

# NOTE TO USERS

Page(s) not included in the original manuscript and are unavailable from the author or university. The manuscript was scanned as received.

7, 44 , 97

This reproduction is the best copy available.

**UMI**®

Université de Sherbrooke

**Étude des mécanismes de régulation de la télomérase  
chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Par

Stéphanie Larose

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
En vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D) en Microbiologie

Déposée le 11 janvier 2008

Soutenue le 27 mars 2008



Library and  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-48562-0*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-48562-0*

**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.

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

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

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

  
**Canada**

## COMPOSITION DU JURY

Dre. Chantal Autexier	Rapporteur externe à l'université
Dr. Éric Massé	Rapporteur externe au programme
Dr. Antonio Conconi	Président et responsable du programme
Dr. Raymund J. Wellinger	Co-directeur de thèse
Dr. Sherif Abou Elela	Co-directeur de thèse

## RÉSUMÉ

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques situées à l'extrémité des chromosomes eucaryotes, ils sont composés de répétitions d'ADN en tandem associées avec plusieurs protéines et sont importants pour le maintien de l'intégrité du génome. La taille des télomères est influencée par une balance entre des processus de raccourcissement (ex. : réplication incomplète, dégradation nucléolytique) et des processus d'allongement par la télomérase. La télomérase est une ribonucléoprotéine composée d'une sous-unité transcriptase inverse Est2p, d'une sous-unité ARN Tlc1 et d'autres protéines régulatrices comme Est1p et Est3p. La télomérase possède la capacité d'allonger l'extrémité des chromosomes en utilisant sa sous-unité ARN comme matrice pour l'addition de répétitions télomériques grâce à son activité transcriptase inverse. Plusieurs observations suggèrent qu'une variation de l'expression des différentes composantes de la télomérase influencerait les fonctions de cette dernière. Par exemple, la surexpression de Tlc1 cause un raccourcissement des télomères tandis que la surexpression de Est1 peut causer une légère augmentation de la taille des télomères dans certains cas. Par contre, peu de choses sont connues en ce qui concerne la régulation de l'expression de chacune des sous-unités de la télomérase.

Durant mes études, je me suis intéressée aux mécanismes de régulation de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, plus précisément, à mieux comprendre la régulation de l'expression des sous-unités de la télomérase. Mes études ont démontré que la RNase III de levure Rnt1p, une endoribonucléase spécifique à l'ARN double brin, régule l'expression des sous-unités de la télomérase et est requise pour le maintien des télomères. La délétion de Rnt1p augmente l'expression des ARNm Est1, Est2, Est3 et de l'ARN Tlc1, augmente l'activité de la télomérase ainsi que la taille des télomères. De plus, Rnt1p aurait un rôle à jouer au niveau de la dégradation spécifique de Est1 dans le cycle cellulaire. Mes études ont également été orientées sur la régulation de l'expression de Tlc1 et sur sa biogénèse en général. Une analyse détaillée de la région promotrice de Tlc1 a permis d'identifier la présence d'éléments conservés ayant la propriété d'activer ou de réprimer l'expression de Tlc1. De plus, une nouvelle voie de maturation de cet ARN a été caractérisée suite à une analyse détaillée de la région 3' de Tlc1. Globalement, mes résultats ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes contrôlant l'expression des sous-unités de la télomérase et influençant le maintien des télomères.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Table des matières</b> .....	I
<b>Liste des figures</b> .....	IV
<b>Abréviations</b> .....	VII
<b>Résumé</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	1
1. Les télomères .....	1
1.1 L'ADN télomérique et sous-télomérique .....	2
1.2 Les protéines télomériques .....	6
1.3 Le problème réplcatif terminal .....	11
1.4 L'homéostasie télomérique .....	15
2. La télomérase .....	17
2.1 Les composantes .....	18
2.2 Les mécanismes de recrutement et de régulation .....	27
3. L'endoribonucléase Rnt1p .....	30
3.1 La famille des RNase III .....	31

3.2 Les mécanismes d'action de Rnt1p .....	33
3.3 Les fonctions de Rnt1p .....	35
<b>Chapitre I</b> .....	<b>43</b>
Préambule .....	43
<b>Chapitre II</b> .....	<b>91</b>
Préambule .....	91
Matériel et Méthodes .....	92
Résultats .....	93
<b>Chapitre III</b> .....	<b>96</b>
Préambule .....	96
<b>Chapitre IV</b> .....	<b>141</b>
Préambule .....	141
Matériel et Méthodes .....	142
Résultats .....	144



<b>Chapitre V</b> .....	147
Préambule .....	147
Matériel et Méthodes .....	148
Résultats .....	151
<b>Discussion</b> .....	161
Régulation négative de la télomérase par la RNase III .....	161
Régulation de l'expression de Tlc1 à travers sa région promotrice .....	169
Étude de la biogénèse de l'ARN de la télomérase Tlc1 .....	174
<b>Conclusion</b> .....	185
<b>Remerciements</b> .....	187
<b>Références</b> .....	188

## LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'un télomère chez <i>S.cerevisiae</i> . ....	4
Figure 2 : Modèles de configurations adoptées par les télomères humains et de levures. ....	7
Figure 3 : Le problème réplcatif terminal. ....	13
Figure 4 : Cycle d'élongation par la télomérase. ....	14
Figure 5 : Structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez différentes espèces. ....	20
Figure 6 : Modèle de maturation de l'ARN de la télomérase chez l'humain et chez la levure. ....	22
Figure 7 : Représentation schématique de la famille des RNAses III. ....	32
Figure 8 : Modèle du mécanisme de clivage par Rnt1p. ....	36

Figure 9 : Modèle de maturation des petits ARN nucléaires (snARN) impliquant diverses protéines. ....	39
Figure 10 : Analyse de l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase chez <i>S. cerevisiae</i> . ....	95
Figure 11 : Analyse de l'expression du gène rapporteur <i>lacZ</i> sous le contrôle du promoteur de <i>TLC1</i> en absence de Rnt1p. ....	146
Figure 12 : Analyse de l'expression de Tlc1 en absence des exonucléases Rat1p et Xrn1p. ....	156
Figure 13 : Analyse de l'expression de Tlc1 en absence des facteurs de clivage/polyadénylation Rna14p et Rna15p. ....	157
Figure 14 : Analyse de l'expression de Tlc1 en absence de l'exonucléase Rrp6p. ....	158
Figure 15 : Analyse de l'expression de Tlc1 en absence du facteur de terminaison Nrd1p. ....	159
Figure 16 : Analyse de l'expression de Tlc1 en absence de l'hélicase Sen1p. ....	160

Figure 17 : Modèle de régulation de l'ARNm Est1 par Rnt1p durant le cycle  
cellulaire. .... 165

Figure 18 : Modèle de maturation des formes poly A- et poly A+ de l'ARN Tlc1.  
..... 177

## ABRÉVIATIONS

5-FOA	acide 5-fluoro-orotique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi	interférence par l'ARN
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ARS	séquences de réplication autonome
CFI	complexe de facteurs de clivage I
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
C-terminal	carboxy terminal
D-loop	boucle de déplacement
dsRBD	domaine de liaison à l'ARN double brin
<i>EST1</i>	gène codant pour la protéine Est1p
<i>EST2</i>	gène codant pour la protéine Est2p
<i>EST3</i>	gène codant pour la protéine Est3p
G	guanine
kDa	kilo dalton
miARN	micro ARN

NMD	voie de régulation des ARNm contenant des codons non-sens
nt	nucléotides
N-terminal	amino terminal
pb	paire de base
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
Pol I	ARN polymérase I
Pol II	ARN polymérase II
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase	ribonucléase
RNP	ribonucléoprotéine
sb	simple brin
siARN	petit ARN interférant
TAS	séquences associées aux télomères
TERRA	molécule d'ARN contenant des séquences télomériques
TLC1	gène de l'ARN de la télomérase chez <i>S.cerevisiae</i>
Tlc1	composante ARN de la télomérase chez <i>S.cerevisiae</i>
T-loop	boucle télomérique
TMG	triméthylguanosine
TPE	effet de proximité télomérique
TRF	fragment terminal de restriction
snARN	petits ARNs nucléaires
snoARN	petits ARNs nucléolaires
WT	type sauvage

# INTRODUCTION

## 1. Les télomères

L'extrémité des chromosomes eucaryotes est protégée par une structure nucléoprotéique faite d'ADN répété en tandem et de protéines appelée télomères. Ces structures protègent entre autres les chromosomes contre des fusions bout à bout, contre la dégradation nucléolytique et contre les recombinaisons aberrantes (Ferreira et al. 2004). La première description fonctionnelle des télomères remonte à la fin des années 1930 lorsque les chercheurs Hermann Muller et Barbara McClintock, travaillant de façon indépendante, sont arrivés à la même conclusion : l'extrémité des chromosomes linéaires eucaryotes est différente d'un site de cassure double brin d'ADN à l'intérieur d'un chromosome (Muller 1938; McClintock 1939; McClintock 1941). Par contre, la biologie des télomères a commencé à être étudiée seulement une cinquantaine d'années plus tard avec la détermination des séquences télomériques et du mécanisme de synthèse des télomères chez le cilié *Tetrahymena* (Blackburn et Gall 1978; Greider et Blackburn 1985; Greider et Blackburn 1987). Depuis ce temps, ce champ d'étude s'est développé considérablement compte tenu des liens entre les télomères, le cancer et le vieillissement (Collado et al. 2007).

**1.1 L'ADN télomérique et sous-télomérique.** L'ADN télomérique est constitué de courtes séquences répétées en tandem, caractérisées par la présence de plusieurs résidus guanine (G) sur le brin d'ADN saillant à l'extrémité 3' du chromosome (Henderson 1995). Ces séquences peuvent être de nature régulières comme chez les vertébrés ou chez le cilié *Tetrahymena* ( $T_2AG_3$  et  $T_2G_4$  respectivement) (Blackburn et Gall 1978; Moyzis et al. 1988; Kipling et Cooke 1990), ou peuvent être dégénérées comme dans le cas de la levure *S. cerevisiae* ( $(TG)_{1-6}TG_{2-3}$ ) communément abrégées  $TG_{1-3}/C_{1-3}A$  (Shampay et al. 1984). Le Tableau 1 présente une liste abrégée de quelques organismes et de leurs séquences télomériques. La longueur des répétitions télomériques est très variable d'une espèce à l'autre. Ces répétitions peuvent atteindre des milliers de paires de bases (pb) chez les vertébrés tandis que chez *S. cerevisiae* elles ne sont que d'environ 300 pb (Shampay et Blackburn 1988). L'ADN télomérique se retrouve majoritairement sous forme de duplex, par contre, une extension simple brin G-riche est observée à l'extrémité 3' des télomères chez la plupart des organismes. Chez les ciliés, cette extension G-riche serait de 12-16 nucléotides (nt) (Klobutcher et al. 1981) contrairement à une centaine de bases chez *H. sapiens* (Wright et al. 1997). Chez *S. cerevisiae*, les chromosomes acquièrent une extension G-riche > 25 nt à la fin de la phase S du cycle cellulaire tandis qu'en dehors de la phase S, ces extensions seraient de 12-14 nt (Wellinger et al. 1993; Larrivee et al. 2004). La Figure 1 représente la structure d'un télomère chez *S. cerevisiae*.

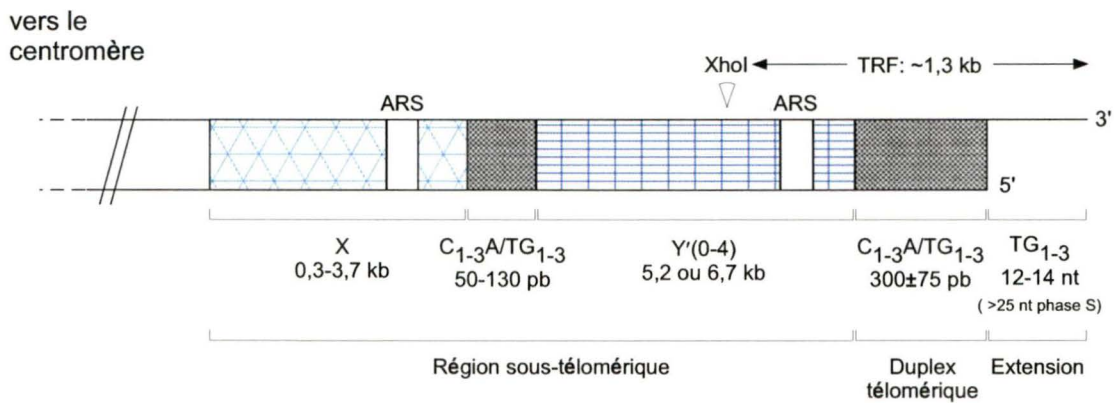


Organismes	Séquence du brin G-riche	Références
<b>Ciliés</b>		
<i>Tetrahymena thermophila</i>	T <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	(Blackburn et Gall 1978)
<i>Oxytricha nova</i>	T <sub>4</sub> G <sub>4</sub>	(Klobutcher <i>et al.</i> 1981)
<b>Levures</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(TG) <sub>1-6</sub> TG <sub>2-3</sub>	(Shampay <i>et al.</i> 1984)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T <sub>1-2</sub> ACA <sub>0-1</sub> C <sub>0-1</sub> G <sub>1-6</sub>	(Sugawara et Szostak 1986)
<b>Plante</b>		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	T <sub>3</sub> AG <sub>3</sub>	(Richards et Ausubel 1988)
<b>Vertébrés</b>		
<i>Homo sapiens</i>	T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub>	(Moyzis <i>et al.</i> 1988)
<i>Mus musculus</i>	T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub>	(Kipling et Cooke 1990)

**Tableau 1. Comparaison des répétitions télomériques chez différents organismes.**

La séquence du brin allant de 5' vers l'extrémité 3' du chromosome est représentée.

Plusieurs organismes possèdent aussi des régions sous-télomériques formées de séquences d'ADN plus ou moins répétées appelées TAS (Telomere Associated Sequences) (Henderson 1995). Chez *S. cerevisiae*, on retrouve deux catégories de TAS appelés éléments X et Y' (Chan et Tye 1983). L'élément Y' peut être de deux tailles différentes: soit le Y' long (6,7 kb) et le Y' court (5,2 kb). De plus, il se retrouve en 1 ou 4 copies sur environ les deux tiers des chromosomes. Quant à l'élément X, il a une taille allant de 0,3 à 3,7 kb et se retrouve en 1 copie sur tous les télomères. Les éléments X et Y' contiennent chacun des ARS (Autonomous Replicating Sequences) et



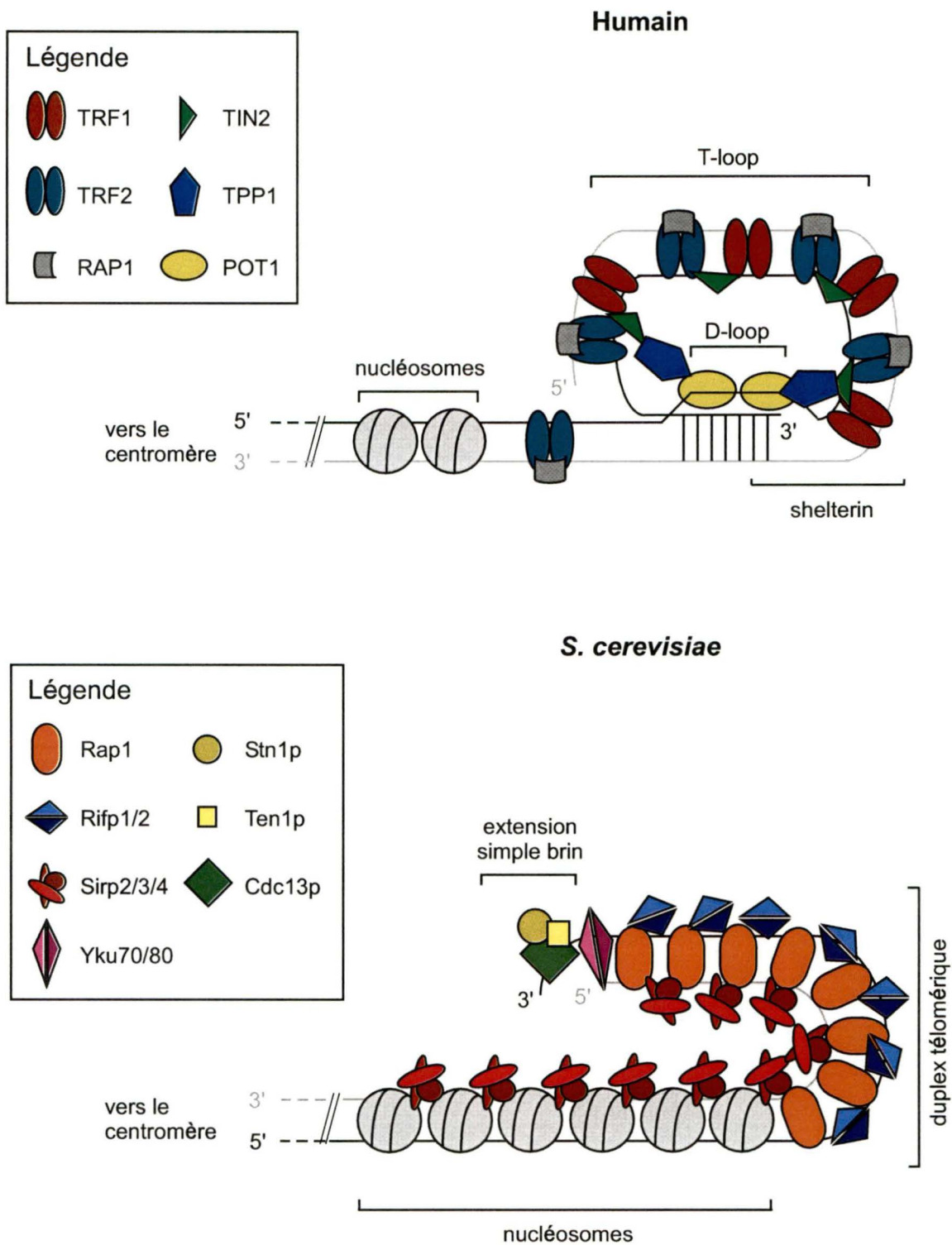
**Figure 1. Représentation schématique d'un télomère chez *S.cerevisiae*.** Les deux extrémités d'un chromosome comportent  $300 \pm 75$  pb de répétitions  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ . Les télomères contiennent aussi des régions sous-téломériques appelées X et Y' contenant chacune des séquences de répliation autonome ARS. La région Y' contient un site de restriction pour l'endonucléase XhoI permettant d'évaluer la longueur des télomères. Le fragment de restriction terminal (TRF) ainsi libéré est d'environ 1,3 kb pour des cellules de type sauvage. Voir le texte pour une description plus détaillée. La figure n'est pas à l'échelle.

peuvent ainsi servir d'origine de réplication (Louis et al. 1994; Pryde et al. 1997). Le rôle fonctionnel et structural de ces éléments demeure encore méconnu mais leur présence indique un mécanisme de maintien des télomères par recombinaison, plus précisément par la voie de recombinaison homologue impliquant la protéine Rad52p (Louis et Haber 1990; Lundblad et Blackburn 1993; Louis et al. 1994; Le et al. 1999; Teng et Zakian 1999). Les régions sous-télomériques sont liées par plusieurs protéines comme Abf1p, Tbf1p, Sir1p et les protéines du complexe ORC (Origin Replication Complex) (Fourel et al. 1999; Pryde et Louis 1999). Dernièrement, l'implication des protéines Tbf1p et Reb1p comme régulateurs négatifs de la taille des télomères a été démontrée (Berthiau et al. 2006).

Jusqu'à tout récemment, de par leur nature hétérochromatique et leur habileté à réprimer la transcription de gènes placés à proximité (voir explications prochaine section), les télomères avaient toujours été considérés transcriptionnellement inactifs. Deux récentes études ont maintenant démontré que les télomères humains sont transcrits en molécule d'ARN contenant des séquences télomériques répétées (TERRA) (Azzalin et al. 2007; Schoeftner et Blasco 2008). Ces ARN, très hétérogènes en longueur, sont transcrits à partir de régions télomériques/sous-télomériques par la polymérase II et des hybridations *in situ* par fluorescence (FISH) démontrent qu'ils sont localisés aux télomères (Azzalin et al. 2007; Schoeftner et Blasco 2008). De plus, l'abondance de ces ARNs serait régulée par différents

mécanismes incluant la taille des télomères, le stade de développement, les stress cellulaires, le stade tumoral et la structure de la chromatine (Azzalin et al. 2007; Schoeftner et Blasco 2008). Pour l'instant toutefois, le rôle joué par ces molécules d'ARN reste indéterminé.

**1.2 Les protéines télomériques.** Pour accomplir adéquatement leur fonction de protection, les télomères sont liés par plusieurs protéines, soit de façon transitoire ou de façon constitutive. Ce complexe nucléoprotéique possède une structure particulière de la chromatine qui est non-nucléosomale appelée télosome (Wright et al. 1992). Voir Figure 2. Chez *S. cerevisiae*, les répétitions télomériques ne sont pas liées par des histones mais par la protéine Rap1p (RAP : Repressor Activator Protein) (Conrad et al. 1990; Wright et Zakian 1995; Strahl-Bolsinger et al. 1997). *RAP1* est un gène essentiel qui a été identifié à la fois comme répresseur et activateur de la transcription de différents loci comme par exemple les loci de type sexuel *HML* et *HMR* (Shore et Nasmyth 1987; Buchman et al. 1988). La protéine Rap1p lie les répétitions télomériques avec grande affinité et régule de façon négative la taille des télomères (Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990). De plus, Rap1p interagit avec les protéines Rif1p et Rif2p (RIF : Rap1p Interacting Factor) (Hardy et al. 1992; Wotton et Shore 1997) ainsi qu'avec les protéines Sir3p et Sir4p (SIR : Silent Information Regulator) (Moretti et al. 1994; Strahl-Bolsinger et al. 1997). Toutes ces protéines contribueraient à maintenir l'homéostasie des télomères. Différents mutants de délétion de



**Figure 2. Modèles de configurations adoptées par les télomères humains et de levures.** Les télomères humains se terminent par une structure en boucle nommée T-loop/D-loop où le simple brin télomérique envahit le duplexe télomérique pour déplacer le brin G-riche. Les télomères de levures se replient sur eux-mêmes pour former une région hétérochromatique répressive. Plusieurs protéines faisant parties du télosome sont indiquées sur le schéma toutefois certaines protéines décrites dans le texte ne sont pas représentées.

Rap1p (*rap1<sup>Δ</sup>*) ainsi que la délétion des protéines Rif1p et Rif2p provoquent une augmentation de la taille des télomères (Kyrion et al. 1992; Wotton et Shore 1997). Plusieurs protéines impliquées dans les voies de signalisation (points de contrôle) et de réparation des dommages à l'ADN se retrouvent aussi aux télomères. C'est le cas notamment de l'hétérodimère Ku70p/Ku80p qui lie directement l'ADN télomérique de façon constitutive durant tout le cycle cellulaire (Gravel et al. 1998; Fisher et al. 2004; Schramke et al. 2004). Ku aurait un rôle important à jouer au niveau de la protection des télomères contre des mécanismes de dégradation nucléolytique et de recombinaison; rôle qu'il joue également au site de cassure double brin d'ADN (Polotnianka et al. 1998; Fisher et Zakian 2005). En son absence, les télomères sont très courts et une longue extension G-riche est observée durant tout le cycle cellulaire (Boulton et Jackson 1996; Porter et al. 1996; Gravel et al. 1998). Ku aurait aussi un rôle à jouer dans le recrutement de la télomérase (voir explications section 2.2). Le complexe MRX (Mre11p, Rad50p, Xrs2p) et la protéine Tel1p seraient aussi présents aux télomères (Takata et al. 2004; Takata et al. 2005). L'absence de Tel1p ou d'une des composantes du complexe MRX cause un raccourcissement des télomères (Lustig et Petes 1986; Kironmai et Muniyappa 1997; Boulton et Jackson 1998). Il a récemment été démontré que Tel1p était enrichie aux télomères courts et était requis pour des niveaux normaux des protéines Est1p et Est2p aux télomères (Goudsouzian et al. 2006; Bianchi et Shore 2007; Sabourin et al. 2007). De plus, Tel1p serait important pour l'activation de la télomérase

spécifiquement aux télomères courts (Arneric et Lingner 2007; Chang et al. 2007; Hector et al. 2007). Quant au complexe MRX, il serait important pour l'établissement de la structure télomérique terminale et pour réguler l'assemblage de protéines impliquées au niveau de la réplication des télomères (Larrivee et al. 2004; Takata et al. 2005). Des protéines liant l'ADN télomérique double brin ont aussi été identifiées chez d'autres organismes. Chez la levure *S. pombe* la protéine Taz1p s'associe aux répétitions télomériques (Cooper et al. 1997) tandis que chez les mammifères les répétitions sont liées par les protéines TRF1 et TRF2 (Zhong et al. 1992; Billaud et al. 1996; Billaud et al. 1997). Plusieurs facteurs se lient aussi aux protéines TRF1 et TRF2. TRF1 interagit entre autres avec les protéines TANK1/2, PINX1, TIN2 et KU70/80 (Hsu et al. 2000; Smith et de Lange 2000; Kaminker et al. 2001; Zhou et Lu 2001; Kim et al. 2004; Ye et al. 2004a). De son côté, TRF2 interagit avec les protéines WRN, hRAP1, TIN2, ERCC1/XPF et MRN (Li et al. 2000; Zhu et al. 2000; Zhu et al. 2003; Opresko et al. 2004). TRF1 est considéré comme un régulateur négatif de la taille des télomères tandis que TRF2 est important pour les fonctions de capuchon télomérique et pourrait avoir un rôle à jouer dans les mécanismes de réparation de dommages à l'ADN (Smogorzewska et de Lange 2004; Bradshaw et al. 2005).

Tout comme le duplexe télomérique, l'extrémité 3' simple brin est également liée par des protéines spécifiques. Chez *S. cerevisiae*, il a été

démontré que la protéine essentielle Cdc13p possède une très grande affinité pour l'extension simple brin télomérique (Lin et Zakian 1996; Nugent et al. 1996). Cdc13p interagit avec les protéines Stn1p et Ten1p pour former un capuchon télomérique qui protège l'extrémité chromosomique (Grandin et al. 1997; Grandin et al. 2001). La perte de fonction de la protéine Cdc13p (*cdc13-1*) ou de la protéine Stn1p (*stn1-13*) cause une dégradation du brin C-riche dans la phase G2/M résultant en une augmentation de l'extension simple brin télomérique (Garvik et al. 1995; Grandin et al. 1997; Vodenicharov et Wellinger 2006). Chez les mammifères, la protéine POT1 (Protection Of Telomeres) s'associe aux télomères via une interaction avec la protéine TPP1 (alias PTOP/PIP1/TINT1) (Liu et al. 2004) et via une interaction avec l'extension simple brin (Ye et al. 2004b). Ces protéines liant le simple brin télomérique sont très importantes pour protéger l'extrémité chromosomique.

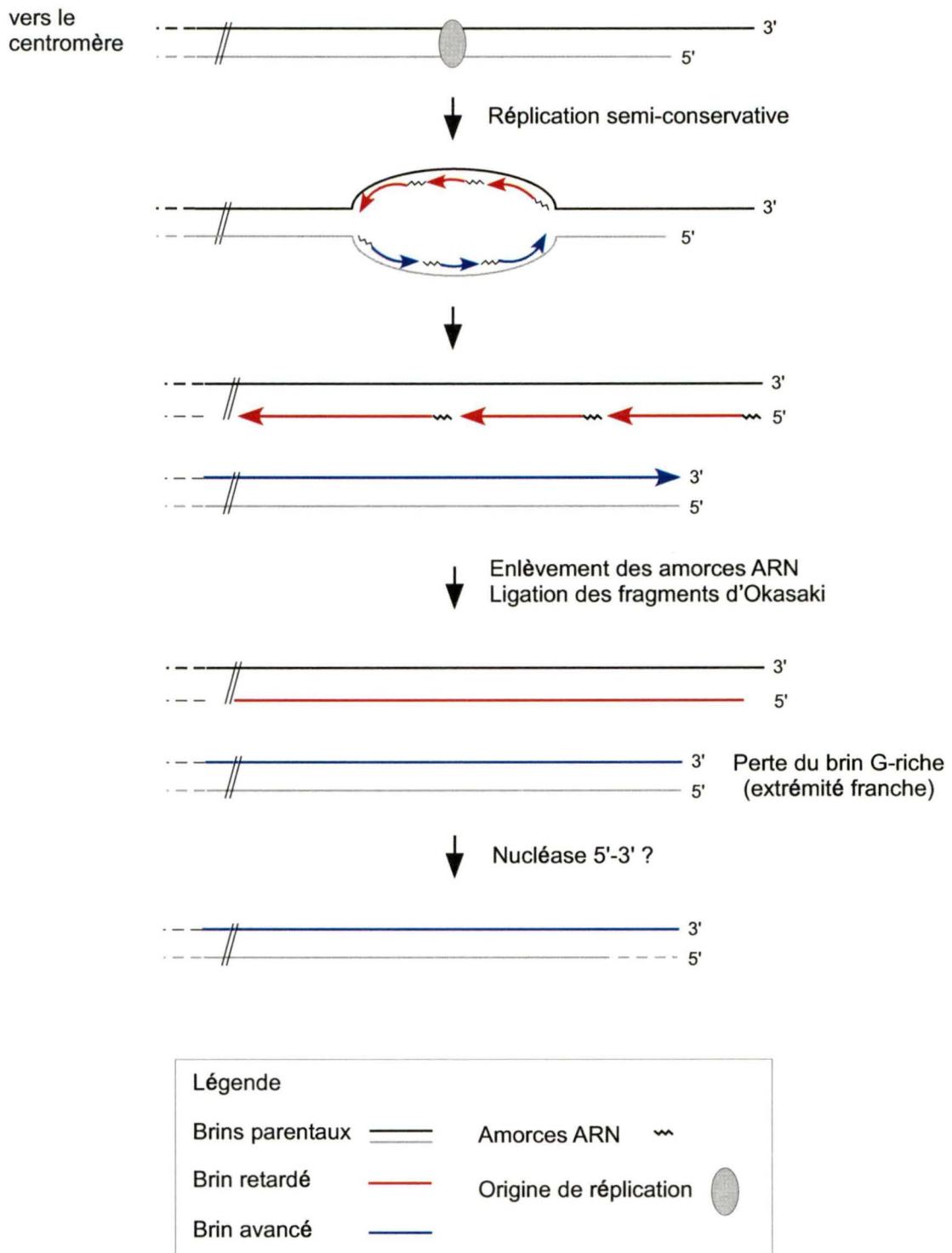
Récemment chez les mammifères, le concept de « shelterin » a émergé comme étant un complexe qui donne forme aux télomères et ainsi qui les protège (de Lange 2005). Ce complexe est formé des protéines TRF1, TRF2, POT1, soit trois protéines qui lient les répétitions télomériques, interconnectées par les protéines TIN2, TPP1 et RAP1. Il a été démontré par une analyse de microscopie électronique que les télomères humains ne se terminent pas de façon linéaire mais plutôt par une structure en boucle nommée T-loop/D-loop (Griffith et al. 1999). Il a été proposé que l'extrémité simple brin envahisse le duplex télomérique pour aller interagir avec le brin C-



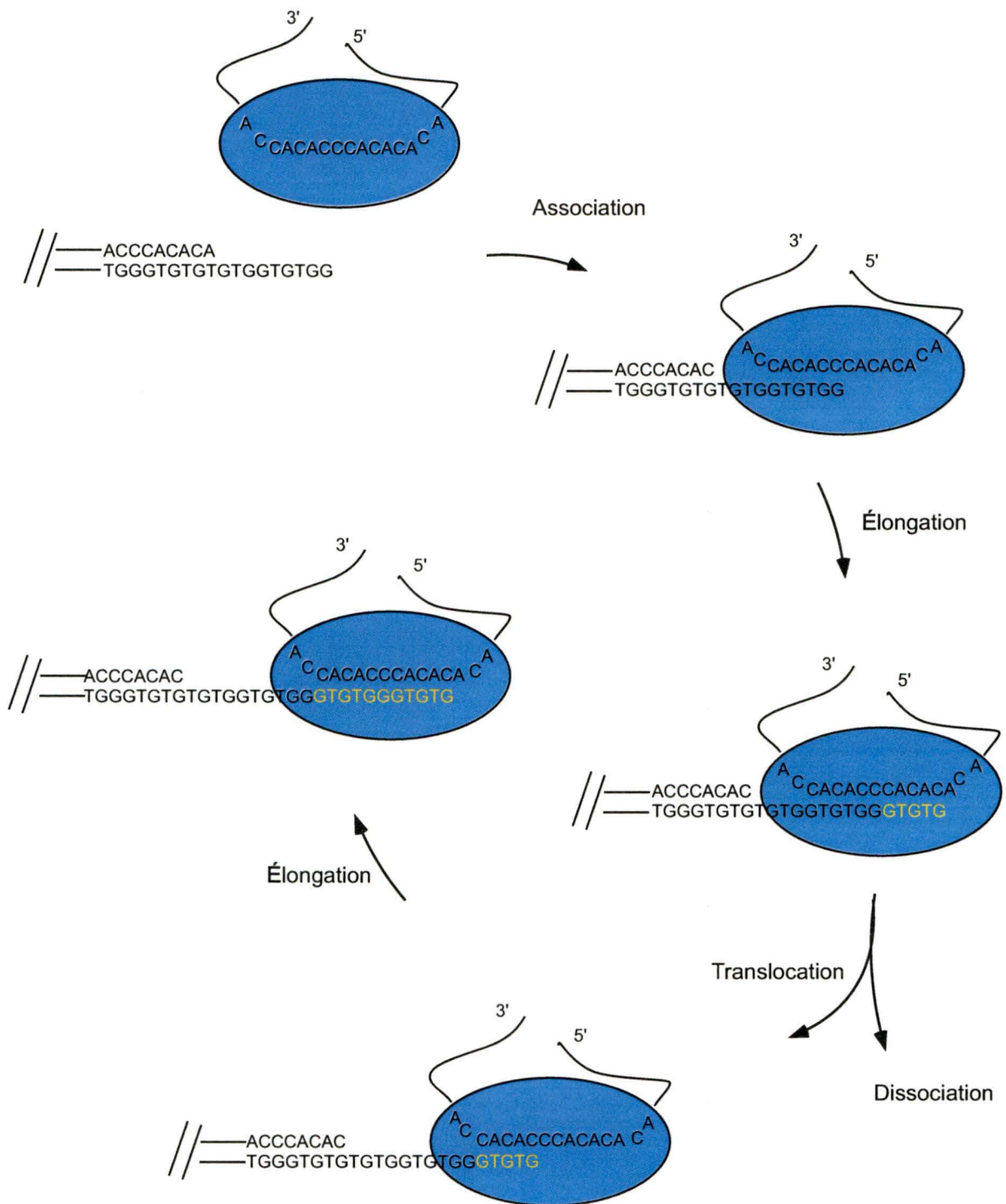
riche et par le fait même déplacer le brin G-riche. Voir Figure 2. *In vitro*, TRF1 et TRF2 possèdent chacune la capacité de plier l'ADN ce qui pourrait peut-être stimuler le repliement des télomères *in vivo* (Bianchi et al. 1997; Griffith et al. 1999). La protéine TRF2 serait quant à elle très importante pour maintenir une structure télomérique normale et protéger les chromosomes contre des fusions bout à bout (van Steensel et al. 1998). Chez la levure, il a été suggéré qu'un repliement structural des télomères pourrait se former par l'association des séquences télomériques et sous-télomériques (Strahl-Bolsinger et al. 1997; Pryde et Louis 1999; de Bruin et al. 2000; de Bruin et al. 2001). *In vitro*, il a été démontré que la protéine Rap1p peut stimuler le repliement d'ADN télomérique (Vignais et Sentenac 1989; Muller et al. 1994). De plus, le repliement structural des télomères serait requis pour maintenir une répression transcriptionnelle près des télomères appelée TPE (Telomere Position Effect) (Gottschling et al. 1990; de Bruin et al. 2000). Curieusement, la formation d'une structure télomérique en boucle (T-loop) a récemment été observée par microscopie électronique chez une levure *K. lactis* mutante possédant des télomères anormalement longs (Cesare et al. 2008).

**1.3 Le problème répliatif terminal.** En plus de leur rôle de protection, les télomères permettent aussi la réplication complète des chromosomes. Le « end replication problem » a été soulevé pour la première fois au début des années 1970 (Watson 1972; Olovnikov 1973). En effet, suite à la réplication conventionnelle, une brèche est générée à l'extrémité 5'

du nouveau brin synthétisé dû à l'enlèvement de la dernière amorce d'ARN. Voir Figure 3. Sans aucun mécanisme compensatoire, les chromosomes se raccourciraient à chaque division cellulaire subséquente, causant ainsi une instabilité génomique menant éventuellement à la mort cellulaire. Pour pallier à ce problème, la plupart des eucaryotes utilisent l'enzyme télomérase (Greider et Blackburn 1985; Greider et Blackburn 1987). La télomérase est une ribonucléoprotéine composée d'une sous-unité catalytique transcriptase inverse, d'une matrice ARN et de protéines accessoires. La composante ARN contient une courte séquence complémentaire aux répétitions télomériques qui est utilisée comme matrice pour allonger le brin G-riche à l'aide de la sous-unité transcriptase inverse (Yu et al. 1990; Singer et Gottschling 1994; Lingner et al. 1997b). Voir Figure 4. Chez l'humain et les ciliés, la télomérase est capable d'ajouter plusieurs nucléotides à un substrat télomérique sur plusieurs rondes d'élongation *in vitro*, une activité nommée processive (Morin 1989; Greider 1991). Par contre chez *S. cerevisiae*, l'activité de la télomérase *in vitro* est non processive, c'est-à-dire que la télomérase reste liée à son substrat après une ronde d'élongation (Cohn et Blackburn 1995; Prescott et Blackburn 1997a). *In vivo*, l'activité de la télomérase chez *S. cerevisiae* serait majoritairement non processive sauf au niveau des télomères très courts (Chang et al. 2007). La télomérase sera introduite plus en détails dans la prochaine section.



**Figure 3. Le problème réplcatif terminal.** Lorsque la réplication de l'ADN débute à une origine de réplication, deux fourches de réplication se forment et se dirigent dans des directions opposées. Puisque l'ADN est synthétisé seulement dans la direction 5'-3', chaque fourche va contenir un brin avancé et un brin retardé générant ainsi deux extrémités chromosomiques différentes. La synthèse discontinue du brin retardé va générer une extension 3' causée par l'enlèvement de la dernière amorce ARN (fragment d'Okasaki). Sans mécanismes compensatoires, le chromosome va raccourcir à chaque rondes de réplcations. D'un autre côté la synthèse continue du brin avancé va générer une extrémité franche qui pourrait être transformée à son tour en extension 3', par l'action d'une nucléase 5'-3' hypothétique.



**Figure 4. Cycle d'élongation par la télomérase.** La télomérase utilise sa matrice ARN pour allonger le brin G-riche des télomères. Après une première élongation (nucléotides jaunes), la télomérase peut soit se dissocier ou se transloquer pour une seconde ronde d'élongation.

