2-hEST1B Glc ou Gal. La durée d'exposition pour les extraits contenant HA2-hEST1B et HA2-hEST1A + HA2-hEST1B (pistes 5-8) était plus longue que pour HA2-hEST1A seul (pistes 3 et 4). Le marqueur de masse moléculaire est représenté à gauche (kDa).

indépendant, haute copie et régie

par P_{GAL1} (tableau 4), et

transformé ces constructions dans

une souche de levure. L'analyse

immunobuvardage montre que les

protéines HA2-hEST1A et HA2-

hEST1B peuvent être produites

chez la levure seulement lorsque

les cellules correspondantes sont

cultivées en présence de galactose

(figure 18). Toutefois, on peut

noter que le niveau d'expression

de HA2-hEST1B est plus faible

que HA2-hEST1A, phénomène

déjà observé chez les cellules de

mammifères (Reichenbach et al., 2003). L'essai de complémentation avec hEST1A et

hEST1B a été entrepris seulement dans les souches non modifiées et contenant les

différentes formes de hTERT du fait de la sénescence prématurée chez les cellules

pTLC1hTRP qui ne permettrait pas de mesurer l'effet de hEST1B et de plus, hEST1A a

plus d'affinité pour les répétitions télomériques levures que humaines. La stratégie employée est indiquée à la figure 19.

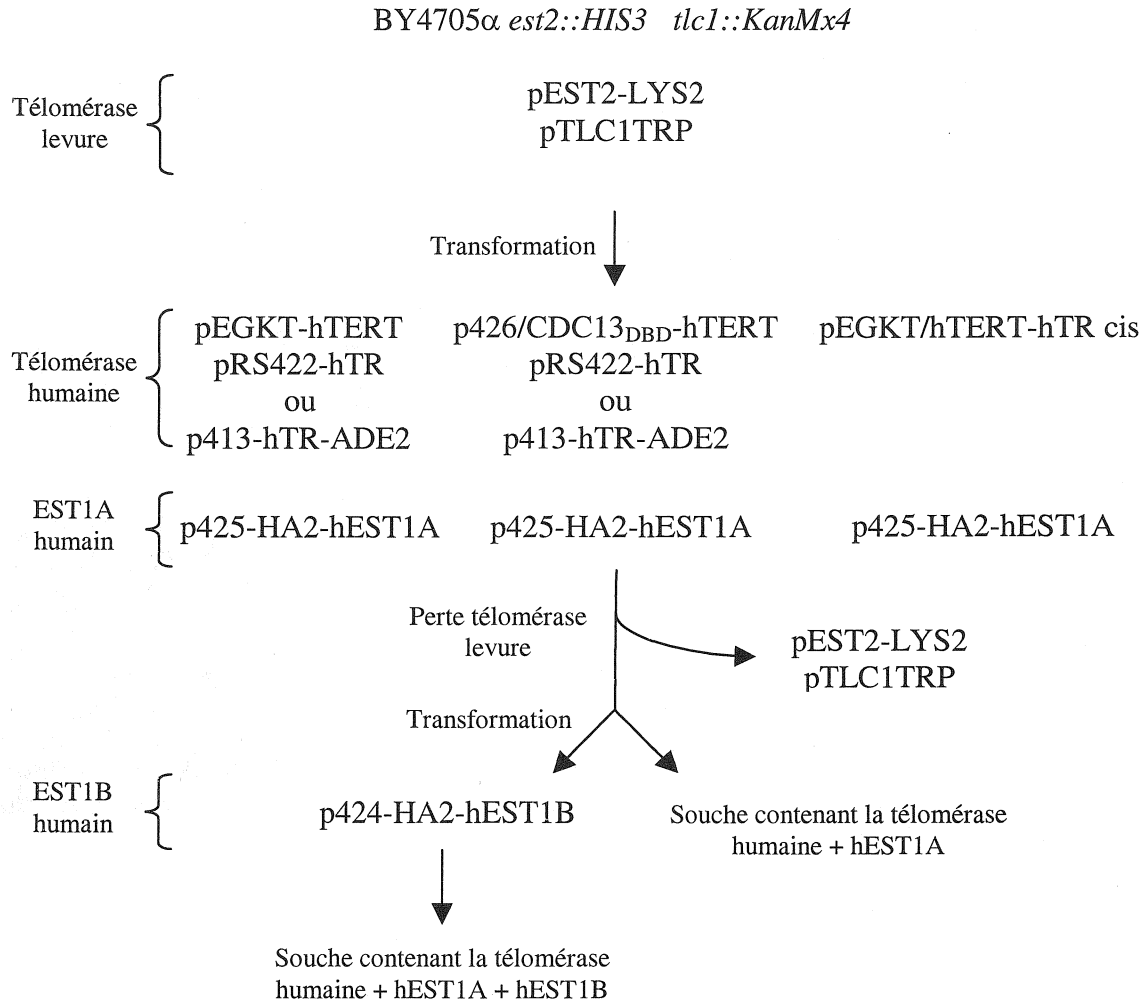


Figure 19 : Schéma de l'essai de complémentation entre la télomérase humaine et de levure en présence de EST1A et EST1B humain.

La même procédure exposée à la figure 15 a été employée pour cet essai avec quelques modifications. La souche de départ contenant les deux systèmes de télomérase sur plasmides (levure et humaine) a été transformé avec p425-HA2-hEST1A. Ces cellules ont été cultivées en milieu liquide YC-HIS-(ADE)-URA-LEU Glc et étalées sur le même milieu de sélection. La perte des plasmides pEST2-LYS2 et pTLC1TRP a été analysée en striant en parallèles les colonies sur différents milieux de sélection : YC-HIS-(ADE)-URA-LEU-LYS Glc, YC-HIS-(ADE)-URA-LEU-TRP Glc, YC-HIS-(ADE)-URA-LEU Glc pour vérifier la perte de pEST2-LYS2, pTLC1TRP et comme contrôle de croissance. Les clones comprenant seulement les plasmides exprimant la télomérase humaine et hEST1A ont été restreintes sur milieux sélectifs YC-HIS-(ADE)-URA-LEU Gal pour vérifier la survie en absence de télomérase de levure, et transformés en parallèle avec p424-HA2-hEST1B. La survie pour les clones exprimant seulement la télomérase humaine et hEST1A + hEST1B a été vérifiée en striant ces colonies sur milieu YC-HIS-(ADE)-URA-LEU-TRP Gal.

Encore une fois, aucune complémentation n'est observée en combinant soit hEST1A seul ou hEST1A et hEST1B avec les différentes formes de télomérase humaine (tableau 9).

Dernièrement, avec la technique de clonage et séquençage des télomères, nous avons vérifié au niveau moléculaire si tout de même quelques répétitions humaines pouvaient être ajoutées à l'extrémité des chromosomes mais pas même une de ces répétitions n'est trouvée.

De cette étude de complémentation nous pouvons clairement conclure que, en elles-mêmes, les composantes limitantes de la télomérase humaine testées sous différentes formes ne sont pas en mesure de maintenir la survie d'une souche avec des télomères humains ou de levures dépourvu de la télomérase de levure, et ce même en présence de hEST1A et hEST1B. Ce manque de complémentation n'est du ni à un manque d'activité télomérase humaine ni à un défaut dans sa localisation cellulaire.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Structure terminale des télomères de levures humanisées : vers une explication de l'évolution des télomères

Le remplacement de la séquence ARN matrice de *TLC1* de levure par une matrice humanisée (figure 8) résulte en l'incorporation de répétitions régulières $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ aux extrémités endogènes des chromosomes de *S. cerevisiae* (Henning et al., 1998; Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003).

Nous avons confirmé ces travaux dans notre souche RWY12 en reprogrammant de la sorte notre télomérase de levure, puis caractérisé en détail les télomères de cette souche de levure modifiée (Bah et al., 2004). Aucun phénotype de sénescence n'a été observé lors de la culture à long terme sur milieu sélectif de cette souche ayant la matrice ARN de *TLC1* humanisée (au moins jusqu'à 2500 Gén.) (figure 9). La technique d'hybridation directe dans le gel suivie de l'analyse de l'ADN (Dionne et Wellinger, 1996) montre que l'organisation structurale des télomères de levures humanisées a des similitudes avec celle de souches WT : adjacent à la région sous télomérique constituée des éléments X et Y', on retrouve une région télomérique double brin suivie d'une extension télomérique 3' simple brin; mais une partie de la région double brin est humaine $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ et une extension télomérique complètement humaine $[T_2AG_3]$ d'au moins 24 bases constitue la fin du chromosome (figures 10 et 20). Les TRFs de cette

souche humanisée, ~1 kb, sont plus courts (mais stables) que ceux de cellules WT (~1,2 kb). Néanmoins, la nature de ces télomères évoluent lorsque les cellules accumulent le nombre de divisions cellulaires : les télomères sont toujours maintenus à une longueur courte et stable de 150 ± 50 pb mais les répétitions télomériques internes de levures sont progressivement remplacées par les répétitions humaines et de longues extensions humaines 3' simple brin sont générées (discuté plus loin). Le clonage et séquençage de plusieurs de ces télomères à différentes générations a confirmé cette conversion graduelle des répétitions levures par les répétitions humaines (figure 13) (discuté plus loin). Les télomères mixtes de levures humanisées sont stables d'un point de vue mitotique (Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003) mais lors de la méiose de sévères défauts sont observés (Alexander et al., 2003; Lin et al., 2004).

Le simple fait que seul l'humanisation de la matrice ARN de la télomérase de levure autorise l'ajout de séquences télomériques humaines aux extrémités des chromosomes, qui peuvent se répliquer indéfiniment, soulève une question cruciale à savoir comment de telles répétitions humaines peuvent être maintenues chez la levure *S. cerevisiae*? La réponse à cette question se situerait au niveau de la région sous télomérique des télomères. Par comparaison des répétitions télomériques chez différents organismes, on remarque que T_2AG_3 est l'unité télomérique la plus répandue (tableau 1) et sa présence aux extrémités chromosomales de levures pourrait indiquer que c'était le télomère ancestrale de levure. En effet, les deux éléments sous télomériques X et Y' contiennent une densité importante de répétitions parfaites T_2AG_3 ou apparentées entre leurs jonctions avec les répétitions télomériques $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ et la séquence ARS (figures 1 et 20). Comme chez les séquences télomériques humaines (figure 2), un

gradient de conservation de la séquence T_2AG_3 de l'ARS vers les répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ est observé. La juxtaposition aux télomères de *S. cerevisiae* de répétitions télomériques authentiques et de répétitions de type télomérique suggère que durant l'évolution des levures bourgeonnantes, une nouvelle séquence répétitive télomérique $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ a été ajoutée à une déjà existante $[C_3TA_2/T_2AG_3]$. Cette nouvelle séquence télomérique, probablement survenue suite à des changements dans les gènes codant pour la

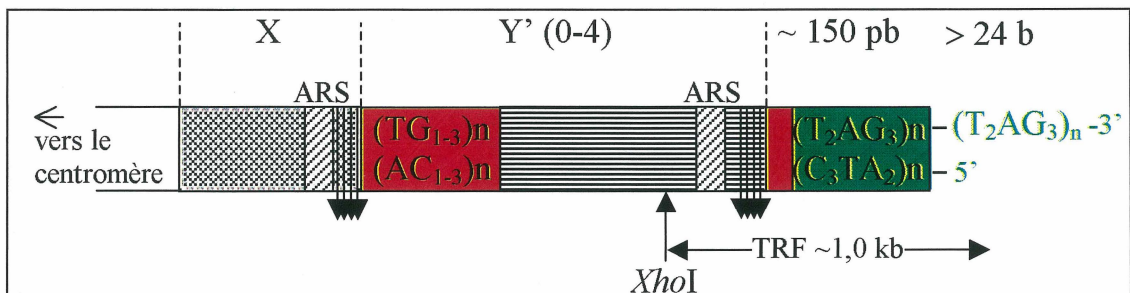


Figure 20 : Organisation structurale des télomères chez la levure humanisée

L'humanisation de la télomérase par modification complète de la séquence matrice de levure permet l'ajout de répétitions télomériques humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ à l'extrémité 3' des chromosomes de levure (représenté ici en vert). Ces télomères sont correctement répliqués par la télomérase et la machinerie conventionnelle et l'organisation des télomères est conservée par rapport aux télomères de la souche isogénique dont la télomérase n'a pas été modifiée. Les flèches verticales orientées vers le bas représentent des répétitions télomériques humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ parfaites ou dégénérées toutes liées par Tbf1p. L'extension 3' simple brin est supérieure à 24 bases et un TRF d'environ 1,0 kb est généré après coupure avec l'endonucléase *XhoI*. L'humanisation des télomères n'est pas complète, une quantité critique de répétitions levures (rouge) est maintenue avant les répétitions humaines (vert).

télomérase, a été stabilisée ensuite à travers son interaction avec un ancêtre de Rap1p.

Cette hypothèse implique que les anciennes répétitions télomériques ainsi que leurs protéines associées ancestrales sont devenues sous télomérique, ce qui est en accord avec la présence de traces de séquences T_2AG_3 dans les régions sous télomériques adjacentes aux séquences $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$. Tbf1p, lequel lie toutes les répétitions sous télomériques apparentées à la séquence T_2AG_3 (discuté plus loin), serait dérivé de protéines

télomériques ancestrales. Cette hypothèse est supportée par l'homologie de séquence entre les domaines télobox de Tbf1p et Taz1p (Brun et al., 1997). Ce modèle de co-évolution entre Rap1p, Tbf1p et l'ADN télomérique indique que les régions sous télomériques de *S. cerevisiae* correspondraient à des anciens télomères et justifierait donc la maintenance des répétitions humaines distales chez les télomères de *S. cerevisiae*. Finalement, la comparaison des régions sous télomériques chez l'humain et la levure montre des caractéristiques structurales conservées au niveau de l'évolution : les répétitions dégénérées T₂AG₃ identifient une frontière entre les régions sous télomériques (Flint et al., 1997).

Mécanisme de survie des levures humanisées

Les télomères de levure sont maintenus par la télomérase où *EST2* et *TLC1* sont les composantes essentielles et au moins quatre autres gènes seraient impliqués dans l'activité *in vivo* de la télomérase aux télomères (Lingner et al., 1997; Evans et Lundblad, 2000; Ritchie et al., 1999). En l'absence de télomérase, les télomères peuvent être maintenus par recombinaison homologue dépendante de *RAD52*, menant soit à l'amplification de la région sous télomérique (survivants de type I) ou soit des répétitions télomériques (survivants de type II) (Lundblad et Blackburn, 1993; Teng et Zakian, 1999). Jusqu'à présent, il est connu que le maintien des télomères chez la levure ne peut se faire que par une de ces deux voies uniquement : la télomérase inhibe la recombinaison des télomères alors que l'on peut basculer dans un mode de recombinaison lorsque cette enzyme n'est plus exprimée (Teng et Zakian 1999, Lundblad et Blackburn 1993). Pour

déterminer quelle voie est utilisée dans le maintien des télomères de souches humanisées, nous avons procédé à la perte du plasmide pTLC1(h)TRP, la seule composante ARN de la télomérase présente dans notre souche haploïde RWY12. Après de nombreuses tentatives, nous étions incapables de perdre pTLC1hTRP dans notre souche humanisée alors que chez la souche isogénique contrôle, les cellules ayant perdues pTLC1TRP sénescence normalement aux environs de 70-90 Gén. (Lundblad et Blackburn, 1993). Dans la souche humanisée BY4705 utilisée pour l'étude de complémentation, des résultats similaires ont été observés à savoir ni la perte de *EST2* ni la perte de *TLC1h* ne sont tolérées (tableau 9). D'autres ont montré que dans une souche humanisée diploïde, homozygote pour l'allèle *tlc1h* mais hétérozygote pour les délétions de *EST2* et *RAD52*, qu'il n'était pas possible de générer des spores *tlc1h est2* suite à la microdissection alors que la viabilité et la longueur des télomères de la spore *tlc1h EST2 rad52* n'étaient pas affectées (Alexander et Zakian, 2003).

Cette létalité synthétique observée chez les cellules humanisées peut simplement s'expliquer par leurs télomères plus courts au départ de ~150 bases par rapport à la souche WT. L'état de sénescence est donc atteint plus tôt chez les cellules humanisées et cela pourrait expliquer l'absence de colonies ayant perdu *TLC1h* et/ou *EST2*. La maintenance des télomères dans une souche humanisée est donc dépendante de la télomérase. L'absence, tout au long de l'analyse de remplacement de séquence à long terme chez la souche humanisée RWY12, de profils télomériques sur gels caractéristiques des survivants de type I ou II va en faveur de cette conclusion.