Les télomères peuvent aussi être maintenus par d'autres mécanismes alternatifs. Par exemple chez *D. melanogaster*, la télomérase n'est pas présente et les télomères sont maintenus par rétrotransposition (Pardue et DeBaryshe 2003). Chez *S. cerevisiae*, en absence d'activité télomérase, les télomères peuvent être maintenus par recombinaison homologue (Lundblad et Blackburn 1993; Lendvay et al. 1996). Les télomères de certaines lignées cellulaires humaines peuvent également être maintenus par des mécanismes alternatifs appelés ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) (Bryan et al. 1995; Bryan et al. 1997; Dunham et al. 2000).

**1.4 L'homéostasie télomérique.** Chez *S. cerevisiae*, la taille des télomères est maintenue par un équilibre entre le raccourcissement réplicatif et l'allongement par la télomérase (Shampay et al. 1984). Un important mécanisme de régulation en *cis* de la taille des télomères a été démontré avec le « décompte protéique » des protéines Rap1p, Rif1p, Rif2p (Marcand et al. 1997; Ray et Runge 1999; Levy et Blackburn 2004). Il a été démontré que le fait de lier de façon artificielle un plus grand nombre de protéines Rap1p aux télomères provoque un raccourcissement de ces derniers proportionnel au nombre de molécules Rap1p présentes aux télomères (Marcand et al. 1997). Le même effet a été observé avec les protéines Rif1p et Rif2p, et ce, même dans la situation où Rap1 ne peut lier les protéines Rif1p/Rif2p (Levy et Blackburn 2004). Le mécanisme de décompte protéique se ferait donc via le décompte des protéines Rif1p/Rif2p.

Il a été proposé qu'un repliement structural transitoire des télomères pourrait être formé en présence d'un grand nombre de protéines Rap1p/Rif1p/Rif2p déployées aux télomères (Ray et Runge 1999; Levy et Blackburn 2004). Cette liaison en *cis* de facteurs protéiques à l'extrémité des chromosomes aurait une importance cruciale pour la régulation de l'activité télomérase. Il a récemment été démontré qu'en fait, les télomères se retrouvent sous deux conformations, soit extensible ou non extensible par la télomérase (Teixeira et al. 2004). Le laboratoire du Dr. J. Lingner a développé un essai permettant une analyse de l'élongation d'un seul télomère à la fois. Cet essai a permis de démontrer que la télomérase n'agit pas sur tous les télomères à chaque cycle cellulaire mais agit préférentiellement sur les télomères qui sont courts. L'homéostasie de la taille des télomères serait donc régulée par un état extensible ou non extensible par la télomérase: un télomère long recrute plusieurs complexes Rap1/Rif1p/Rif2 et se retrouve dans un état non extensible tandis qu'un télomère court recrute moins de complexes Rap1/Rif1p/Rif2 et se retrouve dans un état extensible (Loayza et de Lange 2004). Une régulation semblable est aussi observée chez les cellules humaines avec le complexe « shelterin » (Ancelin et al. 2002; Smogorzewska et de Lange 2004; Cristofari et al. 2007b).

## 2. La télomérase

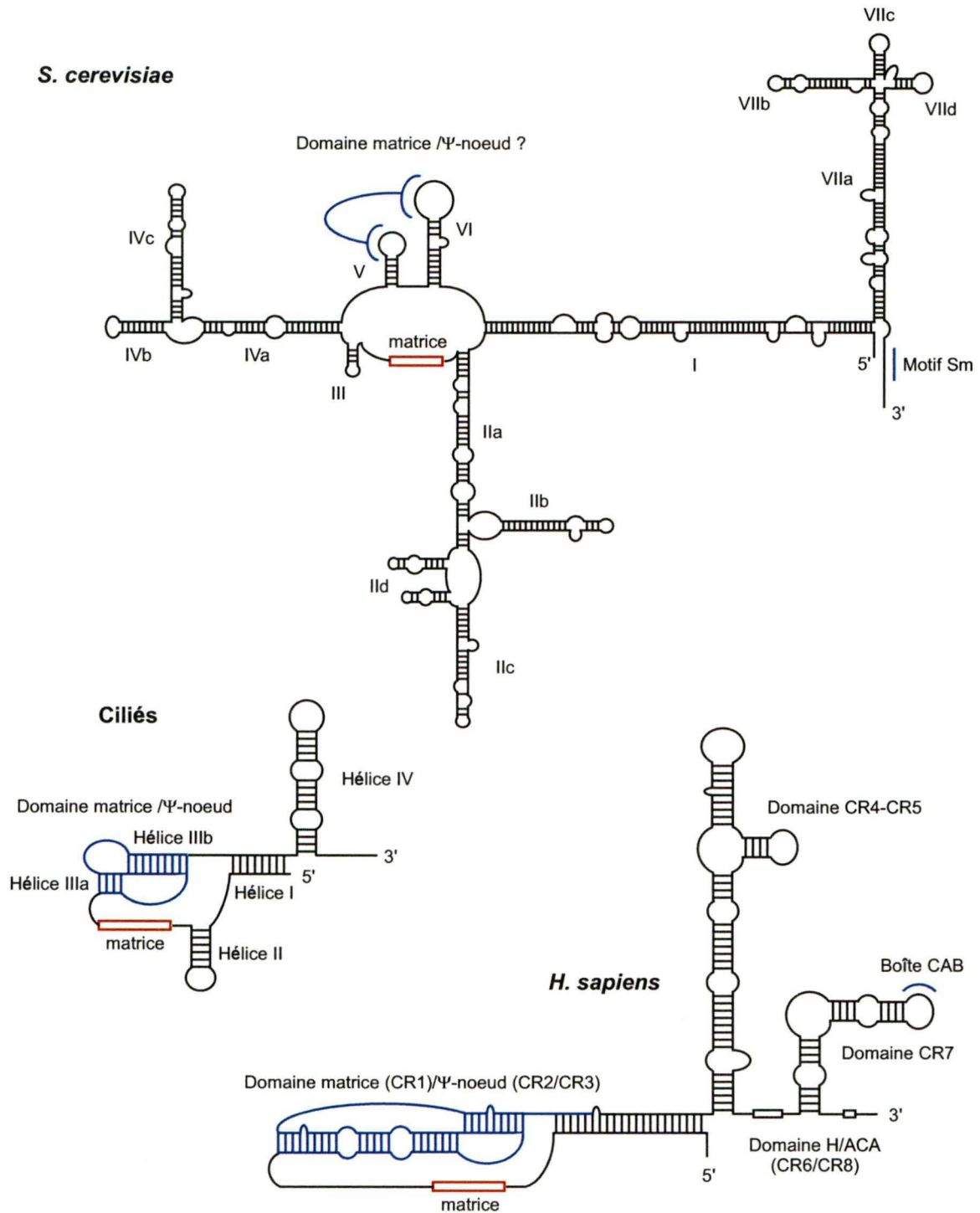
Les premières évidences biochimiques de l'activité télomérase ont été démontrées dans le laboratoire du Dr. E.H. Blackburn par le Dr. C.W. Greider en 1985 (Greider et Blackburn 1985). En ajoutant un oligonucléotide (TTGGGG)<sub>4</sub> à un extrait cellulaire de *Tetrahymena* contenant du dGTP radiomarké, le Dr. Greider a pu mettre en évidence une activité qui générerait une échelle de répétitions ayant une périodicité de 6 nucléotides par analyse sur gel de polyacrylamide. Cette activité « terminale transférase » spécifique aux séquences télomériques, fut nommée par la suite télomérase (Greider et Blackburn 1987). Peu de temps après, la dépendance d'une matrice ARN pour cette activité fut démontrée (Greider et Blackburn 1989; Yu et al. 1990). Des études génétiques chez *S. cerevisiae* étaient aussi menées en parallèle. Un criblage génétique ayant pour but de trouver des mutants affectés dans le maintien de leurs télomères a été effectué dans le laboratoire de Dr. J.W. Szostack par le Dr. V. Lundblad. Ce criblage a permis d'identifier un gène nommé alors *EST1* (Ever Shorter Telomeres) puisque les télomères de ce mutant raccourcissaient de plus en plus au fil des générations (Lundblad et Szostak 1989). Plusieurs études génétiques et biochimiques ont par la suite mis en évidence les composantes protéiques et ARN de la télomérase chez différents organismes (Cohn et Blackburn 1995; Lendvay et al. 1996; Counter et al. 1997; Lingner et al. 1997a; Lingner et al. 1997b; Prescott et Blackburn 1997b; Nugent et Lundblad 1998).

**2.1 Les composantes.** *In vitro* l'activité télomérase requiert seulement la composante ARN et la sous-unité catalytique transcriptase inverse de la télomérase (Lingner et al. 1997a). Par contre, plusieurs protéines sont essentielles à l'activité télomérase *in vivo*. Chez *S. cerevisiae*, le noyau catalytique de la télomérase est composé de Est2p (sous-unité transcriptase inverse) et de Tlc1 (sous-unité ARN) mais cette ribonucléoprotéine contient aussi plusieurs protéines régulatrices (Est1p, Est3p, yKu70/80p, Sm). La délétion des gènes *EST1*, *EST2*, *EST3* et *TLC1* cause un raccourcissement progressif des télomères d'environ 3-5 pb par division cellulaire et mène à une sénescence cellulaire après environ 60-80 générations (Lundblad et Szostak 1989; Singer et Gottschling 1994; Lendvay et al. 1996). La surexpression de certaines composantes de la télomérase peut aussi causer des phénotypes télomériques. Par exemple, une surexpression de la protéine Est1p peut causer une légère augmentation de la taille des télomères dans certaines souches de levures (Virta-Pearlman et al. 1996). D'un autre côté, la surexpression de l'ARN Tlc1 peut causer un raccourcissement des télomères en séquestrant l'hétérodimère yKu70/80 (Singer et Gottschling 1994; Peterson et al. 2001).

L'ARN de la télomérase n'a pas seulement une fonction de matrice, il est aussi important pour la liaison de plusieurs protéines et pour l'assemblage de la télomérase en soi. La taille des ARNs de la télomérase varie énormément d'une espèce à l'autre. Il peut être très court comme chez les



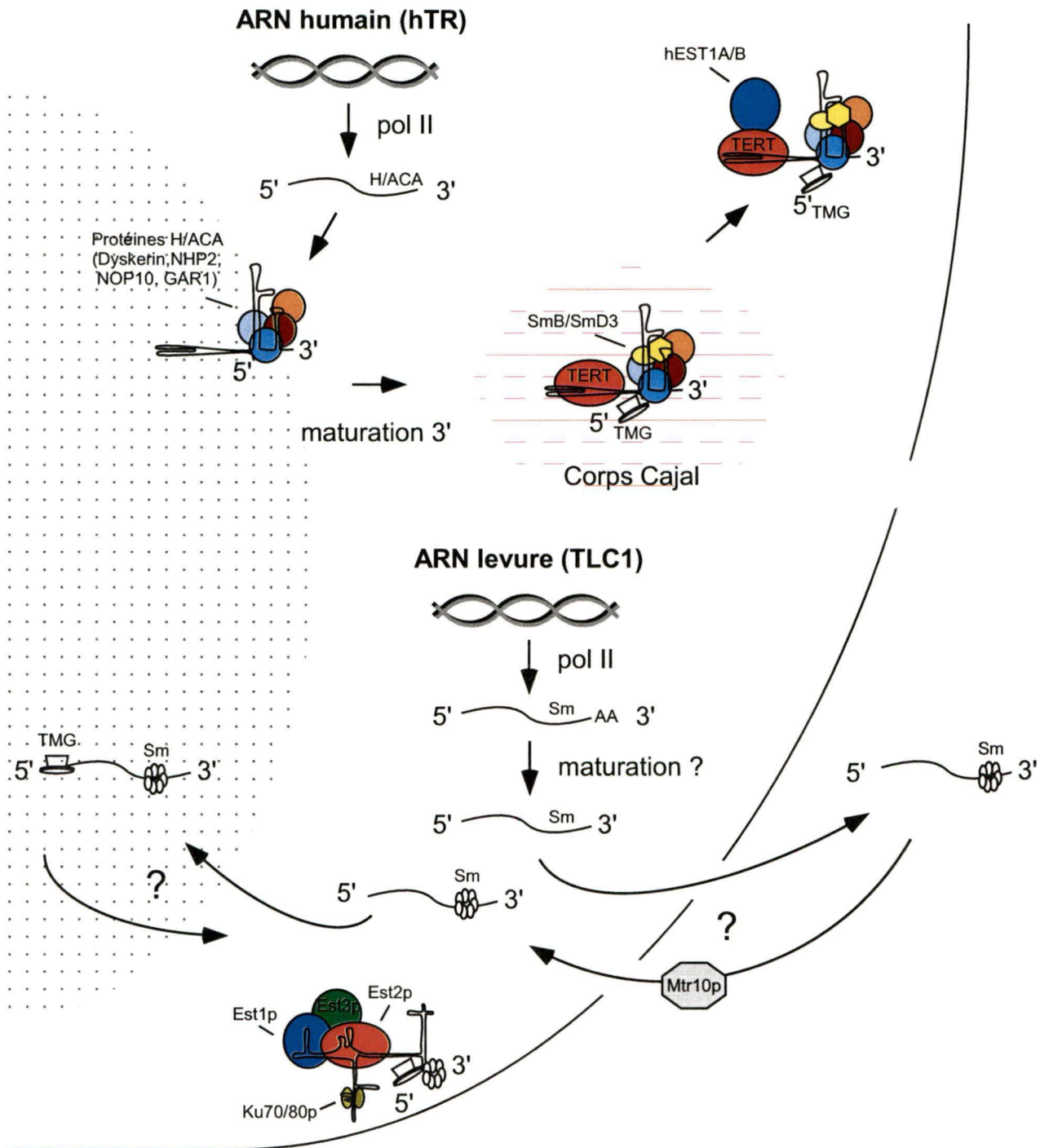
ciliés ~ 150 nt (Greider et Blackburn 1989) ou les vertébrés ~ 450 nt (Chen et al. 2000) mais il peut aussi être très long comme chez les levures ~ 1300 nt (Singer et Gottschling 1994; Dandjinou et al. 2004; Zappulla et Cech 2004; Hsu et al. 2007; Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). La structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez les ciliés et les vertébrés est très similaire incluant entre autres la formation d'une structure pseudo-nœud (structure d'ARN tertiaire adoptant une conformation s'apparentant à un nœud) autour de la région matrice. Voir Figure 5. Récemment, une structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae* (Tlc1) a été déterminée par analyse phylogénétique et par prédiction informatique (Dandjinou et al. 2004; Zappulla et Cech 2004). Cette structure inclue entre autres certaines régions hélicales connues comme étant des sites de liaisons des protéines Est1p et yKu70/80 (Peterson et al. 2001; Seto et al. 2002) ainsi qu'une région centrale connue pour interagir avec la sous-unité catalytique Est2p (Chappell et Lundblad 2004; Lin et al. 2004). Tout comme chez les ciliés et les vertébrés, des observations suggèrent que la région centrale pourrait former une structure pseudo-nœud entre les hélices V et VI (Chappell et Lundblad 2004; Lin et al. 2004). Chez l'humain, le pseudo-nœud d'une molécule d'ARN hTR pourrait former une interaction en *trans* avec le pseudo-nœud d'une seconde molécule d'ARN hTR (Ly et al. 2003). Une interaction semblable reste à être démontrée chez la levure mais il a tout de même été suggéré que Tlc1 aurait la capacité de dimériser (Prescott et Blackburn 1997a; Gipson et al. 2007). La structure de l'ARN Tlc1 semble très flexible.



**Figure 5. Structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez différentes espèces.** La séquence matrice de l'ARN est indiquée par un rectangle rouge. Le domaine pseudo-noeud caractérisé (ciliés, humains) ou non (levure) est indiqué en bleu. Les autres différents domaines sont aussi indiqués.

En effet, il est possible de changer la position de la tige-boucle liant Est1p à un autre endroit dans Tlc1 sans affecter les fonctions de la télomérase (Zappulla et Cech 2004). De plus, il est possible de réduire la taille de Tlc1 en rapprochant les régions essentielles à la liaison des constituants protéiques de la télomérase tout en conservant une certaine activité *in vivo* (Zappulla et al. 2005). Ce « mini-Tlc1 » ne peut toutefois pas compléter parfaitement la délétion de l'ARN Tlc1 puisque ces souches possèdent des télomères plus courts mais stables. Par ailleurs, il a récemment été démontré que le nombre de molécule d'ARN Tlc1 est inférieur au nombre de télomères dans une levure haploïde (Mozdy et Cech 2006). Cette étude a également démontré qu'une levure diploïde hétérozygote *TLC1/tlc1Δ* a des télomères plus courts qu'une levure diploïde de type sauvage, démontrant ainsi l'haplo-insuffisance de la télomérase (Mozdy et Cech 2006).

La maturation de l'ARN Tlc1 ressemble beaucoup à la maturation des snARNs. Voir Figure 6. Tout comme la majorité des snARNs, Tlc1 est transcrit par l'ARN polymérase II, il possède une coiffe TMG à son extrémité 5' ainsi qu'un site Sm à son extrémité 3' essentiel à la liaison des protéines Sm (Chapon et al. 1997; Seto et al. 1999). Chez la levure, Tlc1 se retrouve sous deux formes : soit une forme polyadénylée (poly A+) qui compte pour environ 5-10% de Tlc1 au total, ainsi qu'une forme non polyadénylée (poly A-) qui compte pour la majorité de Tlc1 (Chapon et al. 1997). Il a d'ailleurs été proposé que la forme poly A+ serait un précurseur de la forme poly A-. De



**Figure 6. Modèle de maturation de l'ARN de la télomérase chez l'humain et chez la levure.** La maturation de l'ARN hTR chez la télomérase humaine s'apparente beaucoup à la maturation des snoARNs tandis que la maturation de l'ARN Tlc1 chez la télomérase de levure s'apparente beaucoup à la maturation des snARNs. Voir le texte pour une description plus détaillée.

plus, Tlc1 poly A- serait la forme majeure associée au complexe télomérase (Bosoy et al. 2003). Récemment, l'ARN de la télomérase chez la levure *S. pombe* a été identifié (Ter1) et tout comme l'ARN de *S. cerevisiae* Tlc1, il possède une coiffe TMG, un site Sm et une certaine fraction est polyadénylée (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). Concernant la localisation de Tlc1, il a été suggéré que cet ARN pourrait transiter dans le cytoplasme et dans le nucléole (Teixeira et al. 2002). De plus, l'importine Mtr10p pourrait aussi avoir un rôle à jouer au niveau de la localisation nucléaire de Tlc1 puisqu'en son absence, Tlc1 se retrouve partout à l'intérieur de la cellule (Ferrezuelo et al. 2002). Toutefois, ces expériences ont toutes été réalisées en condition de surexpression ce qui ne reflète pas toujours la réalité. Chez les vertébrés, les snARNs subissent plusieurs étapes de maturation dans le cytoplasme où ils acquièrent une coiffe TMG et s'associent aux protéines Sm avant d'être importés de nouveau dans le noyau (Matera et Shpargel 2006). Chez la levure, la présence des snARNs dans le cytoplasme est toujours incertaine mais des observations suggèrent que les snARNs pourraient acquérir leur coiffe TMG au nucléole (Mouaikel et al. 2002).

Contrairement à la levure, la maturation de l'ARN de la télomérase hTR chez l'humain ressemble beaucoup plus à la maturation des petits ARNs nucléolaires (snoARNs). Voir Figure 6. hTR est transcrit par l'ARN polymérase II, il possède une coiffe TMG à son extrémité 5' et un motif H/ACA à son extrémité 3' essentiel pour la liaison des protéines H/ACA (Feng et al.

1995; Mitchell et al. 1999; Dragon et al. 2000; Pogacic et al. 2000; Fu et Collins 2006). Plus récemment, il a été démontré que hTR possède aussi un motif CAB à son extrémité 3' qui contribue à la liaison de certaines protéines Sm à hTR (Fu et Collins 2006). Le motif CAB est également essentiel à la localisation de hTR dans les corps Cajal (Jady et al. 2004; Zhu et al. 2004). La signification biologique de cette localisation a récemment été démontrée. L'accumulation de hTR dans les corps Cajal serait importante pour faciliter le recrutement de la télomérase aux télomères et pour faciliter l'élongation des télomères mais ne serait pas nécessaire à la biogénèse de la télomérase contrairement à ce qui avait été proposé précédemment (Pederson 2004; Cristofari et al. 2007a; Theimer et al. 2007). Tout comme chez la levure et l'humain, la biogénèse de la télomérase chez les ciliés semble s'effectuer par différentes étapes d'assemblage protéique.

Contrairement à la sous-unité ARN, la sous-unité catalytique (TERT) de la télomérase est conservée chez les eucaryotes. La protéine p123 de *E. aediculatus* a été la première sous-unité catalytique purifiée (Lingner et Cech 1996). Des analyses de séquences ont permis de révéler des motifs caractéristiques de transcriptase inverse dans la séquence de p123 (Lingner et al. 1997b). Par la suite, la recherche de motifs transcriptase inverse chez d'autres eucaryotes a permis d'identifier plusieurs homologues notamment chez l'humain (hTERT) et chez la levure (Est2p) (Counter et al. 1997; Kilian et al. 1997; Lingner et al. 1997b; Meyerson et al. 1997; Nakamura et al. 1997).

Chez *S. cerevisiae*, la sous-unité catalytique Est2p a tout d'abord été identifiée par un criblage génétique comme étant une protéine essentielle au maintien des télomères (Lendvay et al. 1996). Par la suite, des comparaisons de séquences ont permis de révéler qu'Est2p possède un motif transcriptase inverse essentiel à l'activité de la protéine; l'introduction d'une simple mutation à l'intérieur de ce motif mène à un raccourcissement des télomères et éventuellement à la sénescence (Counter et al. 1997; Lingner et al. 1997b). En plus de son domaine transcriptase inverse, Est2p possède aussi d'autres domaines fonctionnels permettant l'interaction avec les autres composantes de la télomérase. Par exemple, les portions N-terminale et centrale d'Est2p contiennent différents motifs requis pour la liaison avec la protéine Est3p et pour l'interaction avec l'ARN Tlc1 respectivement (Friedman et Cech 1999; Barbour et al. 2000; Livengood et al. 2002; Friedman et al. 2003). Plus spécifiquement, des motifs structuraux dans l'ARN Tlc1 sont importants pour cette interaction Est2p-Tlc1 (Chappell et Lundblad 2004; Lin et al. 2004). De plus, une interaction entre la protéine nucléolaire PinX1p et Est2p a été démontrée (Lin et Blackburn 2004). Il a été suggéré que PinX1p pourrait agir comme protéine chaperonne et séquestrer Est2p au nucléole en formant un complexe inactif (Lin et Blackburn 2004). Une autre étude a aussi démontré qu'Est2p pouvait transiter dans le nucléole, par contre, comme expliqué précédemment, cette étude a été effectuée en conditions de surexpression (Teixeira et al. 2002).

En plus de ces deux composantes du noyau catalytique de la télomérase, d'autres protéines font aussi parties de cette ribonucléoprotéine. Chez *S. cerevisiae*, un criblage génétique ayant pour but d'identifier des facteurs ayant des problèmes au niveau du maintien de leurs télomères a permis d'identifier la protéine Est1p (Lundblad et Szostak 1989). Cette protéine aurait un rôle important à jouer au niveau du recrutement et de l'activation de la télomérase et ce, de façon spécifique au cours du cycle cellulaire (Taggart et al. 2002). Récemment des homologues d'Est1p ont aussi été identifiés chez l'humain et chez les levures *S. pombe* et *C. albicans*, ces homologues seraient aussi impliqués dans le maintien des télomères (Beernink et al. 2003; Reichenbach et al. 2003; Singh et Lue 2003; Snow et al. 2003). Tout comme Est2p, il a été démontré qu'Est1p interagit directement avec l'ARN Tlc1 (Zhou et al. 2000a; Livengood et al. 2002; Seto et al. 2002). Une autre protéine, Est3p, interagit aussi avec l'ARN Tlc1 mais cette interaction est dépendante de la protéine Est2p (Hughes et al. 2000; Friedman et al. 2003). Est3p a été identifié dans un criblage génétique et sa délétion confère elle aussi un phénotype de sénescence (Lendvay et al. 1996). Pour l'instant le rôle d'Est3p au niveau du maintien des télomères demeure toujours mal compris. Une autre protéine se retrouve aussi associée au complexe télomérase, soit l'hétérodimère Ku. Ku lie directement une structure tige-boucle dans l'ARN Tlc1 (Peterson et al. 2001). Cette interaction serait importante pour une association normale d'Est1p et d'Est2p aux télomères. Tout comme Est1p, Ku aurait un rôle important à jouer dans



la régulation de la télomérase au travers du cycle cellulaire (Fisher et al. 2004). Ces rôles seront introduits dans la prochaine section.

**2.2 Les mécanismes de recrutement et de régulation.** Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité télomérase est régulée d'une façon dépendante du cycle cellulaire. Il a été démontré que l'allongement des télomères survient en fin de phase S jusqu'au début de la phase G2/M et qu'aucune élongation n'est observée en phase G1 (Diede et Gottschling 1999; Marcand et al. 2000). Malgré cette absence d'activité en phase G1, il semblerait que le noyau catalytique de la télomérase serait présent aux télomères de façon constitutive. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont démontré que la sous-unité catalytique Est2p était présente aux télomères tout au long du cycle cellulaire et que cette interaction était dépendante de l'ARN Tlc1 (Taggart et al. 2002). De plus, il a été démontré que la liaison de l'ARN Tlc1 avec l'hétérodimère Ku était essentielle à la présence d'Est2p aux télomères en phase G1 (Fisher et al. 2004). Toutefois, le recrutement de la télomérase par l'hétérodimère Ku n'est pas requis durant toutes les phases du cycle cellulaire. En absence de Ku, les protéines Est1p et Est2p se retrouvent quand même aux télomères en fin de phase S mais en faible quantité (Fisher et al. 2004). De plus, la délétion de Ku cause un important raccourcissement des télomères mais ces derniers sont maintenus à cette longueur critique de façon stable, contrairement à la sénescence engendrée par la délétion des sous-unités de la télomérase

(Boulton et Jackson 1996). Ces résultats suggèrent que Ku serait important, mais non essentiel, pour recruter la télomérase aux télomères en phase G1 et pourrait promouvoir son activité en fin de phase S.

Un autre mécanisme de recrutement et d'activation de la télomérase très important et indépendant de Ku se ferait via la liaison des protéines Cdc13p et Est1p. Plusieurs évidences biochimiques et génétiques suggèrent que Cdc13p et Est1p interagissent ensemble et que cette interaction est essentielle pour l'activité de la télomérase (Evans et Lundblad 1999; Qi et Zakian 2000; Pennock et al. 2001). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont démontrées que la protéine Cdc13p était présente aux télomères tout au long du cycle cellulaire, avec une forte augmentation en fin de phase S, soit au moment où les télomères sont allongés par la télomérase (Taggart et al. 2002). Cette même étude a aussi démontrée que la présence de la protéine Est1p aux télomères était régulée dans le cycle cellulaire. En effet, Est1p n'est pas détectée aux télomères en phase G1 par contre une forte association d'Est1p est observée en fin de phase S. Des expériences de co-immunoprécipitation ont aussi démontrées qu'Est2p et Est1p interagissent ensemble seulement en fin de phase S et non en phase G1 (Osterhage et al. 2006). Ce même groupe a également mis en évidence que la dégradation d'Est1p en phase G1 par la voie du protéasome serait aussi importante pour réguler l'assemblage de la télomérase dans le cycle cellulaire. Plus récemment un autre mécanisme de recrutement a été

proposé impliquant les protéines Tel1p et Mre11p. En absence de ces dernières, la liaison des protéines Est1p et Est2p aux télomères en fin de phase S/début G2 serait diminuée (Goudsouzian et al. 2006).

La télomérase humaine semble également être régulée de façon dépendante du cycle cellulaire. Il a récemment été démontré que hTR et hTERT se localisaient à différents endroits dans la cellule selon les phases du cycle cellulaire (Jady et al. 2006; Tomlinson et al. 2006). Par des expériences d'hybridation in situ et d'immunofluorescence ces deux groupes ont démontrés qu'en phase G1, hTR est présent dans les corps Cajal tandis que hTERT se retrouve dans des foci nucléoplasmiques. Par la suite, en début de phase S, hTERT se retrouve dans le nucléole tandis que les corps Cajal, qui contiennent toujours hTR, se rapprochent en périphérie du nucléole. Durant le reste de la phase S, hTERT et hTR se retrouvent en périphérie des corps Cajal et parfois aux télomères. Ces résultats suggèrent que l'assemblage de la télomérase humaine ainsi que son association aux télomères seraient régulés durant le cycle cellulaire.

L'activité de la télomérase peut aussi être contrôlée de façon négative. Il a récemment été démontré que l'hélicase Pif1p limite l'action de la télomérase aux télomères. La délétion de Pif1p cause une augmentation de la taille des télomères tandis que sa surexpression cause un raccourcissement de ces derniers (Schulz et Zakian 1994; Zhou et al. 2000b).

*In vitro*, Pif1p diminue la processivité de la télomérase au niveau de l'addition de nucléotides et contribue à dissocier cette dernière des amorces télomériques tandis qu'*in vivo*, la délétion de Pif1p augmente la présence d'Est1p aux télomères (Boule et al. 2005). Ces résultats suggèrent que Pif1p serait importante pour réguler la présence de la télomérase aux télomères. De plus, l'abondance de Pif1p serait régulée durant le cycle cellulaire puisqu'une augmentation de la protéine est observée à la fin de la phase S/début G2, soit lorsque la télomérase est active aux télomères (Vega et al. 2007).

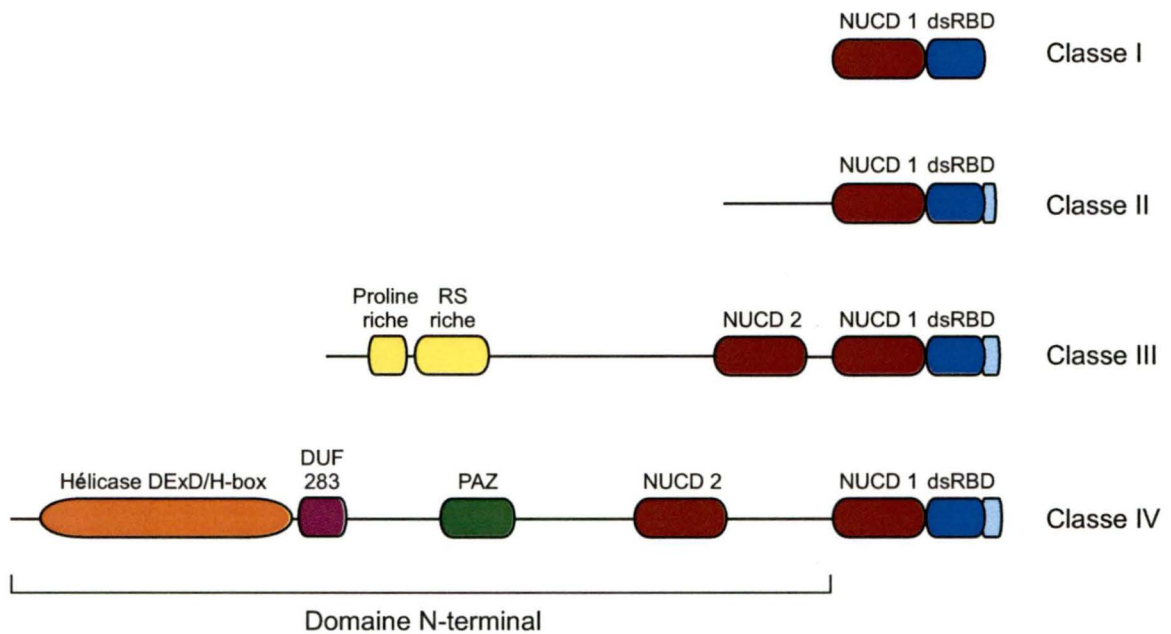
### **3. L'endoribonucléase Rnt1p**

La première description d'une endonucléase spécifique à l'ARN double brin remonte à la fin des années 1960 (Robertson et al. 1968). Depuis ce temps, des membres de la famille des RNase III ont été identifiés chez toutes les espèces à l'exception des archaebactéries où les fonctions RNase III sont soutenues par une nucléase de type boucle-hélice-boucle (Lykke-Andersen et al. 1997). Les membres de cette famille possèdent tous des caractéristiques communes soit: un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) contenant un motif spécifique «  $\alpha\beta\beta\beta\alpha$  » ainsi qu'un domaine nucléase contenant un motif signature « RLEFLGD » (Kharrat et al. 1995; Blaszczyk et al. 2001). Les RNase III sont impliquées au niveau de plusieurs mécanismes cellulaires comme la maturation d'ARN précurseurs (ARNr, snARN, snoARN,

miARN, siARN) ainsi que la régulation de l'expression de certains ARNm (Lamontagne et al. 2001; MacRae et Doudna 2007). L'implication des RNase III au niveau du mécanisme d'interférence par l'ARN a grandement contribué à l'intérêt porté envers cette famille d'enzymes.

**3.1 La famille des RNase III.** En se basant sur des motifs structuraux, la famille des RNase III peut être divisée en quatre grandes sous classes (Lamontagne et al. 2001). Voir Figure 7. La première classe est représentée par les enzymes bactériennes qui possèdent un domaine de liaison à l'ARN ainsi qu'un domaine nucléase (Nicholson 1999). Les enzymes de la classe II sont caractérisées par la présence d'une extension N-terminale et se retrouvent chez certains fungus comme *Saccharomyces cerevisiae* (Rnt1p) et *Schizosaccharomyces pombe* (Pac1) (Abou Elela et al. 1996; Rotondo et Frendewey 1996). Ce domaine N-terminal additionnel est important pour la conformation de l'enzyme ainsi que pour son efficacité de clivage (Lamontagne et al. 2000). Les enzymes de la classe III sont caractérisées par la présence d'un deuxième domaine nucléase et sont représentées, entre autres, par la protéine Drosha qui est impliquée dans la maturation des pré-miARN (Wu et al. 2000; Lee et al. 2003b). La protéine Drosha possède aussi un domaine riche en résidus proline et un domaine riche en résidus sérine-arginine qui pourraient être importants pour l'interaction avec d'autres protéines et ainsi conférer la spécificité de l'enzyme (Wu et al. 2000; Han et al. 2006). Finalement les enzymes de la classe IV se

Échelle 100 a.a ≈ —



**Figure 7. Représentation schématique de la famille des RNases III.** La famille des RNase III peut se diviser en 4 grandes classes. Les boîtes bleues représentent les domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD), les boîtes rouges représentent les domaines nucléases (NUCD), les boîtes jaunes représentent une région riche en résidus proline et une région riche en résidus sérine-arginine, la boîte verte représente le domaine PAZ (PAZ), la boîte orange représente le domaine hélicase (DExD/H-box), la boîte violet représente le domaine DUF 286 et les lignes noires représentent des régions de fonctions inconnues à l'intérieur du domaine N-terminal.

distinguent par leur domaine hélicase (DExD/H-box), par le domaine de fonction inconnue DUF283 (Domain of Unknown Function 283) et par leur domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) impliqué dans la liaison à l'ARN (Jacobsen et al. 1999; Ma et al. 2004). La classe IV est représentée par les enzymes Dicer qui sont requises pour générer de petits fragments d'ARN d'environ 22 nt impliqués dans des mécanismes d'interférence par l'ARN (Bernstein et al. 2001).

**3.2 Les mécanismes d'action de Rnt1p.** Depuis la découverte de l'implication des RNase III au niveau des mécanismes d'interférence par l'ARN, beaucoup d'efforts ont été entrepris dans le but de mieux comprendre la façon dont les RNase III sélectionnent et clivent leurs substrats d'ARN db. Une des RNase III bien caractérisée de la classe II est la protéine Rnt1p retrouvée chez *S. cerevisiae* (Abou Elela et al. 1996). Rnt1p est une protéine d'environ 54,5 kDa représentée par trois domaines fonctionnels majeurs. À l'extrémité C-terminale de la protéine, on retrouve le domaine de liaison à l'ARN db (dsRBD) essentiel pour la liaison de Rnt1p à ses substrats d'ARN db (Lamontagne et al. 2000). Le dsRBD est aussi important pour la localisation nucléaire/nucléolaire de Rnt1p (Catala et al. 2004). Contrairement à la RNase III bactérienne ou à Pac1 son homologue chez la levure à fission, Rnt1p possède en plus une courte extension d'acides aminés basiques à la toute fin du dsRBD importante pour la liaison de protéines et pour la localisation nucléaire de Rnt1p (Tremblay et al. 2002; Catala et al. 2004;

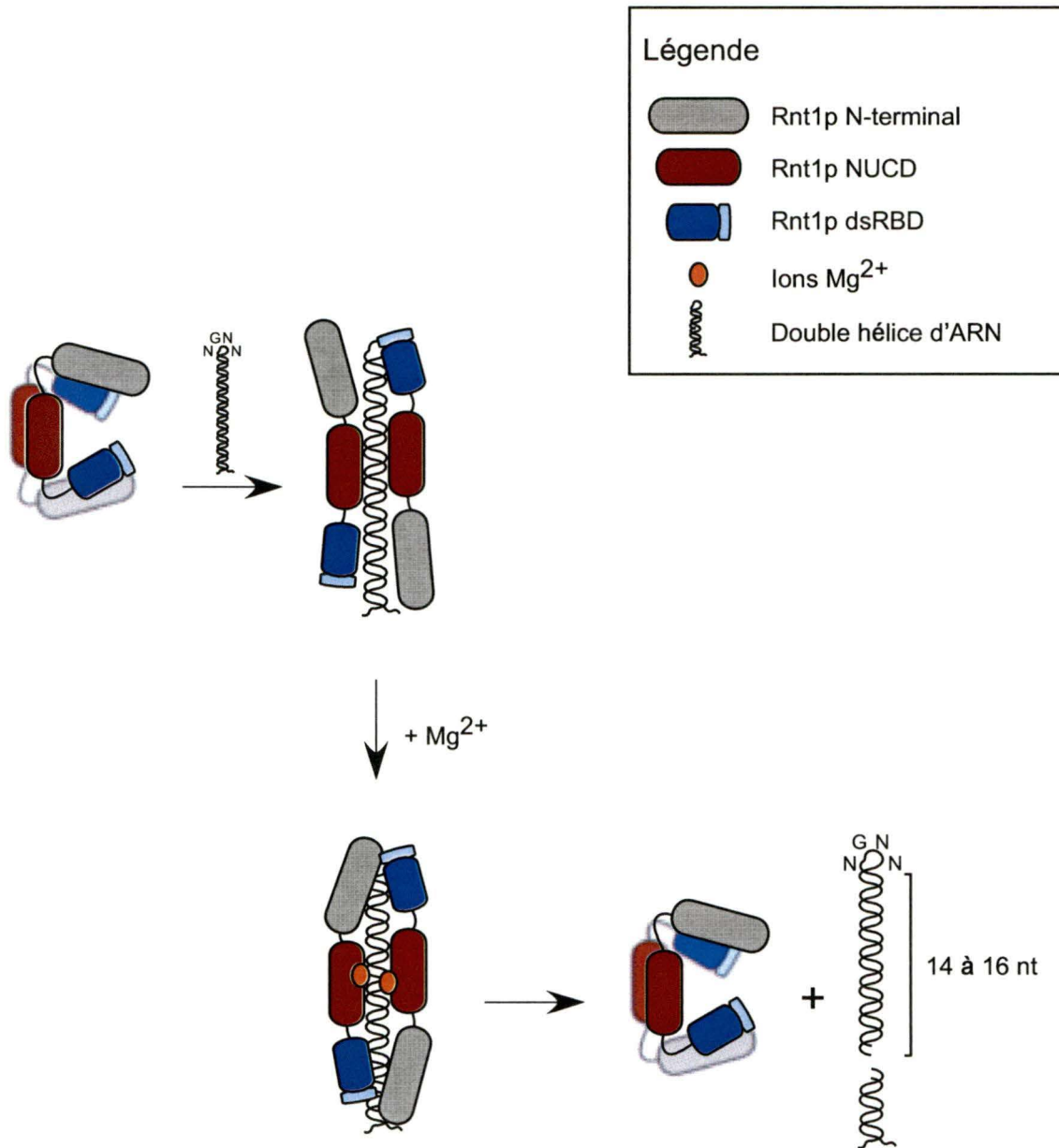
Catala et al. 2008). Le domaine central de la protéine a été caractérisé comme étant le domaine nucléase de Rnt1p. La délétion de ce domaine ou la mutation d'un simple résidu du motif signature abolit l'activité de clivage de Rnt1p (Lamontagne et al. 2000; Catala et al. 2004; Lamontagne et Elela 2004). D'un autre côté, il a été démontré que le domaine N-terminal de Rnt1p était important pour l'efficacité de clivage de l'enzyme. La délétion de ce dernier cause une diminution de l'efficacité de clivage de ses substrats d'ARN db (Lamontagne et al. 2000). De plus, des études biochimiques et génétiques ont permis de mettre en évidence des interactions inter et intra moléculaires du domaine N-terminal avec lui-même ainsi qu'entre le domaine N-terminal et le dsRBD suggérant que Rnt1p fonctionne sous forme d'homodimère (Lamontagne et al. 2000). Plusieurs évidences biochimiques et structurales provenant d'analyses avec d'autres RNase III suggèrent que cet homodimère serait antiparallèle (Gan et al. 2006; Macrae et al. 2006).