Protéines associées aux télomères de levures humanisées et régulation de la longueur des télomères

Pour étudier au plus précis l'évolution à long terme des séquences télomériques de la souche humanisée RWY12, nous avons eu recours au clonage et séquençage des télomères (annexe 1). Cette technique permet à la fois l'analyse de la longueur et de la nature des répétitions télomériques mais seul un télomère marqué, en l'occurrence le télomère du chromosome V-R dans notre cas (figure 12A), peut être suivi. Le fait de placer le marqueur génétique *ADE2* à l'extrémité du chromosome V-R résulte en une séquence sous-télomérique artificielle mais malgré ce fait les longueurs des tracts terminales TG₁₋₃ correspondent à celles de ceux de télomères WT. Dès lors, on peut supposer que l'homéostasie des télomères n'est pas perturbée et que l'évolution au télomère du chromosome V-R est semblable à celle de tous les autres télomères (télomères X et X-Y') (Diede et Gottschling, 1999, Marcand et al. 1999, Ray et Runge, 1999).

Les récents travaux de Alexander et al. et Brevet et al. nous ont permis de mieux comprendre l'homéostasie des télomères de levures humanisées. Ces groupes rapportent qu'un télomère marqué constitué exclusivement de répétitions télomériques humaines (figure 21C) peut être maintenu de façon stable chez la levure. Néanmoins nos résultats montrent que le remplacement complet des répétitions levures n'aurait pas lieu *in vivo*, au moins à travers les 2500 Gén. de culture. La composition en protéines des télomères de levures humanisées a été déterminée par des expériences d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIPs) (Alexander et al., 2003).

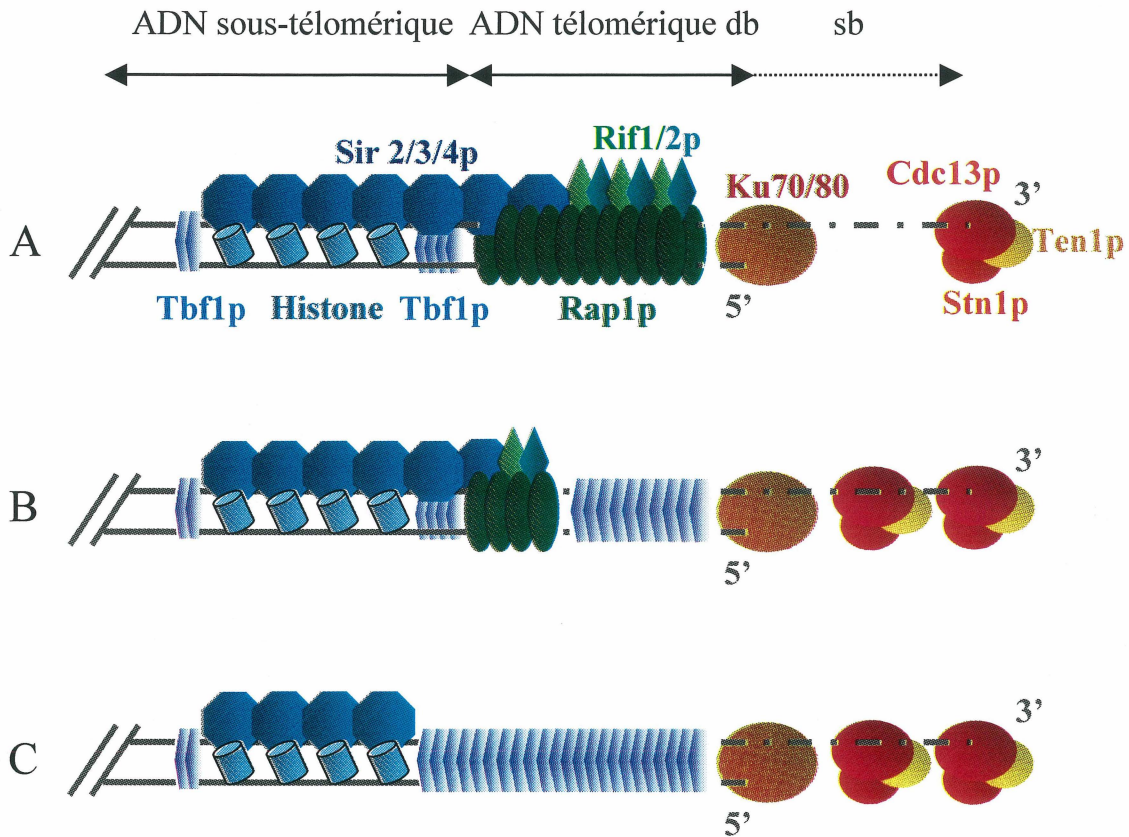


Figure 21 : chromatine télomérique chez différentes souches de levure
 Certaines protéines associées aux télomères de différentes souches de levure sont représentées : (A) protéines associées aux télomères d'une souche WT; (B) souche humanisée; (C) souche avec un télomère marqué complètement humain (télomère VII-L avec seulement des répétitions télomériques humaines [T₂AG₃/C₃TA₂] – Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003).

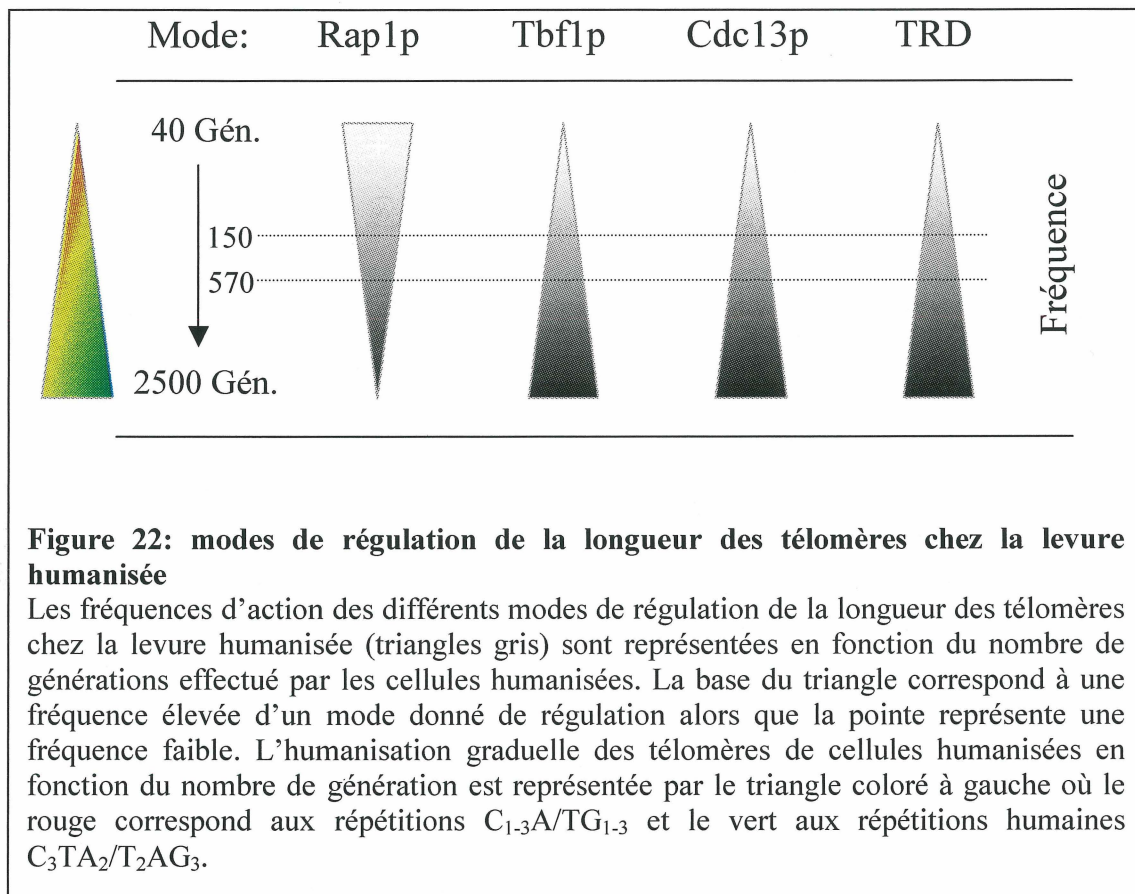
Un télomère constitué purement de répétitions humaines [C₃TA₂/T₂AG₃] ne lie ni Rap1p ni Rif1p/Rif2p alors que Cdc13p et Tbf1p sont liés de façon efficace (Alexander et Zakian, 2003) (figure 21C). Rap1p aurait donc pour seul rôle essentiel l'activation transcriptionnelle. Un télomère mixte constitué de répétitions levures et de répétitions humaines distales lie en quantité moindre Rap1p et Rif1p/Rif2p, alors qu'un enrichissement en Tbf1p et Cdc13p est observé par rapport à la même souche contrôle

avec des répétitions télomériques levures seulement (Alexander et Zakian, 2003) (figures 21B et 21A).

L'évolution des télomères de cellules humanisées en fonction de l'accumulation des divisions cellulaires (figure 13) est le résultat de l'humanisation de la télomérase de levure au départ, dont les effets se répercutent sur les protéines associées aux télomères (Cf. paragraphe précédent) (figure 21B) et sur la régulation de la longueur de ses télomères (figure 22).

Durant une phase initiale, l'ajout des premières répétitions humaines perturbe le nombre de sites de liaison de Rap1p et diminue l'affinité de liaison de Cdc13p : les répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ dans les portions plus internes des télomères sont graduellement remplacées par des répétitions mutantes $[C_3TA_2/T_2AG_3]$. Il en résulte une diminution des répétitions télomériques de ~150 nt seulement après quelques générations (figures 10 et 13, 40 Gén.). Néanmoins les télomères sont maintenus à une longueur courte et stable et deux hypothèses pourraient expliquer cet événement : Tbf1p, qui se lie aux séquences nouvellement formées $[C_3TA_2/T_2AG_3]$, aurait un effet plus répressif sur le système de régulation de la longueur des télomères par rapport au complexe Rap1p/Rif1p/Rif2p; et/ou le fait que Cdc13p ait moins d'affinité pour les répétitions télomériques humaines par rapport aux répétitions levures pourrait compromettre l'accès de la télomérase aux télomères humanisés. Du début de l'humanisation des télomères jusqu'à 150 Gén., la quantité de répétitions levures restante est suffisante pour lier un nombre satisfaisant de molécules Rap1p et on peut présumer à ce stade que le mode de régulation de la longueur des télomères est majoritairement dépendant du complexe autour de Rap1p par rapport aux systèmes de régulation via Tbf1p et Cdc13p (figure 22).

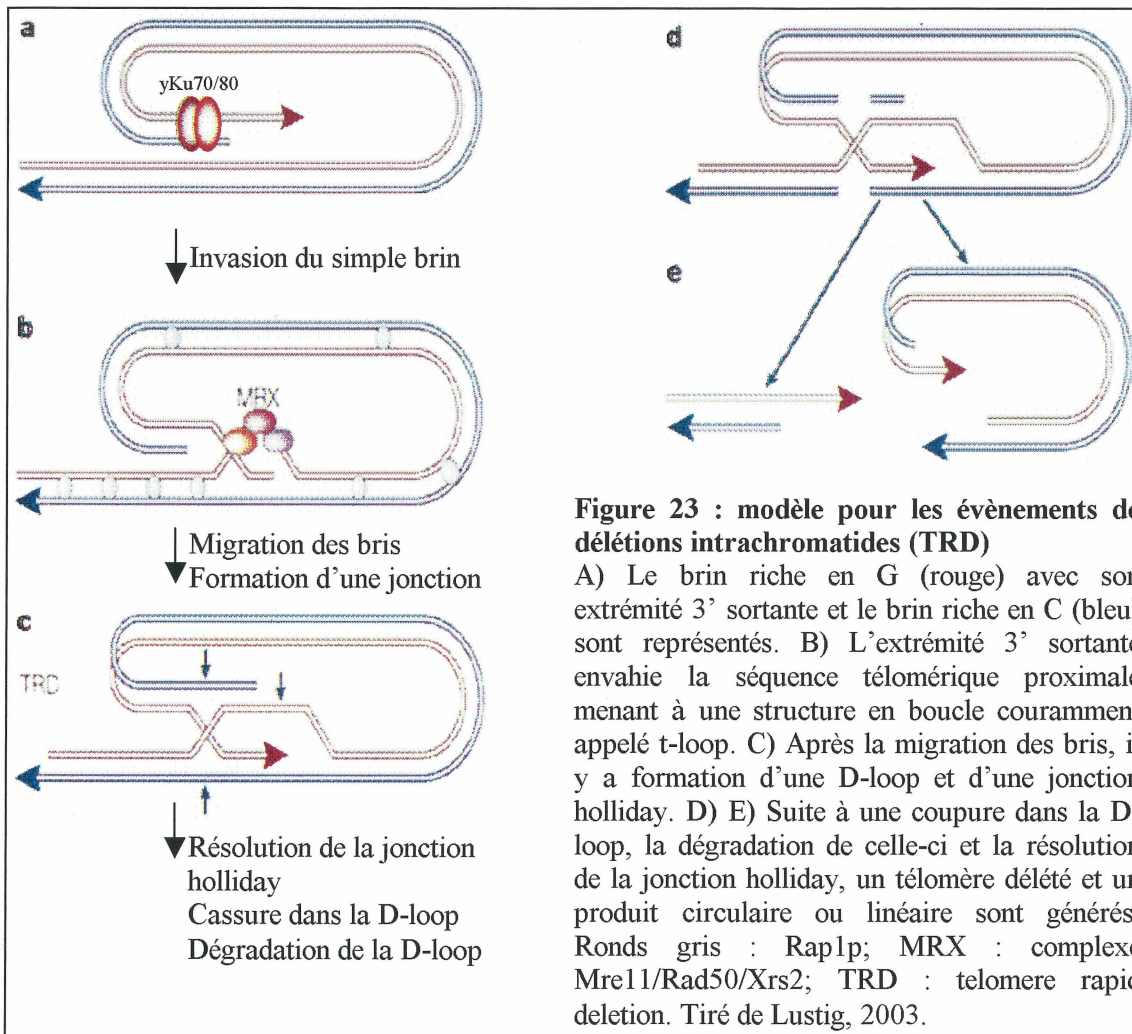
La transition dans les modes de régulation de la longueur des télomères s'observe entre 150 et 570 Gén., là où les télomères deviennent tous humanisés, toujours aussi courts mais un peu plus hétérogènes. Le remplacement des répétitions levures par les répétitions humaines se fait de plus en plus en profondeur et donc de moins en moins de sites de liaison pour Rap1p sont présents aux télomères. La régulation de la longueur des télomères basculerait selon un mode qui n'est plus majoritaire à Rap1p (figure 22).



Dans une dernière étape, 570 à 2500 Gén., les répétitions mutantes ont remplacé la plupart des répétitions WT loin au sein du télomère pour ne laisser qu'environ 50 bp de répétitions levures (figures 10 et 13) qui peuvent potentiellement lier seulement deux molécules Rap1p. De plus de longues extensions humaines simple brin sont générées (figure 10A). À un tel niveau de remplacement de séquence, la diminution du nombre de

sites de liaisons télomériques pour Rap1p devrait induire une élongation massive et non contrôlé des télomères comme dans les allèles *rap1t* dépourvus de la partie C-terminale chez *K. lactis* (Krauskopf et Blackburn; 1998). En outre, la quasi absence des protéines Rif, qui limitent l'action de la télomérase (Teng et al., 2000), est normalement associée avec une augmentation de la longueur des télomères (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). Ce phénotype n'est pas tant prononcé dans nos souches humanisées, tout de même les télomères deviennent un peu plus long et plus hétérogènes et ce seulement après une certaine période de latence durant laquelle les télomères étaient stables et courts. La période de latence requiert la présence de répétitions internes WT, extrêmement résistantes au remplacement de séquences, pour maintenir la régulation de la longueur des télomères; seulement après que la plupart des répétitions levures aient été remplacées par les répétitions humaines, une augmentation légère a lieu.

Les nombreux complexes recrutés aux télomères par la liaison de molécules Cdc13p aux longues extensions humaines 3' simple brin pourrait être une réponse à la diminution du mode de régulation via Rap1p où ceux ci assureraient les fonctions de stabilité des télomères en régulant négativement l'accès de la télomérase (figures 21 et 22). Également les évènements de délétions intrachromatides – TRD – pourraient expliquer l'hétérogénéité des télomères. La perte progressive des sites de liaison pour Rap1p augmenterait le taux de TRD tandis que la précision de ce mécanisme serait perdue. De plus, les longues extensions humaines 3' simple brin favoriseraient le TRD car ces structures en boucles initieraient les évènements de délétions (figure 23) (voir section suivante).



En résumé, il y a plusieurs mécanismes qui contribuent au taux de remplacement des répétitions télomériques chez la levure humanisée et qui agissent à des fréquences très différentes. Dans un premiers temps, le système de mesure de la longueur des télomères via le comptage des molécules Rap1p liées aux répétitions levures est le mode principal de régulation; et suite à l'humanisation progressive des télomères et donc à la modification de chromatine télomérique, les modes de régulation de la longueur des télomères via Tbf1p, Cdc13p et le TRD augmenteraient en fréquence d'action et compenseraient à eux trois le défaut de régulation via Rap1p due au manque de sites de

liaisons pour cette molécule (figure 22). La levure humanisée reste donc un modèle idéal pour étudier les mécanismes qui régulent la longueur des télomères en particulier le TRD, et ces résultats complètent les travaux réalisés chez la levure *K. lactis* (McEachern et al., 2002; McEachern et Blackburn, 1995; Krauskopf et Blackburn, 1998).

La levure humanisée : un modèle pour étudier les fonctions des télomères

L'ARN de la télomérase est utile car la mutation de sa région matrice permet l'altération expérimentale des séquences télomériques. En effet, ce système de télomères humains chez *S. cerevisiae* (encore trop peu exploité) reste un outil privilégié pour étudier les fonctions des télomères.

Un point majeur de cette étude est la mise en évidence de longues extensions humaines simple brin chez les cellules humanisées ayant accumulées un nombre important de divisions cellulaires (figure 10A, pistes 12 et 14). Chez les cellules de mammifères cette extension peut atteindre jusqu'à plus de 200 nt (McElligott et Wellinger, 1997; Wright et al., 1997; Makarov et al., 1997; van Steensel et al., 1998; Huffman et al., 2000) et forme des structures en boucles nommées t-loops qui permettent la séquestration de l'extension 3' en envahissant la région télomérique proximale (Griffith et al., 1999; Munoz-Jordan et al., 2001; Murti et Prescott, 1999). Chez la levure *S. cerevisiae* de telles structures de repliements existent également (figure 3) mais le statut de l'extension 3' dans ces structures est inconnu (de Bruin et al., 2001; Strahl-Bolsinger et al., 1997). Le fait que la levure humanisée ait seulement ~150 pb de

répétitions télomériques comparé à ~3000 pb chez l'humain pourrait engendrer des contraintes topologiques dans la formation d'une boucle, néanmoins des boucles de 150-800 pb ont été mises en évidence chez les trypanosomes (Munoz-Jordan et al., 2001). Des expériences de microscopie électronique, déjà menées chez les cellules de mammifères et les trypanosomes, seraient difficilement envisageables chez la levure (et encore moins chez la levure humanisée) car la longueur minimale du simple brin doit être d'au moins 75 nt pour visualiser les boucles. Une autre alternative s'impose donc pour vérifier l'existence de t-loop chez la levure : mettre en évidence que des mécanismes de délétions intrachromatides ont lieu. En effet, ces événements TRD seraient initiés par l'invasion du simple brin télomérique dans le duplex télomérique proximal, ce qui résulte en la formation d'une structure t-loop (figure 23). Nos résultats suspectent que de tels événements interviendraient dans le système de régulation de la longueur des télomères car la présence de longues extensions simple brin chez les levures où l'humanisation des télomères est avancée favoriserait cette action.

De multiples mécanismes sembleraient jouer chacun ou en synergie un rôle dans la régulation de la longueur des télomères de levures humanisées. Le taux de TRD serait augmenté dans nos souches humanisées et le mécanisme de mesure de la longueur des télomères par comptage des molécules Rap1p serait progressivement remplacé par un mode Rap1p indépendant qui serait assuré par Tbf1p. Ce modèle est donc idéal pour étudier les différents modes de mesure de la longueur des télomères ainsi que le taux de renouvellement des séquences télomériques.

Les travaux de Alexander et Zakian ont démontré qu'un certain nombre de protéines étaient associées aux télomères de levures humanisées, notamment Rap1p, Tbf1p, Cdc13p et Yku80p. Il serait intéressant de compléter cette étude sur la composition en protéines des télomères humanisés (en comparant avec la composition en protéines des télomères de souches WT) de façon à avoir une idée plus précise sur les facteurs qui réguleraient ces nouvelles séquences télomériques.

Ce modèle de levure humanisée pourra servir de contrôle dans de nombreuses études, là où applicable, car la seule différence par rapport à une souche WT et qui conduit à l'ajout de répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure est l'humanisation de la séquence matrice de *TLC1*.

Complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure

Un second volet de cette étude a été consacré à l'élaboration d'un modèle chez *S. cerevisiae* où le maintien des télomères de levures humanisées serait assuré par les composantes centrales de la télomérase humaine, *hTERT* et *hTR*, et non par ceux de la télomérase de levure, *EST2* et *TLC1*. La génération d'un tel système hétérologue pourrait se révéler utile dans l'étude de la régulation de la télomérase humaine. Plusieurs travaux laisseraient supposer qu'une complémentation fonctionnelle est possible mais aucun regroupement n'a été initié à date pour parvenir à cet objectif.

L'ARN de la télomérase humaine (*hTR*) peut être exprimé de façon stable chez la levure *S. cerevisiae* (Dez et al., 2001); la co-expression de *hTR* et *hTERT* chez *S.*

cerevisiae permet l'assemblage d'une RNP active capable d'ajouter des répétitions télomériques humaines *in vitro* (figure 16A), et peut être purifié par immunoprécipitation (Bachand et al., 1999); un substrat spécifique pour la télomérase humaine, le simple brin humain, peut être généré chez les levures humanisées (figure 10A); la composante catalytique de la télomérase humaine hTERT et supposément son ARN associé hTR sont correctement situés à leur site d'action à savoir le noyau (figure 17); et d'après le tableau 2, de nombreuses protéines associées aux télomères ou à la télomérase sont conservées entre la levure *S. cerevisiae* et l'humain.

Malgré ces prérequis, la télomérase humaine (hTERT et hTR) n'est pas capable de maintenir la survie d'une souche de levure humanisée ou WT dépourvue de la télomérase de levure (EST2 et TLC1(h)) (tableau 9). Les soupçons devenaient donc orientés vers un défaut dans le recrutement de la télomérase humaine aux télomères. Nous avons donc testé une fusion entre hTERT et CDC13_{DBD} (p426/CDC13_{DBD}-hTERT), laquelle complémente une souche Cdc13-1ts à 35 °C, de façon à forcer le recrutement aux télomères et ainsi éliminer le besoin de facteurs additionnels, mais celle-ci manque aussi de complémente (tableau 9). Ce résultat montre de façon sans équivoque que le défaut d'activité télomérase humaine aux télomères humanisés n'est pas du à un défaut de recrutement de protéine hTERT aux télomères. De plus, une fusion entre hTERT et hTR, où l'activité télomérase humaine est dix fois supérieure par rapport au même gènes exprimés sur deux plasmides indépendant (Bachand et al., 2000), montre que la télomérase humaine déjà sous forme de RNP n'aide en rien à la survie des cellules *est2 tlc1(h)*. Finalement, un résultat similaire est observé lors de la co-expression de deux

orthologues humains de Sc Es1p, EST1A et EST1B (figure 19), en combinaison avec les différentes fusions TERT et l'ARN humain TR.

Des différents systèmes que nous avons testé, nous pouvons donc conclure que la télomérase humaine n'est pas active aux télomères de levures humanisées (ni WT) et ne peut donc compléter l'absence de la télomérase de levure.

Chez l'humain, la masse moléculaire de l'holoenzyme télomérase est estimée à plus de 1000 kDa (Schnapp et al., 1998). Dès lors, il est raisonnable de suggérer que d'autres cofacteurs essentiels pour l'activité *in vivo* de la télomérase humaine peuvent jouer un rôle aux télomères hétérologues ou restent à découvrir. Tout dernièrement, il a été publié que la fusion entre hPot1 et hTERT muté dans son domaine DAT, impliqué dans les associations télomère-télomérase (cette mutation rend l'enzyme catalytiquement active mais incapable d'allonger les télomères *in vivo*), complétait cette mutation en allongeant les télomères (Armbruster et al., 2004) plus efficacement qu'une fusion hTRF2-hTERT (Armbruster et al., 2003). Il serait donc très intéressant de tester une fusion de ce type pour sauver la sénescence de nos levures humanisées *tlc1h est2*.

Finalement, il est possible que la télomérase humaine ne puisse jamais agir aux télomères de levures si l'on considère que la régulation de ces deux télomérases et la fonction des télomères dans ces deux organismes soient trop distantes. En effet, les composantes hTR et hTERT ont co-évolué fonctionnellement comme un complexe ribonucléoprotéique pour maintenir la longueur des télomères. Une telle co-évolution au sein d'une espèce pourrait résulter en l'incompatibilité inter-espèces entre les

composantes de l'enzyme (tableau 9). Ce degré d'incompatibilité corrèle avec la distance d'évolution : par exemple, l'ARN de la télomérase de lapin est fonctionnellement compatible avec TERT humain (Xiang et al., 2000), alors que l'ARN de souris de l'est pas (Chen et Greider, 2003). Les éléments qui assurent une telle incompatibilité entre espèces pourraient alors représenter une interaction ARN-ARN ou ARN-protéine spécifique de l'espèce.

Une complémentation fonctionnelle chez *S. cerevisiae* entre la télomérase humaine et la télomérase de levure est une question qui reste en suspend. On espère que ces travaux inspireront à de nouvelles idées dans l'accomplissement d'un tel système qui, une chose est sûr, ouvrira des horizons inédits dans l'étude des télomères et la télomérase.

REMERCIEMENTS

À **Éveline Clair** dont les travaux ont contribué en grande partie à la réalisation de ce projet ainsi que le groupe de Chantal Autexier, toute l'équipe Wellinger en particulier Lulu (sans oublier les anciens du laboratoire), le département de Microbiologie et Infectiologie, mon jury composé de Antonio Conconi, Guylain Boissonneault et **Raymund Wellinger**, lequel je remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire et sa confiance accordée tout au long de cette maîtrise.



de la neige

LISTE DES RÉFÉRENCES

Adams Martin, A., Dionne, I., Wellinger, R.J. and Holm, C. (2000) The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol Cell Biol*, **20**, 786-796.

Alexander, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *Embo J*, **22**, 1688-1696.

Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C.E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J.P., Sabatier, L. and Gilson, E. (2002) Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol*, **22**, 3474-3487.

Arai, K., Masutomi, K., Khurts, S., Kaneko, S., Kobayashi, K. and Murakami, S. (2002) Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. *J Biol Chem*, **277**, 8538-8544.

Armbruster, B.N., Banik, S.S., Guo, C., Smith, A.C. and Counter, C.M. (2001) N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. *Mol Cell Biol*, **21**, 7775-7786.

Armbruster, B.N., Etheridge, K.T., Broccoli, D. and Counter, C.M. (2003) Putative telomere-recruiting domain in the catalytic subunit of human telomerase. *Mol Cell Biol*, **23**, 3237-3246.

Armbruster, B.N., Linardic, C.M., Veldman, T., Bansal, N.P., Downie, D.L. and Counter, C.M. (2004) Rescue of an hTERT mutant defective in telomere elongation by fusion with hPot1. *Mol Cell Biol*, **24**, 3552-3561.

Autexier, C., Pruzan, R., Funk, W.D. and Greider, C.W. (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *Embo J*, **15**, 5928-5935.

Bacchetti, S. (1996) Telomere maintenance in tumor cells. *Cancer Surv.*, **28**, 197-216

Bachand, F. and Autexier, C. (1999) Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 38027-38031.

Bachand, F. and Autexier, C. (2001) Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol Cell Biol*, **21**, 1888-1897.

Bachand, F., Kukolj, G. and Autexier, C. (2000) Expression of hTERT and hTR in cis reconstitutes and active human telomerase ribonucleoprotein. *Rna*, **6**, 778-784.

Bah, A., Bachand, F., Clair, E., Autexier, C. and Wellinger, R.J. (2004) Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1917-1927.

Bailey, S.M., Meyne, J., Chen, D.J., Kurimasa, A., Li, G.C., Lehnert, B.E. and Goodwin, E.H. (1999) DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14899-14904.

Baumann, P. and Cech, T.R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292**, 1171-1175.

Baumann, P., Podell, E. and Cech, T.R. (2002) Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol*, **22**, 8079-8087.

Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001) Telomere position effect in human cells. *Science*, **292**, 2075-2077.

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

Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2000) Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding. *Mol Biol Cell*, **11**, 3329-3340.

Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, **21**, 6151-6160.

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

Bianchi, A., Stansel, R.M., Fairall, L., Griffith, J.D., Rhodes, D. and de Lange, T. (1999) TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *Embo J*, **18**, 5735-5744.

Biessmann, H. and Mason, J.M. (1992) Genetics and molecular biology of telomeres. *Adv Genet*, **30**, 185-249.

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

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

Bilaud, T., Koering, C.E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1996) The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1294-1303.

Blackburn, E.H. (1992) Telomerases. *Annu Rev Biochem*, **61**, 113-129.

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

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

Blackburn, E.H. and Greider, C.W. (1995) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.

Blasco, M.A., Funk, W., Villeponteau, B. and Greider, C.W. (1995) Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science*, **269**, 1267-1270.

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

Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4639-4648.

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

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.

Brand, A.H., Micklem, G. and Nasmyth, K. (1987) A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell*, **51**, 709-719.

Brevet, V., Berthiau, A.S., Civitelli, L., Donini, P., Schramke, V., Geli, V., Ascenzioni, F. and Gilson, E. (2003) The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. *Embo J*, **22**, 1697-1706.

Brigati, C., Kurtz, S., Balderes, D., Vidali, G. and Shore, D. (1993) An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 1306-1314.

Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, **17**, 231-235.

Brun, C., Marcand, S. and Gilson, E. (1997) Proteins that bind to double-stranded regions of telomeric DNA. *Trends Cell Biol*

Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A. and Reddel, R.R. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, **3**, 1271-1274.

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

Bryan, T.M., Goodrich, K.J. and Cech, T.R. (2000) Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*, **6**, 493-499.

Cangiano, G. and La Volpe, A. (1993) Repetitive DNA sequences located in the terminal portion of the *Caenorhabditis elegans* chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1133-1139.

Cerezo, A., Kalthoff, H., Schuermann, M., Schafer, B. and Boukamp, P. (2002) Dual regulation of telomerase activity through c-Myc-dependent inhibition and alternative splicing of hTERT. *J Cell Sci*, **115**, 1305-1312.

Cerone, M.A., Londono-Vallejo, J.A. and Bacchetti, S. (2001) Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 1945-1952.

Chai, W., Ford, L.P., Lenertz, L., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem*, **277**, 47242-47247.

Chan, C.S. and Tye, B.K. (1983) Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell*, **33**, 563-573.

Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I. and Lundblad, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev*, **15**, 404-414.

Chang, J.T., Chen, Y.L., Yang, H.T., Chen, C.Y. and Cheng, A.J. (2002) Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem*, **269**, 3442-3450.

Chapon, C., Cech, T.R. and Zaug, A.J. (1997) Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna*, **3**, 1337-1351.

Chen, J.L., Blasco, M.A. and Greider, C.W. (2000) Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, **100**, 503-514.

Chen, J.L. and Greider, C.W. (2003) Template boundary definition in mammalian telomerase. *Genes Dev*, **17**, 2747-2752.

Chikashige, Y., Ding, D.Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M. and Hiraoka, Y. (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science*, **264**, 270-273.

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

Cohn, M. and Blackburn, E.H. (1995) Telomerase in yeast. *Science*, **269**, 396-400.

Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R. and Reddel, R.R. (2003) Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol*, **13**, 942-946.

Colgin, L.M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M.O. and Reddel, R.R. (2000) The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia*, **2**, 426-432.

Cong, Y.S. and Bacchetti, S. (2000) Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem*, **275**, 35665-35668.

Cong, Y.S., Wen, J. and Bacchetti, S. (1999) The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, **8**, 137-142.

Cong, Y.S., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*, **3**, 407-425.

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

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

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*, **11**, 1921-1929.