La grande majorité des substrats de Rnt1p possèdent des caractéristiques communes soient: une longue tige d'ARN db plus ou moins entrecoupée de boucles et coiffée d'une tétraboucle de séquence NGNN (Chanfreau et al. 2000). Toutefois, une exception de tétraboucle AAGU a aussi été démontrée (Ghazal et Elela 2006). Des études biochimiques et structurales ont démontré que ces deux tétraboucles adopteraient des structures différentes et que Rnt1p pourrait reconnaître ces structures à travers différentes interactions protéines-ARN (Gaudin et al. 2006; Ghazal et



Elela 2006). Récemment, une étude structurale de résonance magnétique nucléaire (RMN) du dsRBD de Rnt1p avec un substrat ARN a permis de démontrer que le dsRBD contactait le sillon mineur et le sillon majeur de l'ARN à proximité de la tétraboucle (Wu et al. 2004). La liaison du dsRBD à l'ARN permettrait ensuite de positionner le domaine nucléase de l'enzyme au site de clivage soit de 14 à 16 nt à partir de la tétraboucle. Il a été démontré que le clivage de Rnt1p s'effectue toujours à cet endroit précis (Chanfreau et al. 2000). La présence essentielle d'ions  $Mg^{2+}$  permettrait ensuite un clivage efficace du substrat ARN (Lamontagne et al. 2000). La Figure 8 décrit le mécanisme de clivage par Rnt1p.

**3.3 Les fonctions de Rnt1p.** Rnt1p n'est pas une enzyme essentielle toutefois, sa délétion cause un important ralentissement de croissance et une sensibilité à des températures élevées (Abou Elela et Ares 1998). Comparativement à une levure de type sauvage qui se divise en 2-3 heures et pousse à une température optimale de 30 °C, les cellules dépourvues de Rnt1p vont prendre environ dix heures pour se diviser et ce, à une température maximale de 26 °C (Rose et al. 1990; Guthrie et Fink 1991; Abou Elela et Ares 1998). Il a aussi été démontré que la délétion de Rnt1p affecte la progression du cycle cellulaire et la division nucléaire et que cet effet est indépendant de l'activité de clivage de Rnt1p (Catala et al. 2004). Rnt1p se localise à différents endroits dans la cellule selon les phases du cycle cellulaire : en phase G1 jusqu'à la fin de la phase S, Rnt1p est

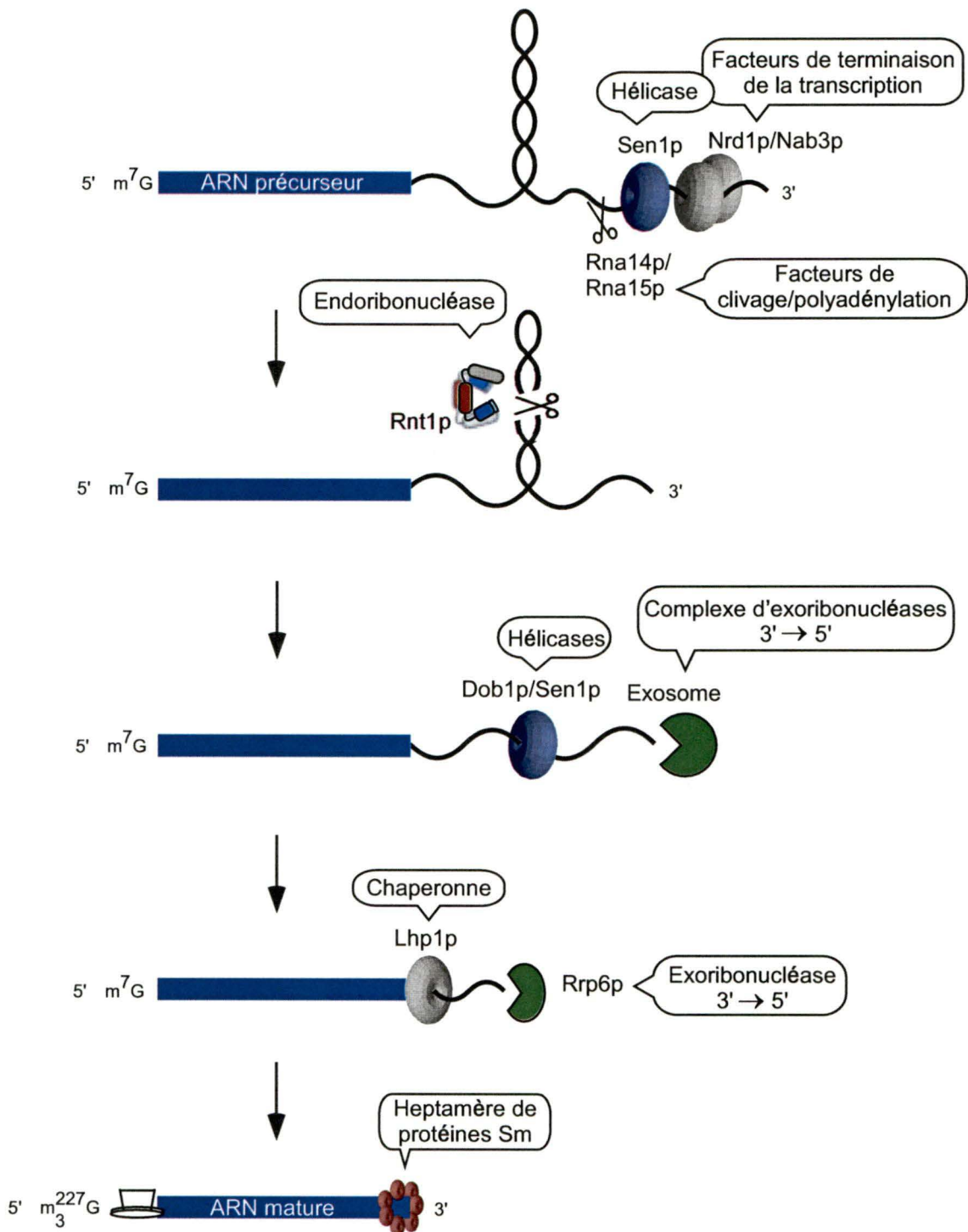


**Figure 8. Modèle du mécanisme de clivage par Rnt1p.** Rnt1p fonctionne sous forme d'homodimère établi à travers des interactions intra et inter moléculaires entre ses domaines N-terminal et C-terminal. En présence d'un substrat, soit une longue tige d'ARN double brin coiffée d'une tétraboucle de séquence NGNN de préférence, ces interactions sont modifiées permettant une interaction entre le substrat et le domaine dsRBD de Rnt1p. Une fois le domaine C-terminal positionné, Rnt1p adopte une conformation stable en présence de deux ions  $Mg^{2+}$  et la réaction de clivage a lieu, à 14 et 16 nucléotides de chaque côté de la tétraboucle.

majoritairement retrouvé au nucléole tandis que de la phase G2 jusqu'à la fin de la mitose, Rnt1p est majoritairement dans le nucléoplasme (Catala et al. 2004). De plus, Rnt1p n'est jamais observé dans le cytoplasme, même en condition de surexpression. Rnt1p est aussi important pour la colocalisation nucléolaire de plusieurs protéines impliquées dans la maturation de l'ARNr. Il a été démontré précédemment que Rnt1p interagit avec la protéine Gar1p et que cette interaction est requise pour la localisation nucléolaire des protéines Gar1p, Nhp2 et Cbf5p qui sont toutes des constituants protéiques des snoARN de la famille H/ACA (Tremblay et al. 2002; Meier 2005).

L'implication de Rnt1p au niveau de la maturation du pré-ARNr a été l'une des premières fonctions attribuées à cette enzyme. Il a été démontré que Rnt1p effectuait la première étape de clivage à l'extrémité 3' du pré-ARNr (Abou Elela et al. 1996; Kufel et al. 1999). Récemment, une étude a démontrée que Rnt1p ne serait pas seulement important pour la maturation du pré-ARNr mais aussi pour la transcription de l'ARNr. Une interaction entre Rnt1p et deux sous-unités de l'ARN pol I a été révélée et il a été démontré que la délétion de Rnt1p inhibe la synthèse de l'ARNr et altère la conformation de la chromatine du locus d'ARNr (Catala et al. 2008). L'implication des RNase III au niveau de la maturation de l'ARNr semble assez répandue puisque la RNase III bactérienne, Pac1 chez *S. pombe* ainsi que la RNase III humaine sont aussi importantes pour cette fonction (Court 1993; Zhou et al. 1999; Wu et al. 2000).

L'implication de Rnt1p au niveau de la maturation de pré-snARN et pré-snoARN est aussi bien connue. En effet, Rnt1p est impliqué dans la maturation de tous les snARN transcrits par la polymérase II soit les snARN U1, U2, U4 et U5 (Chanfreau et al. 1997; Abou Elela et Ares 1998; Allmang et al. 1999a; Seipelt et al. 1999). Rnt1p est aussi impliqué dans la maturation de plusieurs snoARN monocistroniques et polycistroniques (Chanfreau et al. 1998a; Chanfreau et al. 1998b; Qu et al. 1999; Kufel et al. 2000; Ghazal et al. 2005; Hiley et al. 2005). En fait, la maturation d'ARN précurseur par Rnt1p est très similaire d'un substrat à l'autre. La Figure 9 démontre un modèle général de la maturation des snARN impliquant Rnt1p et d'autres facteurs. Tout d'abord, il a été démontré que la terminaison de la transcription des transcrits d'ARN de la pol II non polyadénylés (incluant certains snARN et snoARN) requiert entre autres les protéines Nrd1p, Nab3p et Sen1p, de concert avec la pol II (Steinmetz et al. 2001). Les protéines Nrd1p et Nab3p interagissent ensemble et lient des séquences spécifiques à l'extrémité 3' du pré-ARN ce qui empêche la continuité de la transcription au-delà de la terminaison prévue « read-through » (Conrad et al. 2000; Steinmetz et al. 2001). L'hélicase Sen1p semble aussi jouer un rôle important pour la terminaison de la transcription puisqu'en son absence, on peut observer une continuité de la transcription (Steinmetz et al. 2001). Il a aussi été démontré que l'activité de clivage du complexe CF I, un complexe impliqué dans la formation 3' des ARNm, est importante pour la formation 3' de plusieurs snoARN et snARN (Fatica et al. 2000; Morlando et al. 2002). Effectivement,



**Figure 9. Modèle de maturation des petits ARN nucléaires (snARN) impliquant diverses protéines.** La majorité des snARN sont transcrits à partir de la polymérase II sous forme d'un long précurseur qui subira différentes étapes de maturation à son extrémité 3'. Toutefois la maturation des snARN ne s'effectue pas de façon standard, elle peut dévier du modèle général proposé dans la figure ci-dessus. Voir le texte pour une description plus détaillée.

l'inactivation des sous-unités Rna14p et Rna15p affecte la formation de l'extrémité 3' des petits ARN et cause une transcription continue. Suite à la terminaison de la transcription, l'extrémité 3' ainsi générée va subir d'autres étapes de maturation pour éventuellement mener à une extrémité mature et fonctionnelle. La première étape de cette maturation est généralement effectuée par Rnt1p. Rnt1p reconnaît une structure typique (longue tige d'ARN db coiffée par une tétraboucle NGNN) dans l'extension 3' et clive cette dernière. L'hélicase Sen1p serait aussi importante pour les étapes subséquentes de maturation des petits ARN (Rasmussen et Culbertson 1998; Ursic et al. 2004). Une interaction entre Rnt1p et l'hélicase Sen1p a d'ailleurs été établie génétiquement et biochimiquement (Ursic et al. 2004). L'implication d'une autre hélicase, Mtr4p, a aussi été démontrée au niveau de la maturation de certains snARN (Allmang et al. 1999a). Le clivage de Rnt1p servirait ensuite de point d'entrée pour l'exosome, un complexe d'exonucléases 3' → 5' impliqué dans la maturation des précurseurs des snARN et snoARN (Allmang et al. 1999a; Houseley et al. 2006). Il a été suggéré que des protéines chaperonnes lieraient l'extrémité 3' pour empêcher une dégradation complète de l'ARN par l'exosome (Kufel et al. 2000). C'est le cas notamment de la protéine Lhp1p qui lie les précurseurs de plusieurs snARN (Pannone et al. 1998; Xue et al. 2000). Cette protéine pourrait ensuite être déplacée par des protéines interagissant avec l'ARN et faisant partie du complexe final ribonucléoprotéique, comme par exemple les protéines Sm dans le cas des snARN (Xue et al. 2000). Il a également été suggéré que la

composante Rrp6p de l'exosome serait responsable de la maturation finale de l'extrémité 3' (Allmang et al. 1999a; van Hoof et al. 2000). En ce qui concerne l'extrémité 5' des snARN, aucun processus de maturation n'a été démontré toutefois, l'extrémité 5' mature est modifiée par l'ajout d'une coiffe triméthylée (Will et Luhrmann 2001).

Plus récemment, l'implication de Rnt1p au niveau de la régulation des ARNm a été démontrée. Dans certains cas, Rnt1p serait important pour la dégradation de pré-ARNm non épissés et des introns épissés de ces ARNm (Danin-Kreiselman et al. 2003). Des structures tige-tétraboucle typiques des substrats de Rnt1p ont été retrouvées dans plusieurs introns de différents ARNm épissés, Rnt1p cliverait ces structures et les ARN seraient ensuite dégradés par des exonucléases (Danin-Kreiselman et al. 2003). Dans d'autres cas, Rnt1p serait important pour réguler l'expression de certains gènes en clivant directement à l'intérieur de la séquence codante (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005; Zer et Chanfreau 2005). Des analyses de puces à ADN ont révélé que l'expression de plusieurs ARNm était affectée en absence de Rnt1p suggérant que Rnt1p a probablement d'autres substrats ARNm (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005). Chez *E. coli*, la RNase III est également impliquée dans les processus de dégradation des ARN (Court 1993). De plus, elle possède aussi la capacité de contrôler sa propre expression (Court 1993). Chez les eucaryotes supérieurs, les orthologues de la RNase III participent aussi à la régulation de l'expression des gènes en initiant la

dégradation ou la répression transcriptionnelle à partir de miARN et siARN générés par ces dernières (Carmell et Hannon 2004). Étonnamment, Rnt1p pourrait aussi utiliser un mécanisme semblable à l'interférence par l'ARN pour la régulation de gènes. Il a récemment été démontré que Rnt1p avait la capacité de lier de courts transcrits d'ARN et de les utiliser comme guides pour effectuer un clivage spécifique et ainsi, diminuer l'expression de gène *in vivo* (Lamontagne et Abou Elela 2007).



## CHAPITRE I

Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R.J. et Abou Elela, S. 2006. RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *Journal of Biological Chemistry* 282(7):4373-81.

### Préambule

Ce manuscrit rapporte l'implication de la RNase III Rnt1p, une endoribonucléase spécifique à l'ARN double brin, au niveau de la régulation de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*. Nous démontrons que Rnt1p régule l'expression des ARNs codant pour les sous-unités de la télomérase et est requis pour le maintien des télomères. La délétion de Rnt1p cause une augmentation des niveaux d'ARNs de Est2p (sous-unité catalytique), Tlc1 (sous-unité ARN) ainsi que de Est1p et Est3p (sous-unités régulatrices). Une augmentation de l'activité télomérase *in vitro* ainsi qu'un rallongement des télomères sont aussi observés en absence de Rnt1p. Une analyse bioinformatique approfondie des différents ARNs de la télomérase a permis de démontrer la présence d'un signal de clivage de Rnt1p, soit une structure de type tige-tétraboucle, à l'intérieur de la séquence codante de l'ARNm Est1. Cette structure est clivée *in vitro* et des mutations abolissant sa formation affectent la dégradation de Est1 *in vivo* durant le cycle cellulaire.

## SUMMARY

In baker's yeast, *in vivo* telomerase activity requires a ribonucleoprotein (RNP) complex with at least four associated proteins (Est2p, Est1p, Est3p, and Cdc13p) and one RNA species (Tlc1). The function of telomerase in maintaining chromosome ends, called telomeres, is tightly regulated and linked to the cell cycle. However, the mechanisms that regulate the expression of individual components of telomerase are poorly understood. Here we report that yeast RNase III (Rnt1p), a dsRNA specific endoribonuclease, regulates the expression of telomerase subunits and is required for maintaining normal telomere length. Deletion or inactivation of *RNT1* induced the expression of Est1, Est2, Est3 and Tlc1 RNAs and increased telomerase activity, leading to elongation of telomeric repeat tracts. *In silico* analysis of the different RNAs coding for the telomerase subunits revealed a canonical Rnt1p cleavage site near the 3' end of Est1 mRNA. This predicted structure was cleaved by Rnt1p and its disruption abolished cleavage *in vitro*. Mutation of the Rnt1p cleavage signal *in vivo* impaired the cell cycle dependent degradation of Est1 mRNA without affecting its steady-state level. These results reveal a new mechanism that influences telomeres length by controlling the expression of the telomerase subunits.

## INTRODUCTION

The ends of eukaryotic chromosomes are capped with special structures made of tandem DNA repeats and associated proteins, called telomeres. These structures protect chromosomes from end-to-end fusion, recombination and nucleolytic degradation (LeBel et Wellinger 2005; Hug et Lingner 2006). However, since the conventional DNA replication machinery cannot fully duplicate the ends of linear chromosomes, telomeric DNA will shorten with each round of replication, leading to a replicative senescence (Lundblad et Szostak 1989). To solve this end replication problem, most eukaryotes use the activity of an enzyme called telomerase to ensure the maintenance of telomeric DNA (Greider et Blackburn 1985). Telomerase is a ribonucleoprotein reverse transcriptase that can extend the 3' end of chromosomes using its RNA subunit as a template for the addition of telomeric repeats.

*In vitro*, telomerase activity requires a reverse transcriptase (Tert, Est2p in yeast) and an RNA template (Terc, Tlc1 in yeast) (Cohn et Blackburn 1995; Lingner et al. 1997a). *In vivo*, yeast telomerase requires additional factors for function, including Est1p, Est3p and Cdc13p (Lundblad et Szostak 1989; Lendvay et al. 1996). Deleting any one of the *EST1*, *EST2*, *EST3* or *TLC1* genes or a particular allele of the *CDC13* gene (*cdc13-2*) causes progressive telomere shortening leading to cellular senescence. Increased expression of individual telomerase genes may also lead to telomeric phenotypes. For

example, overexpression of Tlc1 causes telomere shortening by sequestering the Tlc1-binding factor Ku (Singer et Gottschling 1994; Peterson et al. 2001). Similarly, overexpression of Est1p may cause a slight telomere lengthening in some strains (Virta-Pearlman et al. 1996). On the other hand, induction of Est1, Est2 and Est3 mRNA expression in cells with defective non-sense mediated mRNA decay decreases telomere length (Dahlseid et al. 2003). These observations suggest that a variation in the expression levels of the different components of telomerase holoenzyme influences telomerase function. However, the cellular mechanisms that regulate and balance the expression of the different components of the telomerase ribonucleoprotein remain unknown.

Telomere elongation occurs in late S or early G2/M phases of the cell cycle (Diede et Gottschling 1999; Marcand et al. 2000). There is evidence that the catalytic core of telomerase (Est2p and Tlc1) is present at yeast telomeres throughout the cell cycle but requires an association of Est1p, which accumulates in the S phase of the cell cycle (Taggart et al. 2002; Taggart et Zakian 2003). Telomerase activity on the telomeres is negatively regulated by Pif1p, a helicase that is thought to remove telomerase from the chromosome ends (Boule et al. 2005). In addition, the Rif-proteins also exert a negative role on telomere length maintenance (Wotton et Shore 1997), and several other proteins involved in the DNA damage checkpoint and repair pathways were shown to influence steady-state telomere length *in vivo* (d'Adda di Fagagna et al. 2004). At least some of the factors regulating telomere length influence the

activity of the telomerase subunits, yet very little is known about the mechanisms regulating the expression of the telomerase subunits.

Here we show that the expression level of several telomerase subunits is regulated post-transcriptionally by yeast RNase III (Rnt1p). Rnt1p is a dsRNA specific endoribonuclease involved in the maturation of many RNAs, including snRNAs, snoRNAs and pre-rRNAs, (Abou Elela et al. 1996; Chanfreau et al. 1997; Abou Elela et Ares 1998). Recently it was shown that Rnt1p regulates the expression of glucose-dependent genes, degrades unspliced mRNAs and cleaves mRNAs with abnormal 3' ends (Danin-Kreisel et al. 2003; Ge et al. 2005; Lee et al. 2005; Zer et Chanfreau 2005). The majority of Rnt1p substrates include a short RNA stem capped with an AGNN tetraloop structure (Lebars et al. 2001). These particular structures are cleaved at a fixed distance from the tetraloop (Chanfreau et al. 2000; Nagel et Ares 2000; Lamontagne et al. 2003). Deletion of *RNT1* induced the expression of many components of telomerase, leading to an increase in telomerase activity and elongation of the telomeres. A point mutation that impairs Rnt1p's catalytic activity without affecting its expression or interaction with RNA fails to restore normal expression of telomerase subunits or reduce telomere lengths. *In silico* analysis revealed a canonical Rnt1p cleavage site within the coding sequence of the Est1 mRNA. *In vitro* analyses showed that this predicted structure was directly cleaved by Rnt1p in the absence of other factors. Disruption of this Rnt1p cleavage site by silent mutations impaired the cell cycle dependent regulation of Est1 mRNA,

suggesting that Rnt1p triggers RNA cleavage in a cell cycle dependent manner. These results demonstrate that the expression level of the telomerase subunits influences their function and reveal a new regulatory mechanism that controls the accumulation of telomerase related RNAs.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Strains and Plasmids* - All yeast strains were grown and manipulated using standard procedures (Rose et al. 1990; Guthrie et Fink 1991). Strains W303-1A, *mt1* $\Delta$ , *mt1-ts* and *mt1-D247/R* were described earlier (Thomas et Rothstein 1989; Chanfreau et al. 1998a; Catala et al. 2004; Ge et al. 2005). *RNT1* (NLYH15) and *mt1* $\Delta$  (NLYH12) cells harbouring protein-A tagged *EST2* were created by crossing strains YKF103 (*MATa*; *ura3-52*; *ade 2-101*; *lys2-801*; *leu2* $\Delta$ 1; *trp1* $\Delta$ 1; *his3- $\Delta$ 200/CF+* (*TRP1 SUP11*)) (Friedman et Cech 1999) and DUY746 (*MAT $\alpha$* ; *leu2-3,112*; *his3*; *trp1*; *pep4*; *prc1*; *HIS3:pet56:mt1*) (D.Ursic personal communication). Strain SLY150 (*EST1-4*) was constructed by inserting 4 silent mutations (T2061/C; G2064/A; C2067/T; C2070/T) within the *EST1* coding sequence in JPY112 (*MATa/ $\alpha$* ; *lys2* $\Delta$ 0/*lys2* $\Delta$ 0; *ura3* $\Delta$ 0/*ura3* $\Delta$ 0; *his3* $\Delta$ 200/*his3* $\Delta$  200; *leu2* $\Delta$ 0/*leu2* $\Delta$ 0; *RNT1/mt1* $\Delta$ ::*KMX4*), a derivative of BY4705. The DNA fragment used for the replacement of 4 nucleotides was created by cloning two PCR fragments in the pVZ1 vector (Henikoff et Eghtedarzadeh 1987). The first PCR fragment was amplified using primers 5'-CCAGACGAAGCAATTGATGCTGACGAAGATATTACCGTCCAAGTGCC-3' and 5'-GCTGGGTACCGGGCCCCCCTCG AGGTCG-3'. The amplified sequence corresponds to the 3' end of *EST1* and contains 4 mutations disrupting the Rnt1p cleavage site. The second PCR fragment was amplified using primers 5'-CAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACC-3' and 5'-

GTATTGACAGCATATATATTTGC

TGTCTTGAATTTATTATGCTAATAAATAATTATGTTTTTCAAGCGCACTGTG  
CGGTATTTACACC. The amplified fragment contains the *URA3* gene and a short sequence of *EST1*. The integration of the DNA fragment in the yeast genome was selected by growth in the absence of uracil and the marker was removed by counter selection on 5-FOA (5-Fluoro-orotic acid). SLY178 (*EST1-4; bar1Δ::URA3*) was generated by deleting the *BAR1* gene from SLY150 as previously described (Brachmann et al. 1998). MLY30 strain (*bar1Δ::HIS3*) was constructed by deleting the *BAR1* gene in BY4705a strain (*MATa; ade2Δ::hisG; met15Δ0; trp1Δ63; lys2Δ0; ura3Δ0; his3Δ200; leu2Δ0; bar1Δ::HIS3*) (Larrivee et al. 2004).

*In Vitro RNA Cleavage* - *In vitro* cleavage reactions were performed as described previously (Lamontagne et al. 2003). Cleavage of model RNA substrates was performed using T7 synthesized transcripts and recombinant Rnt1p (0.2 pmol) (Lamontagne et Abou Elela 2001) in a 20 µl reaction buffer containing 150 mM KCl and incubated 20 minutes at 30°C. Cleavage of total RNA extracted from yeast was performed as described previously (Ge et al. 2005). Briefly, 50 µg of total RNA was incubated with 4 pmol of recombinant Rnt1p for 10 minutes at 30°C as described for the cleavage of model substrates.

*Analysis of mRNA Stability* - The stability of the different mRNAs was determined after inhibiting transcription using 10 µg/ml of thiolutin as previously described (Ge et al. 2005). Cells were grown at 26°C to mid-log



phase and RNA was extracted at different time points after the addition of the drug. The levels of mRNA were quantified by real-time PCR using *RPR1* (pol III transcript) as an internal control. Half-lives were estimated using the single exponential decay formula  $y = 100 e^{-bx}$ . Thiolutin was kindly provided by Pfizer (Groton, CT).

*Primer Extension and Northern Blot Analysis* - Primer extension was performed using a primer specific for *EST1* (5'-GGGTTGACGACGACAGGCGTGG-3') as described previously (Abou Elela et Ares 1998). Extended products were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Northern blots were performed as described previously (Abou Elela et Ares 1998) using 15  $\mu$ g of total RNA and a 1% denaturing agarose gel or a 4% polyacrylamide gel. The RNA was visualized by autoradiography using randomly labelled probes corresponding to specific genes. The RNA was quantified using InstantImager (Packard, Meriden, CT).

*Real-time PCR Analysis* - Synthesis of cDNA was performed using 2  $\mu$ g of total RNA and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON). Gene-specific primer protocol using a "Flap sequence" common to all primers was used to avoid DNA amplification during subsequent PCR amplification. The cDNA was purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Nepean, ON). Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) as previously described (Giulietti et al. 2001). PCR reactions were done in triplicate using a 25  $\mu$ l reaction volume. TaqMan

probes (5' 6-FAM, 3' TAMRA) and specific primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) were used at a concentration of 250 nM and 900 nM, respectively, in a reaction buffer containing 50 mM KCl, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH 8.0, with 0.625 U home made Taq (Engelke et al. 1990), 0.25 U UDG (New England Biolabs, Pickering, ON), 50 nM ROX Reference Dye (Invitrogen), 200 μM dATP/dGTP/dCTP, 400 μM dUTP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Data were analyzed by the comparative threshold method. All primers and probes used for real-time PCR are listed in Table 1.

*Telomere Length Analysis* - Telomere length was analysed as described earlier (Wellinger et al. 1993). Genomic DNA was extracted from cells grown to mid-log phase. 5 μg of genomic DNA was digested with XhoI, separated on a 1% agarose gel, and transferred to a nylon membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). DNA was visualized by autoradiography with a randomly labelled telomeric probe.

*Cell Cycle Synchronisation and FACS Analysis* - Cells were synchronized in G1 by the addition of α-factor (Bioshop, Burlington, ON) at a final concentration of 0.5 μg/ml for 3 hours. Cells were harvested and resuspended in fresh media containing 200 μg/ml pronase (Roche Diagnostics, Laval, QC) to release the cells from their arrest. Samples were taken at different time points to either extract RNA or monitor the release into the cell cycle by FACS analysis as described previously (Catala et al. 2004). The RNAs

corresponding to the different genes was quantified by real-time PCR using Rpr1 as an internal control.

*Western blot and Telomerase Activity* - Telomerase assays were performed as previously described (Friedman et Cech 1999). The *EST2* gene was modified to incorporate an N-terminal Protein A tag as described (Friedman et Cech 1999). Immunoprecipitation was performed using IgG-sepharose beads (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) and 2 mg of total protein extracted from either *RNT1* (NLYH15) or *mt1Δ* (NLYH12) cells. Extension of a telomeric primer (5' - TAGGGTAGTAGTAGGG - 3') was monitored to determine telomerase activity. Quantifications were performed using a Storm Phosphor Imager (Storm 860, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Total protein (30µg) or immunoprecipitated proteins were run on an 8% SDS-PAGE and transferred onto Hybond-C membrane (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Western blots were performed using 1:7500 diluted (total protein) or 1:5000 diluted (immunoprecipitated protein) of polyclonal rabbit anti-protein A antibodies (Sigma, Oakville, ON). Donkey anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) was used as a secondary antibody to allow detection with ECL Plus reagents (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). After membrane stripping, blots were incubated with mouse anti-PGK Ig diluted 1:500 (Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON) as primary and sheep anti-mouse IgG conjugated with HRP diluted 1:5000 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) as secondary antibody. Detection and

quantification were done using a Storm Fluorescence Imager (Storm 860, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

*Non-linear regression analysis and graph generation* - The graphs shown in Figure 5C were generated using GraphPad Prism Version 4.03 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The data from three independent experiments for *EST1-4; bar1Δ* cells and two independent experiments for *EST1; bar1Δ* were used for the analysis. To choose the best equation to model the data, we compared the different classical equations and all polynomial order equations available in GraphPad. To select the best equation type, we used an F test with  $P < 0.05$ . Two-by-two comparisons were performed to identify the simplest model that best fit the data. The equation used is a polynomial of the fourth order ( $Y=A + B*X + C*X^2 + D*X^3 + E*X^4$ ). The obtained values are shown in supplemental Table 1. The use of non-linear regression was required because the mRNA level is affected by many variables: mRNA decay, Rnt1p cleavage, constitutive expression and cell cycle dependant expression. The use of a non-linear regression also allows for the two main sources of variation in the measurement (normal experimental variation and variation in the cell synchronisation) to be accounted for.

## RESULTS

We previously performed a microarray analysis of RNA extracted from cells lacking *RNT1* and compared it to RNA from wild type cells (Ge et al. 2005). After detailed inspection of the data, we noticed that many telomerase related mRNAs were induced upon the deletion of *RNT1* (Fig. 1A). This induced expression of RNAs coding for telomerase subunits was similar to that of known Rnt1p substrates like *Rps22B* (Danin-Kreisel et al. 2003) and *Mig2* (Ge et al. 2005) mRNAs. The impact of *RNT1* deletion on the expression of telomerase related RNAs was verified by Northern blot analysis. Consistent with the microarray data, the mRNAs coding for the main components of the telomerase RNP complex (*Est1*, *Est2*, *Est3*) and the telomerase RNA *Tlc1* accumulated in the absence of Rnt1p (Fig. 1B). No major increase in the RNA amounts coding for other telomere related proteins like *Cdc13*, *Ten1* and *Tel1* were detected by Northern blot (data not shown). We conclude that Rnt1p is required for normal expression of most core telomerase subunits.

If Rnt1p influences the stability of *Est1*, *Est2*, *Est3* and *Tlc1* RNAs, we expected the deletion of *RNT1* to slow the turnover and increase the half-life of these RNAs. In order to examine this possibility, the half-life of each affected RNA was determined in wild type and *mt1* $\Delta$  cells after inhibiting new transcription using thiolutin. Quantitative PCR analysis was used to estimate the mRNA amounts at different time points after transcription inhibition and

the half-life was calculated for each RNA species (Table 2). We used two unrelated RNAs (Spt15 and Act1) with different half-lives and which are thought not to be directly affected by Rnt1p as controls (supplemental Fig. 1). Indeed, the half-lives of these control RNAs were only slightly longer in *mt1Δ* cells when compared to that in wild type cells due to a general slow metabolism of *mt1Δ* cells (Table 2 and data not shown). In contrast, these experiments showed a significant increase in the half-lives of Est1, Est2 and Est3 mRNAs (Table 2). As previously described, the Tlc1 RNA was already very stable in wild type cells (Chapon et al. 1997), and no decay was observed in both wild type and *mt1Δ* cells even after 1 hour of transcription inhibition (Table 2). When normalized to Spt15, the relative half-lives of Est1 and Est2 were about 2 times longer in *mt1Δ* than in wild type cells, while that of Est3 was only slightly longer in *mt1Δ* cells (Fig. 1C). If the increase in the half-life of the Est2 mRNA of about two fold was significant, it should lead to a corresponding increase in the amount of Est2p. Indeed, deleting *RNT1* in cells expressing a protein A tagged version of the telomerase catalytic subunit Est2p increased the expression of both mRNA and protein expression by 2 to 3 times as compared to that detected in wild type cells (supplemental Fig. 2 and Fig. 1D). We conclude that deletion of *RNT1* slows the decay rate of several telomerase related mRNAs leading to an increase in the expression of these telomerase subunits.

To evaluate the impact of Rnt1p on telomerase function, we examined telomere length in wild type and *mt1Δ* cells by Southern blotting. DNA was

extracted from relevant strains and digested with the restriction enzyme XhoI. Due to a conserved XhoI site in the telomere-proximal Y'-elements, many terminal restriction fragments (TRFs) appear as somewhat smeary bands of about 1.2 kb size on such blots (LeBel et al. 2006). In the absence of Rnt1p, the size of the TRFs increased as compared to that of wild type cells, indicating that the deletion of *RNT1* increases telomere length (Fig. 2A). This increase in telomere length is directly linked to the expression of Rnt1p, since transformation of *mt1*Δ cells with a plasmid harbouring *RNT1* restores normal telomere length (Fig. 2A).

We next examined whether this increase in telomere length is associated with an increase in telomerase activity. Relative telomerase activity was assessed in extracts derived from wild type and *mt1*Δ cells expressing a protein A tagged version of Est2p. In this procedure, telomerase was partially purified using IgG-sepharose beads and used for a direct extension of a telomeric primer (LeBel et al. 2006). As shown in Figure 2B, deletion of *RNT1* resulted in an increase in relative telomerase activity (RTA) as compared with the internal control (Fig. 2B). The observed activity is telomerase specific, since it is RNA dependent and was not observed in precipitates from untagged cells. The observed increase in the telomerase activity is Rnt1p-dependent but strain background-independent and was also observed after the inactivation of a temperature sensitive allele of *RNT1* (data not shown). Thus, the accumulation of the RNAs of telomerase core subunits upon the

deletion of Rnt1p leads to an increase in both its *in vitro* activity and telomere length.

Deletion of Rnt1p affects many cellular pathways and slows cell metabolism (Catala et al. 2004). To ensure that the increased levels of RNA of telomerase subunits is not a secondary effect generated by long term changes in cell metabolism, we monitored the kinetics of telomerase induction upon inactivating a temperature sensitive allele of Rnt1p (*mnt1-ts*) (Ge et al. 2005). If the RNAs coding for the telomerase subunits are targets of Rnt1p-mediated RNA metabolism, their steady-state levels should change with the same kinetics at that of known Rnt1p substrates (e.g. snoRNAs). Total RNA was extracted from *mnt1-ts* cells at different intervals after shift to the restrictive temperature (37°C). The extracted RNA was analyzed using Northern blots or real-time PCR. As expected, Northern blots probed with a snR43 specific probe, a known substrate of Rnt1p, documented a processing defect as early as two hours after shift to 37°C (Fig. 3A). Real-time PCR analysis of the same RNA samples indicated that similar to snR43, the levels for RNAs coding for the telomerase subunits increased 2 hours after shift to the restrictive temperature (Fig. 3B). Est2 mRNA level increased very rapidly after the inactivation of Rnt1p, while the Tlc1 RNA accumulated somewhat more slowly. The steady-state amount of Act1 mRNA increases about two fold upon the deletion of Rnt1p, but this increase is thought to be due to indirect effects on overall cell metabolism and a reduction in the amount of mature rRNA in such cells. Strikingly, the kinetics of mRNA accumulation for Act1 upon Rnt1p



inactivation was very different than that observed for the telomerase associated RNAs. Even 8 hours after the shift to the restrictive temperature, there was no detectable increase in Act1 mRNA (Ge et al. 2005). Given the similarities in the kinetics of the increases of telomerase subunit RNAs with those of the accumulation of non-processed *bona fide* Rnt1p substrates, the data suggest that Est1, Est2, Est3, and Tlc1 RNAs are targets of Rnt1p-controlled RNA metabolism.

Rnt1p is an endoribonuclease that could influence the RNA levels of telomerase subunits by directly cleaving the respective RNAs thereby accelerating their degradation. To test this possibility, we monitored the impact on the expression of the telomerase subunits of a point mutation in *RNT1* (D247/R), which leads to an impaired Rnt1p RNA-cleavage activity without affecting other functions (Tremblay et al. 2002; Lamontagne et al. 2004). Total RNA was extracted from wild type, *mt1Δ* or *mt1-D247/R* cells and analyzed using Northern blots. As shown in Figure 3C, RNAs extracted from *mt1Δ* and *mt1-D247/R* cells exhibit similar increases in the mRNAs of telomerase subunits when compared to wild type cells. We conclude that the RNA cleavage activity of Rnt1p is required for the regulation of normal expression levels of telomerase subunits.

Most Rnt1p substrates include a short RNA stem capped with a terminal AGNN tetraloop (Chanfreau et al. 2000; Nagel et Ares 2000; Lamontagne et al. 2003). We exploited this feature to search for potential Rnt1p substrates within the RNAs coding for telomerase subunits. This *in*

*in silico* search was performed using a previously established strategy that scores potential substrates based on similarity to known cleavage signals and other overall structural features (Ghazal et al. 2005). One stem-loop structure with high similarity to known substrates was predicted within the coding sequence of Est1 mRNA near its 3' end (Fig. 4A). A model RNA representing the predicted cleavage signal was synthesized *in vitro* and tested for cleavage using purified recombinant Rnt1p. As shown in Figure 4B, the Est1 RNA structure is cleaved by Rnt1p *in vitro* at the predicted distance from the tetraloop and mutations that disrupt the formation of the stem-loop structure (Est1-4) abolished the cleavage. We also tested the capacity of Rnt1p to cleave the predicted structure in the context of mRNA isolated from cells. Total RNA was extracted from wild type cells or cells expressing a version of Est1 mRNA (*EST1-4*) carrying silent mutations that disrupt the Rnt1p cleavage signal (Fig. 4A). The RNA was incubated with purified recombinant enzyme and the cleavage was detected by either Northern blot or primer extension. As shown in Figure 4C, Est1 mRNA is cleaved by Rnt1p, releasing a product of approximately 2000 nucleotides, consistent with the cleavage of the predicted structure, while the mRNA for Est1-4 was not cleaved. Primer extension analysis mapped the cleavage sites of Rnt1p at 14 and 16 bp from the stem-loop as predicted (data not shown). Examination of *EST1* sequence from other species revealed the presence of a potential Rnt1p cleavage site in all *Saccharomyces* species where the enzyme specificity is conserved (data not shown). To ensure that our *in silico* search did not miss any potential

cleavage sites, we performed a similar *in vitro* cleavage assay on the RNAs coding for the other components of telomerase. This analysis did not reveal any Rnt1p-specific cleavage *in vitro* (data not shown). These results suggest that Est2, Est3 and Tlc1 RNAs do not contain canonical Rnt1p cleavage sites, but they do not exclude the possibility that these RNAs are cleaved by Rnt1p using an alternative mechanism *in vivo*. We conclude that the mRNA coding for Est1p is a direct substrate of Rnt1p.

Most known mRNA substrates of Rnt1p are cleaved by this enzyme in response to variation in growth conditions or cellular signals (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005). Therefore, we presumed that the cleavage of the Est1 RNA *in vivo* might also be triggered by a specific signal. The function of Est1p is cell cycle regulated and there is evidence that the protein is associated with active telomerase at the telomeres in late-S phase (Taggart et al. 2002). A small reduction of Est1 mRNA expression has also been observed in G1-arrested cells (Osterhage et al. 2006). We therefore hypothesized that Est1 mRNA stability could be regulated in a cell cycle and Rnt1p dependent manner. To test this hypothesis, we monitored the expression level of the Est1 mRNA during the cell cycle using synchronized cell cultures of wild type cells (*EST1; bar1Δ*) and cells expressing the version of Est1 mRNA that is not cleaved by Rnt1p (*EST1-4; bar1Δ*). *EST1; bar1Δ* and *EST1-4; bar1Δ* cells were synchronized in G1 phase of the cell cycle with  $\alpha$ -factor and after release, cell cycle progression was monitored by FACS analysis (Fig. 5A). As documented by the FACS profiles, a proportion of the cells were delayed in

re-entering the cell cycle after release. To ensure that this incomplete release does not interfere with the detection of possible cell cycle effects on mRNA expression, we monitored the expression levels of the well established cell cycle regulated gene *CLN2* (Spellman et al. 1998). Total RNA was extracted at each time point from the synchronized cultures and analyzed by Northern blot (Fig. 5B). The relative mRNA levels were determined using real-time PCR (Fig. 5C). As expected, the mRNA of the cell cycle regulated gene *CLN2* displayed similar expression patterns in both *EST1; bar1Δ* and *EST1-4; bar1Δ* cells and its expression in both cases was tightly linked to cell cycle progression (Fig. 5A, 5B and 5C). Also consistent with previous results, we found that the expression of Est1 mRNA in *EST1; bar1Δ* cells follows the cell cycle dependent expression pattern of Cln2 mRNA (Spellman et al. 1998). Est1 mRNA was least expressed in G1 phase as expected (Osterhage et al. 2006) and most expressed in S phase. This result is consistent with the model suggesting that Est1p function is required for telomerase activity at the end of S-phase (Taggart et al. 2002). The cell cycle dependent induction of Est1-4 mRNA, which carries mutations disrupting Rnt1p cleavage site, was similar to that of the Est1 mRNA. However, at the end of the S phase, more Est1-4 mRNA than Est1 mRNA was detected. As observed in Figure 5D, the highest detected Est1 RNA value was similar in *EST1;bar1Δ* and *EST1-4;bar1Δ* strains while the lowest Est1 RNA value was significantly higher in *EST1-4;bar1Δ* strain compared to the *EST1;bar1Δ* strain. As expected, no difference was observed for Cln2 mRNA between the two strains. We conclude that the

identified Rnt1p cleavage of the Est1 mRNA contributes to efficient cell cycle dependent repression of Est1 mRNA.

## DISCUSSION

In this study, we show that yeast RNase III negatively regulates the expression of yeast telomerase subunits and contributes to the cell cycle regulation of Est1 mRNA level. Decreased decay rates and increased steady-state levels of the RNAs lead to an increase in telomerase activity and to telomere elongation (Fig. 1, 2). The catalytic endoribonucleolytic activity of Rnt1p was required for controlling the expression of the telomerase RNP complex, suggesting that Rnt1p targets one or more telomerase related RNAs for direct cleavage (Fig. 3). Indeed, recombinant Rnt1p cleaved Est1 mRNA *in vitro* and mutations that disrupt Rnt1p cleavage impaired the cell cycle repression of Est1 mRNA without affecting the decay of other cell cycle regulated RNAs (Fig. 4 and 5). These results reveal a new layer of regulation that controls telomere length by adjusting the expression of telomerase subunits and identify new targets for eukaryotic RNase III.

Efforts to understand how telomere length is regulated revealed a cell cycle controlled machinery that encompasses competing telomere elongation and shortening factors (Evans et Lundblad 2000; Smogorzewska et de Lange 2004). However, very little is known about how the expression of telomerase itself is regulated and what impact variations in its expression levels may have on the telomere length. Earlier studies indicated that the expression levels of individual components of the telomerase RNA complex are not interdependent since an overexpression of any single factor appeared not to alter the

expression of the others (Peterson et al. 2001; Teo et Jackson 2001; Snow et al. 2003). It was proposed that an increase in the telomerase activity requires increased expression of at least the majority of the components of the telomerase RNP complex (Teo et Jackson 2001). However, conditions that change these expression levels accordingly and factors that regulate them were not identified thus far. The present study identifies Rnt1p as such a factor. The increase in telomerase activity upon the deletion of *RNT1* is not a generic response to general perturbation in RNA metabolism (Fig. 3). In addition, previous studies have shown that mutations inhibiting nonsense-mediated mRNA decay (NMD) induces the expression of Est1, Est2 and Est3 mRNAs but, unlike deletion of *RNT1*, lead to short telomeres (Dahlseid et al. 2003). The simultaneous induction of the different telomerase subunit RNAs in the absence of *RNT1* indicates that either Rnt1p controls the expression of each RNA independently or it induces the expression of a single RNA that in turn induces the others. We prefer the first possibility because expressing the subunit RNAs individually from a heterologous and repressible promoter did not affect the expression of the other subunits (Larose et al., unpublished observation). Consistently, a mutation that only disrupts Rnt1p cleavage of Est1 mRNA does not increase the expression of the other components of the telomerase holoenzyme (data not shown).

The results thus raise the question of how Rnt1p exerts this negative regulation on the expression levels of the mRNAs coding for telomerase subunits. One possibility is that Rnt1p simultaneously cleaves Est1, Est2, Est3

and Tlc1 RNAs in the nucleus, before they are exported to the cytoplasm (Das et al. 2003). This is supported by the fact that the catalytic activity of Rnt1p is required for the normal expression of all four RNAs and that the response of these RNAs to the inactivation of Rnt1p follows the same kinetics as that of known substrates. Moreover, our data do show that Est1 mRNA can directly be cleaved by Rnt1p *in vitro* (Fig. 4). Our failure to detect such direct cleavage of Est2, Est3, and Tlc1 RNAs could be explained if those RNAs require additional cellular factors for cleavage. Previous studies have shown that chaperones may mediate the cleavage of non-canonical Rnt1p substrates (Giorgi et al. 2001). For example, processing of the snoRNA U18 is Rnt1p-dependent *in vivo*, but recombinant Rnt1p alone does not cleave pre-U18 snoRNA *in vitro* (Giorgi et al. 2001). Such an *in vitro* cleavage of pre-U18 requires the presence of Nop1p, a nucleolar protein that associates with U18. It is therefore possible that yet to be identified proteins mediate the cleavage of Est2, Est3, and Tlc1 by Rnt1p in a U18-like fashion. Another possibility is that Rnt1p cleaves another RNA that will affect telomerase mRNA levels. Since the catalytic activity of Rnt1p is required for normal telomerase mRNA levels, that possibility could be envisaged but no such example has been observed yet.

The discovery that Rnt1p directly cleaves Est1 mRNA adds to a growing list of Rnt1p substrates that include mRNAs coding for glucose and iron related proteins (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005). To date, yeast is the only eukaryote in which direct cleavage of mRNAs by RNase III enzymes has



been documented. In vertebrates, conditional mRNA degradation is normally carried out in the cytoplasm by the machinery of RNA interference (Yang et al. 2000; Zamore et al. 2000). The fact that Rnt1p is localized in the nucleus suggests that it cleaves its target mRNAs in the nucleoplasm, which raises questions about the function of this cleavage and its contribution to the overall regulation of gene expression (Catala et al. 2004). Nascent mRNAs are exported rapidly to the cytoplasm and at any given time, the bulk of cellular mRNAs are found in the cytoplasm (Das et al. 2003). This explains why deletion of *RNT1* or disruption of Rnt1p cleavage activity does not dramatically increase the half-life of its target RNAs. Similarly, a disruption of its cleavage site in the targeted RNA, like in the case of the Est1-4, does not lead to a major increase of the RNA steady state level. This observation is consistent with those made in previous studies using other Rnt1p mRNA targets (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005). It is therefore unlikely that the function of Rnt1p cleavage is to fully silence the expression of *EST1* or similarly regulated genes. Instead, Rnt1p-dependent cleavage may provide a fail-safe mechanism for programmed transcription inhibition or act as a fine tuner for gene expression. Indeed, expressing the mRNAs coding for telomerase subunits from heterologous promoters dramatically increases their expression in an Rnt1p-dependent manner (Larose et al., unpublished observation).

It is known that the abundance of Est1p is cell cycle regulated (Taggart et al. 2002). Consistent with recent results (Osterhage et al. 2006) and with

previous genome-wide transcriptional profiling (Spellman et al. 1998), we show here that this is accompanied by a cell cycle dependent regulation of the mRNA coding for Est1p. A significant increase of Est1 mRNA was observed during the transition from G1 to S phase of the cell cycle. This increase correlates with an increase of the protein level observed in S phase (Taggart et al. 2002). After S-phase and when cells enter G2, the level of Est1 mRNA rapidly decreased (Fig. 5). It is noteworthy that the normally strictly nucleolar localization of Rnt1p is relaxed exactly at this point in the cell cycle such that the enzyme is found throughout the nucleus in G2/M (Catala et al. 2004). This cell cycle regulated control of Rnt1p localization could thus be responsible for the cell cycle dependent degradation of the Est1 mRNA. A comparable situation was previously reported for the endoribonuclease MRP: the exit of this enzyme from the nucleolus allows the cleavage of the cell cycle regulated Clb2 mRNA (Gill et al. 2004). The G1/S phase dependent increase in Est1 mRNA therefore occurs when Rnt1p is sequestered in the nucleolus and consequently is unchanged, even if Rnt1p cleavage site is disrupted in the Est1-4 mRNA. This implies that transcription of *EST1* itself is induced in a cell cycle dependent manner and corroborates the inclusion of this gene in the list of G1/S induced genes that encompasses several DNA-replication genes (Spellman et al. 1998). The G2-dependent decrease of Est1 mRNA level was not blocked by the deletion of *RNT1*, suggesting that normal decay of the mRNA combined with reduced transcription contribute to Est1 repression.

Therefore, our results indicate that telomerase activity in yeast is regulated by a combination of transcriptional and posttranscriptional events.

## REFERENCES

1. Hug, N., and Lingner, J. (2006) *Chromosoma* **115**, 413-425
2. LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 2785-2788
3. Lundblad, V., and Szostak, J. W. (1989) *Cell* **57**, 633-643
4. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) *Cell* **43**, 405-413
5. Cohn, M., and Blackburn, E. H. (1995) *Science* **269**, 396-400
6. Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R., and Lundblad, V. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 11190-11195
7. Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B., and Lundblad, V. (1996) *Genetics* **144**, 1399-1412
8. Singer, M. S., and Gottschling, D. E. (1994) *Science* **266**, 404-409
9. 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) *Nat. Genet.* **27**, 64-67
10. Virta-Pearlman, V., Morris, D. K., and Lundblad, V. (1996) *Genes Dev.* **10**, 3094-3104
11. Dahlseid, J. N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M. J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M. R., and Berman, J. (2003) *Eukaryot. Cell* **2**, 134-142
12. Diede, S. J., and Gottschling, D. E. (1999) *Cell* **99**, 723-733
13. Marcand, S., Brevet, V., Mann, C., and Gilson, E. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 487-490
14. Taggart, A. K., Teng, S. C., and Zakian, V. A. (2002) *Science* **297**, 1023-1026
15. Taggart, A. K., and Zakian, V. A. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 275-280
16. Boule, J. B., Vega, L. R., and Zakian, V. A. (2005) *Nature* **438**, 57-61
17. Wotton, D., and Shore, D. (1997) *Genes Dev.* **11**, 748-760
18. d'Adda di Fagagna, F., Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1781-1799
19. Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998) *EMBO J.* **17**, 3738-3746
20. Abou Elela, S., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996) *Cell* **85**, 115-124
21. Chanfreau, G., Elela, S. A., Ares, M., Jr., and Guthrie, C. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2741-2751
22. Ge, D., Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2005) *Curr. Biol.* **15**, 140-145
23. Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., and Chanfreau, G. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1279-1289
24. Lee, A., Henras, A. K., and Chanfreau, G. (2005) *Mol. Cell* **19**, 39-51
25. Zer, C., and Chanfreau, G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 28997-29003
26. Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. (2001) *EMBO J.* **20**, 7250-7258
27. Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 3142-3147
28. Nagel, R., and Ares, M., Jr. (2000) *RNA* **6**, 1142-1156

29. Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Elela, S. A. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 985-1000
30. Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA
31. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor, New York
32. Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998a) *Embo J.* **17**, 3726-3737
33. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**, 619-630
34. Catala, M., Lamontagne, B., Larose, S., Ghazal, G., and Elela, S. A. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 3015-3030
35. Friedman, K. L., and Cech, T. R. (1999) *Genes Dev.* **13**, 2863-2874
36. Henikoff, S., and Eghtedarzadeh, M. K. (1987) *Genetics* **117**, 711-725
37. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) *Yeast* **14**, 115-132
38. Larrivee, M., LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1391-1396
39. Lamontagne, B., and Abou Elela, S. (2001) *Purification and characterization of Saccharomyces cerevisiae Rnt1p nuclease*, Academic Press, San diego, CA
40. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001) *Methods* **25**, 386-401
41. Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E., and Ginsburg, D. (1990) *Anal. Biochem.* **191**, 396-400
42. Wellinger, R. J., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1993) *Cell* **72**, 51-60
43. Chapon, C., Cech, T. R., and Zaug, A. J. (1997) *RNA* **3**, 1337-1351
44. LeBel, C., Larrivee, M., Bah, A., Laterreur, N., Lvesque, N., and Wellinger, R. J. (2006) *Methods Mol. Biol.* **313**, 265-316
45. Lamontagne, B., Hannoush, R. N., Damha, M. J., and Abou Elela, S. (2004) *J. Mol. Biol.* **338**, 401-418
46. Tremblay, A., Lamontagne, B., Catala, M., Yam, Y., Larose, S., Good, L., and Elela, S. A. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4792-4802
47. Ghazal, G., Ge, D., Gervais-Bird, J., Gagnon, J., and Abou Elela, S. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2981-2994
48. Osterhage, J. L., Talley, J. M., and Friedman, K. L. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 720-728
49. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273-3297
50. Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 177-208
51. Evans, S. K., and Lundblad, V. (2000) *J. Cell Sci.* **113 Pt 19**, 3357-3364
52. Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 197-202
53. Snow, B. E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R. M., Robinson, M. O., and Harrington, L. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 698-704

54. Das, B., Butler, J. S., and Sherman, F. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5502-5515
55. Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. (2001) *EMBO J.* **20**, 6856-6865.
56. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000) *Cell* **101**, 25-33
57. Yang, D., Lu, H., and Erickson, J. W. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 1191-1200
58. Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., and Schmitt, M. E. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 945-953
59. Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415

## FOOTNOTES

We thank K. Friedmann for strain YKF103, D. Ursic for strain DUY746, J. Parenteau for strain JPY112, V. Lundblad for plasmid pVL145. We also thank J. Gervais-Bird for bioinformatics support. This work was supported by grant # MOP-67162 and MOP-74438 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). S. A. is a Chercheur-Boursier Senior and R.J.W. a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. Deletion of *RNT1* causes an increase in the steady-state level of RNAs of telomerase subunits.** (A) Illustration of the expression profiles of telomerase related mRNAs upon the deletion of *RNT1*. The data were extracted from a previously performed microarray analysis using RNA extracted from wild type or *mt1* $\Delta$  cells (Ge et al. 2005). Mig2 and Rps22B mRNAs are shown as positive controls, while Act1 mRNA is shown as a negative control. (B) Northern blot analysis of RNAs coding for the telomerase RNP complex. Total RNA was extracted from wild type or *mt1* $\Delta$  cells and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference. The RMA indicated below each gel is an average of three experiments with a standard deviation of  $\pm 0.2$  or less. (C) Graphical representation of the relative increases in the half-lives of the telomerase mRNAs upon the deletion of *RNT1*. The relative increase in the half-lives of the telomerase mRNAs was normalized to the half-life of Spt15 mRNA, which serves as a control for possible indirect effects caused by the slow metabolism of *mt1* $\Delta$  cells. The different half-live values used to calculate the relative increase are indicated in Table 2. The data were obtained from three independent transcription inhibition experiments. (D) Western blot analysis of Est2p expression. Total proteins were extracted from wild type or *mt1* $\Delta$  cells expressing proA-*EST2*. Immunoprecipitation was



performed using IgG-sepharose beads. Proteins from total extract (upper panel) or from immunoprecipitation (lower panel) were separated using SDS-PAGE and Est2p was visualized using antibodies against the protein A. The expression level of Est2p was normalized to the IgG heavy chains or to Pgk1p. The relative protein amount (RPA) is an average of three experiments with a standard deviation of  $\pm 0.6$ .

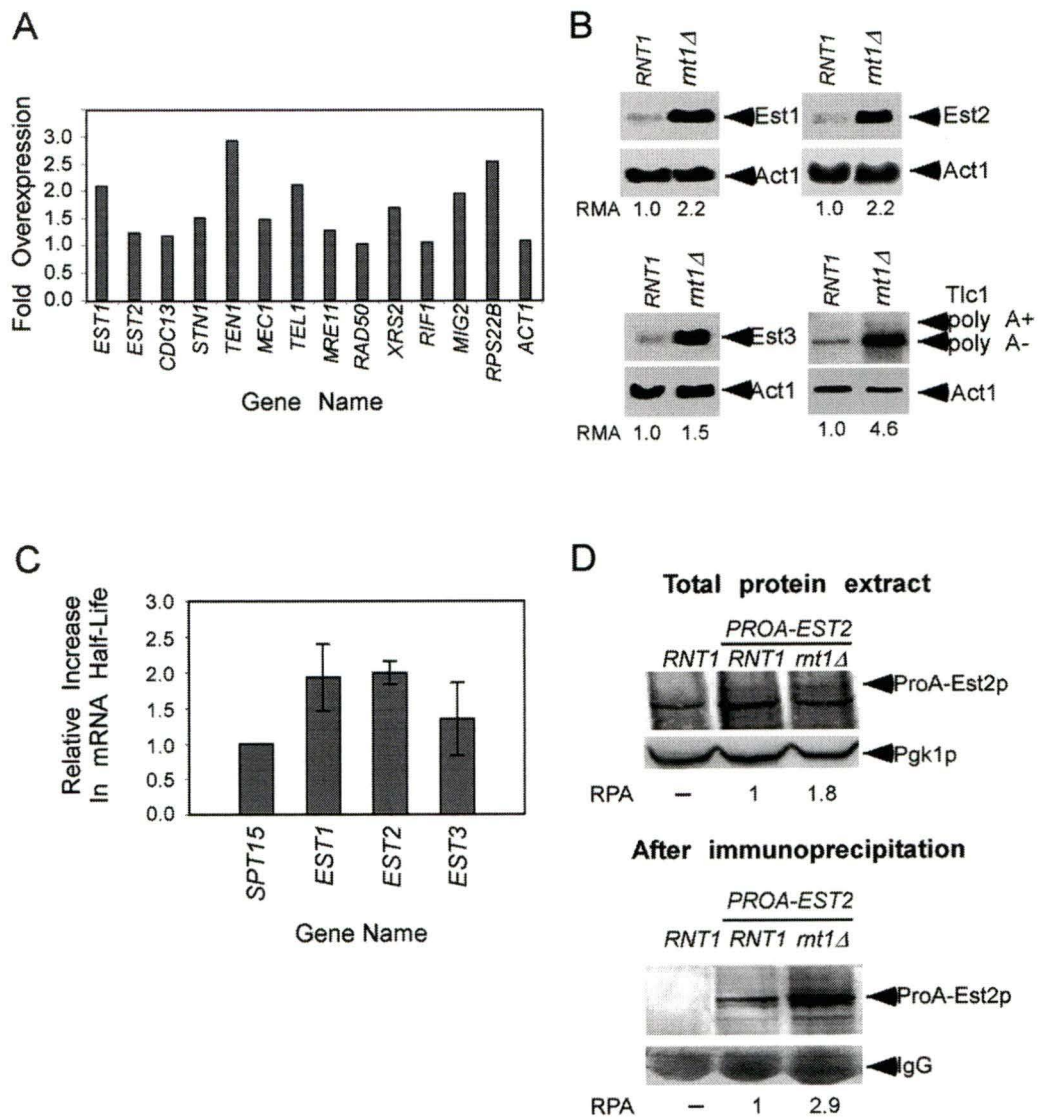
**FIGURE 2. Rnt1p is required for normal telomerase activity.** (A) Southern blot analysis of telomere length. Genomic DNA was extracted from wild type or *mnt1* $\Delta$  cells and digested with XhoI restriction enzyme to release the terminal restriction fragment (TRF). The DNA was separated on a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane and visualized with a randomly labelled telomeric probe. Note that this experiment was repeated several times using different clones and strain backgrounds and the increase in the telomere length was reproducible for each clone and not due to clonal variation. (B) *In vitro* assay of the telomerase activity. Telomerase was partially purified by immunoprecipitating proA-EST2 using IgG affinity chromatography. RNA dependent extension of a telomeric primer was monitored using denaturing PAGE. The increase in the relative telomerase activity (RTA) was calculated using the activity of the wild type telomerase as a reference. The data were obtained from three independent experiments using three independent cell extracts with a standard deviation of  $\pm 0.8$ .

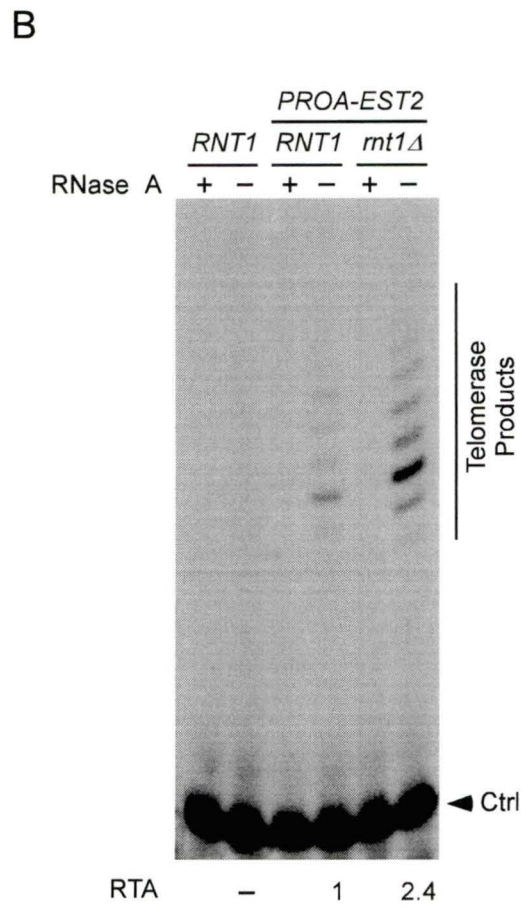
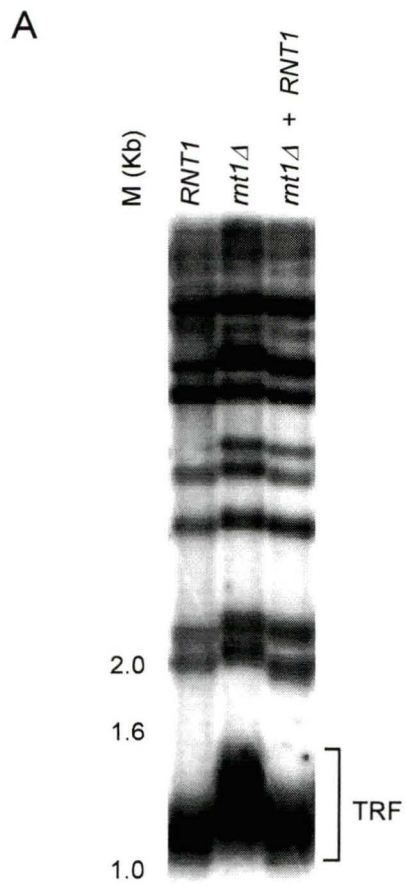
**FIGURE 3. Rnt1p catalytic activity is required for the normal expression of the telomerase subunits.** (A) Northern blot analysis of H/ACA snoRNA in cells expressing Rnt1p temperature sensitive allele (*mnt1-1338/T*). RNA was extracted from *mnt1-1338/T* cells at different intervals after shift to 37°C. A radiolabeled probe against *snR43* was used to detect both mature and extended species as indicated on the right. (B) Graphical representation of the relative increase in mRNA levels of different telomerase components in cells expressing Rnt1p TS allele (*mnt1-1338/T*). RNA was extracted as described in A and quantified using real-time PCR. The levels of the different mRNAs are presented relative to that of Act1. The indicated values represent an average of three independent experiments. The graph curves were obtained using Microsoft Excel. (C) Comparison between the expression levels of the telomerase related RNAs in wild type cells, *mnt1*Δ cells, and cells expressing a catalytically impaired version of Rnt1p (*mnt1-D247/R*). The RNA was analyzed by Northern blot gene specific probes. Expression levels were quantified using Instant Imager and normalized to Act1 mRNA as a loading control. The indicated values represent an average of three independent experiments with a standard deviation of ± 0.4 or less.

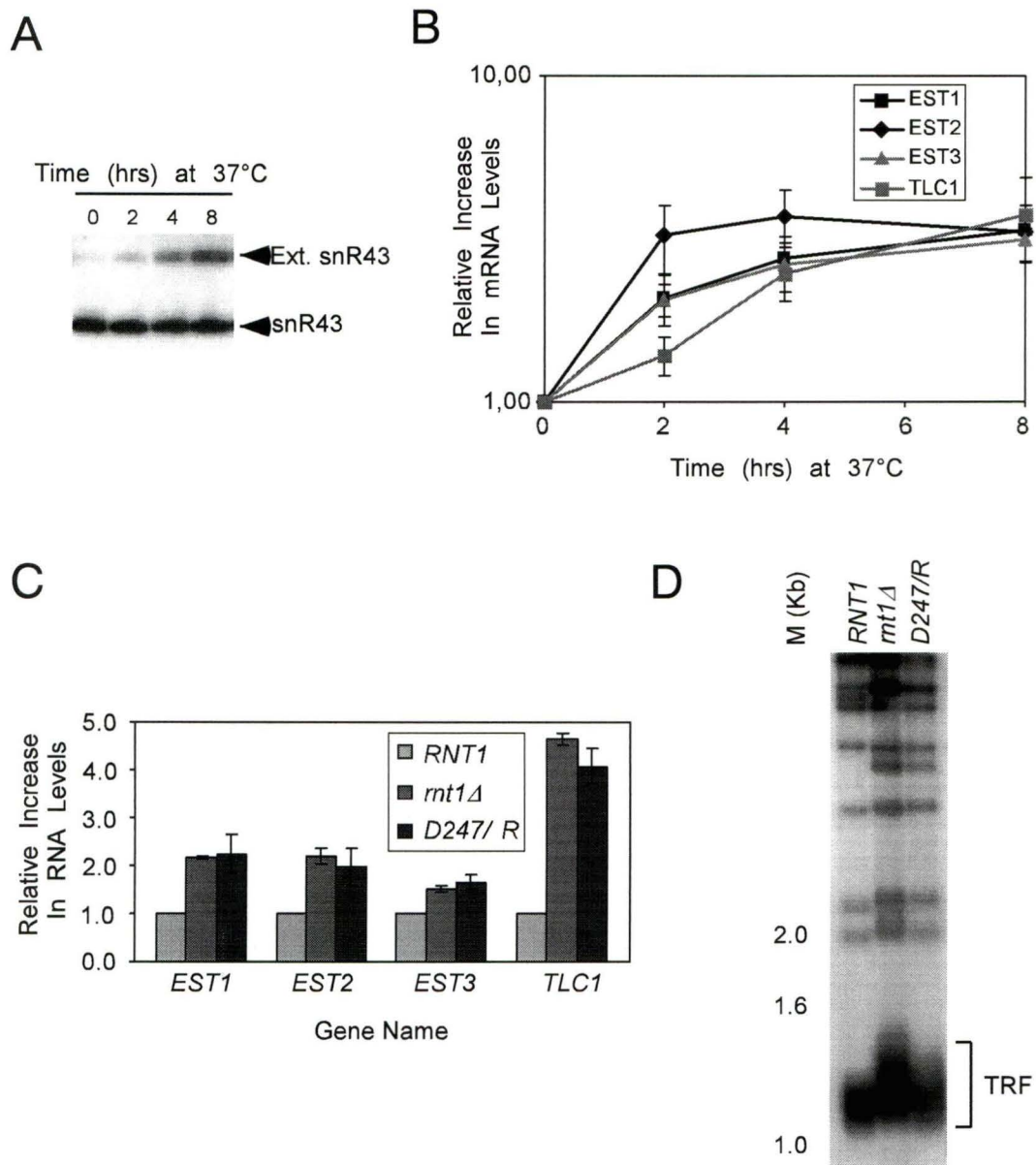
**FIGURE 4. Rnt1p directly cleaves Est1 mRNA using a conserved cleavage signal.** (A) Schematic representation of Rnt1p's cleavage signal at the 3' end of *EST1* mRNA. The RNA structure was predicted *in silico* using Mfold (Zuker 2003). The predicted cleavage sites of Rnt1p are indicated by

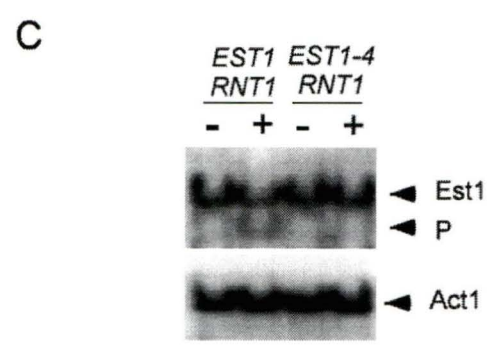
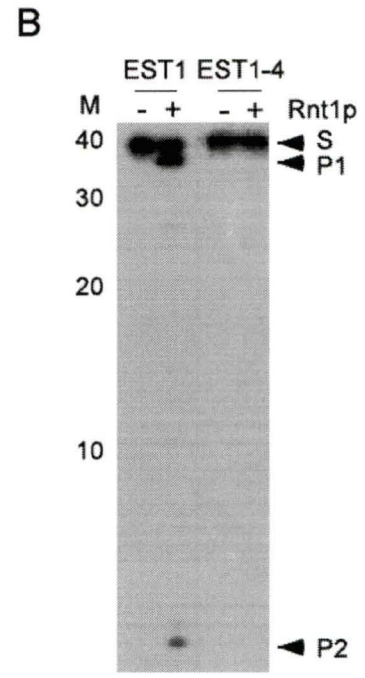
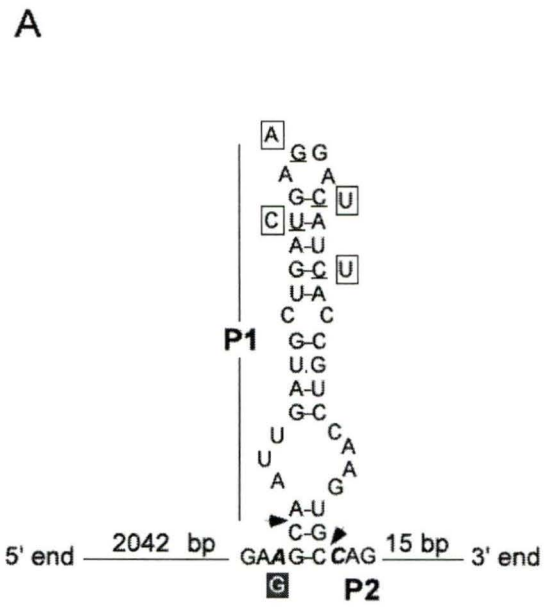
arrows. P1 and P2 indicate the cleavage products observed *in vitro*. The boxed letters indicate the mutations that disrupt Rnt1p cleavage signals. The underlined letters indicate the position of the third nucleotide in the codon of Est1 open reading frame near the tetraloop recognized by Rnt1p. Bold italic nucleotides represent the 5' and 3' ends of the synthetic substrate used for *in vitro* cleavage assay in Figure 4 (B). The nucleotide highlighted in grey was introduced to stabilize the synthetic substrate. (B) *In vitro* cleavage of a model Est1 substrate. Model RNA substrate representing the predicted Rnt1p cleavage site within the coding sequence of the Est1 mRNA (EST1) or a version carrying mutations disrupting Rnt1p recognition site (EST1-4) were T7 transcribed and incubated *in vitro* with (+) or without (-) recombinant Rnt1p enzyme in the presence of 150 mM KCl and Mg<sup>2+</sup> at 30°C. The position of the substrate (S) and the products (P1, P2) are indicated on the right. The position of the 10 bp ladder (M) is indicated on the left. (C) Cleavage of total RNA extracted from wild type cells (*RNT1*; *EST1*) or cells expressing a version of Est1 mRNA carrying the 4 silent mutations (indicated in A) that disrupt the tetraloop structure (*RNT1*; *EST1-4*). RNA was incubated with (+) or without (-) recombinant Rnt1p enzyme as described in B. The position of the full length mRNA and the 5' end cleavage product (P) are indicated on the right. The position of the predicted cleavage site was confirmed by primer extension (data not shown) and indicated in panel A.

**FIGURE 5. Deletion of Rnt1p impairs the cell cycle dependent degradation of Est1 mRNA.** (A) Flow cytometry analysis of cell-cycle synchronized *EST1; bar1Δ* and *EST1-4; bar1Δ* cells. Cells were synchronized in G1 by the addition of  $\alpha$ -factor and released into a synchronous S-phase and monitored by FACS analysis. Unreplicated (1N) and replicated (2N) DNA are indicated on the top. (B) Northern blot analysis of Cln2, Est1 and Act1 mRNAs in cell-cycle synchronized *EST1; bar1Δ* and *EST1-4; bar1Δ* cells. Total RNA was extracted at the indicated time points after release and visualized using gene specific randomly labelled probes. (C) Analysis of Cln2 and Est1 mRNA expression profile after release of *EST1; bar1Δ* (\*) and *EST1-4; bar1Δ* (■) cells. RNA was extracted from cells synchronized and released shown in A. Quantifications of mRNA levels were performed using real-time PCR as explained in Materials and Methods. The data are an average of two experiments for *EST1; bar1Δ* and three experiments for *EST1-4; bar1Δ* cells. The graph curves were obtained by a non-linear regression analysis, using the simplest statistically valid model to determine the best curve fit as explained in Materials and Methods. (D) Comparison between the highest and lowest RNA values of Est1 and Cln2 mRNAs in *EST1; bar1Δ* and *EST1-4; bar1Δ* cells. The highest and lowest RNA values of Est1 and Cln2 mRNAs were determined directly from the curves shown in C.