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

d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q. and Jackson, S.P. (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol*, **11**, 1192-1196.

de Bruin, D., Kantrow, S.M., Liberatore, R.A. and Zakian, V.A. (2000) Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 7991-8000.

de Bruin, D., Zaman, Z., Liberatore, R.A. and Ptashne, M. (2001) Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast. *Nature*, **409**, 109-113.

de Lange, T. (1994) Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2882-2885.

de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, **21**, 532-540.

de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M. and Varmus, H.E. (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, **10**, 518-527.

Dernburg, A.F., Sedat, J.W. and Hawley, R.S. (1996) Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell*, **86**, 135-146.

Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2001) Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res*, **29**, 598-603.

Diede, S.J. and Gottschling, D.E. (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell*, **99**, 723-733.

Dionne, I. and Wellinger, R.J. (1996) 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.

Dragon, F., Pogacic, V. and Filipowicz, W. (2000) In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol*, **20**, 3037-3048.

DuBois, M.L., Diede, S.J., Stellwagen, A.E. and Gottschling, D.E. (2000) All things must end: telomere dynamics in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **65**, 281-296.

Espejel, S., Franco, S., Rodriguez-Perales, S., Bouffler, S.D., Cigudosa, J.C. and Blasco, M.A. (2002) Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J*, **21**, 2207-2219.

Etheridge, K.T., Banik, S.S., Armbruster, B.N., Zhu, Y., Terns, R.M., Terns, M.P. and Counter, C.M. (2002) The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem*, **277**, 24764-24770.

Evans, S.K. and Lundblad, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**, 117-120.

Evans, S.K. and Lundblad, V. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci*, **113**, 3357-3364.

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

Fiset, S. and Chabot, B. (2001) hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2268-2275.

Flint, J., Bates, G.P., Clark, K., Dorman, A., Willingham, D., Roe, B.A., Micklem, G., Higgs, D.R. and Louis, E.J. (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, **6**, 1305-1313.

Ford, L.P., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001a) The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *Rna*, **7**, 1068-1075.

Ford, L.P., Suh, J.M., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol Cell Biol*, **20**, 9084-9091.

Ford, L.P., Zou, Y., Pongracz, K., Gryaznov, S.M., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001b) Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem*, **276**, 32198-32203.

Forstemann, K., Hoss, M. and Lingner, J. (2000) Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2690-2694.

Fourel, G., Revardel, E., Koering, C.E. and Gilson, E. (1999) Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *Embo J*, **18**, 2522-2537.

Friedman, K.L. and Cech, T.R. (1999) Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev*, **13**, 2863-2874.

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

Gilley, D. and Blackburn, E.H. (1996) Specific RNA residue interactions required for enzymatic functions of Tetrahymena telomerase. *Mol Cell Biol*, **16**, 66-75.

Gilley, D., Lee, M.S. and Blackburn, E.H. (1995) Altering specific telomerase RNA template residues affects active site function. *Genes Dev*, **9**, 2214-2226.

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

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

Grandin, N., Damon, C. and Charbonneau, M. (2000) Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and stn1 To regulate telomerase recruitment. *Mol Cell Biol*, **20**, 8397-8408.

Grandin, N., Damon, C. and Charbonneau, M. (2001) Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J*, **20**, 1173-1183.

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

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

Greider, C.W. (1999) Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, **97**, 419-422.

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

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

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. and de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503-514.

Grobelny, J.V., Kulp-McEliece, M. and Broccoli, D. (2001) Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet*, **10**, 1953-1961.

Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H., Meyerson, M. and Weinberg, R.A. (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [see comments]. *Nat Med*, **5**, 1164-1170.

Hardy, C.F., Sussel, L. and Shore, D. (1992) A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev*, **6**, 801-814.

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

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

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

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

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

Hemann, M.T. and Greider, C.W. (1999) G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3964-3969.

Henderson, E. (1995) Telomere DNA structure. In Blackburn, E.H. and Greider, C.W. (eds.), *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 11-34.

Henning, K.A., Moskowitz, N., Ashlock, M.A. and Liu, P.P. (1998) Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5667-5671.

Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., Wright, W.E. and White, M.A. (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*, **13**, 817-826.

Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T. and Chen, D.J. (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev*, **14**, 2807-2812.

Huard, S., Moriarty, T.J. and Autexier, C. (2003) The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4059-4070.

Huffman, K.E., Levene, S.D., Tesmer, V.M., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem*, **275**, 19719-19722.

Hughes, T.R., Evans, S.K., Weilbaecher, R.G. and Lundblad, V. (2000) The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol*, **10**, 809-812.

Jones, J.M., Gellert, M. and Yang, W. (2001) A Ku bridge over broken DNA. *Structure (Camb)*, **9**, 881-884.

Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K. and Lingner, J. (2002) Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci*, **27**, 572-579.

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

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. and Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.

Kim, S.H., Kaminker, P. and Campisi, J. (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells [see comments]. *Nat Genet*, **23**, 405-412.

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

Kirk, K.E., Harmon, B.P., Reichardt, I.K., Sedat, J.W. and Blackburn, E.H. (1997) Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation [see comments]. *Science*, **275**, 1478-1481.

Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P. and Prescott, D.M. (1981) 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.

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

Krauskopf, A. and Blackburn, E.H. (1998) Rap1 protein regulates telomere turnover in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12486-12491.

Kyrion, G., Boakye, K.A. and Lustig, A.J. (1992) C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 5159-5173.

Lai, C.K., Mitchell, J.R. and Collins, K. (2001) RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, **21**, 990-1000.

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

Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E. and Greider, C.W. (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*, **152**, 143-152.

Le, S., Sternglanz, R. and Greider, C.W. (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell*, **11**, 999-1010.

LeBel, C., Larrivée, M., Bah, A., Laterreur, N., Lévesque, N. and Wellinger, R.J. (2004) Assessing telomeric phenotypes. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press (In press).

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

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

Li, B. and Lustig, A.J. (1996) A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **10**, 1310-1326.

Li, B., Oestreich, S. and de Lange, T. (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell*, **101**, 471-483.

Lin, J., Smith, D.L. and Blackburn, E.H. (2004) Mutant telomere sequences lead to impaired chromosome separation and a unique checkpoint response. *Mol Biol Cell*, **15**, 1623-1634.

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

Lin, J.J. and Zakian, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13760-13765.

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

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

Lingner, J., Hendrick, L.L. and Cech, T.R. (1994) Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev*, **8**, 1984-1998.

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

Liu, Z.P. and Tye, B.K. (1991) A yeast protein that binds to vertebrate telomeres and conserved yeast telomeric junctions. *Genes Dev*, **5**, 49-59.

Loayza, D. and De Lange, T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, **424**, 1013-1018.

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

Louis, E.J. (1995) The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 1553-1573.

Louis, E.J. and Haber, J.E. (1990a) Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **124**, 547-559.

Louis, E.J. and Haber, J.E. (1990b) The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics*, **124**, 533-545.

Louis, E.J. and Haber, J.E. (1992) The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 559-574.

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

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

Lustig, A.J. (2001) Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions. *Nat Struct Biol*, **8**, 297-299.

Lustig, A.J. (2003) Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet*, **4**, 916-923.

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

Marcand, S., Brevet, V. and Gilson, E. (1999) Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *Embo J*, **18**, 3509-3519.

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

Masutomi, K., Kaneko, S., Hayashi, N., Yamashita, T., Shirota, Y., Kobayashi, K. and Murakami, S. (2000) Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. *J Biol Chem*, **275**, 22568-22573.

Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., Weinberg, R.A., Stewart, S.A. and Hahn, W.C. (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, **114**, 241-253.

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

McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, **26**, 234-282.

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

McEachern, M.J. and Blackburn, E.H. (1995) Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature*, **376**, 403-409.

McEachern, M.J. and Blackburn, E.H. (1996) Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev*, **10**, 1822-1834.

McEachern, M.J. and Hicks, J.B. (1993) Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **13**, 551-560.

McEachern, M.J., Iyer, S., Fulton, T.B. and Blackburn, E.H. (2000a) Telomere fusions caused by mutating the terminal region of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11409-11414.

McEachern, M.J., Krauskopf, A. and Blackburn, E.H. (2000b) Telomeres and Their Control. *Annu Rev Genet*, **34**, 331-358.

McEachern, M.J., Underwood, D.H. and Blackburn, E.H. (2002) Dynamics of telomeric DNA turnover in yeast. *Genetics*, **160**, 63-73.

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

Melek, M., Davis, B.T. and Shippen, D.E. (1994) Oligonucleotides complementary to the *Oxytricha nova* telomerase RNA delineate the template domain and uncover a novel mode of primer utilization. *Mol Cell Biol*, **14**, 7827-7838.

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. and Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**, 785-795.

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

Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y.S., Wen, J., Hirte, H.W., Piaggio, G., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Bacchetti, S. and Farsetti, A. (2000) Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 3764-3771.

Mitchell, J.R. and Collins, K. (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*, **6**, 361-371.

Mitchell, J.R., Wood, E. and Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, **402**, 551-555.

Moriarty, T.J., Huard, S., Dupuis, S. and Autexier, C. (2002) Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Mol Cell Biol*, **22**, 1253-1265.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. and Wu, J.R. (1988) 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.

Muller, H.J. (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net*, **13**, 181-195, 198.

Munoz-Jordan, J.L., Cross, G.A., Lange, T. and Griffith, J.D. (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J*, **20**, 579-588.

Murti, K.G. and Prescott, D.M. (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14436-14439.

Nakamura, T.M. and Cech, T.R. (1998) Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, **92**, 587-590.

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

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

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

Nugent, C.I. and Lundblad, V. (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev*, **12**, 1073-1085.

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

Pennock, E., Buckley, K. and Lundblad, V. (2001) Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell*, **104**, 387-396.

Perrem, K., Colgin, L.M., Neumann, A.A., Yeager, T.R. and Reddel, R.R. (2001) Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 3862-3875.

Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M. and Gottschling, D.E. (2001) The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet*, **27**, 64-67.

Pogacic, V., Dragon, F. and Filipowicz, W. (2000) Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol*, **20**, 9028-9040.

Polotnianka, R.M., Li, J. and Lustig, A.J. (1998) The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol*, **8**, 831-834.

Ponzi, M., Pace, T., Dore, E. and Frontali, C. (1985) Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *Embo J*, **4**, 2991-2995.

Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B. and Petes, T.D. (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 582-585.

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

Prescott, J. and Blackburn, E.H. (1997b) Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev*, **11**, 528-540.

Prescott, J.C. and Blackburn, E.H. (2000) Telomerase RNA template mutations reveal sequence-specific requirements for the activation and repression of telomerase action at telomeres. *Mol Cell Biol*, **20**, 2941-2948.

Qi, H. and Zakian, V.A. (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev*, **14**, 1777-1788.

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

Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P. and Lingner, J. (2003) A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol*, **13**, 568-574.

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

Ritchie, K.B., Mallory, J.C. and Petes, T.D. (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6065-6075.

Samper, E., Goytisolo, F.A., Slijepcevic, P., van Buul, P.P. and Blasco, M.A. (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep*, **1**, 244-252.

Schnapp, G., Rodi, H.P., Rettig, W.J., Schnapp, A. and Damm, K. (1998) One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3311-3313.

Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E. and Geli, V. (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet*, **36**, 46-54.

Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K. and Tsuruo, T. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *Embo J*, **19**, 2652-2661.

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

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

Shay, J.W. and Wright, W.E. (1996) Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol*, **8**, 66-71.

Shippen-Lentz, D. and Blackburn, E.H. (1990) Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science*, **247**, 546-552.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

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

Smith, C.D. and Blackburn, E.H. (1999) Uncapping and deregulation of telomeres lead to detrimental cellular consequences in yeast. *J Cell Biol*, **145**, 203-214.

Smith, C.D., Smith, D.L., DeRisi, J.L. and Blackburn, E.H. (2003) Telomeric protein distributions and remodeling through the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**, 556-570.

Smith, J., Zou, H. and Rothstein, R. (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie*, **82**, 71-78.

Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A. and de Lange, T. (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres [see comments]. *Science*, **282**, 1484-1487.

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G. and de Lange, T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, **20**, 1659-1668.

Snow, B.E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R.M., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2003) Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol*, **13**, 698-704.

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

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

Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R. and Gottschling, D.E. (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev*, **17**, 2384-2395.

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

Sugawara, N. and Szostak, J.W. (1986) Telomeres of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Suppl.)*, **1**, 373.

Suka, N., Luo, K. and Grunstein, M. (2002) Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet*, **32**, 378-383.

Sussel, L. and Shore, D. (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7749-7753.

Taggart, A.K., Teng, S.C. and Zakian, V.A. (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science*, **297**, 1023-1026.

Teng, S.C., Chang, J., McCowan, B. and Zakian, V.A. (2000) Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell*, **6**, 947-952.

Teng, S.C. and Zakian, V.A. (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 8083-8093.

Tesmer, V.M., Ford, L.P., Holt, S.E., Frank, B.C., Yi, X., Aisner, D.L., Ouellette, M., Shay, J.W. and Wright, W.E. (1999) Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol Cell Biol*, **19**, 6207-6216.

Tham, W.H. and Zakian, V.A. (2002) Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene*, **21**, 512-521.

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

Tsukamoto, Y., Taggart, A.K. and Zakian, V.A. (2001) The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol*, **11**, 1328-1335.

Ulaner, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Oruganti, H., Giudice, L.C. and Hoffman, A.R. (2000) Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer*, **85**, 330-335.

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

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

Vassetzky, N.S., Gaden, F., Brun, C., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1999) Taz1p and Teb1p, two telobox proteins in *Schizosaccharomyces pombe*, recognize different telomere-related DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4687-4694.

Vega, L.R., Mateyak, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 948-959.

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

Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D. and Hannon, G.J. (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev*, **12**, 1769-1774.

- Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, **239**, 197-201.
- 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. and Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**, 498-502.
- Wellinger, R.J., Ethier, K., Labrecque, P. and Zakian, V.A. (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell*, **85**, 423-433.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1993a) 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.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1993b) Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell*, **72**, 51-60.
- Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K. and Lingner, J. (2001) Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *Embo J*, **20**, 3526-3534.

Wold, M.S. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, **66**, 61-92.

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

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

Wright, J.H. and Zakian, V.A. (1995) Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1454-1460.

Wright, W.E., Brasiskyte, D., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1996) Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *Embo J*, **15**, 1734-1741.

Wright, W.E. and Shay, J.W. (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol*, **27**, 383-389.

Xiang, H., Wang, J., Mao, Y.W. and Li, D.W. (2000) hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 503-510.

Yang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Huang, H. and Weissman, S.M. (2002) Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp Cell Res*, **277**, 201-209.

Yi, X., White, D.M., Aisner, D.L., Baur, J.A., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2000) An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia*, **2**, 433-440.

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

Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. and Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs [see comments]. *Nature*, **344**, 126-132.

Zakian, V.A. (1989) Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet*, **23**, 579-604.

Zakian, V.A. and Blanton, H.M. (1988) Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 2257-2260.

Zhou, J., Hidaka, K. and Futcher, B. (2000) The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Mol Cell Biol*, **20**, 1947-1955.

Zhou, X.Z. and Lu, K.P. (2001) The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell*, **107**, 347-359.

ANNEXE 1

Bah, A., Bachand, F., Clair, E., Autexier, C. and Wellinger, R.J. (2004) Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1917-1927.

Cet article reprend les principaux résultats de cette étude sur les levures humanisées concernant la caractérisation précise des télomères de levure dont la télomérase a été humanisée et l'étude de complémentation entre la télomérase humaine et la télomérase de levure. J'ai réalisé la plupart des expériences publiées dans cet article et ces résultats sont revus dans ce mémoire.

Title Page:

Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast.

Amadou Bah¹, François Bachand^{2, 3}, Éveline Clair^{1, 4}, Chantal Autexier² and Raymund J. Wellinger^{1*}.

1) Dept. of Microbiology and Infectiology, Groupe ARN/RNA Group, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada;

2) Dept. of Anatomy and Cell Biology, Dept. of Medicine, McGill University and Bloomfield Center for Research in Aging, Lady Davis Institute for Medical Research, The Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, Montreal, Canada.

3) Current address: Dept. of Cancer Biology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA

4) Current address: Dept. of Biochemistry, McGill University, Montreal, Canada

* Corresponding author:

phone: 819 564 5214

Fax: 819 564 5392

email: Raymund.Wellinger@Usherbrooke.ca

Keywords:

Telomeres, Telomerase, yeast

ABSTRACT.