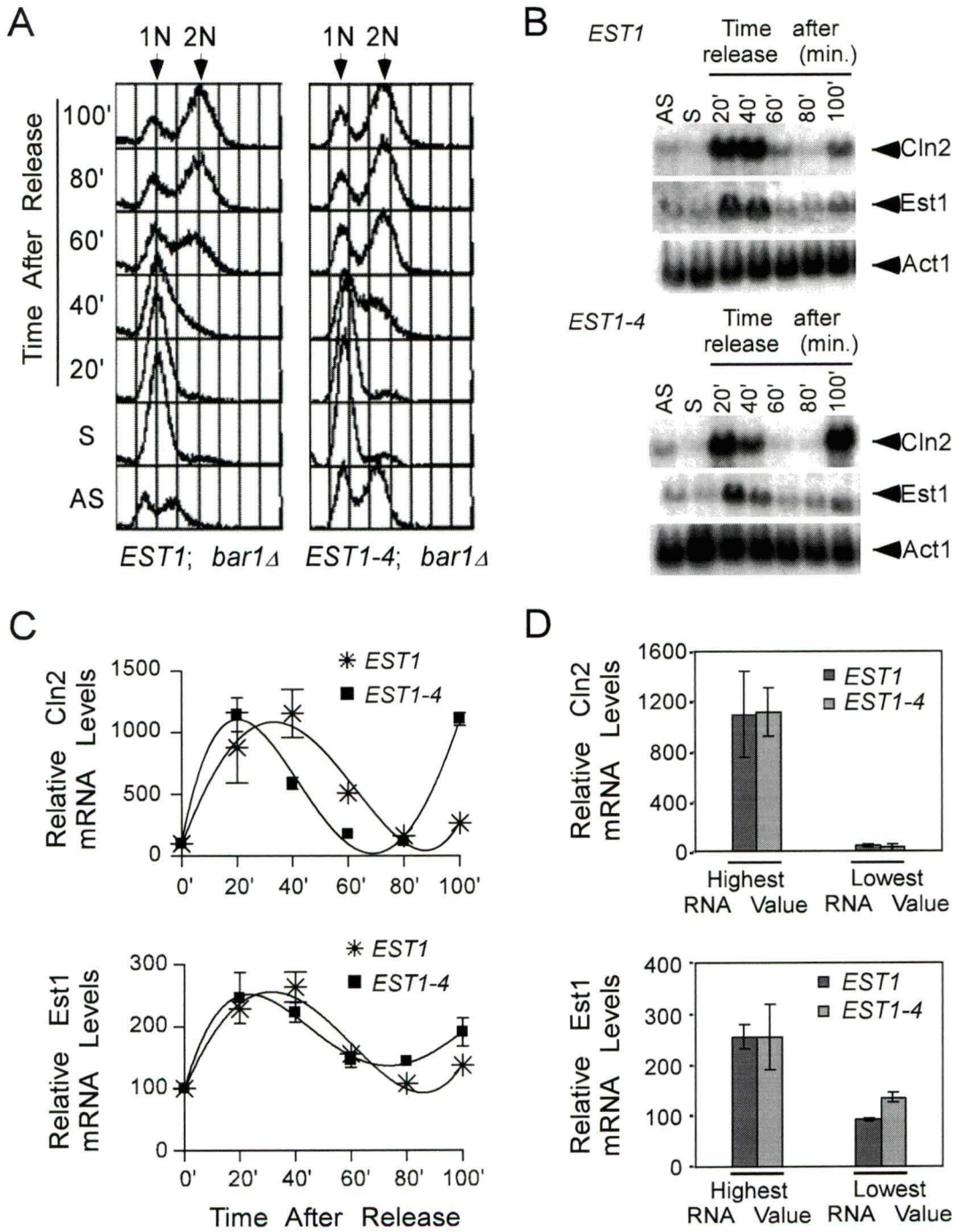






Larose et al., 2006  
Figure 4





Larose et al., 2006  
Figure 5

## TABLES

**Table 1. Primers and Probes used for Real-Time PCR**

Name	Sequence
Primer EST1 For RTP	CTGCATTAAAGTATCATT CAGGTAA
Primer EST1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCCGAGTTGTAAACATAAGATCGAAA
Probe EST1 RTP	TCCCATTGTGGCAGCCAAGTT
Primer EST2 For RTP	AACAGACCAACAGCAAGTGA
Primer EST2 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTCTCTATTGGCTTTTCGCATTA
Probe EST2 RTP	TCCGCCCATGGCAAGCTTT
Primer EST3 For RTP	GCTTGACCAAGCAGGACTTA
Primer EST3 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTCTTATCGATGCGTATACCTTGTA
Probe EST3 RTP	ACCGCATATGAGCCCGACAATT
Primer SPT15 For RTP	AAACATTGTGGCAACTGTGA
Primer SPT15 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCAATACGCATGATGACAGCAG
Probe SPT15 RTP	TGCGCTACATGCCCGTAATGC
Primer RPR1 For RTP	TTGTTCCGTTTGACTTGTGCG
Primer RPR1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTGGAACAGCAGCAGTAATCG
Probe RPR1 RTP	AGACCTTGACGCTCACGCCGT
Primer ACT1 For RTP	TCCGGTGATGGTGTTACTCA
Primer ACT1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCATTCTCAAATGGCGTGAGG
Probe ACT1 RTP	CGTCGTTCCAATTTACGCTGGTTT
Primer CLN2 For RTP	TAACAGCAATAACGCAACCA
Primer CLN2 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCGGAACATTCCATGGTTAATGA
Probe CLN2 RTP	CCGCAACGGCGCATTACCT
Primer FLAP	GATAAATAATGTGCCGGATCC

**Table 2.** Half-lives of Different Telomerase mRNA Components<sup>a</sup>

Strain	<i>RNT1</i>	<i>rnt1Δ</i>
Gene Name	Aver. 1/2 Life (min.)	Aver. 1/2 Life (min.)
<i>EST1</i>	10.8 ± 0.6	31.2 ± 5.5
<i>EST2</i>	7.2 ± 1.2	22.1 ± 6.2
<i>EST3</i>	17.9 ± 3.6	34.5 ± 5.7
<i>TLC1</i>	> 60.0	> 60.0
<i>SPT15</i>	12.4 ± 2.3	18.7 ± 3.8

<sup>a</sup> mRNA half-lives were determined by real-time PCR quantification of RNA extracted from thiolutin-treated cells as described in Experimental Procedures. The values represent an average of three independent experiments. Spt15 mRNA is used as a negative control.

## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

### **FIGURE LEGENDS**

#### **SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Northern blot analysis of control mRNAs.**

Total RNA was extracted from wild type or *mt1*Δ cells and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference.

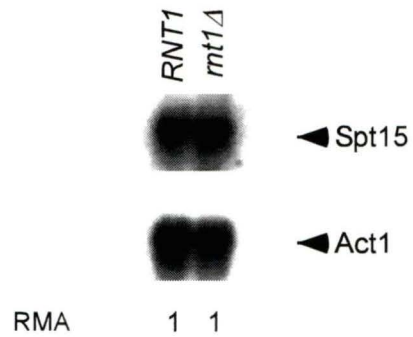
#### **SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Northern blot analysis of proA-Est2 mRNA.**

Total RNA was extracted from wild type or *mt1*Δ cells which both contain a tagged allele of *EST2* (*proA-EST2*) and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference.

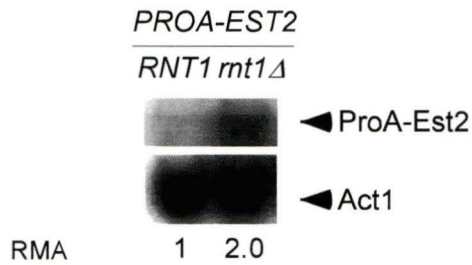
**Supplemental Table 1. Fit parameters and errors for Figure 5C**

Strain	<i>EST1; bar1Δ</i>		<i>EST1-4; bar1Δ</i>	
Gene	<i>CLN2</i>	<i>EST1</i>	<i>CLN2</i>	<i>EST1</i>
A	89.3 ± 149.6	98.3 ± 14.6	108 ± 71	99.4 ± 20.2
B	59.8 ± 27.6	10.5 ± 2.7	114 ± 13	15.5 ± 3.7
C	-0.806 ± 1.318	-0.182 ± 0.13	-4.02 ± 0.63	-0.500 ± 0.178
D	-5.20 ± 20.79 × 10 <sup>-3</sup>	-7.35 ± 202.9 × 10 <sup>-5</sup>	4.36 ± 0.99 × 10 <sup>-2</sup>	5.37 ± 2.80 × 10 <sup>-3</sup>
E	7.47 ± 10.33 × 10 <sup>-5</sup>	8.83 ± 10.08 × 10 <sup>-6</sup>	-1.38 ± 0.49 × 10 <sup>-4</sup>	-1.83 ± 1.39 × 10 <sup>-5</sup>
R <sup>2</sup>	0.847	0.934	.947	0.738

The numbers represent the coefficient used in the equation (polynomial of the fourth order  $Y=A + B*X + C*X^2 + D*X^3 + E*X^4$ ) to analyse the data.



**SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Northern blot analysis of control mRNAs.** Total RNA was extracted from wild type or *rnt1* cells and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference.



SUPPLEMENTAL FIGURE 2. **Northern blot analysis of proA-Est2 mRNA.** Total RNA was extracted from wild type or *rnt1* cells which both contain a tagged allele of EST2 (*proA-EST2*) and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference.

## CHAPITRE II

Détermination de l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase Tlc1.

### **Préambule**

Afin de pouvoir étudier la biogénèse de l'ARN de la télomérase Tlc1, nous avons déterminé de façon précise l'extrémité 5' de Tlc1. Une analyse par extension d'amorce nous a permis de démontrer que la majorité de l'ARN Tlc1 débute précisément avec une guanosine, toutefois une faible proportion de Tlc1 possède des extensions à son extrémité 5'.



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Souche et conditions de croissance**

La souche de levure utilisée dans cette étude est W303-1A (Thomas et Rothstein 1989). La croissance des levures s'est effectuée selon des conditions standards dans un milieu riche YEPD contenant 2 % de glucose, à une température de 30 °C (Rose et al. 1990; Guthrie et Fink 1991).

### **Extraction d'ARN**

L'extraction d'ARN a été effectuée selon des conditions standards (Rose et al. 1990). Brièvement, des cultures de 50 ml ont été incubées à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,8 à 660 nm. Les cellules ont ensuite été culotées par centrifugation à 4000 r.p.m. et l'ARN total a été extrait à l'aide de billes de verres suivi de phénol/chloroforme.

### **Analyse d'extension d'amorce**

L'analyse d'extension d'amorce a été effectuée selon les conditions décrites précédemment (Larose et al. 2007). Brièvement, 15 µg d'ARN total est inversement transcrit en utilisant l'amorce Tlc1-33-49 (CAGCCATTGACATTTTC) ou l'amorce Tlc1-52-68 (TACGATTAAGCAAACGC). Les produits pourvus d'extensions sont ensuite migrés sur gel dénaturant de polyacrylamide 8 % et analysés par autoradiographie.

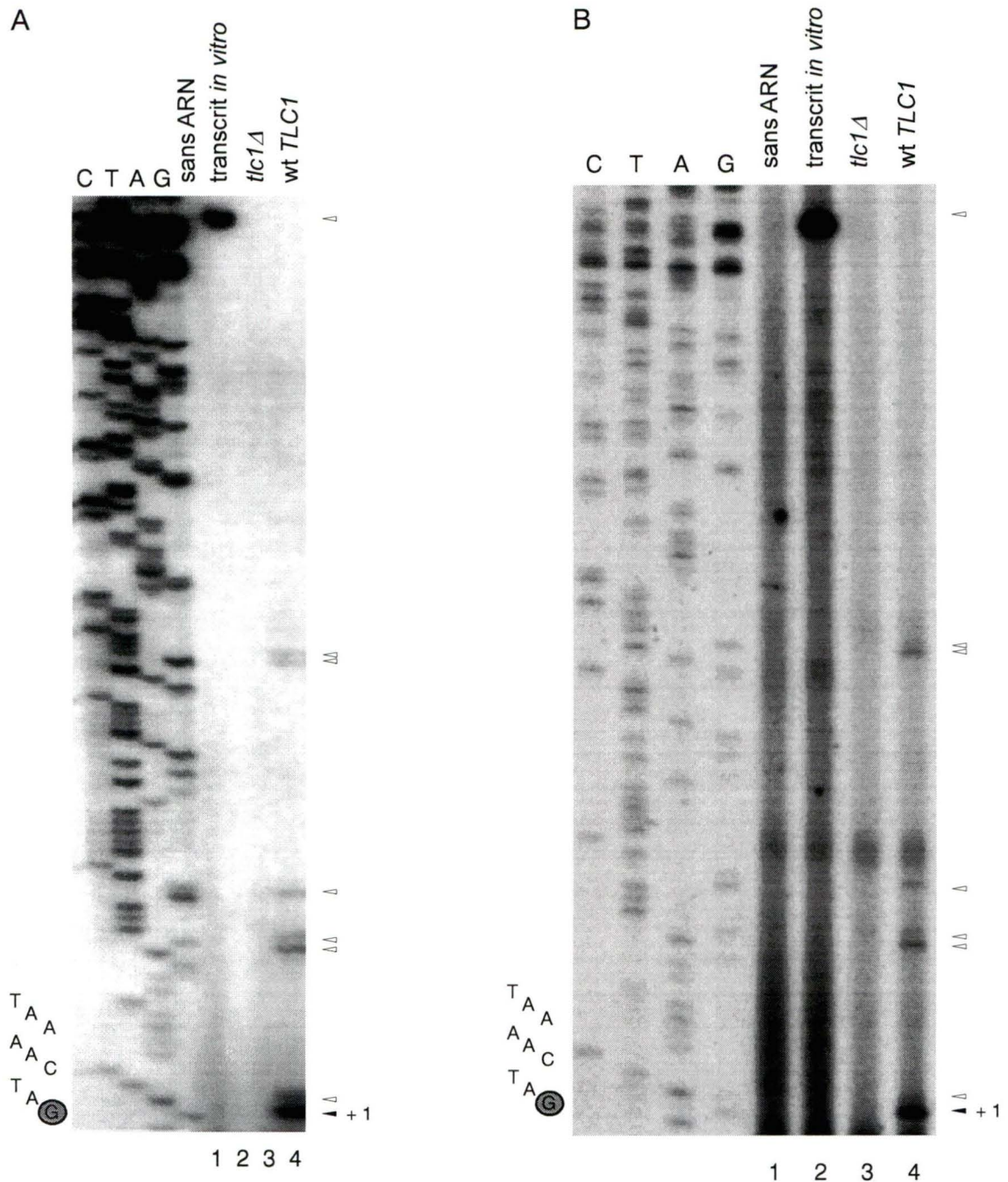
## RÉSULTATS

### Identification de l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase Tlc1.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la composante ARN de la télomérase (Tlc1) a été identifiée par criblage génétique en utilisant une banque d'ADNc surexprimé pouvant supprimer l'état de répression transcriptionnelle d'un gène placé en proximité d'un télomère (Singer et Gottschling 1994). À partir de cet ADNc, la taille approximative de Tlc1 a été déterminée sans toutefois préciser ses extrémités 5' et 3', rendant difficile l'étude de la biogénèse de Tlc1. Ce projet consistait à déterminer de façon précise l'extrémité 5' de Tlc1 pour permettre subséquemment un alignement de séquence utilisant ce point d'ancrage. Cet alignement de séquence a ensuite été utilisé pour déterminer la structure secondaire de Tlc1 ainsi que pour étudier la région promotrice de Tlc1 (Dandjinou et al. 2004; Larose et al. soumis).

En effectuant une technique d'extension d'amorce et en utilisant un oligo pouvant se lier environ 50 nucléotides en aval de l'extrémité 5' prédite, nous avons pu démontrer que Tlc1 se termine de façon majoritaire avec une guanosine (Figure 10 A). Cette bande majeure ne se retrouve pas dans les différents contrôles : une réaction sans ARN (pour exclure les dimères d'amorce), une réaction effectuée avec un transcrit *in vitro* sens (pour exclure les arrêts pouvant être causés par des structures) et une réaction effectuée sur de l'ARN provenant d'une souche *tlc1Δ* (pour exclure les bandes non

spécifiques provenant d'une hybridation avec d'autres ARN). De plus, même en utilisant une amorce différente, cette bande majeure est toujours détectée (Figure 10 B). Nous avons donc nommé cette guanosine comme le +1 de Tlc1. Curieusement, une faible proportion de Tlc1 semble posséder des extensions à son extrémité 5'. En effet quelques bandes minoritaires sont détectées en amont de l'extrémité majeure. Ces extensions pourraient correspondre à des intermédiaires de maturation ou encore à des sites d'initiation de la transcription. Puisque Tlc1 possède une coiffe TMG, il serait intéressant de déterminer si l'extrémité majeure +1 ainsi que les extensions observées sont coiffées TMG.



**Figure 10. Analyse de l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase chez *S.cerevisiae*.** L'ARN total de différentes souches a été analysé par une technique d'extension d'amorce en utilisant l'amorce Tlc1-33-49 (A) ou l'amorce Tlc1-52-68 (B). La piste 1 sert de contrôle négatif et contient seulement l'amorce utilisée dans la réaction de réverse transcription sans présence d'ARN. La piste 2 contient un transcrit in vitro correspondant à Tlc1 et sert de contrôle d'arrêt de la polymérase. La piste 3 contient de l'ARN d'une souche déléetée pour *TLC1* tandis que la piste 4 contient de l'ARN de type sauvage. Une réaction de séquençage faite avec la même amorce utilisée pour la transcription inverse est indiquée sur la gauche comme référence. Les premiers nucléotides de la réaction de séquençage sont indiqués et le nucléotide encerclé correspond à l'extrémité majeure de Tlc1. La flèche noire représente aussi l'extrémité 5' de Tlc1 tandis que les flèches blanches représentent des extensions de Tlc1.

## CHAPITRE III

Larose, S., Dandjinou, A.T., Abou Elela, S. et Wellinger, R.J., 2008. Identification of Sequence Elements Required for the Transcription and Polyadenylation of Yeast Telomeres RNA. Soumis.

### Préambule

Ce manuscrit rapporte l'analyse de la région promotrice de *Tlc1* ainsi que l'analyse de la biogénèse de l'extrémité 3' de *Tlc1*. En effectuant un alignement de séquence de gènes *TLC1* provenant des levures s'apparentant au groupe *Saccharomyces* de phylogénie rapprochée *sensu stricto*, plusieurs régions de forte homologie ont été identifiées. Une analyse de délétion a permis de révéler des séquences qui possèdent la propriété d'activer ou de réprimer l'expression de *Tlc1*. Cette régulation du promoteur de *TLC1* s'est d'ailleurs avérée importante pour la fonction de la télomérase et le maintien des télomères. De plus, cette étude rapporte aussi que la biogénèse de *Tlc1* peut s'effectuer sans la formation d'un précurseur polyadénylé. Différentes modifications ont été apportées à l'extrémité 3' de *Tlc1* dans le but de modifier ou d'empêcher la formation d'un ARN *Tlc1* polyadénylé. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'extrémité 3' mature de *Tlc1* peut être produite indépendamment des séquences en aval du site Sm de *Tlc1* et que la polyadénylation n'est pas un prérequis à la biogénèse.

Title:

**IDENTIFICATION OF SEQUENCE ELEMENTS REQUIRED FOR  
THE TRANSCRIPTION AND POLYADENYLATION OF YEAST  
TELOMERASE RNA**

Stéphanie Larose, Alain T. Dandjinou, Sherif Abou Elela\* and Raymund J. Wellinger\*

Laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke, \*Département de  
microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé,  
Université de Sherbrooke, 3001 12e Ave Nord, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Running title: Sequence elements required for Tlc1 synthesis

Address Correspondence to : Sherif Abou Elela or Raymund Wellinger, Département de  
Microbiologie et d'Infectiologie, Université de Sherbrooke, 3001 12<sup>e</sup> Ave Nord,  
Sherbrooke, Québec. Tel. (819) 564-5214; Fax. (819) 564-5392; E-  
Mail: [Sherif.Abou.Elela@USherbrooke.ca](mailto:Sherif.Abou.Elela@USherbrooke.ca) or [Raymund.Wellinger@USherbrooke.ca](mailto:Raymund.Wellinger@USherbrooke.ca)

## SUMMARY

The RNA component of the budding yeast telomerase (Tlc1) is found in two forms, an abundant non-polyadenylated (poly (A-)) form found in the functional telomerase complex and a rare polyadenylated (poly (A+)) version with unknown function. It was suggested that the mature Tlc1 RNA is processed from the polyadenylated precursor, but the mechanism regulating its expression and the functional relevance of the stable polyadenylated form remained unclear. Here we examined the impact of sequences near *TLC1* 5' and 3'-ends on RNA synthesis and telomere maintenance. Deletions of conserved sequences near the 5'-end identified a core promoter regulated by defined transcription repressors and enhancers. Interestingly, mutations that disrupted *TLC1* polyadenylation signal impaired polyadenylation without affecting the expression of the mature form. Strikingly, removal of all cryptic polyadenylation signals near the *TLC1* 3'-end blocked the accumulation of detectable polyadenylated RNA without affecting the mature non-polyadenylated form or telomere length. These results indicate that generation of the mature form of the telomerase RNA subunit and its function in telomere maintenance is not dependent on the presence of a polyadenylated precursor.

## INTRODUCTION

Telomeres are nucleoprotein structures made of repetitive DNA sequences bound to specialized proteins in order to protect the ends of linear chromosomes and maintain genome integrity (1,2). In most eukaryotes, the maintenance of telomeric DNA is accomplished by a ribonucleoprotein complex called telomerase (3). Telomerase maintains telomeres length by acting as a reverse transcriptase that adds DNA repeats to the chromosome ends using its RNA moiety as a template (3,4). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the core telomerase required for activity *in vitro* is composed of the reverse transcriptase catalytic subunit Est2p and the template RNA Tlc1 (5,6). Other factors including the Est1p, Est3p, yKu70/80 and Sm proteins interact with the telomerase RNA and influence the enzyme activity *in vivo* (3).

Telomere length is maintained in part by various factors that regulate access of telomerase to its substrate, the telomeres, and influence its activity (7,8). However, little is known about how the expression of the telomerase subunits is regulated. The expression of certain components of telomerase such as Est1p was shown to be regulated both at the transcriptional and posttranscriptional level by defined signals embedded in the gene sequence (9-12). In contrast, very little information is available about the mechanism controlling the expression of the RNA moiety of the telomerase. Recently, it was shown that fewer molecules of Tlc1 RNA than telomeres are present in yeast cells during late S-phase of the cell cycle (13). This suggests that the amount of



Tlc1 RNA in the cell is rate limiting for telomerase activity. Indeed, *TLC1/tlc1Δ* heterozygote diploid cells, exhibit shorter telomeres than wild type diploid cells consistent with *TLC1* haploinsufficiency (13). This implies that maintaining optimal telomere length requires a tight regulation of Tlc1 expression. Indeed, recently it was shown that a significant number of genes affecting the regulation of steady state telomere length do so by affecting *TLC1* transcription (14). Clearly, the abundant RNA pol II associated PAF1C complex plays an important role in this, but specific cis- and trans-acting determinants for *TLC1* expression remained elusive.

Tlc1 RNA displays many features shared by small nuclear RNAs (snRNA) such as a 5' 2,2,7-trimethylguanosine (TMG) cap and a Sm-protein binding site at the 3'-end (15). This suggests that Tlc1 follows a maturation pathway related to that described for snRNAs (15). Indeed, it was recently shown that like snRNAs, Tlc1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and requires factors that also affect snRNA synthesis and stability (9,15,16). However, unlike all known snRNAs, Tlc1 is found in two forms, a major non polyadenylated species (poly(A-)) and a minor polyadenylated (poly(A+)) version that accounts for 5-10% of total Tlc1 RNA (17). Expression of Tlc1 from mRNA promoters like Gal4 increases the expression level of the polyadenylated version to 60% of the total without affecting the expression of non-polyadenylated form (17). Conditional repression of the Tlc1 expression and defects in the polyadenylation machinery block the expression of the polyadenylated form and reduces the amount of the non-polyadenylated version (17). This led to the suggestion that at least part of Tlc1 is

first transcribed as a polyadenylated RNA precursor that is subsequently processed into mature non-polyadenylated form. However, the functional relevance of this peculiar maturation pathway and its contribution to telomerase function remains unclear.

Here we analyzed the sequences near the 5'-end and 3'-end of the telomerase RNA gene with the goal of identifying the promoter and terminator elements influencing its expression. Deletions upstream of the *TLC1* 5'-end revealed repressor and enhancer elements that regulate the overall gene expression without altering the ratio of polyadenylated to non-polyadenylated forms. In contrast, mutations near the 3'-end blocked the synthesis of all detectable polyadenylated Tlc1 without affecting the overall amount of mature RNA. These results indicate that the synthesis and function of mature Tlc1 are not strictly dependent on RNA polyadenylation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Strains and Media* - All yeast strains were grown and manipulated using standard procedures (18,19). Strain W303-1A was described earlier (20,21). Strain CSHY76 (MAT $\alpha$ / $\alpha$ ; *ade2/ade2*; *ura3/ura3*; *leu2/leu2*; *his3/his3*; *trp1/trp1*; *tlc1::LEU2/TLC1*; *rad52::TRP1/RAD52*) was kindly provided by C. Greider (22). Strains from the "sensu stricto" group, i.e. S288C (*S. cerevisiae*), SK1 (*S. cerevisiae*), CBS 432 (*S. paradoxus*), UFRJ 50791 (*S. cariocanus*), IFO 1815 (*S. mikatae*), IFO 1802 (*S. kudriavzevii*), CBS 7001 (*S. bayanus*) and DBVPG 6560 (*S. pastorianus*) were all described earlier (23).

*Plasmid Construction* - The pADCEN36 plasmid containing wild type *TLC1* was described earlier (23). The segments upstream of *TLC1* described in Figure 1A were deleted using the SOE (splicing by overlapping) technique (24). The final PCR products were digested with *SpeI* and *EcoRI* restriction enzymes and cloned into pADCEN26 (a pRS316 plasmid containing a 327 base pairs (bps) *ADH1* transcription terminator (25) inserted into *SacI* and *SpeI* upstream of the fragments' cloning sites). This resulted in the generation of the plasmids pADCEN27 ( $\Delta$ G), pADCEN28 ( $\Delta$ H), pADCEN29 ( $\Delta$ I), pADCEN30 ( $\Delta$ J), pADCEN31 ( $\Delta$ K), pADCEN32 ( $\Delta$ AF), pADCEN33 ( $\Delta$ G to K) and pADCEN34 ( $\Delta$ A to K). Primers used for PCR amplifications are listed in Table 1 of Supplemental Material. All the different constructs were sequenced for confirmation and were transformed into the CSHY76 diploid strain. The *TLC1* promoter - *lacZ* fusions described in Figure 2A were produced by cloning PCR fragments corresponding

to the different promoter segments into the *Sma*I site upstream of the coding sequence of *lacZ* in SLP092. This resulted in the generation of the following plasmids: SLP152 (A to K), SLP153 (AF), SLP154 (G to K), SLP155 (H to K), SLP156 (I to K), SLP157 (J to K) and SLP158 (I) respectively. The SLP092 vector was generated by cloning the *ADH1* transcription terminator described above into the *Eco*RI site of YEp353 (26). The *TLC1-CYC1* promoter constructs described in Figure 2C were generated by cloning different *TLC1* promoter fragments into SLP162. The SLP162 plasmid was generated by cloning *CYC1* promoter in SLP092 (27). *CYC1* UAS $\Delta$  or SLP163 (Figure 2C) was created by digesting SLP162 with *Sma*I and *Xho*I to remove the upstream activation sequence of *CYC1*. *CYC1* UAS<sub>*TLC1I*</sub> or SLP164 was created by cloning a PCR fragment into the *Sma*I and *Xho*I of SLP162. Similarly the plasmids SLP172 (URS<sub>*ACT1*</sub>), SLP167 (URS<sub>*TLC1H*</sub>), and SLP165 (URS<sub>*CAR1*</sub>) were created by inserting the fragments corresponding to *ACT1* coding sequence (nts 771 to 843), *TLC1* region H, and the known repressor of *CAR1* (28) in the *Xho*I of SLP162. All the different constructs were sequenced for confirmation and were transformed into the W303-1A strain. The *ADH1* construct described in Figure 3A (SLP151) was created by inserting a PCR fragment corresponding to the *ADH1* terminator into a *Sna*BI site engineered 10 nucleotides downstream of the *TLC1* poly (A-) termination site. Point mutations in the polyadenylation signals found in the *TLC1* 3'-end were obtained by PCR (plasmid SLP149). The 500 bps *ACT1* coding sequence cassette was generated by PCR and cloned blunt into the *Sna*BI site (plasmid SPL169) near *TLC1* 3'-end. All 3'-end modifications were

amplified by PCR and cloned in pRS316 SmaI site to generate plasmids SLP160, SLP161, SLP177 respectively. These plasmids were later used to produce the probes required for the ribonuclease protection assay described in Figure 4. All the different constructs were sequenced for confirmation and were transformed into the CSHY76 diploid strain. Primers used for PCR amplifications are listed in Table 1 of Supplemental Material.

*Sequence Alignment* - Homologous sequences between the *PDX3* and *CSG2* genes from the “sensu stricto” strains were amplified and sequenced as described earlier (23). The intergenic sequence between *PDX3* ATG and *TLC1* 5'-end were aligned using the computer program ClustalW followed by manual optimization (29). The established 5'-end nucleotide of the mature *Tlc1* RNA and the first nucleotide of the *PDX3* coding region were used as anchors for alignment (23).

*Complementation analysis and telomere length analysis* - The ability of the different *TLC1* constructs to complement the deletion of *TLC1* was tested using a double mutant spore (*tlc1* $\Delta$ , *rad52* $\Delta$ ) derived from the diploid strain CSHY76. Telomere homeostasis was tested using senescence and telomere length assays as described previously (23).

*Isolation of total and poly (A+) RNA* -Total RNA was prepared as previously described (9). Oligo (dT) based fractionation of poly (A+) RNA was performed as described by Perbal (30) using oligo (dT) type 7 matrix (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec).

*Primer extension and Northern blot analysis* - Primer extensions were performed as previously described (31) using a primer specific for *TLC1* (TLC1-33-49). Extended products were separated on an 8% denaturing polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Northern blots were performed as previously described (9). Total RNA (15 or 20 µg) was run on a 4% polyacrylamide gel or on a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane (Hybond N+, GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec) and visualized by autoradiography using randomly labelled probes or labelled primer corresponding to specific genes. The RNA was quantified using an Instant Imager (Packard, Meriden, CT). Primers are listed in Table 1 of Supplemental Material.

*RNase protection assay* - Total RNA (20 µg) was incubated with 0.5 fmol of riboprobe and incubated at 42°C in 80% formamide buffer for more than 8 hrs (32). The hybridization reaction was then digested with RNase T1 for 1 hour at 37°C. The protected fragments were analyzed on polyacrylamide gels. All riboprobes complementary to *Tlc1* 3'-end were generated by T7 or T3 transcription from plasmids containing either the whole *TLC1* sequence or bearing only the different 3'-end modifications as described above. In the case of the wild type sequence, the plasmid was digested with *Hinf*I restriction enzyme inside *TLC1* sequence while in the case of the plasmids containing the different 3'-end cassettes, they were digested in the plasmid backbone with *Pvu*II enzyme.

## RESULTS

Since its discovery some 14 years ago (6) the yeast telomerase RNA was extensively studied, yet the promoter controlling its expression remained poorly defined. In order to identify the regulatory elements controlling the transcription of *TLC1* we scanned the region between its 5'-end and the upstream *PDX3* gene (Figure 1A) for sequence conservation. *TLC1* sequences from *Saccharomyces* "sensu stricto" species were obtained and aligned using the sequence of the mature *TLC1* and *PDX3* as guides (supplemental Figure 1). Sequence conservation ranging from 14% to 53% was observed in 5 regions labelled A to K, starting in position +1 and ending in position -644 relative to *TLC1* transcription start site (Figure 1A and supplemental Figure 1). The highest sequence conservation was found relatively far from *TLC1* transcription start site in regions G (-242 to -299) and A-F (-299 to -644) (Figure 1A). Sequence homology in region G corresponded to a highly conserved snoRNA (33,34) transcribed in the opposite direction of *TLC1*. On the other hand, region A-F was found opposite to the *PDX3* promoter region (35), which may explain sequence conservation in this region. We have searched the first 200 bps from the 5'-end of *Tlc1* for the binding site of the basal transcription factor TATA binding protein (TBP) (36), which is normally found 40 to 120 base pairs (bps) from the transcription initiation site in yeast (37,38). Surprisingly, we did not find near the *TLC1* 5'-end any highly conserved canonical TATA box or initiation site consensus like those normally found near non-coding RNA promoters in yeast

(38)(supplemental Figure 1). Instead, we found several weakly conserved TATAGA elements and more conserved TATATCTAAA and TATATCA sequences at -75, -171 and -221 bps from the transcription start respectively. The lack of a strong consensus element suggests the presence of multiple degenerate transcription initiation sites.

Since no defined promoter structure was identified through sequence homology, we deleted all conserved sequence elements individually or in combination and tested their impact on *TLC1* transcription (Figure 1). All deletions were introduced in plasmids containing the entire *TLC1* locus found between the *PDX3* to *CSG2* genes (23). The capacity of the different deletion mutations to support *TLC1* expression and restore telomerase activity was tested in strains that lack both *TLC1* and *RAD52* genes (23). As expected, the plasmid carrying the entire *TLC1* locus (WT) supported normal growth (Table 1), RNA expression (Figure 1B) and telomere length (Figure 1D), while the empty vector (Vector) did not. Primer extension analysis of RNA extracted from cells harbouring the WT plasmid using a primer corresponding to the mature *Tlc1* RNA sequence revealed one major (+1) and seven minor transcription start sites (Figure 1C). The plasmid driven transcription start sites and the ratio of the polyadenylated to non-polyadenylated *Tlc1* RNA were similar to those expressed from the chromosomal copy of *TLC1* (data not shown and (23)). Deletion of the entire region upstream of *TLC1* ( $\Delta A-K$ ) blocked the expression of both polyadenylated and non-polyadenylated RNA and inhibited cell growth after 40-50 generations as observed with the empty vector (Figure 1 and Table 1).



Deletion of the most upstream region ( $\Delta$ A-F) close to the promoter of the non-essential gene *PDX3* (35) did not affect growth or reduce telomere length. This suggests that the A-F region is not required for the normal function of the *TLC1* promoter. Surprisingly, deleting the entire region located between the unessential snoRNA (snRNA161) and the *TLC1* transcription start site ( $\Delta$ G-K) did not lead to growth arrest (Table 1) and resulted in the expression of two new and extended RNA species (Figure 1B). Oligo (dT) column fractionation indicated that the larger of these two RNA species is polyadenylated while the other is not (data not shown). Primer extension analysis using RNA extracted from cells carrying the  $\Delta$ G-K construct did not detect any of the established *Tlc1* 5'-end (Figure 1C). Instead, a new transcription start site was detected within the A-F region -131 nucleotides (nts) from the mature *Tlc1* 5'-end (position -430 in the normal WT sequence). This suggests that the difference in the RNA size detected by Northern blot (Figure 1B) corresponds to a difference in the position of the transcription start. Consistently, RNase protection assays revealed no difference between the 3'-end of the wild type RNA and that expressed from the  $\Delta$ G-K construct (data not shown). The relatively low amount of RNA produced by the  $\Delta$ G-K construct resulted in shorter but stable telomere length (Figure 1D). Together these results suggest that the A-F region contains a cryptic promoter that can be active when it is moved closer to the mature *Tlc1* RNA sequence. However, the transcriptional activity of this promoter does not generate RNA that is sufficient for telomere maintenance at normal length.

Individual deletion of the regions G and H did not inhibit transcription or growth (Figure 1 and Table 1). Curiously, deletions of either region H or A-F increased the level of Tlc1 in the cell (Figure 1B) suggesting that these regions negatively regulate *TLC1* expression. In contrast, deletion of region I, which is the most conserved region found between *TLC1* and snR161, completely abolished transcription (Figure 1B and C), reduced telomere length (Figure 1D) and lead to growth arrest (Table 1). Deletion of region J that contains a TATA box-like sequence proximal to the main *TLC1* transcription start site severely inhibited transcription and reduced telomere size, however the cells did not exhibit growth arrest (Table1). Deleting the region immediately upstream of the mature Tlc1 sequence (K) reduced transcription and moderately decreased telomere length. All deletions in the promoter region affected the expression of both the polyadenylated and non-adenylated forms of Tlc1 similarly. This suggests that the promoter elements control all forms of Tlc1, regardless of the nature of their 3'-end. We conclude that *TLC1* transcription is driven by a 140 bps long promoter sequence that is regulated by independent upstream elements.

It was previously shown that heterologous mRNA Pol II promoters can support the expression of Tlc1 (17). However, formally it is not clear if the promoter of *TLC1* could drive mRNAs expression. In order to define the core *TLC1* promoter sufficient for transcription and examine its capacity to produce mRNA, we cloned various fragments of the *TLC1* promoter upstream of a *lacZ* reporter gene (Figure 2A) and monitored RNA expression by Northern blot. As shown in Figure 2B, no RNA expression was detected from the empty *lacZ*

vector. In contrast, the introduction of the entire *TLC1* upstream region (A-K) resulted in the expression of a single band corresponding to the predicted size of LacZ. This confirms the *TLC1* promoter capacity to transcribe protein coding mRNA. Expression from the A-F region containing the newly identified cryptic *TLC1* promoter was slightly above background (Figure 2B). All fragments containing the I region (G-K, H-K and I-K) supported expression, while those without it (J-K) did not (Figure 2B). Interestingly, the removal of the presumed repressor of *TLC1* transcription (H) dramatically increased *lacZ* transcription. On the other hand, the insertion of the I region by itself did not support transcription, suggesting that I is not sufficient for transcription but rather works as a transcription enhancer. These results confirm that the first 242 bps upstream of *TLC1* are both necessary and sufficient for transcription. We conclude that *TLC1* promoter resides in the region between the first nucleotide of the mature RNA and position -242 upstream.

The promoter deletion study and the LacZ reporter analysis suggest that *TLC1* is regulated by a transcription repressor in region H and a transcription enhancer in region I. In order to directly test this possibility we used an established system for repressors and enhancers (Fig. 2C). It is based on a *CYC1* core promoter that can be activated or repressed by heterologous elements (Fig. 2C). The positions of the *CYC1* core promoter and its natural upstream activator sequence (UAS) were precisely determined and easily separated (27,39). Transcription from the intact *CYC1* promoter or the different *TLC1-CYC1* fusions was monitored by Northern blot using probes

complementary to the sequence of the reporter LacZ mRNA. As shown in Figure 2D, no expression was detected from the empty *lacZ* vector, while strong expression was detected from the intact *CYC1* promoter (*CYC1* pro-*lacZ*). Deletion of the *CYC1* natural activator (*CYC1* UAS $\Delta$  pro-*lacZ*) blocked the reporter expression. Interestingly, replacement of the *CYC1* UAS with *TLC1* I region (*CYC1* UAS<sub>*TLC1I*</sub> pro-*lacZ*) dramatically increased RNA expression even above the level observed with *CYC1* UAS pro-*lacZ* indicating the *TLC1* I fragment is more active as an enhancer than the *CYC1* UAS. As expected, insertion of a fragment corresponding to a part of the coding region of *ACT1* between the *CYC1* UAS and the reporter gene (*CYC1* URS<sub>*ACT1*</sub> pro-*lacZ*) did not inhibit the expression. On the other hand, introduction of a known repressor (*CYC1* URS<sub>*CAR1*</sub> pro-*lacZ*) (28) or the *TLC1* H region (*CYC1* URS<sub>*TLC1H*</sub> pro-*lacZ*) in the presence of *CYC1* UAS completely repressed transcription. We conclude that *TLC1* promoter activity is regulated by defined enhancer and suppressor located at -85 to -144 and -144 to -242 bps respectively from the transcription start site. Therefore, this region constitutes the core promoter of *TLC1*.