The maintenance of telomeric repeat DNA depends on an evolutionarily conserved reverse transcriptase, called telomerase. *In vitro*, only the catalytic subunit and a telomerase-associated RNA are required for the synthesis of species-specific repeat DNA. In an attempt to establish a heterologous system for the study of the human telomerase enzyme, we expressed the two core components and predicted regulatory subunits in the yeast *S. cerevisiae*. We show that adequate substrates for human telomerase can be generated, the expressed enzyme was localized in the nucleus and it had the capacity to synthesize human specific repeats *in vitro*. However, there was no evidence for human telomerase activity at yeast telomeres *in vivo*. Therefore, functional replacement of the yeast telomerase by the human enzyme may require additional human-specific components. We also replaced the template region of the yeast telomerase RNA with one that dictates the synthesis of vertebrate repeats and performed a detailed molecular analysis of the composition of the telomeres upon outgrowth of such strains. The results suggest that vertebrate repeats on yeast telomeres are subject to a very high degree of repeat turnover and show that an innermost tract of 50 bp of yeast repeats are resistant to replacement.

INTRODUCTION.

The ends of eukaryotic chromosomes, the telomeres, are essential to ensure genome stability and to facilitate the complete replication of chromosomal DNA (for recent reviews, see 1-3). Telomeric DNA in most organisms is composed of short direct repeats and a minimal amount of such repeats is essential to fulfill the telomeric functions (4). Telomeric repeat DNA consists of a species-specific length of double-stranded DNA and ends with a 3'-end overhang. In addition, due to the sequence of the repeats, the strand composing the chromosomal 3'-end is usually rich in guanosines (referred to as the G-rich strand, 5). As a consequence of the end-replication problem, the maintenance of a functional tract of telomeric DNA in most systems depends on a specialized reverse transcriptase, called telomerase (1,6). In human cells, telomerase activity is readily detectable in most transformed cell lines, cancer tissue cells and in germ line cells, whereas there is little activity in normal somatic cells (see 7 for a review). This correlation between telomerase activation and tumorigenic transformation of cells has recently been corroborated with cell culture experiments (8). Thus, the telomerase enzyme represents a promising and intensely studied target for anti-cancer therapies (9). In this respect, defined and tractable systems would be of great help to investigate the properties of telomerase.

The telomerase holoenzyme is a ribonucleoprotein (RNP) consisting of a number of proteins and an RNA molecule. The essential core elements, the catalytic protein subunit and the associated RNA, have been identified and cloned from a variety of organisms, including humans (hTERT, hTR) and the yeast *S. cerevisiae* (Est2p, TLC1)(see 10,11 for reviews). *In vitro* studies of reconstituted human enzyme have shown that these two elements alone suffice to provide activity, but the experiments also indicated that additional factors may be needed for *in vivo* maturation, assembly, recruitment and/or activation of the RNP (12-15). Furthermore, genetic studies in yeast have identified several factors that are essential for *in vivo* activity of telomerase at the telomeres (Est1p, Est3p, Cdc13/Est4p, and at least one ATM/ATR related kinase, (16,17), suggesting that the *in vivo* regulation of telomerase is much more complex than the current *in vitro* assays can recapitulate.

Insights regarding the *in vivo* regulation of human telomerase could be obtained by studying human telomerase in a heterologous system, such as yeast. Telomere structure and a number of the known telomerase associated factors appear conserved between human and yeast cells. For example, the species-specific double-stranded telomeric repeats are bound by related proteins (scRap1p, hRAP1/TRF2, TRF1) and these proteins appear to regulate telomere length maintenance in both systems (18,19). In addition, there are clear homologies between the human and yeast catalytic proteins hTERT and Est2p, respectively (10). More recently, human proteins sharing similarities to the yeast telomerase-associated protein Est1p also have been identified and the human hPOT1 protein may be a functional analogue of the yeast Cdc13/Est4p (see 20, for review). In addition to these structural similarities, yeast telomerase will elongate telomeric substrates containing human repeats (21,22). Furthermore, substitutions in the yeast telomerase RNA template region to direct the synthesis of vertebrate-specific repeats results in telomeres containing vertebrate repeats (23). Such so called humanized telomeres in yeast apparently are stable and the mitotic stability of the chromosome containing the human telomeric repeats is not affected (24,25). Finally, the

human telomerase RNA can be stably expressed in yeast (26) and a telomerase activity synthesizing human repeats can be documented by immunoprecipitation from extracts of yeast cells coexpressing hTR and hTERT (27,28). However, despite the functional similarities of the telomere structures, telomerase and associated proteins between human and yeast, it remained unknown whether human telomerase could functionally complement the yeast telomerase in mediating telomere function and cell survival.

Here we report our efforts to reconstitute in yeast a functional human telomerase that is active on yeast telomeres. The results demonstrate that reprogramming the yeast telomerase RNA to template human repeats establishes telomeric end-structures comprising a relatively long 3'-overhang of the humanized G-rich strand. Therefore, a suitable substrate for the human telomerase can be generated on yeast telomeres. Furthermore, we show that the expressed human telomerase subunits do form an active complex and localize to the nucleus. However, despite the presence of all these required prerequisites and the expression of two of the human hEST1 homologues in our yeast system, we were unable to detect any polymerization activity of the human enzyme on yeast telomeres.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and Yeast Strains.

The pTLC1TRP and pTLC1hTRP plasmids were generated in the pRS314 backbone (29). First, pTLC1TRP contains a 2,9 kb NdeI-EcoRI fragment isolated spanning the *TLC1* gene and isolated from pAZ1 (30) in the unique EcoRI site. Second, a 1 kb StuI-NsiI fragment of the *TLC1* gene in pTLC1TRP was replaced by the corresponding fragment isolated from pTLC1h (23). The resulting plasmid, pTLC1hTRP, thus contained the yeast *TLC1* gene with the template region converted to template human repeats. pEST2-LYS2 contains a 4.4 Kb BamHI fragment with the *EST2* gene inserted into the SmaI site of pRS317 (31). The p413-hTR-ADE2 plasmid was created by replacing the original *HIS3* marker gene with the *ADE2* marker gene in p413-hTR (28). Plasmid pEGKT-hTERT (*URA3* marker gene) was described previously (28). p426/CDC13_{DBD}-hTERT (*URA3* marker gene) was generated using a XbaI CDC13_{DBD} fragment fused to a 3.4 Kb XbaI-HindIII hTERT fragment from pEGKT-hTERT (28). The resulting SpeI-HindIII CDC13_{DBD}-hTERT fusion fragment was then cloned into the yeast expression vector p426-GAL1 (32) digested with SpeI and HindIII. pRS422-hTR (*ADE2* marker gene) was produced by cloning a SacI-XhoI fragment from p413-hTR (28) into the pRS422 vector (33) digested with SacI and XhoI. p425-HA2-hEST1A (*LEU2* marker gene) was constructed by inserting a PmeI restriction fragment containing HA2-hEST1A derived from pcDNA3.1-HA2-hEST1A (Snow et al. 2003) into p425-GAL1 (32). p424-HA2-hEST1B (*TRP1* marker gene) was constructed in the same way in p424-GAL1 (32). Note that the expression of the GST-hTERT, CDC13_{DBD}-hTERT, hEST1A and hEST1B proteins as well as the hTR RNA are under the control of the galactose inducible GAL1-promoter. When appropriate, proper plasmid constructs were confirmed by sequencing (fusion proteins and promoter insertions).

RWY12 (*Mata*, *ura3-52*, *lys 2-801*, *ade2-101*, *trp1-Δ1*, *his3-Δ200*, *leu2-Δ1*, *tlc1Δ::LEU2*, VR-ADE2-T) containing pAZ1 (*TLC1*, *URA3*)(34) was the strain used for the long term

telomere sequence replacement study. After selection of cells that had lost pAZ1 on 5-FOA plates, pTLC1TRP or pTLC1hTRP plasmids were introduced. One wild-type (pTLC1TRP-containing clone) and three independent pTLC1hTRP-containing clones respectively were restreaked on selective media for long-term sequence analysis (~2500G).

BY4705 (*Mata/Mata*, *ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG*, *his3Δ200/his3Δ200*, *leu2Δ0/leu2Δ0*, *lys2Δ0/lys2Δ0*, *met15Δ0/met15Δ0*, *trp1Δ63/trp1Δ63*, *ura3Δ0/ura3Δ0*) (33) was the host strain for the complementation study. *TLC1* disruption by KanMx4 was performed by one step PCR gene replacement (33). The deletion of the *EST2* gene was performed by gene displacement using an EcoRI-BamHI fragment containing the *EST2* gene in which an internal 1.4 kb HpaI fragment was replaced by *HIS3*. The first 316 bp and the last 919 bp were homologous to the *EST2* gene. All deletions were confirmed by Southern blotting (data not shown). The resulting BY4705 *tlc1Δ::KanMx4/TLC1*, *est2Δ::HIS3/EST2* strain was then sporulated and selected spores deleted for both genes were first transformed with yeast telomerase plasmids pTLC1TRP (or pTLC1hTRP) and pEST2-LYS2 for maintaining survival. Then human telomerase plasmids pRS422-hTR and pEGKT-hTERT or p426/CDC13_{DBD}-hTERT were introduced. Complementation tests were performed by loss of different plasmids and observation of survival of cells by replating on selective media. Strain YPH499 has been described previously (29) Yeast and bacterial transformations and yeast genetic analyses were performed using standard methods (35-37).

Isolation and detection of telomeric DNA.

Genomic DNA isolation, digestion with XhoI and gel analyses under non-denaturing conditions were described previously (34). Detection of single-stranded human telomeric repeats were performed with a ³²P-labelled (C₃TA₂)_n oligonucleotides. DNA was then denatured and transferred to a Hybond-N+ membrane (Amersham Pharmacia biotech) and hybridized to ³²P(C₃TA₂)₃ or ³²P(C₁₋₃A) (5'-CCCACCACACACACCCACACCC-3') oligonucleotides to detect double-stranded human and yeast telomeric repeats respectively. For single strand (ss) and double strand (ds) controls for human telomeric DNA detection, pTLC1hTRP was linearized by PstI and either denatured prior to loading on the gel or used directly. pTLC1hTRP contains a tract of 19 bp of human telomeric repeats as targets. Alternatively, p16R containing 1,6 kb of human telomeric repeats was used (38). Linearized double-stranded and single-stranded phagemid DNA derived from pGT55 were respectively used as single-stranded (ss) and double-stranded (ds) controls for yeast telomeric DNA (34). In all gels, end-labeled 1 kb ladder DNA (Gibco-BRL) was used as a DNA size standard.

Telomere cloning and sequence analysis.

Chromosome V-R telomeres, which are linked to *ADE2* in the RWY12 strain, were amplified using an established protocol (39) with slight modifications. Briefly, genomic DNA from humanized cells was isolated after indicated numbers of generations of growth and resuspended in 50 μl of 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Tailing of 3' ends was performed by denaturing 100 ng of genomic DNA for 5 min at 95°C, then tailing buffer complemented with 2 mM dCTP and 1 U of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, Amersham Pharmacia Biotech) was added and the reaction incubated for 30 min. The

TdT enzyme was heat-inactivated at 65°C for 10 min and at 94°C for 5 min. Tailing reactions were then transferred to puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences) containing the following primers at 0.8 pmol/μl, dG₁₈-*Bam*HI (5'-CGGGATCCG₁₈-3') and DIA5-1 (5'-GTGAGCGGATAACAATTTACACAGTCTAGATGTCCGAATTGATCCCAGAGTAG-3'). 3' end amplification was performed with an initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 45 cycles with 20 sec denaturation (94°C), 12 sec annealing (62°C) and 20 sec extension (72°C), and a final extension step of 5 min at 72°C. PCR reactions were then run on 2 % agarose gels, bands excised, purified and cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were sequenced using M13 forward primer and SequiTherm EXCEL™II DNA sequencing kit on a LiCor 4200 DNA-sequencer. Sequencing data were analysed with GraphPad Prism software.

hTERT immunolocalization

Yeast cells used for the complementation study were grown to OD_{660nm} = 0.5 and fixed with 5% formaldehyde for 10 min. The cells were resuspended in PPBMG (100 mM potassium phosphate buffered at pH 6.5, 0,5 mM MgCl₂) plus 5% formaldehyde, incubated for 30 min and washed three times in B buffer (1,2 M sorbitol, 100 mM potassium phosphate buffered at pH 7.5). Rabbit anti-hTERT polyclonal antibody (1/200) (a generous gift from Lea Harrington) and a monoclonal mouse anti-Nop1p (1/10000) (40) antibodies were diluted in PBS containing 1 mg/ml BSA, applied to the cells and incubated for 2 hours at room temperature. Cells were then washed several times with PBS containing 1mg/ml BSA. As secondary antibodies, Texas Red conjugated goat anti-rabbit antibodies and Oregon Green conjugated goat anti-mouse antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon) were diluted 1/1000 and applied for 2 hours to the cells. After several washes with PBS containing 1mg/ml BSA, DAPI (1 μg/ml in PBS) was added for 2 min, and the cells were washed again 3 times with PBS. Slides were mounted and cells were visualised with an Olympus IX70 epifluorescent microscope.

Human protein expression, western analyses and telomerase activity

Expression of hTERT and hTR, determination of human telomerase activity and western analyses for the hTERT proteins were performed as described previously (27). Yeast strains containing either p425-HA2-hEST1A or p424-HA2-hEST1B plasmids were grown on selective medium containing 2% glucose or galactose to OD_{660nm} 0,5-3,0. Protein extracts were prepared as described (41). Samples were separated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to Hybond C nitrocellulose membrane (Amersham) and probed with an Anti-HA mouse monoclonal antibody (Boehringer Mannheim), followed by secondary detection with a horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibodies (Amersham).

RESULTS

Previous reports suggested that a functional complementation of the yeast telomerase by the human enzyme may be possible. First, changing the template region of the yeast telomerase RNA into one that directs synthesis of human repeats results in mitotically stable yeast telomeres carrying human telomeric repeats (23-25). Second, the core subunits of the human telomerase can be expressed in yeast and assemble to form an active enzyme (27,28). However, none of these studies examined functional complementation of the yeast telomerase by expression of the human core components.

Creating the substrate and a molecular analysis of humanized telomeres.

In vitro, ciliate telomerase requires single-stranded DNA with a 3'-end as a substrate (42). A 3'-overhang at the very distal end of chromosomal DNA is a conserved feature in many species, including yeast and humans (3). For telomerase-mediated elongation, the sequence of the overhang appears to be less important as long as there are some nucleotides to anneal with the template region. For example, yeast telomerase can use human and various ciliate repeat DNA as substrate (21,22,43,44) and, at least *in vitro*, human telomerase can also use various substrates (45). To ensure that a suitable substrate for the human enzyme can be generated in yeast, we used a yeast telomerase RNA that carries human repeats at the template site (pTLC1hTRP). Previous reports showed that when this RNA replaces the endogenous wild-type yeast telomerase RNA, human telomeric repeats are incorporated into yeast chromosomal telomeres (23). We repeated this experiment and analyzed the incorporation of human repeats into telomeric DNAs and, in particular, into the 3'-overhangs. Single-stranded overhangs on telomeres can be detected using a non-denaturing in-gel hybridization technique, followed by detection of all telomeric repeat DNA in the same gel, once the DNA is denatured (34). Yeast cells expressing *Tlc1h* as the sole telomerase RNA were grown on plates for up to 2,500 generations, genomic DNA isolated at various intervals, digested with the *Xho*I restriction enzyme and analyzed as described above. Due to a conserved subtelomeric Y'-element that is present on many yeast telomeres, *Xho*I liberates a diagnostic terminal restriction fragment (TRF) of about 1,2 kb, of which about 300 bp correspond to the terminal repeat DNA. Various other TRFs of larger sizes are also detected in this analysis and these correspond to non-Y' telomeres (34). Single-stranded overhangs carrying human repeats of the G-rich strand can indeed be detected if a C-rich strand oligo is used as a probe (Fig. 1A). Conversely, single-stranded C-rich DNA was never detected (data not shown). The signal detected corresponded to terminal extensions, since it was abolished if the DNA was treated with *E. coli* Exonuclease I prior to analysis (data not shown). Intriguingly, the signal intensities for the human repeats increased with increasing numbers of generations, which suggested that the overhangs have a tendency to lengthen over time. In order to examine whether yeast specific repeats are part of the overhang, the same DNA was also subjected to non-denaturing gel analysis using a yeast specific C-strand probe. While a weak signal for G-strand extensions can be detected on DNA derived from wt *TLC1* harbouring cells, no such signal was detected on DNA derived from *Tlc1h*-harbouring cells (Fig. 1E).