The above mutational analysis of the *TLC1* promoter suggests that, like other yeast RNAs, the nature of the RNA 3'-end is determined by a promoter independent mechanism (40-43). Indeed, it was suggested that the nascent 3'-end of *Tlc1* is determined by polyadenylation signals 1240 bps downstream from the mature 5'-end ((17) and Figure 3A). In order to identify the sequences required for *Tlc1* 3'-end formation, we disrupted all possible polyadenylation signals and monitored the impact on the expression and function of the RNA. All

mutations or DNA cassette insertions were performed in or after position +1180 upstream of the previously proposed polyadenylation signals (17). All mutations were designed to leave 22 bps downstream of the mature 3'-end (Figure 3A) in order to avoid disturbing the stability of the mature sequence and its incorporation into functional telomerase. The impact of the different mutations on RNA expression was monitored by Northern blot (Figure 3) and the position of the 3'-end was mapped using RNase protection assays (Figure 4). As shown in Figure 3B, Northern blot analysis of RNA extracted from wild type cells revealed the presence of both polyadenylated and non-polyadenylated forms of Tlc1 (Tlc1-WT). In contrast, mutations in positions +1172 to +1234 that correspond to the predicted polyadenylation signals (Tlc1-3'MUT) or the insertion of an *ADH1* transcription terminator in position +1180 (Tlc1-3'*ADH1*) inhibited the expression of the predicted polyadenylated RNA transcript. Instead, these mutations induced the expression of new and somewhat larger transcripts without affecting the expression of mature Tlc1 (Figure 3B). Inserting part of the *ACT1* coding sequence (Tlc1-3'*ACT1*), which is known not to cause transcription termination or polyadenylation, produced a single RNA species migrating at the same position as the non-polyadenylated form (Figure 3B). Fractionation of the RNA on an oligo (dT) cellulose column indicated that the aberrant species observed with Tlc1-3'MUT and Tlc1-3'*ADH1* are polyadenylated (Figure 3C). Strikingly, no polyadenylated species could be detected with Tlc1-3'*ACT1* (Figure 3C). This suggests that the accumulation of polyadenylated RNA is not required for the synthesis of mature non-polyadenylated Tlc1. In order to confirm this unexpected

result, we attempted to amplify any possible poly (A+) Tlc1 RNAs present below the detection level of Northern blots or RNase protection assays using RT-PCR primed by oligo (dT). While this very sensitive method readily produced a signal for the reduced amounts of the poly (A+) RNA generated from the Tlc1-3'MUT, we could not detect any polyadenylated RNA in cells expressing the Tlc1-3'ACT1 (data not shown). We conclude that the expression of polyadenylated Tlc1 is not required for the synthesis and maturation of the RNA moiety of telomerase.

In order to directly assess the impact of disrupting the polyadenylation signals on Tlc1 3'-end formation, we examined the RNA termini produced by the different mutations using RNase protection assays. As expected, the 3'-ends of the wild type Tlc1 RNA were mapped to two different regions: the first is 17 nts (T1) and the other is 90-100 nts from the Sm binding-site (T2) (Figure 4A). Separation of the RNAs on oligo (dT) column indicated that T1 corresponds to the 3'-end of non-polyadenylated Tlc1 while T2 identifies the position of the polyadenylated 3'-end (Figure 4A). Consistently, mutations that alter the polyadenylation signal either changed the position of T2 (Figure 4B and C) or completely abolished its formation (Figure 4D). Interestingly, none of the mutations that disrupt the polyadenylation signals changed the position of T1 (Figure 4B, C and D). These data indicate that disruption of Tlc1 polyadenylation does not affect the quality of the non-polyadenylated 3'-end. None of the mutations disrupting the expression of the polyadenylated RNA affected telomere length (supplemental Figure 2) or cell viability (data not shown) further corroborating that polyadenylation is not required for telomerase function.

## DISCUSSION

The data presented here indicate that the expression level of Tlc1 is not simply the product of a constitutively weak promoter, but instead is achieved by balancing the competing effects of a dynamic set of repressor and enhancer elements. Altering the balance between these elements impaired telomerase function *in vivo* suggesting that transcription regulation of Tlc1 contributes to telomere homeostasis (Figure 1 and Table 1). On the other hand, mutating the promoter sequence did not affect 3'-end formation (Figure 1), indicating that the balance between the polyadenylated and non-polyadenylated species of Tlc1 is not controlled by the promoter. Mutations downstream of Tlc1 3'-end indicated that the accumulation of polyadenylated Tlc1 is not required for the biogenesis or function of the telomerase subunit (Figure 3). In addition, we found that the dimerization signals downstream of the mature 3'-end, which was previously assigned a role in RNA biogenesis and function (44), is not required for telomerase function. Together, these results suggest the presence of redundant pathways for the synthesis of mature Tlc1; the first directly produces non-polyadenylated RNA, while the other results in polyadenylated RNA that later can be converted, at least in part, into a non-polyadenylated form.

Transcription is a critical control point for the regulation of gene expression. Part of the information that dictates the expression of a gene is embedded in its promoter region. In yeast, the overall promoter structure of Pol II transcribed non-coding RNA is very similar to that of mRNAs (45). However, non-

coding RNA gene promoters usually exhibit highly defined structures like a TATA box and an optimal transcription initiation site, consistent with the high expression levels of this subclass of RNA (38). Inspection of the *TLC1* promoter (supplemental Figure 1 and Figure 5) readily reveals a structure that is quite different from that of other non-coding RNAs like snRNAs and snoRNAs. No strong TATA box consensus sequence could be found. Instead three apparently redundant TATA-like sequences are found at -75, -171 and -221 bps from the transcription start site (supplemental Figure 1). None of these sites are essential for transcription individually and either site could produce multiple transcription starts in at least 6 regions spanning 70 nucleotides (Figure 1). Multiple transcription initiation sites are normally found for protein coding mRNA but not for snRNA genes (46). We also inspected all conserved sequences near the mature 5'-end and we did not find obvious protein binding site that could explain how the promoter is regulated. Based on the results obtained in this study, the region upstream of the *Tlc1* 5'-end could be divided into three parts; a transcription initiation region (+1 to -85) that includes a weak TATA box, a transcriptional enhancer (-85 to -144), and a transcriptional repressor (-144 to -242) (Figures 1 and 5). This promoter architecture suggests that *Tlc1* is not constitutively transcribed but instead dynamically regulated by competing promoter elements. Indeed, balancing the expression of the different telomerase components requires coordination between several proteins and RNA subunits (9) and any perturbation in this balance alters telomere homeostasis (7). For example, increasing the level of *Tlc1* shortens telomere length due to the



sequestration of the yeast Ku complex, while reducing Tlc1 expression shortens telomere length presumably by decreasing the number of potentially active telomerase enzymes (6,47,48). Consistent with these ideas, we show here that deleting either of the newly identified *TLC1* repressor or enhancer elements reduced the length of the telomeres (Figure 1).

The 3'-ends of the majority of the non-coding RNAs in yeast and in most metazoan cells are non-polyadenylated and are produced through a termination pathway distinct from that used by mRNA (42,49,50). Recently, it was suggested that both termination pathways depend on a similar transcription elongation complex that becomes specialized when it reaches an RNA class specific termination sequence (51). According to this model, all forms of Tlc1 are produced by a single transcription complex that either terminates at a snoRNA like termination signal (e. g. an Nrd1p/Nab3p/Sen1p dependent site) forming non-polyadenylated RNA or at an mRNA like termination site (e.g. an Rna14p/15p dependent site) followed by the addition of a poly(A) tail. Since polyadenylation signals are highly degenerate in yeast (52), a transcription complex that bypasses a non-coding RNA termination signal usually terminates by default in the nearest stretch of A/U rich sequence (31,53). Indeed, many snoRNAs and snRNAs become polyadenylated upon the deletion of ribonucleases that normally degrade aberrant RNAs (31). Accordingly, we propose that the polyadenylated form of Tlc1 results from a leaky or poor non-coding RNA termination signal. Inspection of the sequences near the Tlc1 3'-end reveals several weak and poorly conserved binding sites of the snRNA/snoRNA terminators Nab3p/Nrd1p

(supplemental Figure 3). It is not clear if these potential Nab3p/Nrd1p binding sites are functional, but in all cases termination at these sites is expected to be inefficient in a long RNA like Tlc1. The Nab3p/Nrd1p/Sen1p termination complex usually functions when positioned at a short distance (~ 500 bps) from the promoter (54). Indeed, the only known non-polyadenylated RNA of the approximate size of Tlc1 in yeast (U2 snRNA) uses endoribonucleolytic cleavage by the dsRNA specific ribonuclease Rnt1p (31) to suppress polyadenylation. A poor Nab3p/Nrd1p/Sen1p dependent termination of long transcripts may explain at least in part why a portion of the Tlc1 RNA is polyadenylated. Consistently, separating the potential Nab3p binding site and the polyadenylation signals downstream severely reduced or abolished Tlc1 polyadenylation without affecting the production of the non-polyadenylated form (Figures 3 and 4). However, we cannot exclude at this stage that the 3'-end of the mature species is formed through polyadenylation independent endonucleolytic cleavage near the 3'-end.

It was previously suggested that Tlc1 is first transcribed as a polyadenylated species that is processed into a mature non-polyadenylated species (17). This suggestion was founded mainly on the fact that the polyadenylated and non-polyadenylated forms of Tlc1 are reduced upon the depletion of the polyadenylation termination factors Pcf1p and Rna14p/15p (17). On the other hand, the direct formation of non-polyadenylated Tlc1 is supported by the fact that a subset of Tlc1 poly (A-) RNA continues to accumulate hours after the disruption of RNA polyadenylation ((17) and data not shown). In addition, polyadenylated RNA produced by fusing the Tlc1 polyadenylation

signals to another non-coding RNA (snoRNA) failed to generate mature non-polyadenylated RNA (55). This suggests that additional sequences near the mature 3'-end of Tlc1 are required for the generation of the mature RNA. Consistently, removal of the polyadenylation signal from the region near Tlc1 3'-end failed to block the formation of the non-polyadenylated mature 3'-end (Figures 3 and 4). These seemingly contradicting observations could be explained by a model in which the Tlc1 3'-end is generated either directly or via the processing of the polyadenylated form (Figure 5). In this model, the transcription complex would either terminate within the first 22 bps downstream of the mature 3'-end to generate a non-polyadenylated transcript or read-through to the nearest polyadenylation signal, generating a polyadenylated version. Both transcripts contain the Sm protein binding-site required for RNA biogenesis and thus should be transported to the cytoplasm generating the mature RNA. According to this model, due to the redundancy of the maturation pathways, the disruption of either termination pathway individually will not prevent Tlc1 RNA maturation. This explains why a substantial amount of Tlc1 is produced even when polyadenylation is disrupted and why inactivation of factors like Nrd1p did not inhibit the formation of the mature RNA (data not shown).

Although both the poly (A+) and poly (A-) species of Tlc1 coexist in normal cells, the functional importance of the poly (A+) remained unclear. Both forms of Tlc1 are conserved in different "sensu stricto" *Saccharomyces* (data not shown) and even in distant yeast relatives like *K. lactis* (17) and *S. pombe* (56,57). However, polyadenylated Tlc1 was not found in the active telomerase complex

purified from *S. cerevisiae*, suggesting that it does not directly contribute to telomerase function (58). Here we demonstrate that polyadenylation is not a required feature to generate functional telomerase (Figures 3 and 4). We propose that the persistence of Tlc1 polyadenylation in closely related yeast species simply reflects the limitation of the termination mechanisms generating non-polyadenylated RNA.

## REFERENCES

1. Verdun, R. E., and Karlseder, J. (2007) *Nature* **447**(7147), 924-931
2. LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2005) *J Cell Sci* **118**(Pt 13), 2785-2788
3. Hug, N., and Lingner, J. (2006) *Chromosoma* **115**(6), 413-425
4. Collins, K. (2008) *Mech Ageing Dev* **129**(1-2), 91-98
5. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. (1997) *Science* **276**(5312), 561-567
6. Singer, M. S., and Gottschling, D. E. (1994) *Science* **266**(5184), 404-409
7. Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004) *Annu Rev Biochem* **73**, 177-208
8. Gilson, E., and Geli, V. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10), 825-838
9. Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R. J., and Elela, S. A. (2007) *J Biol Chem* **282**(7), 4373-4381
10. Goudsouzian, L. K., Tuzon, C. T., and Zakian, V. A. (2006) *Mol Cell* **24**(4), 603-610
11. Osterhage, J. L., Talley, J. M., and Friedman, K. L. (2006) *Nat Struct Mol Biol* **13**(8), 720-728
12. Taggart, A. K., Teng, S. C., and Zakian, V. A. (2002) *Science* **297**(5583), 1023-1026
13. Mozdy, A. D., and Cech, T. R. (2006) *Rna* **12**(9), 1721-1737
14. Mozdy, A. D., Podell, E. R., and Cech, T. R. (2008) *Mol Cell Biol*
15. Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L., and Cech, T. R. (1999) *Nature* **401**(6749), 177-180
16. Gallardo, F., Olivier, C., Dandjinou, A. T., Wellinger, R. J., and Chartrand, P. (2008) *EMBO J* **27**(5), 748-757
17. Chapon, C., Cech, T. R., and Zaug, A. J. (1997) *Rna* **3**(11), 1337-1351
18. Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA
19. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor, New York
20. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**(4), 619-630
21. Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998a) *Embo J* **17**(13), 3726-3737
22. Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., and Greider, C. W. (1999) *Genetics* **152**(1), 143-152
23. Dandjinou, A. T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J. F., Abou Elela, S., and Wellinger, R. J. (2004) *Curr Biol* **14**(13), 1148-1158
24. Horton, R. M., Ho, S. N., Pullen, J. K., Hunt, H. D., Cai, Z., and Pease, L. R. (1993) *Methods Enzymol* **217**, 270-279
25. Ammerer, G. (1983) *Methods Enzymol* **101**, 192-201
26. Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) *Gene* **45**(3), 299-310
27. Guarente, L., and Mason, T. (1983) *Cell* **32**(4), 1279-1286
28. Luche, R. M., Sumrada, R., and Cooper, T. G. (1990) *Mol Cell Biol* **10**(8), 3884-3895

29. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-4680
30. Perbal, B. (1988) *A Practical Guide to Molecular Cloning*, Second Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York
31. Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998) *Embo J* **17**(13), 3738-3746
32. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York
33. Olivas, W. M., Muhlrad, D., and Parker, R. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**(22), 4619-4625
34. Torchet, C., Badis, G., Devaux, F., Costanzo, G., Werner, M., and Jacquier, A. (2005) *Rna* **11**(6), 928-938
35. Loubbardi, A., Marcireau, C., Karst, F., and Guilloton, M. (1995) *J Bacteriol* **177**(7), 1817-1823
36. Hampsey, M. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2), 465-503
37. Smale, S. T., and Kadonaga, J. T. (2003) *Annu Rev Biochem* **72**, 449-479
38. Kuehner, J. N., and Brow, D. A. (2006) *J Biol Chem* **281**(20), 14119-14128
39. Guarente, L., and Ptashne, M. (1981) *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(4), 2199-2203
40. Barr, J. N., Whelan, S. P., and Wertz, G. W. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1577**(2), 337-353
41. Bentley, D. L. (2005) *Curr Opin Cell Biol* **17**(3), 251-256
42. Buratowski, S. (2005) *Curr Opin Cell Biol* **17**(3), 257-261
43. Proudfoot, N. (2004) *Curr Opin Cell Biol* **16**(3), 272-278
44. Gipson, C. L., Xin, Z. T., Danzy, S. C., Parslow, T. G., and Ly, H. (2007) *J Biol Chem* **282**(26), 18857-18863
45. Hamada, M., Huang, Y., Lowe, T. M., and Maraia, R. J. (2001) *Mol Cell Biol* **21**(20), 6870-6881
46. Struhl, K. (1989) *Annu Rev Biochem* **58**, 1051-1077
47. Stellwagen, A. E., Haimberger, Z. W., Veatch, J. R., and Gottschling, D. E. (2003) *Genes Dev* **17**(19), 2384-2395
48. 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) *Nat Genet* **27**(1), 64-67
49. Howe, K. J. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1577**(2), 308-324
50. Lykke-Andersen, S., and Jensen, T. H. (2007) *Biochimie* **89**(10), 1177-1182
51. Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., and Kim, V. N. (2006) *Cell* **125**(5), 887-901
52. Irniger, S., and Braus, G. H. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1), 257-261
53. Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, L., Tollervey, D., and Carmo-Fonseca, M. (2007) *Mol Cell Biol* **27**(11), 4157-4165
54. Steinmetz, E. J., Warren, C. L., Kuehner, J. N., Panbehi, B., Ansari, A. Z., and Brow, D. A. (2006) *Mol Cell* **24**(5), 735-746

55. Morlando, M., Greco, P., Dichtl, B., Fatica, A., Keller, W., and Bozzoni, I. (2002) *Mol Cell Biol* **22**(5), 1379-1389
56. Webb, C. J., and Zakian, V. A. (2008) *Nat Struct Mol Biol* **15**(1), 34-42
57. Leonardi, J., Box, J. A., Bunch, J. T., and Baumann, P. (2008) *Nat Struct Mol Biol* **15**(1), 26-33
58. Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I. S., and Lue, N. F. (2003) *J Biol Chem* **278**(6), 3882-3890

## FOOTNOTES

We thank Dr. C. Greider for strain CSHY76. We also thank François Ménard for technical help. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Support for the RNA group core was provided by CIHR. S. A. is a Chercheur Boursier Senior of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).



## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. Identification of promoter elements required for *TLC1* expression and function.** (A) Schematic representation of the *TLC1* chromosomal locus and the flanking upstream genes. The start codon of *PDX3* as well as the 5'-ends of the mature *snR161* and *TLC1* RNAs are represented by arrows indicating the transcription direction. The identity of the conserved sequence motifs studied is indicated by letters. Some regions between the *PDX3* and *TLC1* genes are magnified at bottom. The position of the different 5'-ends of *Tlc1* detected by primer extension performed in C is indicated by arrows and the name of the performed deletion is indicated on the left. Stars (\*) represent 5'-ends detected for specific deletions and the numbers indicated are relative to each deletion respectively and not to *Tlc1* WT 5'-end. (B) Northern blot analysis of *Tlc1* RNA isolated from cells harbouring different deletions in *TLC1* promoter. The relative RNA amounts (RRA) were determined using an Instant Imager and presented as an average of three experiments with a standard deviation of  $\pm 0.40$  or less. N.D. indicates that the RNA was not detected. (C) Primer extension analysis of *Tlc1* RNA derived from strains carrying different promoter deletions. RNA was prepared as in B and the 5'-end was mapped using primer specific to *Tlc1* sequence. DNA sequencing of a cloned *TLC1* gene was performed with the same primer and included on the left as a marker. Black arrowhead (+1) represents the major *Tlc1* 5'-end while white arrowheads represent minor 5'-ends. (D)

Southern blot analysis of telomere length of the different strains examined in B and C. The DNA was extracted from individual yeast clones grown for 30 or 110 generations, digested with XhoI and separated on an agarose gel. The different fragments were visualized using a randomly labelled probe complementary to the telomere sequence.

**FIGURE 2. Defining *TLC1* transcription enhancers and repressors using transcription reporter.** (A) Schematic representation of the different *TLC1* promoter regions cloned upstream of the *lacZ* reporter gene. Gray boxes indicate the sequence near the *Tlc1* 5'-end while black boxes indicate the region encompassing snR161 and the region upstream. (B) Northern blot analysis of the *LacZ* RNA expressed from different *TLC1* promoter regions. Total RNA was extracted from cells carrying the different *TLC1* promoter – *lacZ* fusions, separated on agarose gel and visualized using an end labelled oligonucleotide probe complementary to the *lacZ* sequence. The relative RNA amounts (RRM) were determined as in Figure 1. The average of three experiments with a standard deviation is  $\pm 0.39$  or less is indicated at bottom. (C) Schematic representation of different *CYC1-TLC1* promoter regions cloned upstream of the *lacZ* reporter. The *CYC1* promoter was used as a test promoter to verify repressing and enhancing activity of the different *TLC1* promoter elements. The *CYC1* promoter is represented by two empty boxes: one refers to the core element ( $TATA_{CYC1}$ ) and the other to the upstream activating sequence of *CYC1* ( $UAS_{CYC1}$ ). Constructs containing the *TLC1*

promoter regions I and H are indicated by  $UAS_{TLC1I}$  and  $URS_{TLC1H}$  respectively.  $URS_{ACT1}$  indicate a construct carrying a fragment of the internal coding sequence of *ACT1* gene as a negative control. The known repressor sequence upstream of the *CAR1* gene was used as a positive control ( $URS_{CAR1}$ ). (D) Northern blot analysis of LacZ RNA expressed from the different *CYC1-TLC1* constructs. The RNA was prepared and detected as in B. The relative RNA amount (RRA) is an average of three experiments with a standard deviation of  $\pm 0.88$  or less. N.D. stands for non-detected RNA.

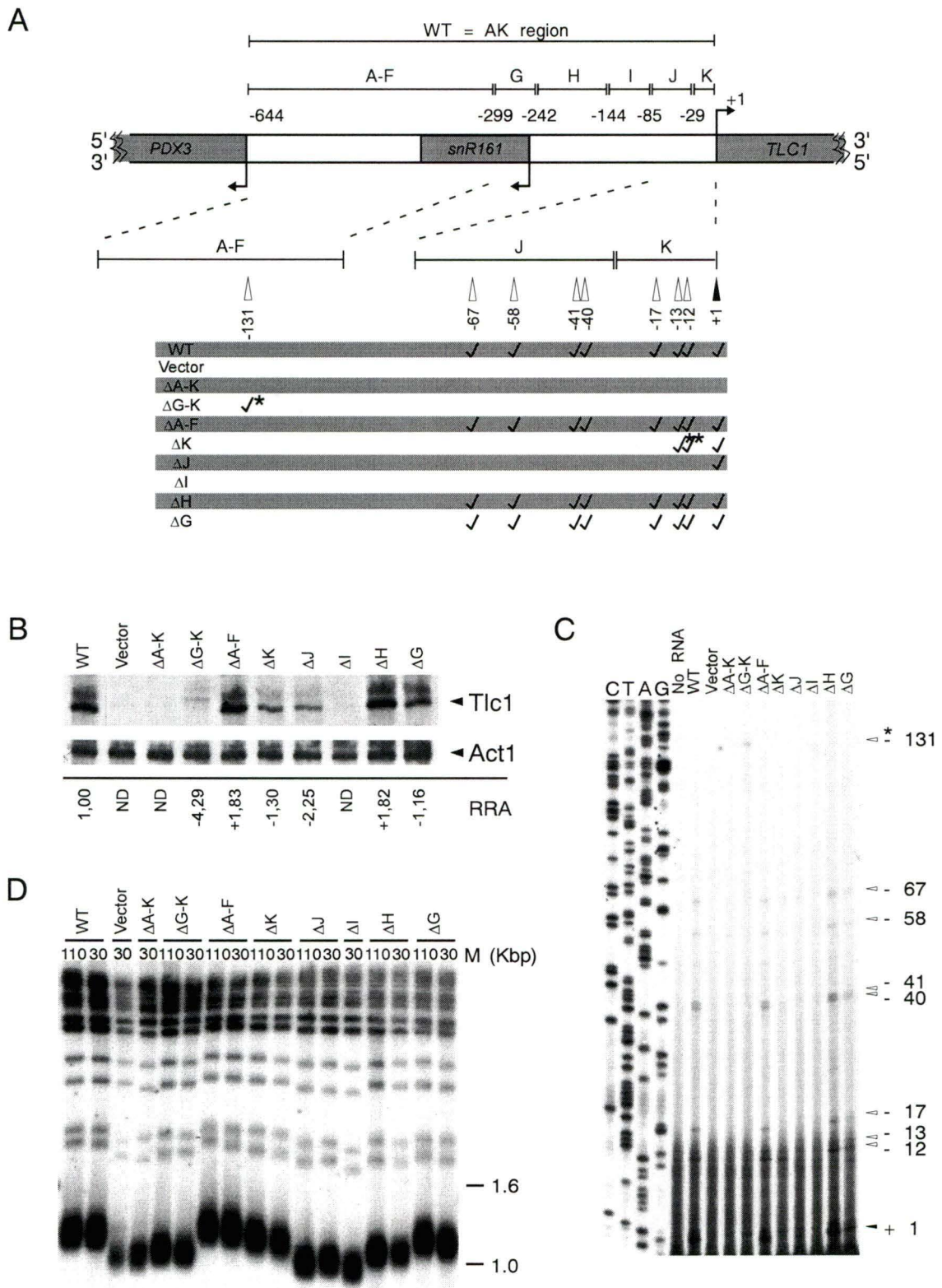
**FIGURE 3. Disruption of the polyadenylation signals does not block the synthesis of mature telomerase RNA.** (A) Schematic representation of *TLC1* and the site of the 3'-end mutations and cassette insertions. The position of the mutations (MUT) or insertion site for the different fragments (*ACT1* and *ADH1*) is indicated (+1180). The major transcription start site, Sm Binding-site, the poly (A-) termination site and the poly (A+) 3'-end are shown on top. MUT replaces all probable/cryptic polyadenylation signals near the *Tlc1* 3'-end. *ACT1* signifies the insertion of a part of the actin (*ACT1*) coding sequence, while *ADH1* indicates the insertion of the transcription terminator of the alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*). (B) Northern blot analysis of the RNA produced from *TLC1* carrying different mutations near the 3'-end. The RNA was extracted and visualized as in Figure 1. Stars (\*) represent polyadenylated *Tlc1* species. The relative RNA amount (RRA) is an average of three experiments with a standard deviation of  $\pm 0.30$  or less. (C) Northern

blot analysis of poly (A-) and poly (A+) RNA from Tlc1 RNA harbouring different 3' ends. Total RNA was extracted as in Figure 1 and fractionated on an oligo (dT) cellulose column. The RNA was visualized by probes specific to the Tlc1 RNA sequence.

**FIGURE 4. Disruption of the polyadenylation signals does not alter the nucleotide position of the mature Tlc1 3'-end.** Mapping of the 3'-ends produced by the different mutations described in Figure 3 was achieved by T1 RNase protection assay. The RNA was prepared as in Figure 3 and hybridized to antisense RNA probes specific for the different mutations including Tlc1-WT (A), Tlc1-3' MUT (B), Tlc1-3' *ADH1* (C), or Tlc1-3' *ACT1* (D) and digested by the ribonuclease T1. The labelled undigested RNA probe (probe) and the probe digested in the presence of tRNA (tRNA) were included as controls. The results of digesting the different probes after hybridization to RNA extracted from cells carrying a complete deletion of the *TLC1* gene (*tlc1* $\Delta$ ) was also included to ascertain the specificity of the different protected bands. Poly (A-) and poly (A+) indicate the digestion of probes hybridized to RNA found in the flow-through and eluted fractions of oligo (dT) column respectively. The position of the probe and the different protected 3'-ends (poly (A-) represented as T1 and poly (A+) as T2) are indicated on the right. The sizes are indicated according to Hinf I enzyme cutting site. The position of the size marker is indicated on the left. The sequence showed on the right of panel (A) represents the sequence adjacent the Tlc1 3'-end. The empty box

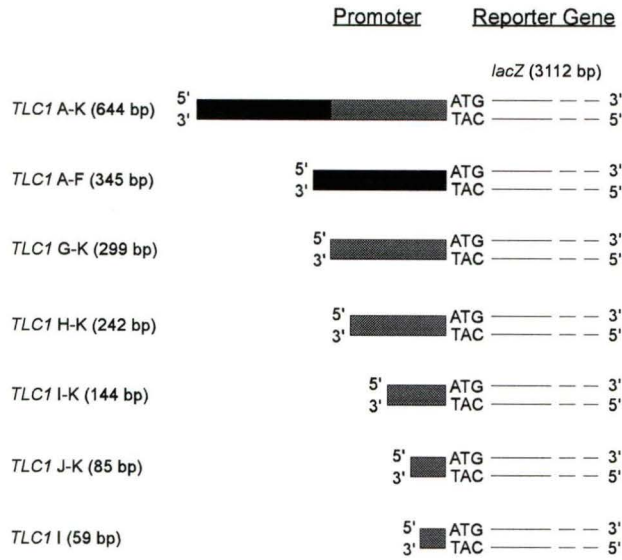
indicates the Sm Binding-site (Sm BS). The open circles indicate the previously mapped 3'-ends (58) and the closed circle indicate the position of the observed G specific T1 cleavage. NS stands for non specific RNA hybridization.

**FIGURE 5. Hypothetical model illustrating redundant maturation pathways for Tlc1 RNA.** The chromosomal locus of *TLC1* and its neighbours *snR161* and *CSG2* are shown on top. The repressor (Fragment H) and activator (Fragment I) sequences are also indicated. The transcription elongation complex of *TLC1* will either terminate near the mature poly (A-) 3'-end or continue to the nearby polyadenylation signals. Termination near the mature end will result in a TMG-capped and non-polyadenylated RNA that is trimmed by 3' to 5'-end exonucleases up to the mature 3'-end defined by the position of the Sm binding proteins. Termination near a polyadenylation signal will produce a polyadenylated RNA that will normally be deadenylated and degraded by exonucleases, unless stabilised by the binding of Sm proteins in the cytoplasm that also facilitates Tlc1 import to the nucleus. According to this model, individual mutations in either pathway should not dramatically affect the steady state level of mature Tlc1 RNA.

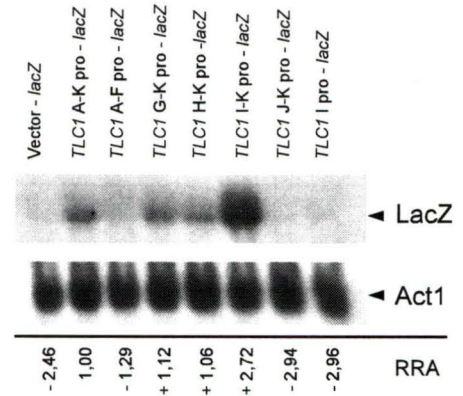


Larose et al., 2008  
Figure 1

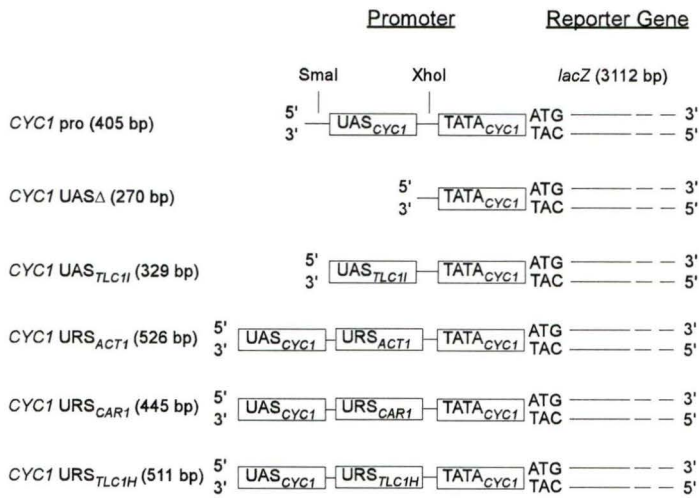
A



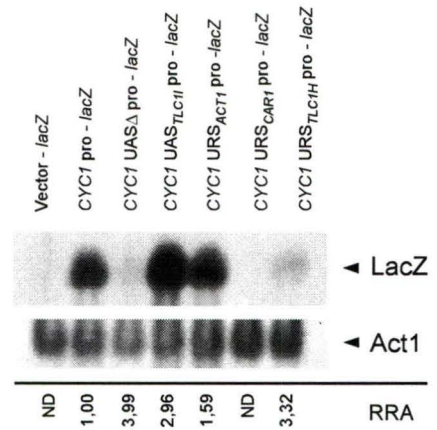
B

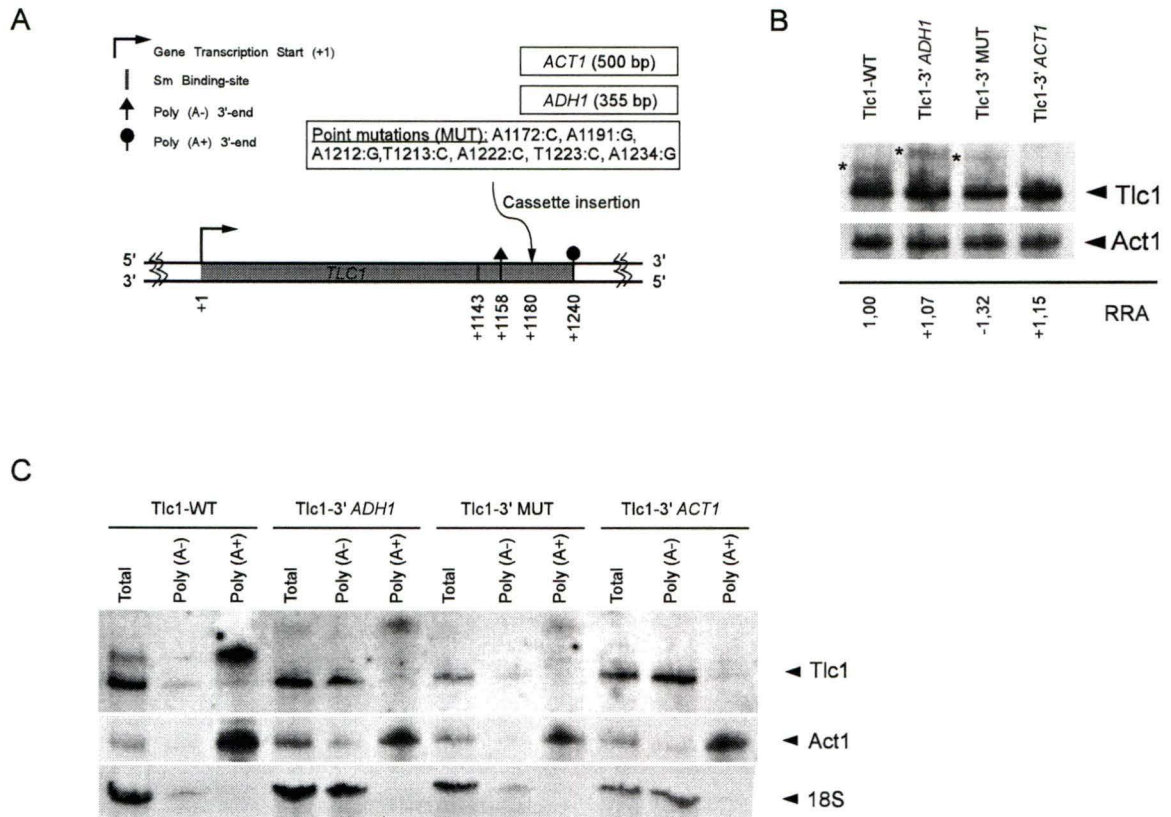


C

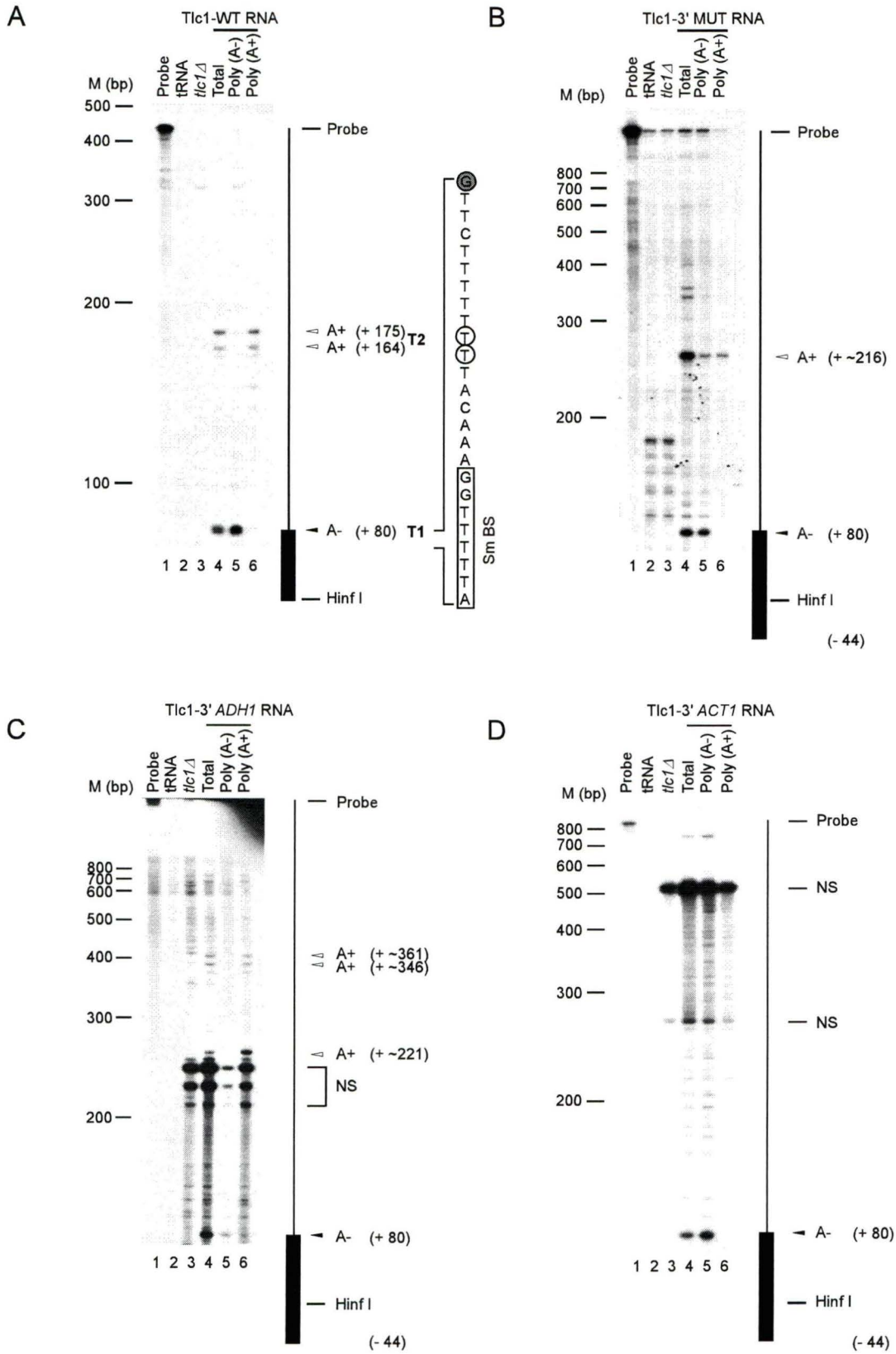


D

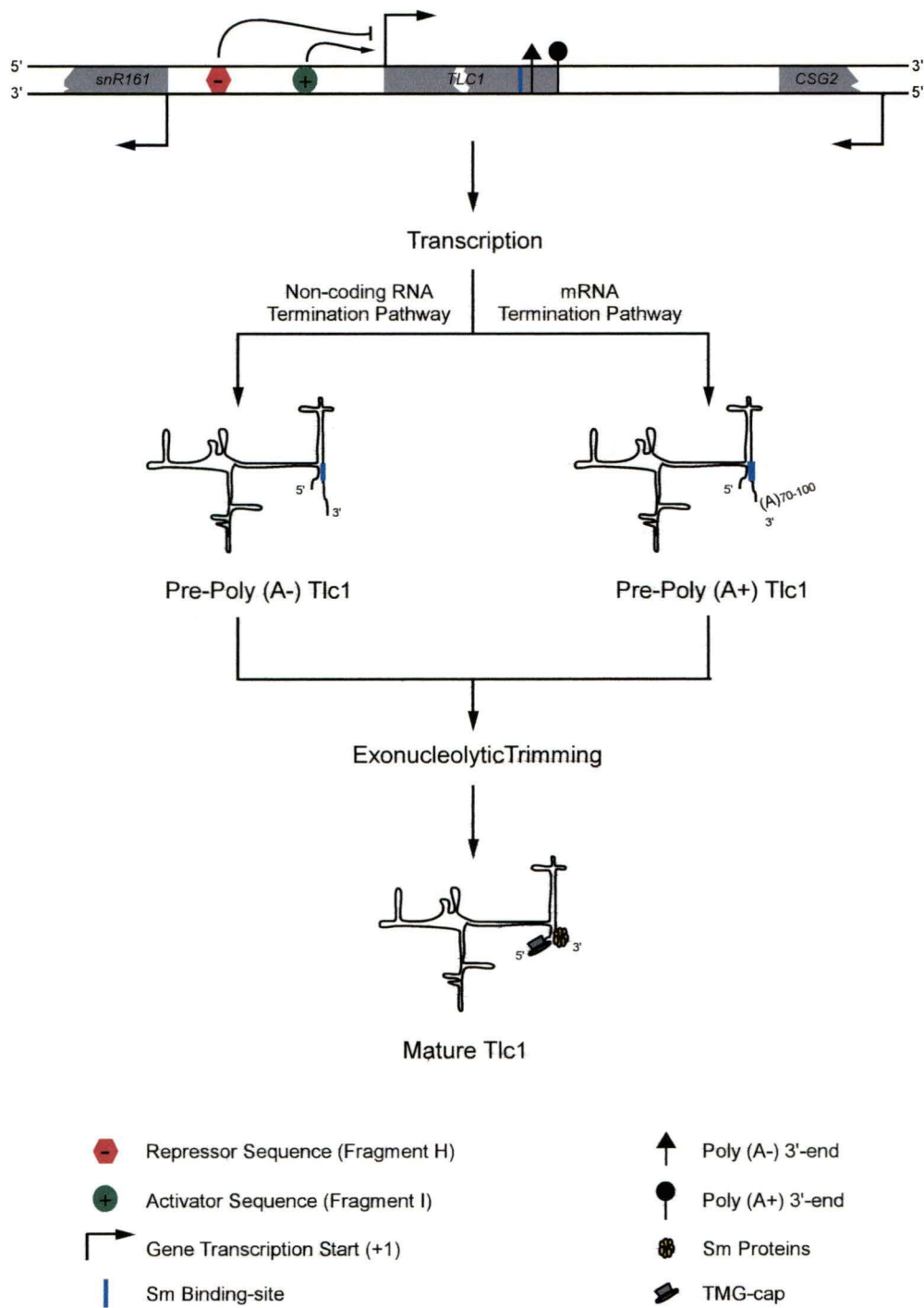








Larose et al., 2008  
Figure 4



Larose et al., 2008  
Figure 5

**TABLE**

**Table 1. Complementation of *TLC1* functions by different promoter deletions**

<i>TLC1</i> Promoter Constructs	Growth with <i>TLC1</i> Plasmid (generations)				Loss of Plasmid	Growth without <i>TLC1</i> plasmid (generations)				
	40	60	80	100	120	140	160	180	200	
WT	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-	
Vector	+/-	-								
$\Delta$ A-K	+/-	+/-	-							
$\Delta$ G-K	++	++	++	++	-					
$\Delta$ AF	++	++	++	++	++	++	+/-	-		
$\Delta$ K	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-	
$\Delta$ J	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-	
$\Delta$ I	++	+/-	-							
$\Delta$ H	++	++	++	++	++	++	+/-	-		
$\Delta$ G	++	++	++	++	++	++	++	++	+/-	-