To examine the approximate size of the G-strand overhangs in these strains, we used probes of differing lengths and increasing washing stringencies with the non-denaturing in gel procedure (38). The longest probe used (30 nt) remained hybridized to

the DNA extracted from yeast to virtually the same extent as it remained hybridized to a positive control containing 1,6 kb of repeats (Fig. 2). However, the signals for a control single-stranded DNA containing a shorter tract (19 nt on pTLC1hTRP) were lost after washing the gels at 55°C (Fig 2, right, middle panel, lane 4 open arrow). This suggests that the entire length of the probe could hybridize on G-rich overhangs, indicating that after culturing of about 100 generations, most humanized overhangs in yeast are longer than 24 nt long.

After the non-denaturing analyses, the DNA in the gels shown in Fig. 1A was denatured and consecutively rehybridized to probes detecting all human G-strand and C-strand repeats (Fig. 1B, data not shown). Consistent with what has been reported, TRF-lengths of the *Tlc1h*-harbouring strains are shorter than wt and remained quite stable for at least 2,500 generations (Fig. 1B, C). However, signal intensities for human specific repeats of both strands tended to increase over the course of the experiments (Fig. 1B, data not shown). Conversely, signal intensities obtained with a probe detecting all yeast specific repeats clearly diminished in these samples (Fig. 1C). This apparent progressive replacement of yeast telomeric repeats with human repeats had been noted previously (24,25), but not examined in detail. We investigated this effect by cloning and sequencing the telomeric repeats adjacent to a marked telomere in the *Tlc1h*-harbouring strain at various times of outgrowth (Fig. 3). Overall, this sequencing effort confirmed the qualitative impressions from the hybridization experiments (composite bars, Fig. 3B). For telomeres containing both human and yeast repeats, the human repeats were distal to the yeast repeats in virtually all cases (data not shown, 23). In no clone did we find a complete replacement however, even after 2,500 generations. On all clones derived from cells grown for more than 1,200 generations, a minimal tract of about 50 bp of yeast specific repeats remained. Surprisingly, we found a significant number of telomeres that did not contain any human specific telomeric repeats, even after 150 generations of growth in the presence of *Tlc1h*. As opposed to the telomeres harbouring a mixture of repeats, the telomeres with yeast repeats only decreased in size over time (white bars, Fig. 3B).

These results demonstrate that over the course of outgrowing yeast cells harbouring *Tlc1h* as sole telomerase RNA, there is a progressive loss of the yeast specific repeats on chromosomal telomeres. This loss is counterbalanced by a progressive increase of human repeats and overall, sequence replacement is very slow, reaching a stable state only after 1,200 generations. In addition, the single-stranded overhangs in such strains are composed of human G-strand repeats that are mostly longer than 24 nt and these overhangs also appear to increase in size during outgrowth. Thus, the data suggests that an adequate substrate for the human telomerase can be generated in yeast.

Expression and localization of the human enzyme.

We next constructed a yeast strain that carried deletions of both the *EST2* and *TLC1* genes. Yeast cells devoid of telomerase activity are able to grow for about 50-70 generations, during which time telomeric repeat DNA is eroded (46). Increasing telomere dysfunction however leads to a growth arrest after such outgrowth. Therefore, our starting strains also contained plasmids carrying *TLC1* and *EST2* (see Materials and Methods). For all assays, starting strains carrying pTLC1hTRP, the *TLC1* gene with

humanized template, or pTLC1TRP, a wild-type copy of *TLC1*, in combination with the pEST2-LYS2 were used in parallel. Into these strains, we introduced yeast plasmids expressing hTERT as a fusion protein with GST (pEGKT-hTERT) or as a fusion protein with the Cdc13p DNA-binding domain (p426/CDC13_{DBD}-hTERT) in combination with an hTR expressing plasmid. First, we assessed whether the human components were expressed and could reconstitute a detectable telomerase activity in yeast extracts (Fig. 4). Both, the CDC13_{DBD}-hTERT and the GST-hTERT fusion proteins were expressed in yeast, since a signal corresponding to their respective predicted MW was detected by Western analysis (Fig. 4B). In addition, combinations of hTR-expressing plasmids with plasmids expressing either hTERT-fusion protein resulted in detectable Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP) signals (Fig. 4A). Although the signals were not very strong, particularly when the CDC13_{DBD}-hTERT construct was used, one must note that in contrast to previous analyses (27,28), the assays were performed using crude yeast cell extracts. Moreover, according to the Western analysis, CDC13_{DBD}-hTERT may be less efficiently expressed than GST-hTERT in yeast. We conclude that expression of either fusion protein in combination with hTR is able to yield an active human telomerase.

In vivo, telomerase substrates, or chromosome ends, are located in the nucleus, thus it was essential to assess whether the expressed human telomerase could be imported into the yeast nucleus. We localized the hTERT fusion proteins using indirect immunofluorescence and an antibody against hTERT (Fig. 5). Cells were also stained with DAPI as an indicator for the nucleus and an antibody against Nop1p, which marks the nucleolus. The hTERT antibody creates low levels of background signal in these assays (Fig. 5A). Clearly, both fusion proteins were found predominantly in the nucleus, yielding a spotted pattern throughout the nucleoplasm (Fig. 5B, C). Remarkably little of the protein remained detectable in the cytoplasm. Although we did not co-localize the hTR RNA, we assume that it is associated with the protein in the nucleus. Thus, it is reasonable to suggest that the expressed human telomerase components can assemble into an active complex that localizes to yeast nuclei.

The human enzyme does not complement the yeast telomerase.

Using our starting strains that contained the core components of human and yeast telomerase on four different plasmids, we selected for strains that had lost either of the components and assayed for *in vivo* complementation. Complementation of the yeast enzyme was scored as the ability of yeast cells to grow past the point at which telomerase-negative yeast cells encounter a growth crisis. Obviously, strains that retained both yeast components always displayed that phenotype, irrespective of whether they also contained other plasmids (Table 1). Such strains served as positive controls. Strains initially containing pTLC1TRP and that had lost all four plasmids did display the expected growth arrest after about 70 generations and served as negative controls. Remarkably, strains that initially contained the pTLC1hTRP plasmid and thus contained the humanized telomeres before plasmid loss never yielded colonies without plasmids containing the genes for the yeast telomerase core components. We infer that growth arrest was occurring at less than 20 generations and it is possible that such cells die extremely rapidly (Table 1, right). This accelerated senescence could be attributed to the initially shorter length of the telomeres in these strains (Fig. 1) and possibly an

accelerated loss of human telomeric repeats. As can be concluded from the results summarized in Table 1, following the loss of the plasmids for the expression of the yeast telomerase components, no combination of the remaining plasmids allowed the yeast cells to grow past the normal growth arrest point. Previous reports indicate that the action of yeast telomerase at the telomeres is independent of additional co-factors such as Est1p, when Est2p is fused to the Cdc13p DNA-binding domain (47). As we initially did not co-express human versions of such cofactors, we speculated that fusing hTERT with CDC13_{DBD} might bypass a requirement for such co-factors. However, targeting hTERT to the telomeres by expression of a CDC13_{DBD}-hTERT fusion protein did not rescue a yeast telomerase deficiency. Of note, the CDC13_{DBD}-hTERT fusion protein used here does complement the temperature sensitive growth defect of a strain harbouring a *cdc13-1* mutation, demonstrating that the Cdc13p included in CDC13_{DBD}-hTERT is functional (data not shown). In addition, chromatin immunoprecipitation experiments have shown that Cdc13p is bound to humanized telomeres to the same extent if not more than to wt telomeres (24). These data strongly suggest that the failure to provide human telomerase activity onto the humanized telomeres is not due to a general failure to target the hTERT protein to the telomeres. Finally, we also expressed hEST1A or hEST1A and hETS1B together with the core human telomerase components. Again, although the hEST proteins could be expressed from our yeast vectors, as assessed by Western analysis (Fig. 4C), no complementation of the yeast telomerase deficiency was observed (Table 1).

We concluded that despite the expression of the two essential human telomerase core components in yeast, their assembly to form an active complex *in vitro* and the localization of hTERT (and presumably hTR) to the nucleus, human telomerase cannot functionally replace yeast telomerase.

DISCUSSION.

The telomerase enzymes of particular species appear to have a relatively relaxed sequence requirement in terms of their substrates *in vitro* and *in vivo*. In addition, recent results showed that the yeast telomerase RNA can be reprogrammed to add vertebrate-specific repeats onto the ends of yeast telomeres (23-25). These features prompted us to ask whether a functional complementation of the yeast core components by the human counterparts was possible. Such an exogenous reconstitution system in yeast cells would be an invaluable tool for an in depth analysis of telomerase function. However, none of the core component combinations tested in this study yielded evidence for a functional human telomerase activity at the endogenous yeast telomeres (Table 1). One could argue that the human telomerase enzyme can be active at yeast telomeres, but that the actual amounts of active RNPs reached in our experiments are too low for maintaining stable repeat tracts. We have shown previously that the co-expressed RNA and hTERT components do assemble into an active RNP with high specificity and that this active RNP can be purified by immunoprecipitations (28). Nevertheless, we also sequenced a number of telomeres cloned from the parent strain harbouring both telomerases. If there was a very low level of human telomerase activity on yeast telomeres, we would have expected to find occasional and perhaps isolated

human repeats imbedded in the yeast repeats. However, no such repeats were found amongst more than 1.5 kb of yeast telomeric sequences, representing more than 10 independent telomeres (data not shown). Given that the core components of human telomerase expressed in yeast can assemble to yield an enzyme with detectable activity *in vitro* (28, Fig. 4), these results strongly suggest that additional co-factors are required for the assembly of an active enzyme at the site of synthesis.

The yeast Est1p and Est3p proteins are examples of such cofactors in yeast: while these proteins are not essential for initial cell growth and *in vitro* telomerase activity, they are essential for *in vivo* telomerase activity (48,49). In addition, one of the non-essential functions of the yeast Cdc13p protein is such a cofactor role (49). We addressed the requirement for cofactors by expressing an hTERT-CDC13_{DBD} fusion protein or by co-expressing two of the recently identified human *EST1* orthologues; however these cofactors were not sufficient to reconstitute human telomerase function at yeast telomeres (data not shown). Therefore, it is reasonable to suggest that additional components of the human enzyme might be necessary for *in vivo* activity of the enzyme at the heterologous telomere. These additional components could include known human telomere-associated proteins such as hPOT1 or the complexes assembled around the TRF1 and TRF2 proteins (18). Moreover, it is entirely possible that essential co-factors for *in vivo* activity of the human telomerase remain to be discovered. Lastly, regulation of human and yeast telomerase and telomere function may be sufficiently distinct to prevent functional action of human telomerase at yeast telomeres.

In vitro, the telomerase substrate sequence requirements are not stringent; however, we speculated that the human enzyme may require vertebrate specific repeats *in vivo*. By reprogramming the yeast telomerase RNA, we found that a vertebrate-specific substrate can be generated in yeast and that the overhangs in such strains mostly are longer than 24 nt (Fig. 2). Upon long-term culturing, these overhangs apparently lengthen, thereby in principle providing an adequate substrate for human telomerase. While the essential yeast capping protein Cdc13p has a lowered affinity for single-stranded vertebrate repeats (50,51), it is able to bind them *in vivo* and the relatively long repeat tracts reported here are consistent with the observed increase in Cdc13p binding at such telomeres (24).

The fine-structure analyses and the sequencing of telomeres in yeast strains expressing a humanized yeast telomerase RNA revealed a pattern of sequence replacement over many generations (Fig. 3). Yeast telomeric repeats are slowly and gradually replaced by human repeats in such strains, reaching a plateau after about 1,200 generations. At this point, all telomeres sequenced still retained about 50-bp of yeast specific repeats (Fig. 3), and all of these sequences encompass at least two Rap1p-binding sites (data not shown). Although recent results have shown that yeast telomeres containing only vertebrate repeats can be mitotically stable (24,25), complete replacement of yeast repeats appears not to occur *in vivo*, at least within 2,500 generations of growth (Fig. 3). These results are consistent with telomeric repeat turnover experiments in another yeast, *Kluyveromyces lactis*, where a similar resistance to turnover for the innermost repeats has been observed (52). Most intriguingly, our sequencing efforts also revealed that in such strains, there are telomeres with about 70 bp of entirely yeast repeats even after 150 generations of

growth in the presence of a humanized yeast telomerase (Fig. 3). In the absence of telomerase activity *in vivo*, yeast telomeres shorten by about 3-5 bp per end and generation such that they reach a growth arrest due to deficient telomeres after about 70 generations (53). Therefore, telomeres with only yeast repeats after 150 generations of growth in the presence of *Tlc1h* are difficult to explain solely with the premise that the humanized telomerase has never acted on them. It is possible that in the particular situation created here, telomeric sequence replenishment by recombination is more effective, which would result in a lower loss rate. Alternatively, the entirely yeast repeat telomeres found after 150 generations could be the result of consecutive sequence addition and sequence loss events. The added sequences would have been vertebrate repeats and while they were present, the internal block of yeast repeats were protected from further gradual losses. Yet, in this scenario, the complete distal block of vertebrate repeats would have to be lost at a surprisingly high frequency to expose only the yeast repeats. One interpretation of the data would stipulate that telomere rapid deletion (TRD) occurs at an extremely high rate in these strains. TRD has been described as a one-step intrachromatid deletion event involving the distal single-stranded overhang and the proximal double-stranded portion of the telomeres (54). TRD is controlled by Rap1p-mediated telomere length control and the progressive losses of Rap1p binding sites from the telomeres in the *Tlc1h* carrying strain may allow an increased rate of TRD. In addition, the precision of TRD events is lost in *rap1^t* mutants, contributing to an increased heterogeneity of telomeric repeat tracts (54), a feature that we also observe during long-term culturing of cells (Figs. 1, 3). However, overall length heterogeneity is less pronounced than in *rap1^t*-cells, arguing that Tbf1p, which will bind the vertebrate telomeric repeats (24), can impose a Rap1p-independent telomere length regulation (25). Finally, TRD occurs at quite high frequency during meiosis, even in wild-type cells (A. Lustig, personal communication). One could therefore invoke the possibility that catastrophic meiotic TRD may be the cause for the severe meiotic defects displayed by yeast strains carrying telomeres with vertebrate telomeric repeat tracts (24). Alternatively, the abrupt losses of the distal vertebrate telomeric repeats could be the result of direct degradation events. However, such degradation events appear to be rare in strains harbouring the yeast Ku-proteins and it has been reported that the yeast Ku-complex is still bound to telomeres harbouring vertebrate repeats (24). It could be argued that TRD- or degradation-mediated loss of vertebrate repeats would leave a few repeats at the yeast-vertebrate repeat boundary, which we should have detect by the sequencing effort. However, re-elongation of such shortened telomeres could be compared to telomere healing and it has been shown that vertebrate repeats are very poor substrates for healing events by yeast telomerase (55). Therefore, such ends may be subject to continued progressive sequence losses until all the vertebrate repeats are lost and the most effective substrate for re-elongation is exposed. Consistent with this idea, most efficient substrates for telomere healing include about 40-50 bp of yeast repeats comprising two Rap1p-binding sites (55), and this corresponds well with what we found to be the obligatory sequences left on yeast telomeres after outgrowth in the presence of *Tlc1h* (Fig. 3). We therefore speculate that an innermost sequence of about 50 bp comprising two Rap1p binding sites is resistant to telomere turnover events and therefore may constitute the preferred minimal functional telomeric repeat tract for *S. cerevisiae*.

Taken together, the results reported here demonstrate that the core components of human telomerase can be expressed in yeast, are properly localized to the nucleus and assemble to form an active enzyme detectable in crude extracts. Moreover, relatively long single-stranded overhangs of vertebrate specific can be generated in yeast by reprogramming the yeast telomerase RNA, thereby providing the suitable substrate for the human enzyme. However, the human enzyme is not active on yeast telomeres *in vivo*, even when targeted to the telomeres by fusing hTERT to Cdc13p or by co-expressing human orthologues of Est1p. Finally, telomeres carrying a mix of yeast and vertebrate specific repeats may undergo frequent rapid deletions of the distal vertebrate repeats. These turnover events however never remove the entire yeast specific tract and about 50 bp, encompassing two Rap1p binding sites, always remain at the proximal end. The system would therefore be ideally suited to study the mechanistic details for TRD and telomere sequence turnover, mechanisms that has been proposed to contribute significantly to telomere behaviour in mammalian cells (54).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank K. Henning, V. Lundblad and L. Harrington for generously providing plasmids and antibodies used in this study. We are also indebted to M. Catala and S. Abou-Elela for help in the microscopic analyses. A. Lustig and V. Zakian communicated results prior to publication and helped us with insightful discussions. This work was supported by a grant of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to R.J.W. (MOP12616), and a grant from CIHR to C.A. (MOP14026). F.B. was the recipient of a doctoral award from the CIHR. R.J.W. is a chercheur national of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CA is a chercheur-boursier of the FRSQ and a recipient of a Boehringer Ingelheim (Canada) Young Investigator Award.