The ability of the different *TLC1* promoter constructs to complement senescence of a double mutant spore (*tlc1* $\Delta$ , *rad52* $\Delta$ ) derived from CSHY76 was assessed by growth on YC-TRP-LEU-URA medium over 100 generations. Two independent clones were selected for each *TLC1* promoter deletion. Plasmid dependence for survival was established by subsequent growth on 5'-FOA and YC-TRP-LEU medium. Wild type plasmid is used as a positive control and empty plasmid is used as a negative control. Abbreviations: Number and colony sizes similar to wild type (++); few small size colonies (+); very heterogenous colony sizes with few normal sized colonies (+/-); absence of growth (-).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

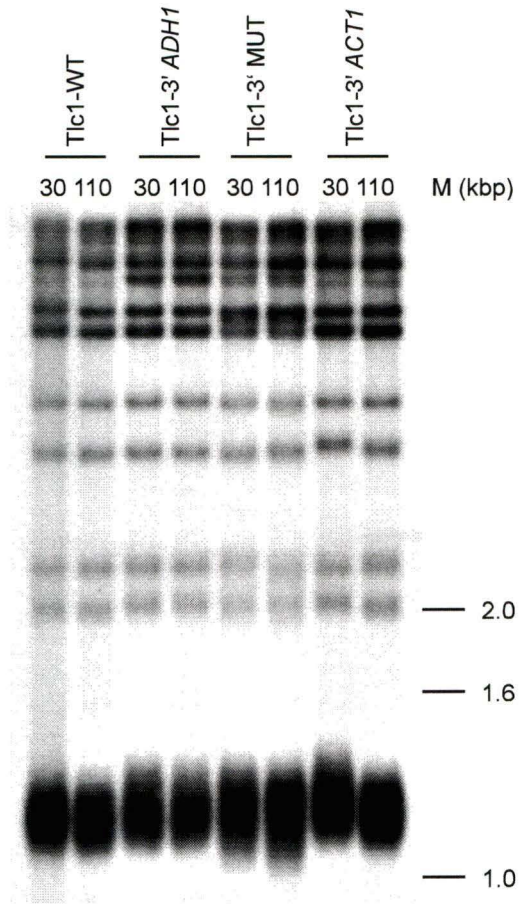
### FIGURE LEGENDS

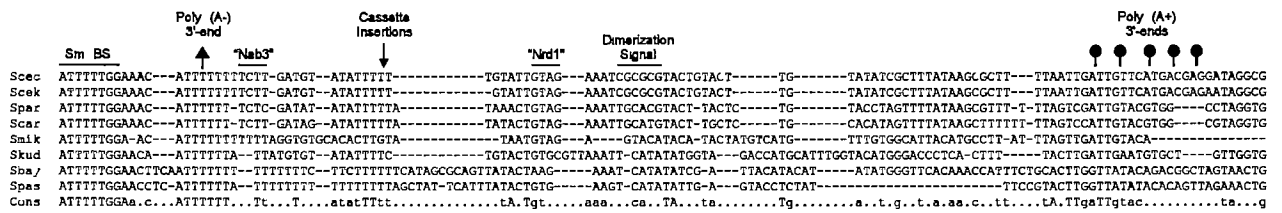
SUPPLEMENTAL FIGURE 1. **Alignment of the *TLC1* promoter region obtained from different *Saccharomyces* “sensu stricto” species.** The sequence from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Sbay) and *S. pastorianus* (Spas) were aligned according to the major 5'-end of Scec as indicated by +1. The numbering is indicated by vertical lines each 10 nucleotides according to Scec and dashes (-) denote gaps introduced to improve the alignment. Underlined nucleotides represent the coding sequence of *TLC1* (from +1 and downstream), *snR161* (-252 to -412) and *PDX3* (from -642 and upstream). The consensus sequence (Cons) is shown at bottom with the uppercase, lower case and dots representing universally conserved, conserved (~ 75%) or variable nucleotides respectively. The conserved regions examined in this study are indicated by letters (AF, G, H, I, J and K). The positions of the different TATA box-like sequence are indicated in bold.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Southern blot analysis of the telomere length in strains harbouring constructs with different Tlc1 3'-ends.** Genomic DNA of the respective cells presented in Figure 3 was prepared as described in Figure 1.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 3. Sequence alignment of the *TLC1* 3'-end obtained from different *Saccharomyces* "sensu stricto" species.** The sequence was obtained and aligned essentially as described in supplemental Figure 1 with the exception that the Sm Binding-site of Tlc1 RNA was used to guide the alignment. The position of the poly (A+) and poly (A-) ends mapped in this study and the position of potential Nab3p and Nrd1p like binding site are indicated on top.









## SUPPLEMENTAL TABLE

**Table 1. Primers used in this study**

Name	Sequence (5' → 3')
SPE-931TLC1FWD <sup>a</sup>	GGGTAC <u>ACTAGT</u> AGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
SPE-298TLC1FWD <sup>a</sup>	GGGTAC <u>ACTAGT</u> GGTAGAGAAAGACACGG (SpeI)
SPE+1TLC1FWD <sup>a</sup>	GGGTAC <u>ACTAGT</u> AGAGAGGAAGATAGGTACC (SpeI)
-6TLC1FWD <sup>a</sup>	GAGAGGAAGATAGGTACC
-35TLC1FWD <sup>a</sup>	GTGATTTTTCTGGTTTGAG
-91TLC1FWD <sup>a</sup>	GGTGACATATAGATCTCAAGG
-150TLC1FWD <sup>a</sup>	GGAAATGGGAGAAAAGTTTTCT
-248TLC1FWD <sup>a</sup>	GTTTATAAATAAATTTTATATCAC
-305-224TLC1REV <sup>a</sup>	<b>GTGATATAAAATTTATTTATAAAC</b> ACGGGTAGTCTCTCTAAG
-298+20TLC1REV <sup>a</sup>	<b>GGTACCTATCTTCCTCTCT</b> ACTCGGGTAGTCTCTCTAAG
-241-122TLC1REV <sup>a</sup>	<b>AACTTTTCTCCCATTTCT</b> TAACACAAGTAAATATACAACACCC
-150-70TLC1REV <sup>a</sup>	<b>CCTTGAGATCTATATGTCACC</b> TTTTTTTTTTATTTTTTTGGCG
-87-7TLC1REV <sup>a</sup>	<b>TTCTCAAACCAGAAAATCAC</b> ATTGCTAAAGAGGAAGTTTTTTTCGCG
-28+20TLC1REV <sup>a</sup>	<b>GGGTACCTATCTTCCTCTCT</b> ACTAAAAGCTACAAAGAAGGTC
+1502TLC1ECOREV <sup>a</sup>	AACAGAA <u>TCGGGAAGG</u> TAAATACCACC (EcoRI)
ADH1 TERM FWD <sup>a</sup>	CCGGAATTGAGCTCAAGCTTTGGACTTCTTCGCC
ADH1 TERM REV <sup>a</sup>	ATCCGCGGACTAGTGCCGGTAGAGGTGTGG
TLC1-A-FOR <sup>b</sup>	CATTTTCAGTGCAGATCCGTGA
TLC1-F-REV <sup>b</sup>	<b>CATACGGGTAGTCTCTCT</b> TAAGCTGG
TLC1-G-FOR <sup>b</sup>	GGTAGAGAAAGACACGGGCAGC
TLC1-K-REV <sup>b</sup>	<b>CATTAGTTTTATTCTCAA</b> ACCAGAA
TLC1-H-FOR <sup>b</sup>	GTTTATAAATAAATTTTATATC
TLC1-I-FOR <sup>b</sup>	GGAAATGGGAGAAAAGTTTTCA
TLC1-J-FOR <sup>b</sup>	GGTGACATATAGATCTCAAGGT
TLC1-IFA <sup>b,e</sup>	GGAAATGGGAGAAAAGTTTTCAGCGCGCGAACTCGCGAAAAAACTTCTCTTTAGCAATATG
TLC1-IRA <sup>b,e</sup>	<b>CATATTGCTAAAGAGGAAG</b> TTTTTTTCGCGAGTTTCGCGCGCTGAAAACTTTTCTCCCATTTC
ADH1-FORW <sup>b,c,e</sup>	ACACAGAATTCAGAAGCTTTGGACTTCTTC
ADH1-REV <sup>b,c,e</sup>	ATGACGAATTCGGGCATGCCGGTAGAG
TLC1-NsilFOR <sup>c</sup>	GCCTTCGATGCATTTAGATAATTTTTGGAAACATTTTTTTTCTTGATGTCTATTTTTT GTATTGTAGAGATCCGCG
TLC1-NsilREV <sup>c</sup>	CCTCGTCATGAACAATCAATCAAAGCGCTTGGAAAGCGATGCACAAGTACAGTACGCG CGATCTCTACAATACAA
TLC1-NsilSnaBI <sup>c</sup>	GCCTTCGATGCATTTAGATAATTTTTGGAAACATTTTTTTTCTTGATGTATA TTTTACGTATTGTAG
TLC1-NdeIREV <sup>c</sup>	GTAACAAGCATATGCAATTATTTGGTTTCCC
ACT1-cassette FOR <sup>c</sup>	TTTGGATTCCGGTGATGGTG
ACT1-cassette REV <sup>c</sup>	CGGTGATTTCTTTTGCATTC
TLC1RPA-5 <sup>c</sup>	GTCGCATTATTTTCCAAGCGG
pRS reverse <sup>c</sup>	GCTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCC
TLC1-33-49 <sup>d</sup>	CAGCCATTGACATTTTC
LACZ2 <sup>d</sup>	GCAAGGCGATTAAGTTGGG
CYC1-FOR <sup>e</sup>	CCTACCTGAATCTAAAATTCCC
CYC1-REV <sup>e</sup>	CATTATTAATTTAGTGTGTGATTTTGTG
CAR1-FA <sup>e</sup>	TTAGCGGTAGCCCGCGAGGGGTCTAAAGAGTA
CAR1-RA <sup>e</sup>	TACTCTTTAGACCCCTCGCGGCTACCGCTAA
ACT1 coding For <sup>e</sup>	TCCGGTGATGGTGTTACTCA
ACT1 coding Rev <sup>e</sup>	ATTCTCAAAATGGCGTGAGG
TLC1-HFA <sup>e</sup>	GTTTATAAATAAATTTTATATCACTATATGTGTGGTGAAGGAAGAGCAATCCTGCTAA AGCTTTTATATCTAAACGCCAAAAAATAAAAAA
TLC1-HRA <sup>e</sup>	TTTTTTTTTTATTTTTTTGGCGTTTAGATATAAAAGCTTTAGCAGGATTGCTCTTCTTT TCACCACACATATAGTGATATAAAATTTATTTATAAAC

<sup>a</sup>Oligonucleotides used for PCR deletion strategy. Underlined sequences are restriction sites added for subsequent cloning (corresponding restriction enzyme is in parenthesis), bold nucleotides include sequences located on both sides of the deleted region

<sup>b</sup>Oligonucleotides used for PCR amplification of *TLC1* promoter region, bold nucleotides in the reverse primers are added sequences corresponding to the "start codon ATG"

<sup>c</sup>Oligonucleotides used for PCR amplification of *TLC1* 3' end

<sup>d</sup>Oligonucleotides used for primer extension and Northern blot analysis

<sup>e</sup>Oligonucleotides used for PCR amplification of *CYC1* promoter regulated by different *TLC1* promoter regions

## CHAPITRE IV

Implication de l'endoribonucléase Rnt1p au niveau de la régulation du promoteur de l'ARN de la télomérase Tlc1.

### Préambule

Cette étude a pour but de vérifier si l'endoribonucléase Rnt1p peut jouer un rôle au niveau de la régulation du promoteur de Tlc1. Nous avons précédemment démontré que la délétion de Rnt1p causait une augmentation de l'expression des ARNm des sous-unités de la télomérase (Larose et al. 2007). Curieusement, malgré le fait que Tlc1 ne semblait pas être un substrat direct de Rnt1p, son expression était la plus affectée par la délétion de Rnt1p. Nous avons donc voulu vérifier si Rnt1p pouvait affecter Tlc1 à travers la régulation de son promoteur. Pour se faire, nous avons analysé l'expression du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur *TLC1* en présence ou en absence de Rnt1p. Cette analyse nous a permis de démontrer que l'absence de Rnt1p cause une augmentation de l'expression de l'ARNm LacZ lorsqu'il est exprimé à partir du promoteur de *TLC1*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **Souches et conditions de croissance**

Les souches de levure utilisées dans cette étude sont W303-1A et *mt1Δ* (Thomas et Rothstein 1989; Chanfreau et al. 1998a). La croissance des levures s'est effectuée selon des conditions standards dans un milieu riche YEPD contenant 2 % de glucose, à une température de 30 °C (Rose et al. 1990; Guthrie et Fink 1991).

### **Plasmides**

Les plasmides utilisés dans cette étude ont été décrits précédemment (Larose et al. soumis). Il s'agit des plasmides SLP092 (no pro - *lacZ*), SLP152 (*TLC1* A-K pro - *lacZ*), SLP153 (*TLC1* A-F pro - *lacZ*) et SLP154 (*TLC1* G-K pro - *lacZ*). Le plasmide SLP123 (*ACT1* pro - *lacZ*), utilisé lors de cette étude, a été généré de la même façon à partir du plasmide SLP092 et de l'amplification de la région promotrice du gène *ACT1* (Munholland et al. 1990).

### **Extraction d'ARN**

L'extraction d'ARN a été effectuée selon des conditions standards (Rose et al. 1990). Brièvement, des cultures de 50 ml ont été incubées à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,8 à 660 nm. Les cellules

ont ensuite été culotées par centrifugation à 4000 r.p.m. et l'ARN total a été extrait à l'aide de billes de verre suivi de phénol/chloroforme.

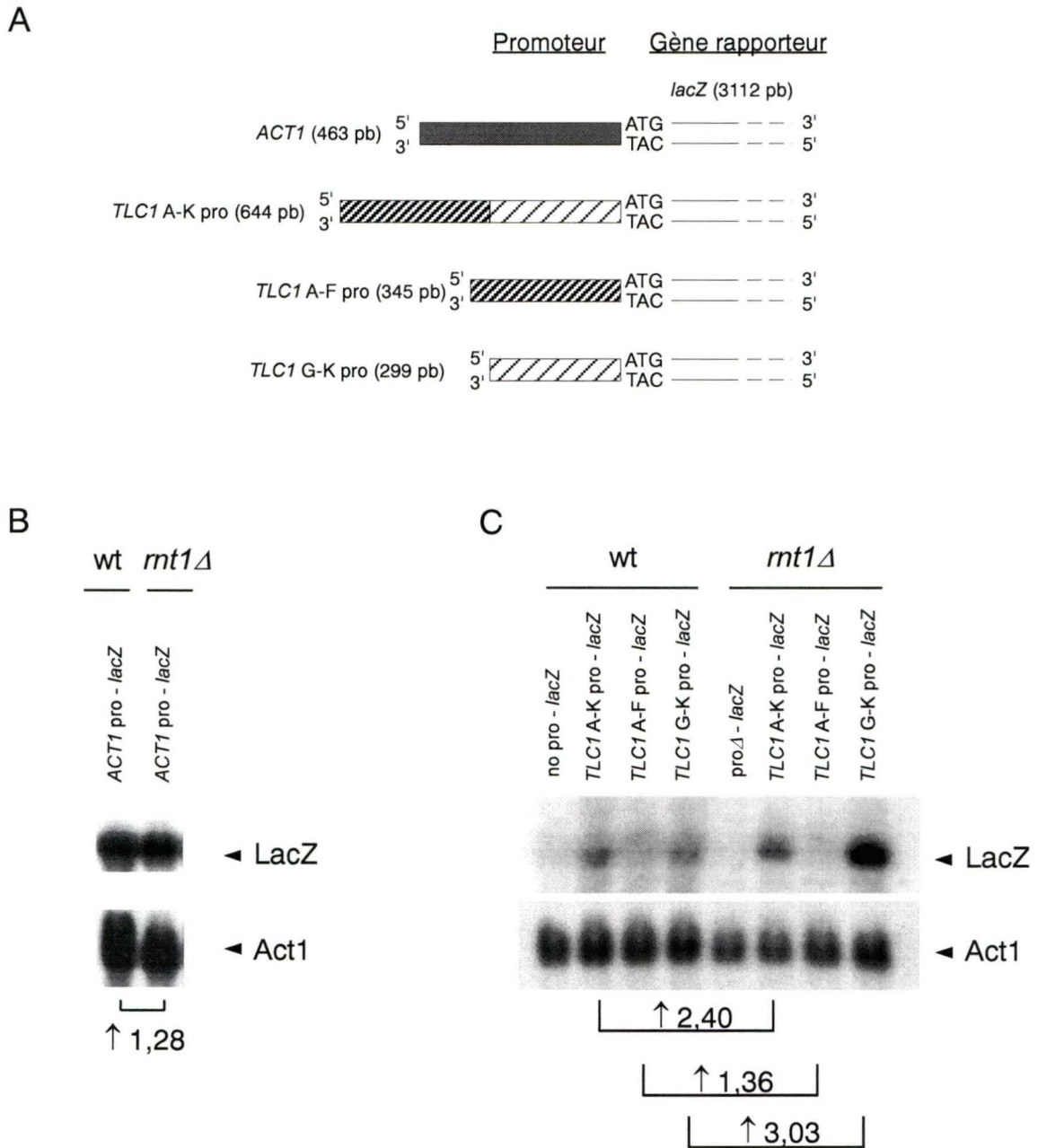
### **Buvarpage Northern**

L'analyse par buvardage de type Northern a été effectuée selon les conditions décrites précédemment (Larose et al. 2007). Brièvement, 15 µg d'ARN total a été migré sur un gel d'agarose 1 % et transféré sur une membrane de nylon Hybon N+ (GE Healthcare). La membrane a ensuite été hybridée avec une sonde spécifique pour chaque gène et a été révélée par autoradiographie. Les quantifications ont été faites à l'aide d'un appareil Instant Imager (Perkin Elmer).

## RÉSULTATS

**L'absence de Rnt1p cause une augmentation de l'expression de l'ARNm LacZ lorsqu'il est exprimé à partir du promoteur de *TLC1*.** Nous avons précédemment analysé la région promotrice de *TLC1* ce qui nous avait permis de délimiter une région importante pour l'expression de Tlc1 (Larose et al. soumis). Dans le but de vérifier si l'endoribonucléase Rnt1p peut jouer un rôle au niveau de la régulation du promoteur de Tlc1, nous avons analysé l'expression du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de différentes régions promotrices de Tlc1. Pour se faire, nous avons utilisé certaines constructions *TLC1* pro - *lacZ* décrites précédemment. De plus, une nouvelle construction *ACT1* pro - *lacZ* servant de contrôle négatif a été utilisée pour cette étude (Figure 11A). Ces différentes constructions ont été transformées dans une souche de levure de type sauvage (wt) ou possédant une délétion de Rnt1p (*mnt1Δ*). Par analyse de buvardage Northern, nous avons pu démontrer que la délétion de Rnt1p n'affecte pas l'expression du gène rapporteur *lacZ* lorsque ce dernier est sous le contrôle du promoteur du gène *ACT1* (Figure 11B). Ce résultat était attendu puisque nous avons démontré que l'expression de l'ARNm Act1 n'est pas affectée par la délétion de Rnt1p (Larose et al. 2007). En ce qui concerne l'expression de l'ARNm LacZ sous le contrôle du promoteur *TLC1*, une analyse de buvardage Northern nous a permis de démontrer que la délétion de Rnt1p affecte la régulation du promoteur *TLC1* (Figure 11C). En effet une augmentation significative de l'ARNm LacZ est

observée en absence de Rnt1p, soit sous le contrôle de la région promotrice complète (A-K) de *TLC1* ou sous le contrôle de la région promotrice proximale (G-K) de *TLC1*. Aucune différence n'a été observée lorsque *lacZ* était sous le contrôle de la région distale (A-F) de *TLC1*, ce qui n'est pas surprenant puisque cette région a de la difficulté à soutenir un niveau de transcription de LacZ détectable par rapport au contrôle sans promoteur (Larose et al. soumis). De plus, nous avons démontré que la région minimale contenant les éléments importants pour la régulation de *TLC1* se situe à l'intérieur de la région proximale (G-K) et c'est cette région qui cause une augmentation de LacZ en absence de Rnt1p (Larose et al. soumis). Les résultats obtenus ici suggèrent donc que Rnt1p affecte la régulation du promoteur de *TLC1*.



**Figure 11. Analyse de l'expression du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur de *TLC1* en absence de *Rnt1p*.** (A) Représentation schématique de différents promoteurs clonés en amont du gène rapporteur *lacZ*. Le promoteur de *TLC1* est représenté par des boîtes rayées tandis que le gène rapporteur est représenté par des lignes droites. Le promoteur du gène *ACT1*, représenté par une boîte grise, a été utilisé comme contrôle positif. (B)(C) Analyse de l'expression de l'ARNm *LacZ* par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche wt ou *mnt1Δ* transformée avec les différents plasmides expliqués ci-haut. L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. L'augmentation relative de *LacZ* entre une souche wt et *mnt1Δ* a été calculée en utilisant l'ARNm *Act1* comme référence. Les valeurs indiquées au bas de chaque figures représentent une moyenne de trois expériences avec un écart type de 0,82 ou moins.

## CHAPITRE V

Étude de la biogénèse de l'ARN de la télomérase Tlc1, en absence de facteurs impliqués dans des processus de maturation.

### Préambule

Chez *S. cerevisiae*, l'ARN de la télomérase Tlc1 possède plusieurs caractéristiques des petits ARN nucléaires (snARN). Comme la majorité des snARN, Tlc1 est transcrit par l'ARN polymérase II, il possède un site Sm à son extrémité 3' requis pour la liaison des protéines Sm et il possède une coiffe 2,2,7-triméthylguanosine à son extrémité 5' (Chapon et al. 1997; Seto et al. 1999). Généralement les snARN sont transcrits sous forme de précurseurs qui vont par la suite subir des étapes de maturation impliquant diverses protéines comme des endoribonucléases, des exonucléases, des hélicases et des protéines chaperonnes (Will et Luhrmann 2001). Puisque Tlc1 possède plusieurs caractéristiques des snARN, nous avons voulu savoir si certains des facteurs normalement impliqués dans la maturation des snARN pouvaient aussi être impliqués dans la maturation de Tlc1. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que certains facteurs sont requis pour un niveau d'expression normal de Tlc1.



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Souches et conditions de croissance

Les souches de levure utilisées dans cette étude sont W303-1A (Thomas et Rothstein 1989), *mt1Δ* (Chanfreau et al. 1998a), AJY856 (*xm1Δ*; *rat1-1*) (Johnson 1997), YRP840 (wt) (Hatfield et al. 1996), YRP1418 (*mt1Δ*; *rrp6Δ*) (van Hoof et al. 2000), *ma14-1* et *ma15-2* (Minvielle-Sebastia et al. 1991), EJS202 (*mt1Δ*; *NRD1*) et EJS203 (*mt1Δ*; *nrd1-5*) (Steinmetz et Brow 1996). Les souches DUY747 (wt), DUY746 (*mt1Δ*), DUY748 (*sen1-1*) et DUY749 (*mt1Δ*; *sen1-1*) n'ont pas été publiées et sont une gracieuseté de Dr. Doris Ursic. La croissance des levures s'est effectuée selon des conditions standards dans un milieu riche YEPD contenant 2 % de glucose, à une température de 26 °C ou 37 °C pendant 6 h (Rose et al. 1990; Guthrie et Fink 1991).

### Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN a été effectuée selon des conditions standards (Rose et al. 1990). Brièvement, des cultures de 50 ml ont été incubées à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,8 à 660 nm. Les cellules ont ensuite été culotées par centrifugation à 4000 r.p.m. et l'ARN total a été extrait à l'aide de billes de verre suivi de phénol/chloroforme.

## **Buvar dage Northern**

L'analyse par buvardage de type Northern a été effectuée selon les conditions décrites précédemment (Larose et al. 2007). Brièvement, 15 µg d'ARN total a été migré sur un gel dénaturant de polyacrylamide 4 % et transféré sur une membrane de nylon Hybon N+ (GE Healthcare). La membrane a ensuite été hybridée avec une sonde spécifique pour chaque gène et a été révélée par autoradiographie. Les quantifications ont été faites à l'aide d'un appareil Instant Imager (Perkin Elmer).

## **Analyse d'extension d'amorce**

L'analyse d'extension d'amorce a été effectuée selon les conditions décrites précédemment (Larose et al. 2007). Brièvement, 15 µg d'ARN total est inversement transcrit en utilisant l'amorce Tlc1-33-49 (CAGCCATTGACATTTTC). Les produits pourvus d'extensions sont ensuite migrés sur gel dénaturant de polyacrylamide 8 % et analysés par autoradiographie.

## **Protection à la RNase**

L'analyse par protection à la RNase a été effectuée selon les conditions décrites précédemment (Larose et al. soumis). Brièvement, 20 µg d'ARN total a été hybridé avec une sonde ARN antisens spécifique à Tlc1. L'hybride est ensuite digéré avec la RNase T1 pendant 1 heure et les produits

sont analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant 4 %. La sonde hybridée à l'ARNt ou à l'ARN extrait d'une souche *t/c1Δ* sert de contrôle.

## RÉSULTATS

**L'absence des exonucléases 5' → 3' Rat1p et Xrn1p n'a pas d'effet sur la biogénèse de Tlc1.** L'exonucléase Rat1p est une enzyme essentielle et se localise au noyau comparativement à l'exonucléase Xrn1p qui n'est pas essentielle et qui se localise au cytoplasme (Amberg et al. 1992; Johnson 1997). Il a été démontré que ces exonucléases sont impliquées dans la formation de l'extrémité 5' des snoARN ainsi que dans la terminaison de la transcription des ARNm dans le cas de Rat1p (Petfalski et al. 1998; Luo et al. 2006). Nous avons voulu vérifier si ces enzymes étaient impliquées dans la maturation de l'extrémité 5' de Tlc1. Pour se faire, nous avons tout d'abord effectué une analyse par buvardage Northern pour vérifier les niveaux d'expression de Tlc1 en absence de ces deux exonucléases. Comme le démontre la Figure 12A, aucune différence n'a été observée lorsque les cellules étaient poussées à la température restrictive. De plus, l'analyse de l'extrémité 5' de Tlc1 par technique d'extension d'amorce n'a démontré aucune différence tout comme l'analyse de l'extrémité 3' de Tlc1 par protection à la RNase (Figure 12B et 12C respectivement). Ces résultats suggèrent que les exonucléases Rat1p et Xrn1p ne sont pas impliquées dans la biogénèse de Tlc1.

**L'absence des facteurs de clivage/polyadénylation Rna14p et Rna15p diminue la quantité des formes poly A+ et poly A- de Tlc1.** Les

protéines Rna14p et Rna15p sont toutes deux des protéines essentielles impliquées dans la formation de l'extrémité 3' de divers transcrits de la pol II polyadénylés et non polyadénylés comme les ARNm, snARN et snoARN (Minvielle-Sebastia et al. 1994; Fatica et al. 2000; Morlando et al. 2002). Nous avons voulu vérifier si l'absence de ces deux protéines pouvait affecter la biogénèse de Tlc1. Par analyse de type Northern, nous avons pu observer que l'inactivation des protéines Rna14p et Rna15p cause une diminution de la quantité des formes poly A<sup>+</sup> et poly A<sup>-</sup> de Tlc1 (Figure 13A). La quantité de la forme poly A<sup>+</sup> semble diminuer en plus grande proportion comparativement à la forme poly A<sup>-</sup>. De plus, on peut remarquer que la quantité de l'ARNm contrôle Act1 diminue. Ces résultats étaient attendus puisque comme mentionné ci-haut, les protéines Rna14p et Rna15p sont importantes pour la formation 3' des ARNm. Aucune différence n'a été observée au niveau des extrémités 5' et 3' de Tlc1 comme le démontre les analyses d'extension d'amorce et de protection à la RNase (Figure 13B et 13C respectivement). Les résultats obtenus suggèrent donc que les protéines Rna14p et Rna15p sont importantes pour l'expression normale de Tlc1.

**L'absence de l'exonucléase Rrp6p et de l'endonucléase Rnt1p augmente l'expression de Tlc1.** L'exonucléase Rrp6p est une exonucléase 3' → 5' qui fait partie du complexe exosome (Allmang et al. 1999b). Ce complexe d'exonucléases 3' → 5' est impliqué tant au niveau de la maturation que de la dégradation de divers ARN (Houseley et al. 2006). Pour

la maturation de plusieurs snARN, il a été démontré que l'exosome entre en action suite à un clivage de l'endoribonuclease Rnt1p (Allmang et al. 1999a; van Hoof et al. 2000). Nous avons voulu vérifier si Rrp6p, de concert avec Rnt1p, pouvait être impliquée dans la maturation de l'extrémité 3' de Tlc1. Nous avons préalablement démontré que la délétion de Rnt1p augmente l'expression de Tlc1 (Larose et al. 2007). Par analyse de buvardage Northern, nous avons reproduit ce résultat et nous avons vérifié si la double délétion de Rnt1p et Rrp6p affecte la biogénèse de Tlc1. Comme le démontre la Figure 14A, la double délétion de ces protéines cause une augmentation de Tlc1 légèrement supérieure à la simple délétion de Rnt1p. Plus spécifiquement, seulement la forme poly A- semble être affectée. Toutefois, malgré le fait que l'expression de Tlc1 soit augmentée, aucune différence n'a été observée au niveau des extrémités 5' et 3' de Tlc1 comme l'indique les Figures 14B et 14C. À première vue l'analyse par extension d'amorce a semblé mettre en évidence de nouvelles extensions 5' mais une surexposition de la piste contenant de l'ARN wt a révélé les mêmes extensions (résultats non montrés) (Figure 14B). Ces résultats suggèrent que Rnt1p et Rrp6p affectent seulement l'expression de Tlc1 mais pas la formation de ses extrémités.

**L'absence du facteur de terminaison Nrd1p augmente l'expression de Tlc1 de concert avec la délétion de l'endoribonucléase Rnt1p.** Nrd1p est une protéine essentielle liant directement l'ARN et impliquée dans la

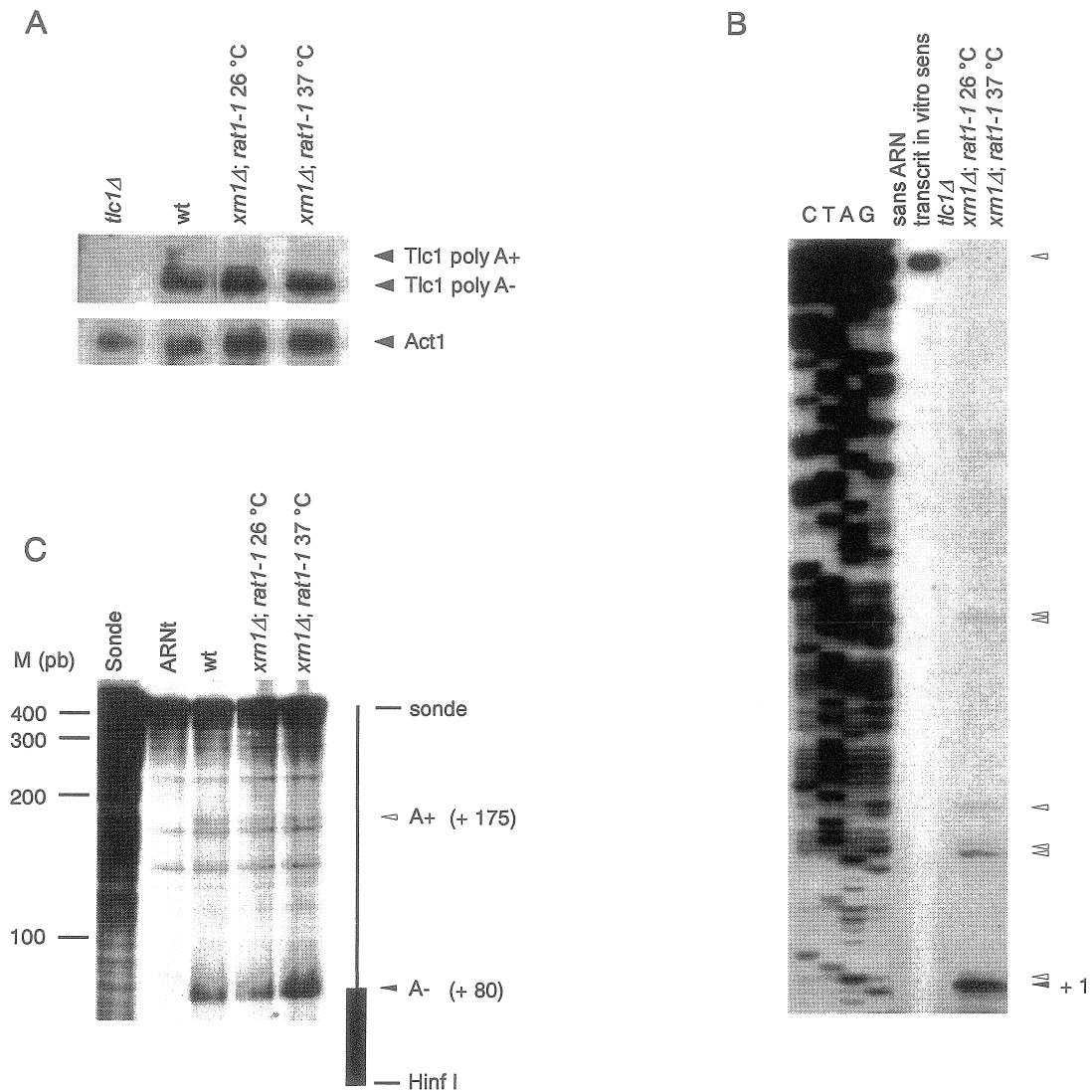
formation de l'extrémité 3' des transcrits non polyadénylés de la pol II (Steinmetz et al. 2001). En absence de Nrd1p, une élongation en 3' des transcrits ARN « read-through » est observée. Nous avons voulu vérifier si Nrd1p, avec ou sans la présence de Rnt1p, pouvait être impliquée dans la maturation de l'extrémité 3' de Tlc1. Les résultats obtenus sont identiques à ceux précédemment obtenus avec la double délétion de Rnt1p et Rrp6p. Comme le démontre les analyses de buvardage Northern, d'extension d'amorce et de protection à la RNase, seulement une légère augmentation de la quantité de Tlc1 est observée en absence de Rnt1p et Nrd1p mais aucune différence au niveau des extrémités 5' et 3' de Tlc1 n'est détectée (Figure 15A, 15B, 15C respectivement). La protéine Nrd1p ne semble donc pas être impliquée dans la formation de l'extrémité 3' de Tlc1.