REFERENCES

1. Blackburn, E.H. (2000) The end of the (DNA) line. *Nat Struct Biol*, **7**, 847-850.
2. Lundblad, V. (2001) Genome instability: McClintock revisited. *Curr Biol*, **11**, R957-960.
3. Chakhparonian, M. and Wellinger, R.J. (2003) Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet*, **19**, 439-446.
4. Sandell, L.L. and Zakian, V.A. (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, **75**, 729-739.
5. Wellinger, R.J. and Sen, D. (1997) The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*, **33**, 735-749.
6. Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, **43**, 405-413.
7. Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.
8. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
9. Huard, S. and Autexier, C. (2002) Targeting human telomerase in cancer therapy. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **2**, 577-587.
10. Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K. and Lingner, J. (2002) Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci*, **27**, 572-579.
11. Aisner, D.L., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 80-85.
12. 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. *et al.* (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**, 498-502.
13. Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W. *et al.* (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*, **13**, 817-826.
14. Licht, J.D. and Collins, K. (1999) Telomerase RNA function in recombinant *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev*, **13**, 1116-1125.
15. Harrington, L. (2003) Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett*, **194**, 139-154.
16. Evans, S.K. and Lundblad, V. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci*, **113**, 3357-3364.
17. Ritchie, K.B., Mallory, J.C. and Petes, T.D. (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6065-6075.
18. de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, **21**, 532-540.
19. Lundblad, V. (2000) Molecular biology. Telomeres keep on rappin'. *Science*, **288**, 2141-2142.
20. Lundblad, V. (2003) Telomere replication: an est fest. *Curr Biol*, **13**, R439-441.

21. Cross, S.H., Allshire, R.C., McKay, S.J., McGill, N.I. and Cooke, H.J. (1989) Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, **338**, 771-774.
22. Riethman, H.C., Moyzis, R.K., Meyne, J., Burke, D.T. and Olson, M.V. (1989) Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial-chromosome vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6240-6244.
23. Henning, K.A., Moskowitz, N., Ashlock, M.A. and Liu, P.P. (1998) Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5667-5671.
24. Alexander, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *Embo J*, **22**, 1688-1696.
25. Brevet, V., Berthiau, A.S., Civitelli, L., Donini, P., Schramke, V., Geli, V., Ascenzioni, F. and Gilson, E. (2003) The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. *Embo J*, **22**, 1697-1706.
26. Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2001) Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res*, **29**, 598-603.
27. Bachand, F., Kukulj, G. and Autexier, C. (2000) Expression of hTERT and hTR in cis reconstitutes and active human telomerase ribonucleoprotein. *Rna*, **6**, 778-784.
28. Bachand, F. and Autexier, C. (1999) Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 38027-38031.
29. Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
30. Beeler, T., Gable, K., Zhao, C. and Dunn, T. (1994) A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 7279-7284.
31. Sikorski, R.S. and Boeke, J.D. (1991) In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 302-318.
32. Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
33. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
34. Dionne, I. and Wellinger, R.J. (1996) 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.
35. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.

36. Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
38. McElligott, R. and Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J*, **16**, 3705-3714.
39. Forstemann, K., Hoss, M. and Lingner, J. (2000) Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2690-2694.
40. Aris, J.P. and Blobel, G. (1988) Identification and characterization of a yeast nucleolar protein that is similar to a rat liver nucleolar protein. *J Cell Biol*, **107**, 17-31.
41. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
42. Lingner, J. and Cech, T.R. (1996) Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10712-10717.
43. Shampay, J., Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, **310**, 154-157.
44. Pluta, A.F., Dani, G.M., Spear, B.B. and Zakian, V.A. (1984) Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from *Oxytricha macronuclear DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1475-1479.
45. Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**, 521-529.
46. Lundblad, V. and Blackburn, E.H. (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**, 347-360.
47. Evans, S.K. and Lundblad, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**, 117-120.
48. Cohn, M. and Blackburn, E.H. (1995) Telomerase in yeast. *Science*, **269**, 396-400.
49. Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R. and Lundblad, V. (1997) Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11190-11195.
50. Lin, J.J. and Zakian, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13760-13765.
51. Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F. and Lundblad, V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**, 249-252.
52. McEachern, M.J., Underwood, D.H. and Blackburn, E.H. (2002) Dynamics of telomeric DNA turnover in yeast. *Genetics*, **160**, 63-73.
53. Singer, M.S. and Gottschling, D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, **266**, 404-409.

54. Lustig, A.J. (2003) Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet*, **4**, 916-923.
55. Lustig, A.J. (1992) Hoogsteen G-G base pairing is dispensable for telomere healing in yeast. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3021-3028.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Single-stranded overhangs and sequence composition of telomeres in yeast strains expressing *Tlc1h*. Genomic DNA from yeast strains expressing wild type *TLC1* and strains expressing the humanized RNA (*Tlc1h*) was extracted after the strains had been cultured for the indicated numbers of generations (40G to ~2500G). The DNA was digested with *Xho*I and analyzed by non-denaturing in-gel hybridization. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13: strains expressing *TLC1wt*. Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14: strains expressing *Tlc1h*.

(A) The native gel was first hybridized to an end-labelled human telomeric probe ($^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$).

(B) DNA in the gel shown in A) was denatured and rehybridized to the same probe.

(C) The probe in B) was washed off and the gel rehybridized to an end-labelled yeast telomeric probe ($^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$).

(D) The same gel shown in panels A-C was rehybridized to a probe specific for the CEN4 region to show about equal loading of the lanes.

(E) Non-denaturing in-gel analysis of the same DNA as shown in A-D, but using the yeast specific C-strand probe first. Lanes 1-7: strains expressing *Tlc1h*. Lanes 8-14: strains expressing *TLC1wt*. Lane 15: genomic DNA derived from a wild type strain (BY4705) without any plasmids.

(F) The DNA in the gel shown in E) was denatured and re-hybridized to a probe specific for CEN4 to control for DNA loading. Lanes 15-17 of the gel shown in A-C, and lanes 16-18 of the gel shown in E contain control DNAs harbouring human telomeric repeats in single-stranded form (H, ss), human telomeric repeats in double-stranded form (H, ds), or a mixture of yeast telomeric repeats in single-stranded and double stranded form (Y, ss+ds). DNA size standard was end-labeled 1kb ladder DNA and sizes are indicated on the left of the gels.

FIGURE 2. Vertebrate G-rich overhangs of at least 30 bases on telomeres of cells carrying *Tlc1h*. Non-denaturing in-gel hybridization was performed with human telomeric probes of various lengths. Shown here are the results obtained with $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_4$ (left) and $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_5$ (right) as probes. Gels were first washed at 30°C and, after appropriate exposures were obtained, they were rewashed at increasing temperatures as indicated on the side of the panels. Lane 1: DNA derived from a strain carrying wt *TLC1* and grown for 100 generations; Lane 2: DNA derived from a strain carrying *Tlc1h* and grown for 100 generations; Lane 3: Linearized and denatured p16R (positive control with 1,6 kb of vertebrate repeats); Lane 4: Linearized and denatured pTLC1hTRP (positive control with 19 nt of vertebrate repeats). Left: Molecular weight standard. Close arrows indicate the chromosomal terminal restriction fragments (TRFs), open arrows point to the pTLC1hTRP control.

FIGURE 3. Sequence analysis of telomeres in *Tlc1h*-harbouring cells.

(A) For each time-point indicated, three independent PCR reactions were performed, the amplified DNA was cloned and several independent clones sequenced. The table indicates the average (\pm standard deviation) length of telomeric sequences obtained after a given number of generations of culture. In brackets the number of clones

containing TG₁₋₃-sequences only (middle column) or containing both TG₁₋₃ and T₂AG₃ sequences (right column) per total clones sequenced is indicated. Telomere length (far right) is calculated only for the mixed telomeres.

(B) A bar graph representation of the data: white bars: telomeres with yeast sequences only; composite bars: telomeres with both human and yeast repeats. Note that the human repeats were always distal to the yeast repeats (data not shown).

FIGURE 4. Detection of expressed human proteins and telomerase activity.

(A) Telomerase activity was visualized by a TRAP assay using crude yeast extracts derived from cultures harbouring the indicated plasmids. Lane 1: YPH499 cells with pEGKT (empty vector) + p423-hTR; lane 2: YPH499 cells with pEGKT-hTERT + p423-hTR; lane 3: BY4705 *est2Δ/tlc1Δ* cells with p426/CDC13_{DBD}-hTERT + pRS422-hTR + pEST2-LYS2 + pTLC1TRP. IC: Internal control signal for the PCR reaction.

(B) Western analysis using an affinity-purified antibody against hTERT was performed to detect GST-hTERT and CDC13_{DBD}-hTERT proteins (see arrows). Protein extracts analyzed were derived from the same cells as in (A). Note that the hTERT antibody does crosshybridize to some other proteins, but the bands at the predicted MW for the fusion proteins (about 151 kDa for GST-hTERT and 155 kDa for CDC13_{DBD}-hTERT) are specific for the strains expressing them.

(C) HA2-hEST1A and HA2-hEST1B expression as analysed by Western blot of total protein extracted from yeast strains grown in the presence of glucose or galactose. Anti-HA antibody was used as a probe and the expected MWs for HA2-hEST1A and HA2hEST1B are 166 kDa and 122 kDa, respectively. Lanes 1 and 2: yeast strain BY4705 grown in glucose (Glc) or galactose (Gal) containing media (no plasmids); lanes 3 and 4: yeast strain BY4705 with p425-HA2-hEST1A grown on indicated media; lanes 5 et 6: yeast strain BY4705 with p424-HA2-hEST1B; lanes 7 et 8: yeast strain BY4705 with p425-HA2-hEST1A and p424-HA2-hEST1B. The exposure time for lanes containing HA2-hEST1B and HA2-hEST1A + HA2-hEST1B (lanes 5-8) was longer than for HA2-hEST1A alone (lanes 3 and 4). About equal amounts of protein was loaded in each lane and molecular mass markers in kDa are indicated on the left.

FIGURE 5. hTERT is localized to the yeast nucleus. In all panels, the nucleolar protein Nop1p was detected with a mouse monoclonal antibody against Nop1p and Oregon Green-labeled goat anti-mouse antibody; hTERT fusion proteins were detected with a rabbit anti-hTERT polyclonal antibody and Texas-red-conjugated anti-rabbit antibody (red), and the nucleoplasm is represented in blue by DAPI staining.

(A), control strain with no hTERT plasmid (BY4705 *est2Δ/tlc1Δ* cells with pEST2-LYS2, pTLC1hTRP and pRS422-hTR plasmids);

(B), same as (A) plus pEGKT-hTERT plasmid;

(C) same as (A) plus p426/CDC13_{DBD}-hTERT plasmid. Representative fields with four cells are shown and identical results were also observed using strains that harbored *TLC1wt* instead of *Tlc1h* (data not shown).

Table 1

Bah et al, 2003

Plasmids in WT Strain	Plasmids lost	Survival (Gen.)	Plasmids in Humanized Strain	Plasmids lost	Survival (Gen.)
TLC1WT, EST2, hTR, hTERT	none	>150	TLC1h, EST2, hTR, hTERT	none	>150
none	hTR, hTERT, TLC1WT, EST2 (all four)	death 70~90	none	hTR, hTERT, TLC1h, EST2 (all four)	death < 20
TLC1WT, EST2	hTR, hTERT	>150	TLC1h, EST2	hTR, hTERT	>150
TLC1WT	hTR, hTERT, EST2	death 70~90	TLC1h	hTR, hTERT, EST2	death < 20
EST2	hTR, hTERT, TLC1WT	death 70~90	EST2	hTR, hTERT, TLC1h	death < 20
TLC1WT, hTERT	hTR, EST2	death 70~90	TLC1h, hTERT	hTR, EST2	death < 20
EST2, hTR	hTERT, TLC1WT	death 70~90	EST2, hTR	hTERT, TLC1h	death < 20
hTR, hTERT	TLC1WT, EST2	death 70~90	hTR, hTERT	TLC1h, EST2	death < 20
TLC1WT, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} ⁻ , hTERT	none	>150	TLC1h, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} ⁻ , hTERT	none	>150
hTR, CDC13 _{DBD} ⁻ , hTERT	TLC1WT, EST2	death 70~90	hTR, CDC13 _{DBD} ⁻ , hTERT	TLC1h, EST2	death < 20

TABLE 1. Summary of complementation assays. BY4705 cells carrying deletions of *TLC1* and *EST2* were transformed with yeast telomerase plasmids pTLC1(h)TRP/pEST2-LYS2) in order to maintain survival. After sporulation, cells were transformed with plasmids carrying human telomerase subunit genes (pRS422-hTR/pEGKT-hTERT or p426/CDC13_{DBD}⁻-hTERT). Complementation of yeast telomerase subunits by the corresponding human subunits can be assessed after loss of different plasmids followed by assessing survival of cells after restreaking on selective media. The left panel summarizes the results obtained with strains harbouring pTLC1TRP (wt *TLC1*); the right panel summarizes the results obtained with the starting strain harbouring pTLC1hTRP (*Tlc1h*). Expression of human telomerase subunit genes was induced by growth on galactose containing media.

Figure 1

Bah et al. 2003

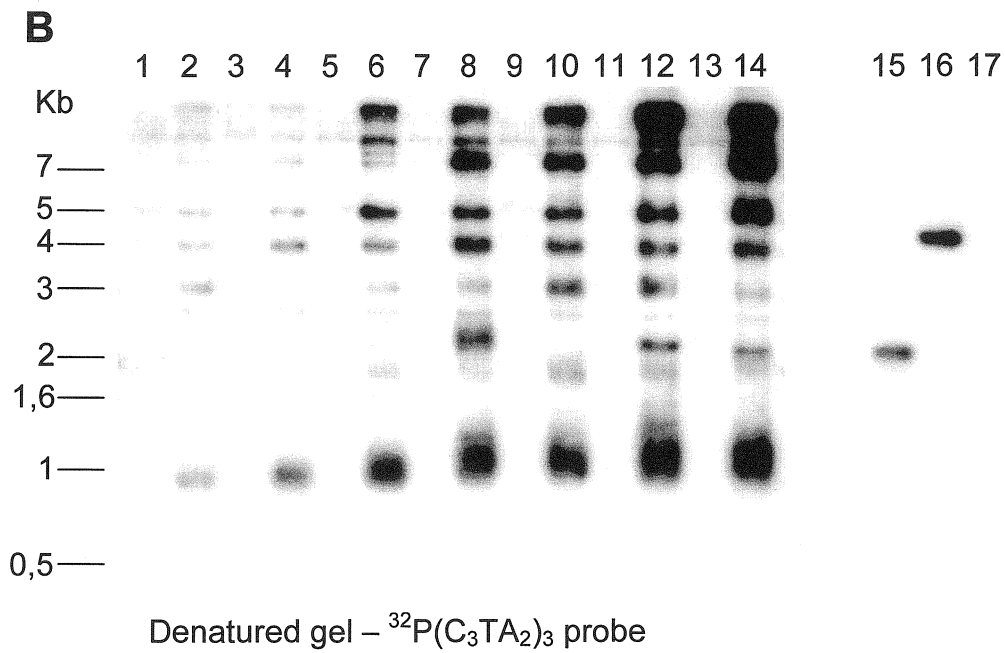
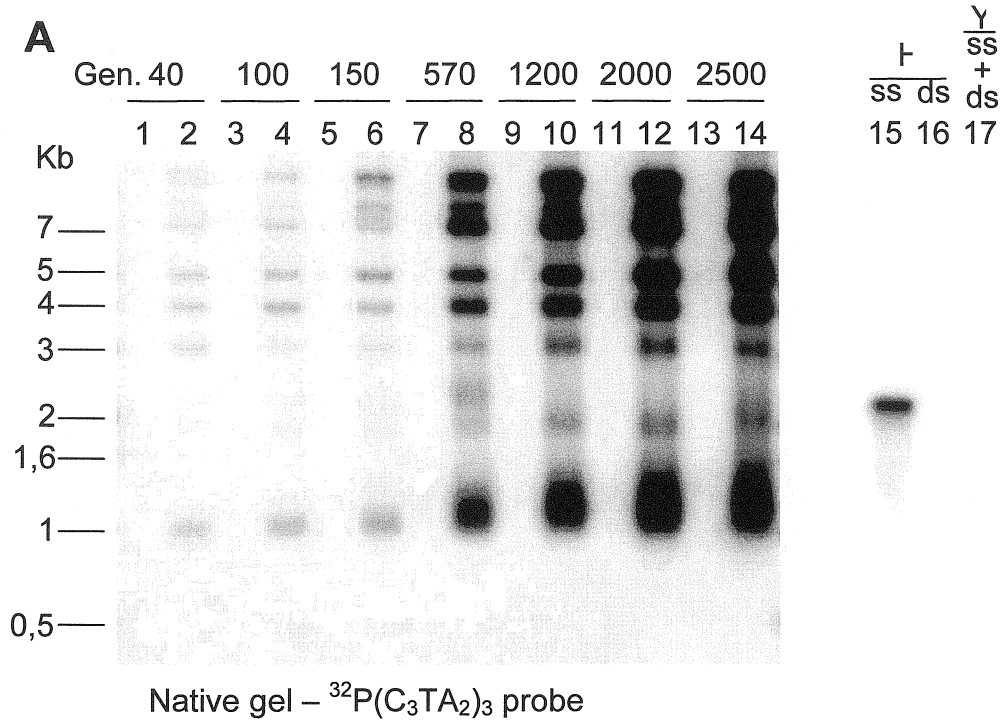


Figure 1 (ctd)

Bah et al. 2003

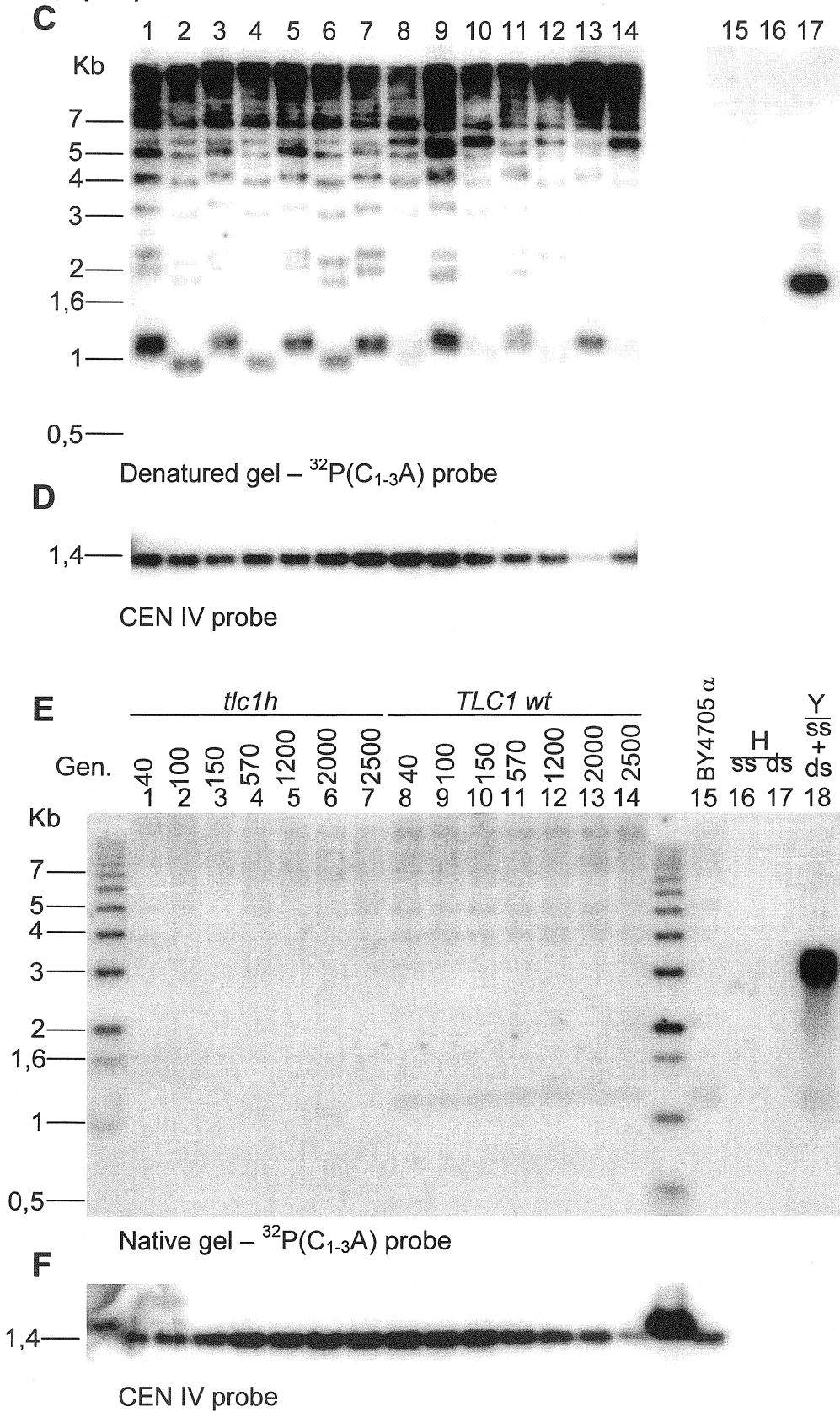


Figure 2

Bah et al. 2003

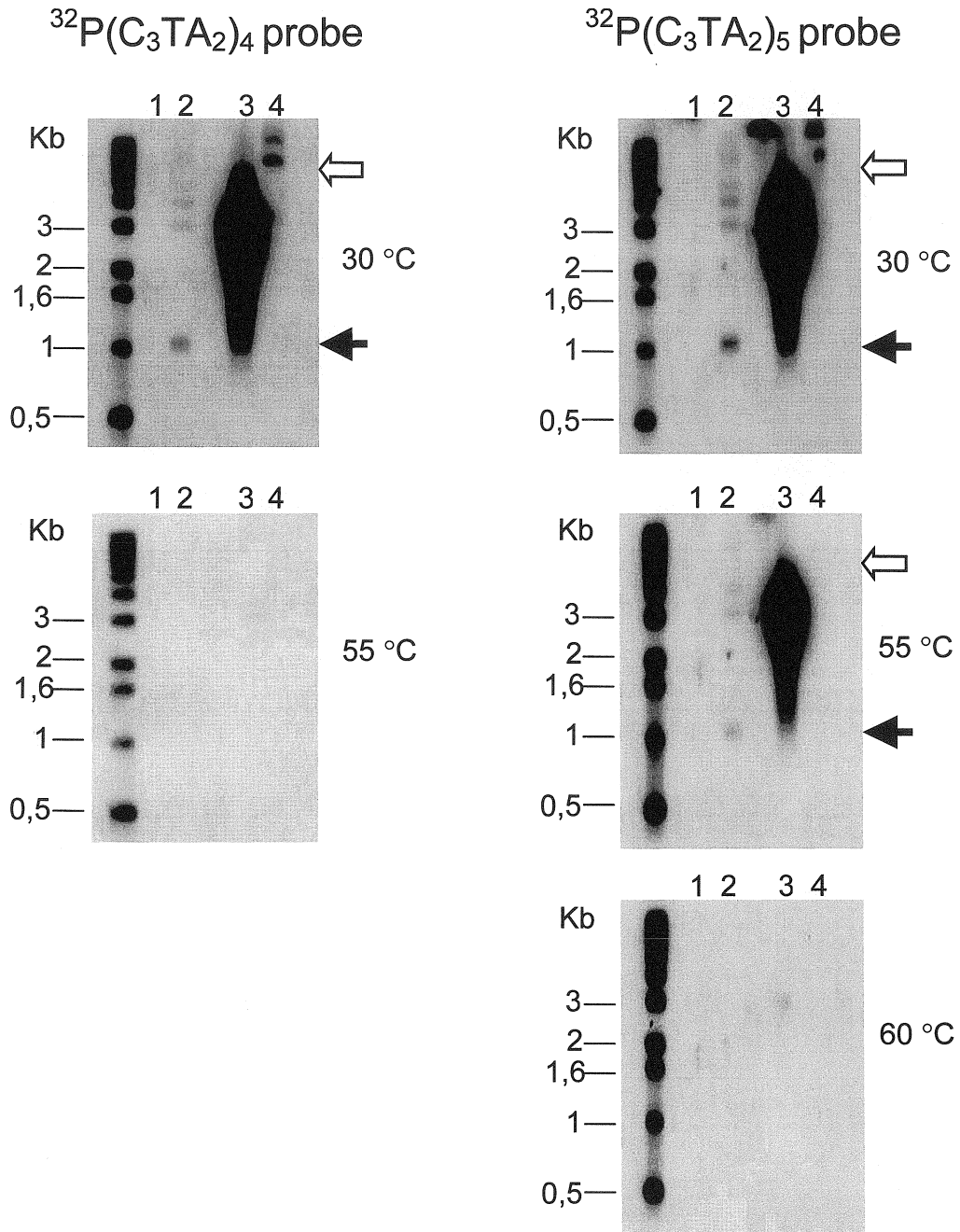


Figure 3

Bah et al. 2003

A

number of generations	TG ₁₋₃ (nt) only telomeres	TG ₁₋₃ (nt) + T ₂ AG ₃ (nt) telomeres		telomere length (nt)
40G	171 ± 13 (6/9)	129 ± 38	40 ± 5	169 ± 39 (3/9)
100G	96 ± 15 (5/14)	103 ± 14	43 ± 29	146 ± 26 (9/14)
150G	71 ± 14 (4/10)	90 ± 3	57 ± 29	147 ± 28 (6/10)
570G	0 (0/7)	87 ± 6	45 ± 31	131 ± 29 (7/7)
1200G	0 (0/7)	59 ± 5	124 ± 19	182 ± 22 (7/7)
2500G	0 (0/10)	48 ± 2	128 ± 36	175 ± 36 (10/10)

B

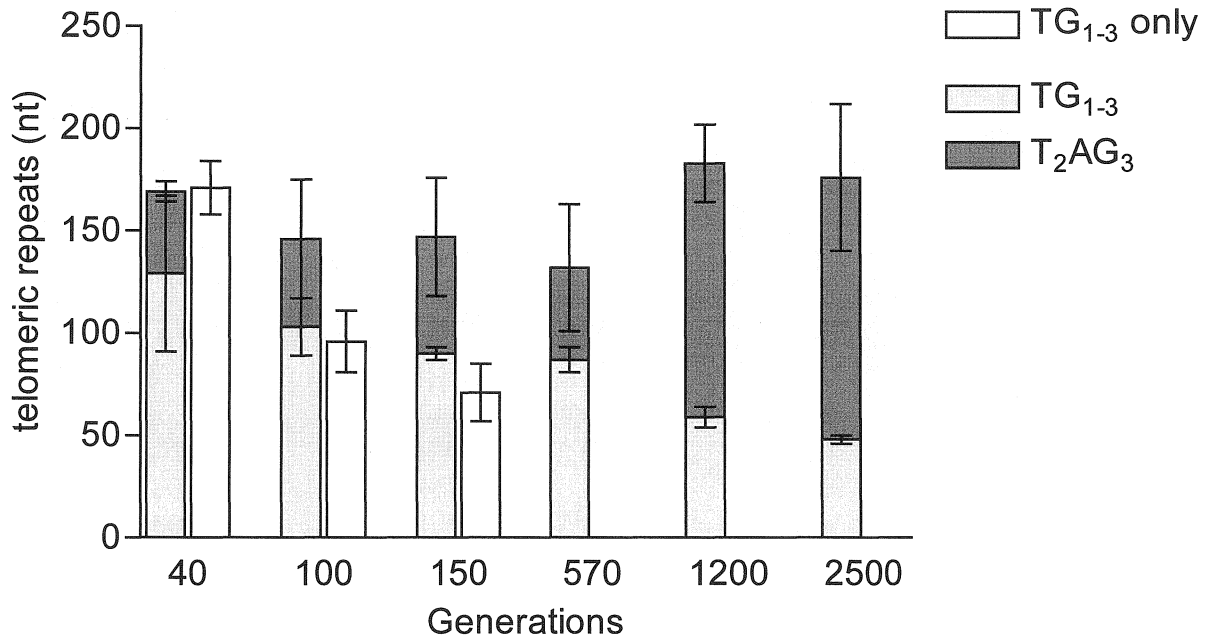


Figure 4

Bah et al. 2003

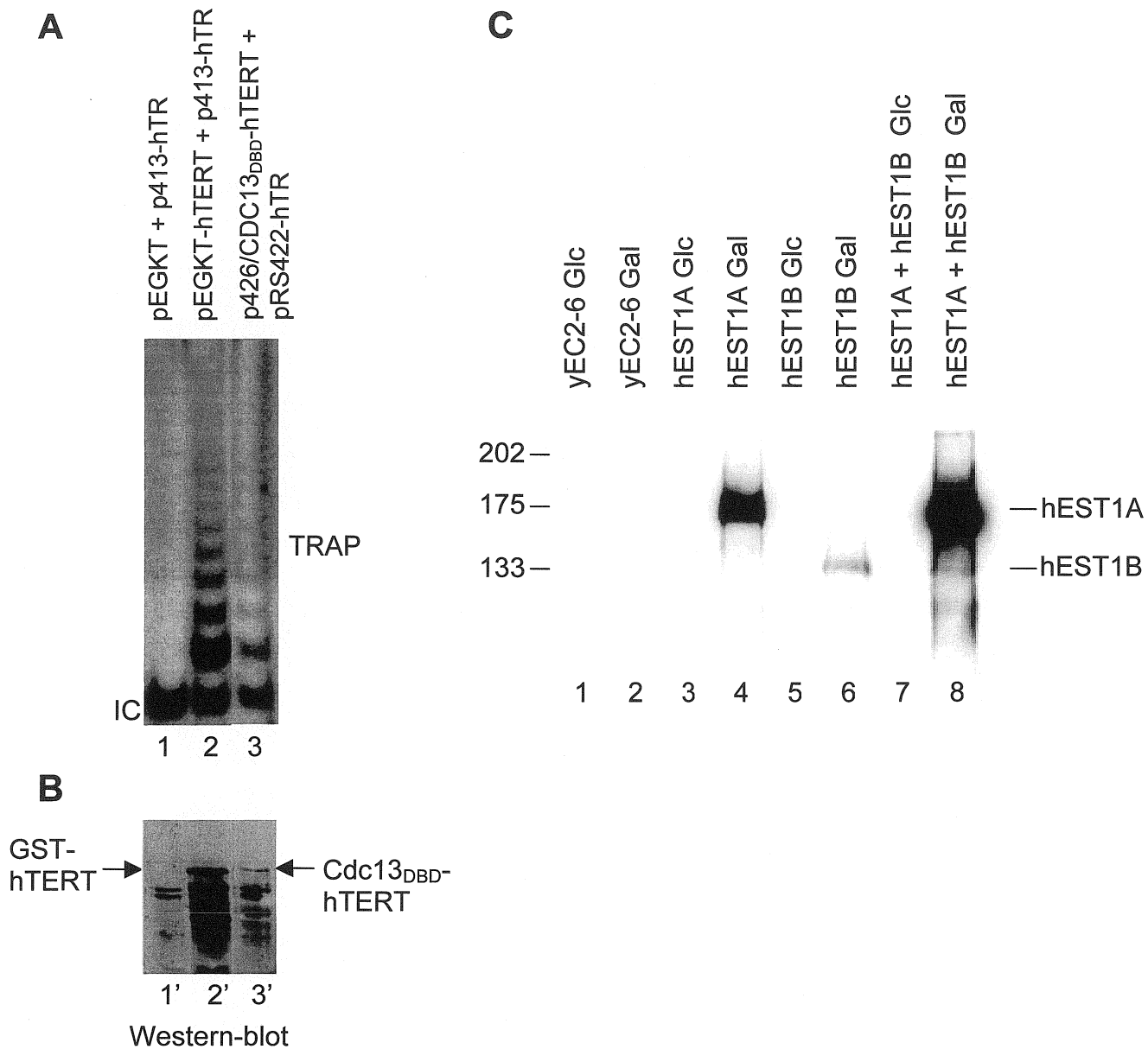


Figure 5

Bah et al. 2003