#### **L'absence de l'hélicase Sen1p n'affecte pas la biogénèse de Tlc1.**

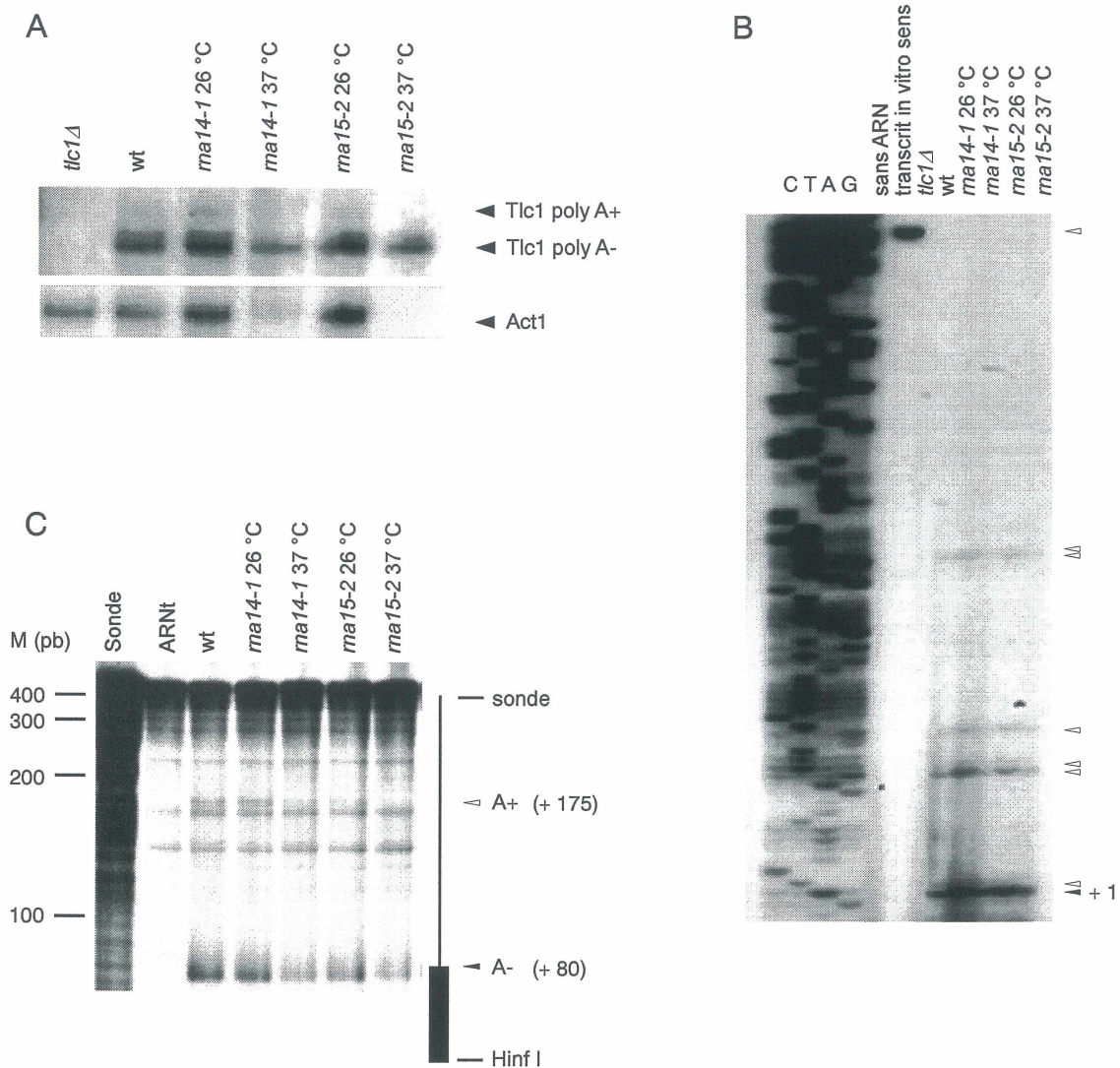
Sen1p est une hélicase essentielle qui de concert avec Nrd1p, est impliquée dans la formation de l'extrémité 3' des transcrits non polyadénylés de la pol II (Steinmetz et Brow 1996; Steinmetz et al. 2001). Tout comme Nrd1p, l'absence de Sen1p cause une élongation en 3' des transcrits ARN « read-through ». Nous avons voulu vérifier si Sen1p, avec ou sans la présence de Rnt1p, pouvait être impliquée dans la maturation de l'extrémité 3' de Tlc1. Comme le démontre les analyses de buvardage Northern, d'extension d'amorce et de protection à la RNase, aucune différence d'expression ou de formation des extrémités 5' et 3' de Tlc1 n'est détectée (Figure 16A, 16B, 16C

respectivement). L'hélicase Sen1p ne semble donc pas être impliquée dans la biogénèse de Tic1.

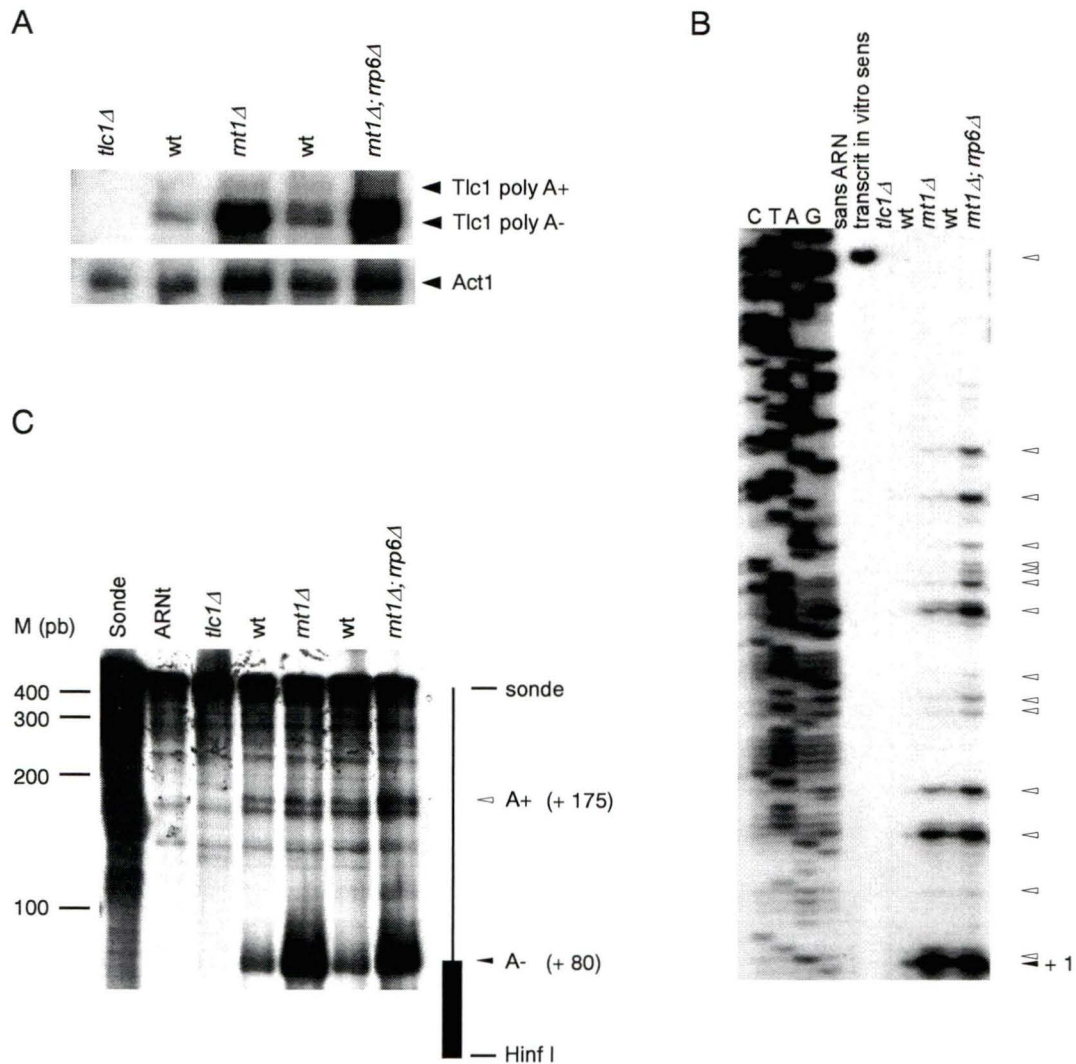




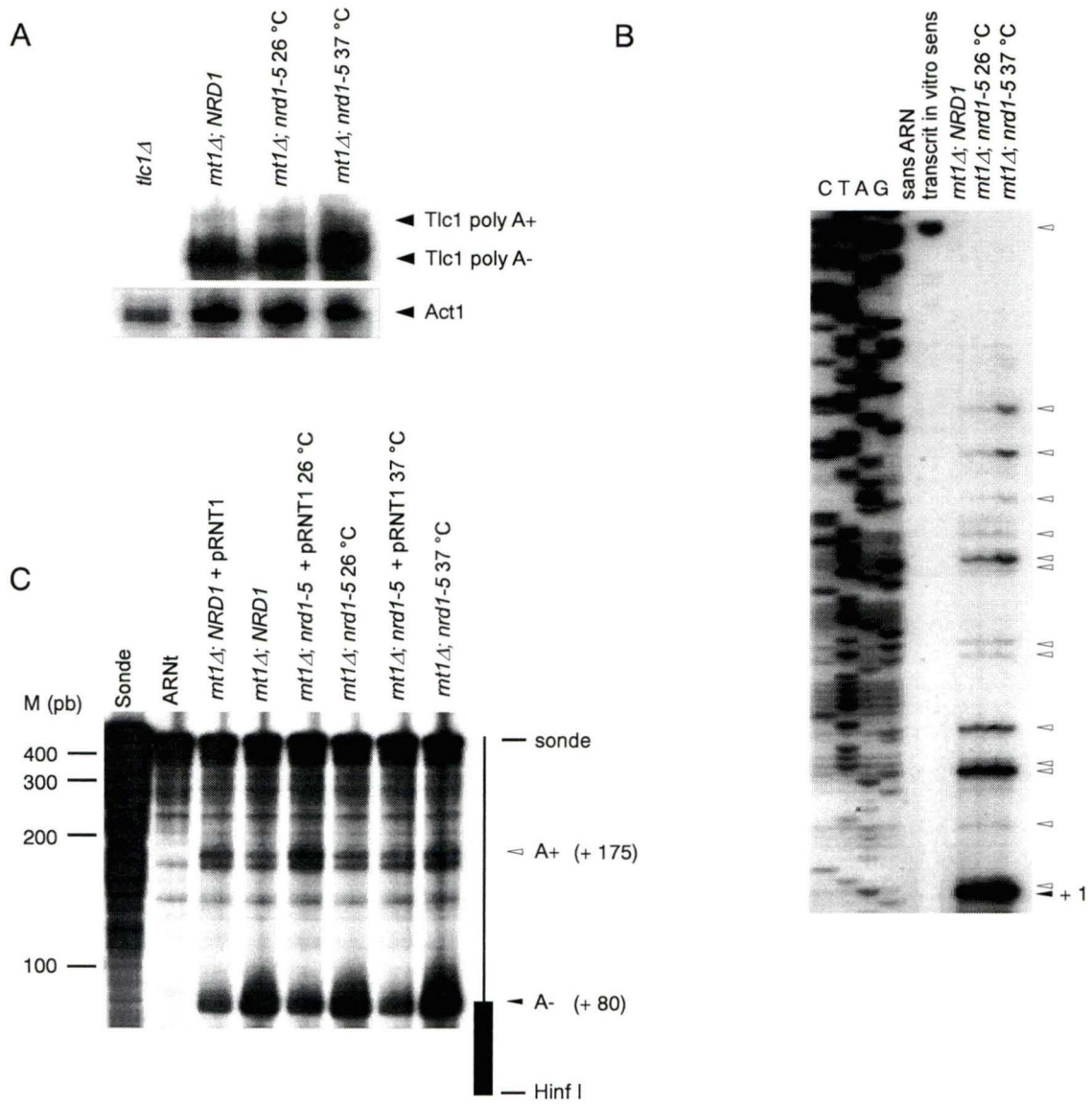
**Figure 12. Analyse de l'expression de Tlc1 en absence des exonucléases Rat1p et Xrn1p.** (A) Analyse de l'expression de Tlc1 par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche wt ou d'une souche *xrm1Δ; rat1-1* poussée à la température permissive (26 °C) ou non permissive (37 °C). L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. (B) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique d'extension d'amorce utilisant un oligo spécifique à Tlc1. Un transcrit d'ARN in vitro a été utilisé comme contrôle d'arrêt de la polymérase. Une réaction de séquençage effectuée avec le même oligo sert de référence. À la droite du schéma, l'extrémité majeure de Tlc1 est indiquée par une flèche noire tandis que les extensions 5' sont indiquées par des flèches blanches. (C) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique de protection à la RNase. Les positions de la sonde, de l'extrémité poly A+ et de l'extrémité poly A- sont indiquées sur la droite du schéma. Les tailles indiquées sont calculées à partir du site de coupure de l'enzyme de restriction Hinf I.



**Figure 13. Analyse de l'expression de Tlc1 en absence des facteurs de clivage/polyadénylation Rna14p et Rna15p.** (A) Analyse de l'expression de Tlc1 par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche wt, d'une souche *ma14-1* ou *ma15-2* poussées à la température permissive (26 °C) ou non permissive (37 °C). L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. (B) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique d'extension d'amorce utilisant un oligo spécifique à Tlc1. Un transcrit d'ARN in vitro a été utilisé comme contrôle d'arrêt de la polymérase. Une réaction de séquençage effectuée avec le même oligo sert de référence. À la droite du schéma, l'extrémité majeure de Tlc1 est indiquée par une flèche noire tandis que les extensions 5' sont indiquées par des flèches blanches. (C) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique de protection à la RNase. Les positions de la sonde, de l'extrémité poly A+ et de l'extrémité poly A- sont indiquées sur la droite du schéma. Les tailles indiquées sont calculées à partir du site de coupure de l'enzyme de restriction HinfI.

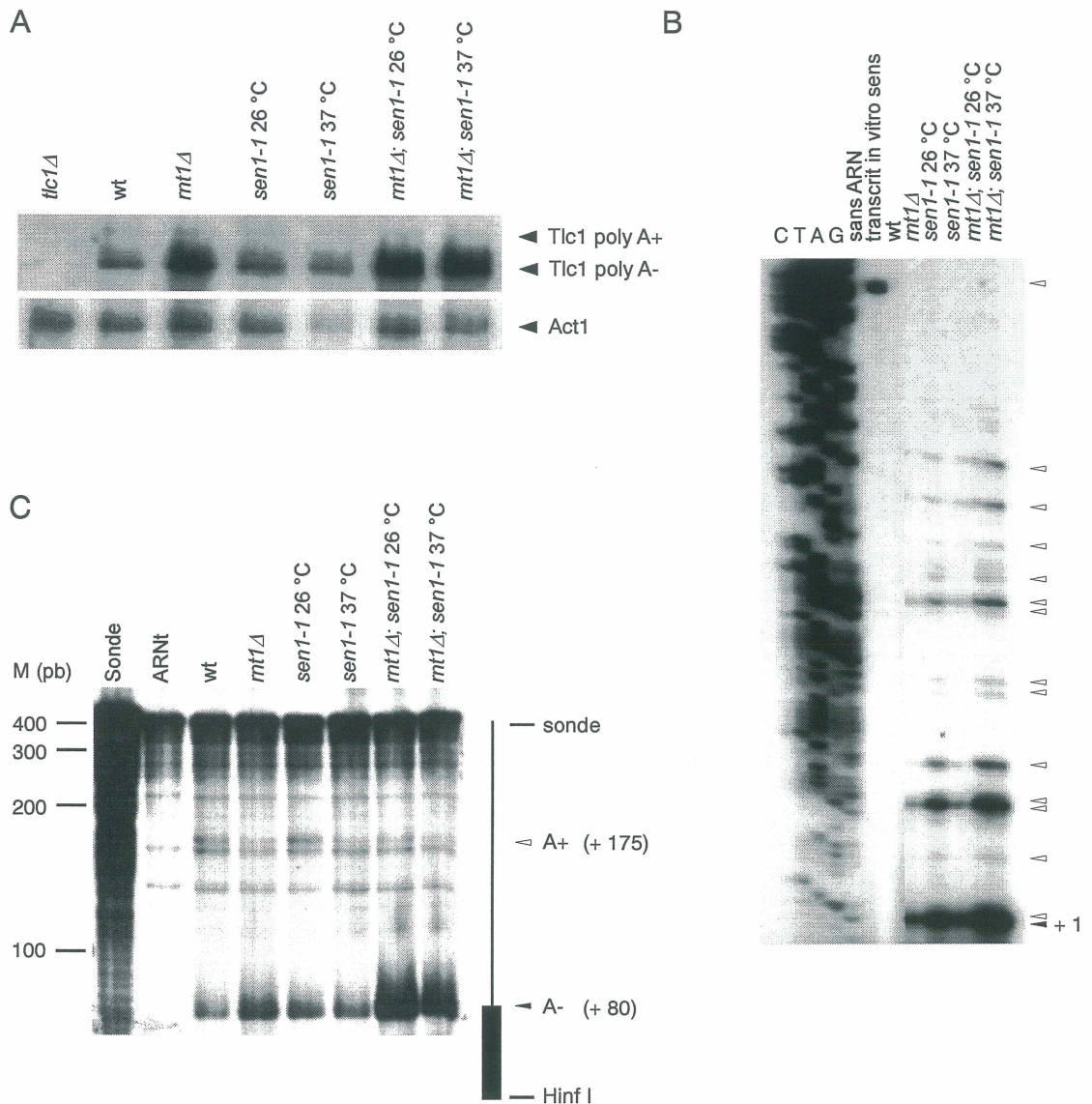


**Figure 14. Analyse de l'expression de Tlc1 en absence de l'exonucléase Rrp6p.** (A) Analyse de l'expression de Tlc1 par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche wt, d'une souche *mt1Δ* ou d'une souche *mt1Δ; rrp6Δ*. L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. (B) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique d'extension d'amorce utilisant un oligo spécifique à Tlc1. Un transcrit d'ARN in vitro a été utilisé comme contrôle d'arrêt de la polymérase. Une réaction de séquençage effectuée avec le même oligo sert de référence. À la droite du schéma, l'extrémité majeure de Tlc1 est indiquée par une flèche noire tandis que les extensions 5' sont indiquées par des flèches blanches. (C) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique de protection à la RNase. Les positions de la sonde, de l'extrémité poly A+ et de l'extrémité poly A- sont indiquées sur la droite du schéma. Les tailles indiquées sont calculées à partir du site de coupure de l'enzyme de restriction Hinf I.



**Figure 15. Analyse de l'expression de Tlc1 en absence du facteur de terminaison Nrd1p.**

(A) Analyse de l'expression de Tlc1 par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche *mt1Δ; NRD1 + pRNT1*, *mt1Δ; NRD1*, *mt1Δ; nrd1-5 + pRNT1*, *mt1Δ; nrd1-5* poussées à la température permissive (26 °C) ou non permissive (37 °C). L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. (B) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique d'extension d'amorce utilisant un oligo spécifique à Tlc1. Un transcrit d'ARN in vitro a été utilisé comme contrôle d'arrêt de la polymérase. Une réaction de séquençage effectuée avec le même oligo sert de référence. À la droite du schéma, l'extrémité majeure de Tlc1 est indiquée par une flèche noire tandis que les extensions 5' sont indiquées par des flèches blanches. (C) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique de protection à la RNase. Les positions de la sonde, de l'extrémité poly A+ et de l'extrémité poly A- sont indiquées sur la droite du schéma. Les tailles indiquées sont calculées à partir du site de coupure de l'enzyme de restriction Hinfl.



**Figure 16. Analyse de l'expression de Tlc1 en absence de l'hélicase Sen1p.** (A) Analyse de l'expression de Tlc1 par buvardage Northern. L'ARN total a été extrait à partir d'une souche *wt*, *mt1Δ*, *sen1-1* ou *mt1Δ; sen1-1* poussées à la température permissive (26 °C) ou non permissive (37 °C). L'ARN a été hybridé avec des sondes spécifiques pour les gènes indiqués sur la droite. (B) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique d'extension d'amorce utilisant un oligo spécifique à Tlc1. Un transcrit d'ARN in vitro a été utilisé comme contrôle d'arrêt de la polymérase. Une réaction de séquençage effectuée avec le même oligo sert de référence. À la droite du schéma, l'extrémité majeure de Tlc1 est indiquée par une flèche noire tandis que les extensions 5' sont indiquées par des flèches blanches. (C) Analyse de l'expression de Tlc1 (extrait des mêmes souches décrites ci-haut) par la technique de protection à la RNase. Les positions de la sonde, de l'extrémité poly A+ et de l'extrémité poly A- sont indiquées sur la droite du schéma. Les tailles indiquées sont calculées à partir du site de coupure de l'enzyme de restriction HinfI.

## DISCUSSION

### Régulation négative de la télomérase par la RNase III.

Une analyse de puce à ADN réalisée dans notre laboratoire a permis de démontrer qu'environ 450 gènes sur les 6000 gènes répertoriés chez *Saccharomyces cerevisiae* avaient une expression augmentée d'au moins deux fois en absence de l'endoribonucléase Rnt1p (Ge et al. 2005). Suite à une analyse *in silico* détaillée des résultats de cette étude, nous avons noté que l'expression de gènes codant pour des sous-unités de la télomérase (*EST1*, *EST2*, *EST3*, *TLC1*) était augmentée en absence de Rnt1p. De plus, l'absence de Rnt1p cause une augmentation de l'activité télomérase ainsi qu'une augmentation de la taille des télomères (Larose et al. 2007). Nos résultats corrént bien avec ce qui avait été suggéré précédemment c'est-à-dire : qu'une augmentation de l'activité télomérase requiert une augmentation de l'expression de la majorité des composantes de la télomérase (Teo et Jackson 2001).

Les résultats obtenus ont inévitablement soulevé la question suivante: comment Rnt1p influence-t-il négativement l'expression des ARNm codant pour les sous-unités de la télomérase? Une possibilité serait que Rnt1p clive directement les ARNm Est1, Est2, Est3 et l'ARN Tlc1 avant qu'ils soient exportés au cytoplasme. Cette possibilité est supportée par le fait que

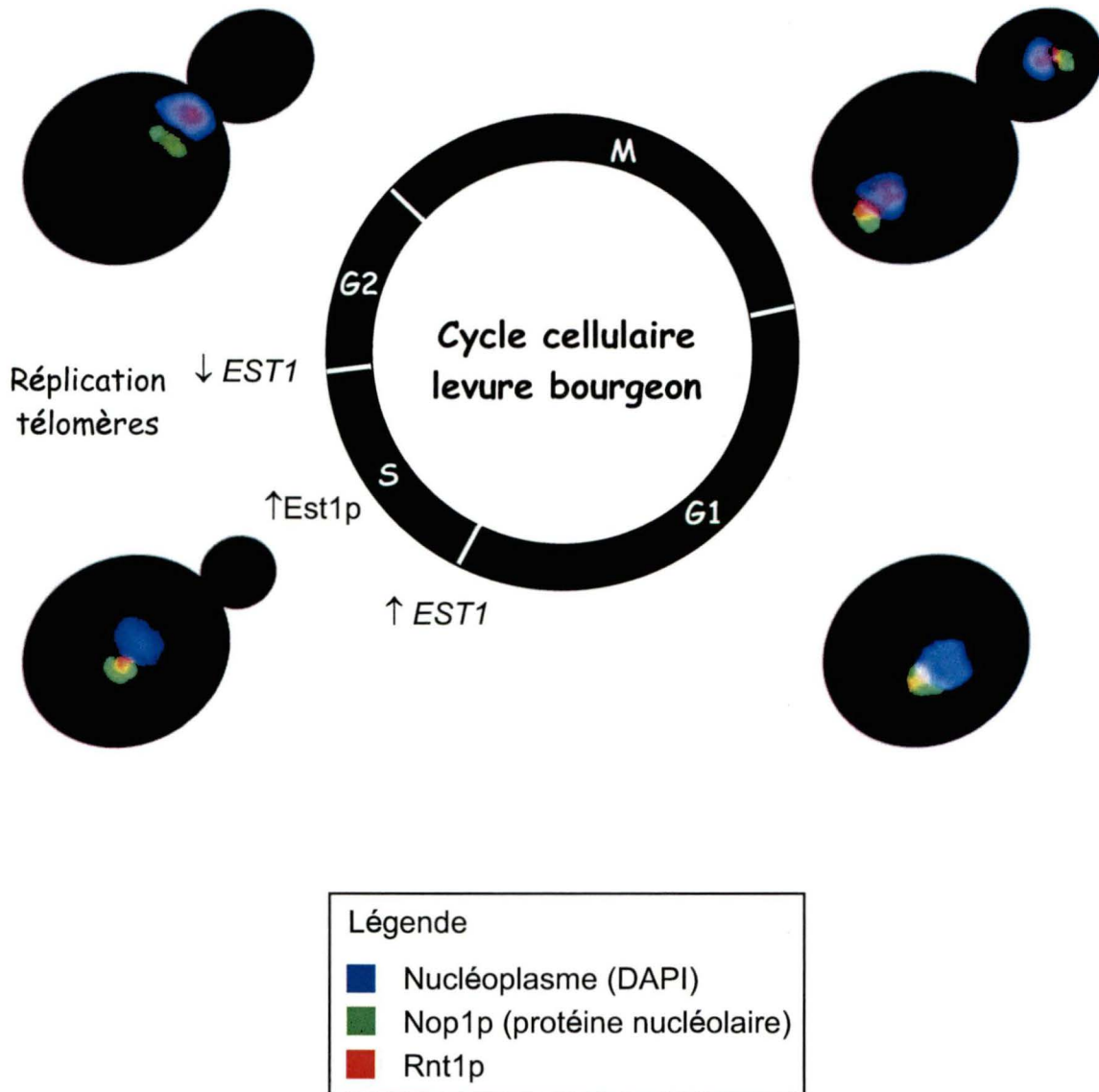
l'activité catalytique de Rnt1p est importante pour l'expression normale des composantes de la télomérase (Larose et al. 2007). De plus, nos résultats démontrent un clivage direct de l'ARNm Est1 par Rnt1p *in vitro* (Larose et al. 2007). Même si aucun clivage direct n'a été détecté pour les autres ARN des composantes de la télomérase, la possibilité d'un clivage assisté par des protéines chaperonnes ne peut être écarté. Effectivement, il a été démontré que Rnt1p pouvait cliver le snoARN U18 à l'aide de protéine chaperonne Nop1p, une protéine nucléolaire (Giorgi et al. 2001). Une deuxième possibilité serait que Rnt1p influence indirectement les ARN des composantes de la télomérase en clivant un autre ARN qui lui, affecterait l'expression de tous les ARN des sous-unités de la ribonucléoprotéine. Toutefois aucun exemple d'un tel mécanisme n'a été démontré jusqu'à maintenant. D'ailleurs, l'abolition du site de clivage par Rnt1p dans l'ARNm Est1 (est1-4) n'affecte pas les autres sous-unités de la télomérase (données non publiées, Larose S.).

La découverte que Rnt1p clive directement Est1 ajoute un nouvel ARNm à la liste grandissante des substrats de Rnt1p. Il a été démontré que Rnt1p clive également des ARNm codant pour des protéines impliquées dans les voies métaboliques du glucose et du fer (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005). Ces résultats soulèvent évidemment la question à propos de l'importance de ces clivages ainsi qu'à la contribution générale de Rnt1p au niveau de la régulation de l'expression des gènes. Puisque Rnt1p n'est jamais retrouvé au

cytoplasme même lorsque surexprimé, ceci suggère que ses substrats seraient clivés à l'intérieur du noyau (Catala et al. 2004). Normalement, suite à la transcription, les ARNm sont rapidement exportés au cytoplasme pour y être traduits (Hieronymus et Silver 2004). Ceci pourrait expliquer pourquoi la délétion de Rnt1p n'affecte pas dramatiquement la demi-vie de ses substrats (Ge et al. 2005; Lee et al. 2005; Larose et al. 2007). D'ailleurs, l'introduction de mutations au niveau du site de clivage de Rnt1p dans l'ARNm Est1 (est1-4) (mutations empêchant le clivage par Rnt1p), ne provoque pas de façon significative une augmentation du niveau d'ARNm Est1 (Larose et al. 2007). Tous ces résultats suggèrent que le clivage d'ARNm par Rnt1p n'aurait pas pour but d'abolir complètement l'expression des ARNm, mais plutôt, pourrait servir de mécanisme de surveillance. Habituellement, les ARNm sont dégradés dans le cytoplasme suite à une déadénylation et à l'enlèvement de la coiffe, majoritairement dans la direction 5' → 3' et minoritairement 3' → 5' (Mitchell et Tollervey 2000). Toutefois, un mécanisme de dégradation nucléaire contrôlant l'abondance des ARNm a aussi été démontré (Das et al. 2003; Kuai et al. 2005). En plus des mécanismes normaux de dégradation, il existe aussi des mécanismes de surveillance spécialisés tels que le NMD, le NSD et le NGD, impliqués dans la dégradation d'ARNm possédant des codons de terminaison prémature, ne possédant pas de codons de terminaison ou possédant une structure stable bloquant la progression de la traduction respectivement (Doma et Parker 2007). Tous ces mécanismes de surveillance agissent au cytoplasme mais des mécanismes de surveillance



nucléaires sont aussi en action comme par exemple la dégradation dépendante de la polyadénylation des ARN par le complexe TRAMP (LaCava et al. 2005; Vanacova et al. 2005; Wyers et al. 2005). Rnt1p pourrait ainsi faire partie des mécanismes de surveillance spécialisés des ARNm. Concernant Est1, Rnt1p pourrait avoir un rôle à jouer au niveau de sa dégradation durant le cycle cellulaire. En accord avec une récente étude et avec des analyses de profil transcriptionnel par puce à ADN, nos résultats ont démontré que l'expression de Est1 est régulée au cours du cycle cellulaire (Spellman et al. 1998; Osterhage et al. 2006; Larose et al. 2007). L'expression de Est1 serait augmentée durant la transition de la phase G1 à la phase S, ce qui corrèle avec une augmentation subséquente de la protéine Est1p en phase S (Taggart et al. 2002; Larose et al. 2007). Suite à la phase S, lorsque les cellules entrent en phase G2, le niveau d'expression de Est1 diminue rapidement. Remarquablement, cette diminution survient au même moment où Rnt1p sort du nucléole et se retrouve à l'intérieur du nucléoplasme (Catala et al. 2004). Voir Figure 17. La localisation de Rnt1p contrôlée en fonction du cycle cellulaire pourrait être responsable de la dégradation de Est1p durant le cycle cellulaire. Une situation semblable a été observée avec la RNase MRP : sa sortie du nucléole permet le clivage de l'ARNm Cib2 (Gill et al. 2004). Quant à l'augmentation de l'expression de Est1 durant la transition G1/S, elle est probablement indépendante de Rnt1p puisque les mutations empêchant le clivage de Est1 par Rnt1p (*est1-4*) ne bloquent pas l'augmentation des niveaux de Est1 et de plus, Rnt1p se



**Figure 17. Modèle de régulation de l'ARNm Est1 par Rnt1p durant le cycle cellulaire.** Lors de la transition de la phase G1 à la phase S, une augmentation de l'expression de Est1 est observée, suivi d'une augmentation de la protéine Est2p. Durant ces deux phases, la protéine Rnt1p est majoritairement localisée au nucléole. Lors de la transition de la phase S vers la phase G2, on observe une diminution de l'expression de Est1. À cette même étape, Rnt1p sort du nucléole pour se retrouver dans tout le nucléoplasme. Voir le texte pour une description plus détaillée. Le nucléoplasme est coloré en bleu à l'aide du colorant DAPI, le nucléole en vert à l'aide du marqueur protéique nucléolaire Nop1p et Rnt1p en rouge. Les photos sont une gracieuseté de M. Catala.

retrouve au nucléole à ce moment contrairement à l'ARNm Est1. La régulation de l'ARNm Est1 par Rnt1p durant le cycle cellulaire serait un mécanisme de régulation additionnel à celui de la protéine Est1p par le protéasome durant le cycle cellulaire (Osterhage et al. 2006). Toutefois, la localisation de Rnt1p n'est sûrement pas le seul moyen de contrôle pour cliver l'ARNm Est1 sinon tout l'ARN serait clivé. Par exemple, des protéines chaperonnes pourraient assister le clivage par Rnt1p, le clivage pourrait être co-transcriptionnel ou encore, un export rapide de l'ARNm Est1 vers le cytoplasme pourrait empêcher que tout l'ARN soit dégradé. Tous ces résultats suggèrent donc que l'activité de la télomérase serait régulée de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Plusieurs niveaux de régulation pourraient être requis pour une régulation précise des composantes de la télomérase, un prérequis essentiel au maintien des télomères et à la survie des cellules. Plusieurs études ont effectivement démontré qu'un déséquilibre de l'expression de certaines sous-unités peut causer une augmentation ou un raccourcissement des télomères (Singer et Gottschling 1994; Virta-Pearlman et al. 1996; Peterson et al. 2001; Dahlseid et al. 2003).

Une troisième possibilité envisageable pour la régulation négative de la télomérase par Rnt1p serait par le biais d'une régulation au niveau du promoteur des gènes des sous-unités, soit de façon directe ou indirecte. Des études de double hybride effectuées dans le laboratoire ont permis d'identifier

plusieurs protéines interagissant avec Rnt1p. Parmi ces protéines, plusieurs facteurs de transcription ont été retrouvés (Tremblay 2002). De plus, des expériences préliminaires effectuées dans le laboratoire suggèrent que Rnt1p serait présent au promoteur de certains gènes d'une façon dépendante de la transcription (données non publiées, Ghazal G.). Que cette interaction soit directe ou non, la présence de Rnt1p au promoteur de gènes ouvre une nouvelle avenue d'étude. Nous avons précédemment démontré que l'expression de *Tlc1* était la plus affectée par la délétion de Rnt1p, malgré le fait que *Tlc1* ne semblait pas être un substrat direct de Rnt1p (Larose et al. 2007). Dans le but de vérifier si Rnt1p pouvait avoir un rôle à jouer au niveau de la régulation du promoteur de *Tlc1*, nous avons analysé l'expression du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur *TLC1* en présence ou en absence de Rnt1p. Une analyse préliminaire a révélé que l'absence de Rnt1p cause une augmentation de l'expression de l'ARNm *LacZ* lorsqu'il est exprimé à partir du promoteur de *TLC1* (Figure 11). Curieusement, la délétion de Rnt1p semble affecter de façon plus significative l'expression de *LacZ* lorsque ce dernier est sous le contrôle de la région promotrice proximale de *Tlc1*, comparativement à la région complète (expérience effectuée en triplicata). La région proximale contiendrait les éléments requis pour une expression normale de *Tlc1*, tandis que la région distale contiendrait le snoARN *snR161* (Olivas et al. 1997; Torchet et al. 2005; Larose et al. soumis). Dans ce contexte particulier, c'est-à-dire lorsque *LacZ* est sous le contrôle de la région promotrice intergénique complète de *Tlc1*, la région distale pourrait avoir un

effet antagoniste sur la région proximale en absence de Rnt1p. Il est quand même remarquable de noter que la région proximale, soit la région promotrice de Tlc1, réagisse à l'absence de Rnt1p. Ces résultats suggèrent que Rnt1p pourrait avoir un rôle à jouer au niveau de la régulation du promoteur de Tlc1. Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de remplacer le promoteur endogène de Tlc1 par le promoteur d'un autre gène non affecté par Rnt1p et d'incorporer ces constructions dans une levure wt ou *mt1Δ* pour vérifier si dans ce contexte il y a perte de l'effet. Précédemment, nous avons montré que Tlc1 n'était pas directement clivé par Rnt1p toutefois, l'activité catalytique de l'enzyme était importante pour une expression élevée de Tlc1 (Larose et al. 2007). Rnt1p pourrait ainsi réguler Tlc1 à travers son promoteur en plus de cliver son ARN (ou de cliver un autre ARN qui aurait un effet sur Tlc1 suggérant une double régulation de Rnt1p sur Tlc1. Afin de vérifier si Rnt1p peut cliver Tlc1 à l'aide de protéines chaperonnes, il serait intéressant d'effectuer des essais de clivage à partir d'extraits cellulaires. Dans le but de mieux comprendre comment Rnt1p affecte négativement les sous-unités de la télomérase, les mêmes expériences suggérées ci-haut pourraient aussi être effectuées avec les ARNm des autres composantes de la télomérase.

## Régulation de l'expression de *Tlc1* à travers sa région promotrice.

L'abondance de chacune des sous-unités de la télomérase est très importante pour le maintien de l'homéostasie des télomères (Smogorzewska et de Lange 2004). Par exemple, la délétion de la sous-unité ARN *Tlc1* cause un raccourcissement progressif des télomères menant éventuellement à une mort cellulaire, tandis que sa surexpression cause un raccourcissement des télomères maintenus de façon stable dans cet état (Singer et Gottschling 1994; Peterson et al. 2001). Récemment, il a été démontré que le nombre de molécules *Tlc1* est inférieur au nombre de télomères présents chez la levure, suggérant une régulation précise du niveau d'expression de *Tlc1* pour le maintien des télomères (Mozdy et Cech 2006). Dans le but de mieux comprendre la régulation de l'expression de *TLC1*, nous avons entamé l'étude de sa région promotrice. En utilisant une approche phylogénétique, nous avons comparé la région intergénique en amont de l'extrémité 5' de *Tlc1* jusqu'au gène *PDX3* des ARN de la télomérase faisant partie du groupe des *sensu stricto* (Figure supplémentaire 1)(Larose et al. soumis). Cet alignement de séquence a permis de révéler la présence de plusieurs éléments conservés. La région intergénique en amont de *TLC1* contient le snoARN snR161 et tel qu'attendu, puisque les snARN sont habituellement très bien conservés, cette région s'est avérée la plus conservée (Olivas et al. 1997; Torchet et al. 2005; Larose et al. soumis). L'extrémité 5' et l'élément caractéristique des snoARN, soit la boîte ACA retrouvée trois nucléotides

avant la fin 3', étaient d'ailleurs parfaitement conservés entre toutes les espèces (Figure supplémentaire 1)(Larose et al. soumis). Compte tenu du contexte de la région intergénique de *TLC1*, le promoteur de *TLC1* devrait se retrouver entre son extrémité 5' et l'extrémité 5' de snR161. En effectuant des délétions ciblées dans la région intergénique de *TLC1* et en utilisant un gène rapporteur *lacZ*, nous avons pu déterminer que tous les éléments importants requis pour réguler la transcription de *TLC1* se retrouvaient effectivement dans cette région, soit à l'intérieur des 242 pb en amont de l'extrémité 5' de *Tlc1* (Larose et al. soumis). Curieusement, la région contenant une partie de snR161 jusqu'à *PDX3* (région distale AF) avait également la capacité de soutenir la transcription de *TLC1* mais à des niveaux beaucoup plus faibles. Cette région contient probablement des séquences promotrices cryptiques pouvant être utilisées dans ce contexte précis mais nous n'avons pas investigué de façon plus approfondie cette avenue.

Puisque *TLC1* est transcrit par l'ARN polymérase II, nous avons cherché si des éléments du promoteur pol II se retrouvaient dans cette région (Chapon et al. 1997). Un élément majeur du promoteur pol II est la boîte TATA, c'est-à-dire une séquence TATAAA retrouvée habituellement entre 40 et 120 nt en amont du site d'initiation de la transcription (Hampsey 1998). La boîte TATA est liée par la protéine TBP (TATA-box binding protein), un facteur de transcription de base essentiel à l'initiation de la transcription (Smale et Kadonaga 2003). Même si cette séquence est généralement

conservée et se retrouve dans la majorité des promoteurs pol II, il a été démontré que TBP peut aussi lier des séquences riches en A/T (Hahn et al. 1989; Singer et al. 1990). En analysant attentivement la région promotrice de *TLC1*, nous n'avons pas réussi à identifier une boîte TATA canonique conservée parmi les différentes espèces de levures *sensu stricto*. Toutefois, une région conservée riche en A/T a été observée environ de -50 pb à -60 pb ainsi qu'une séquence TATA non conservée à environ -75 pb (Larose et al. soumis). Ces séquences pourraient ainsi servir de site de liaison à la protéine TBP. Néanmoins, lorsque la région contenant ces deux boîtes TATA potentielles est délétée ( $\Delta J$  -29 à -85), l'ARN *Tlc1* est quand même transcrit, suggérant ainsi que d'autres séquences pourraient aussi servir de site de liaison à TBP (Larose et al. soumis).

Malgré le fait qu'aucun élément caractéristique du promoteur pol II n'ait été clairement identifié, nous avons déterminé que la région promotrice de *TLC1* contient une région activatrice (UAS) et une région inhibitrice (URS) qui affectent la transcription de *TLC1*. En utilisant le système promoteur *CYC1*/rapporteur *lacZ*, nous avons pu déterminer que la région H (-144 à -242) du promoteur *TLC1* a la capacité d'inhiber la transcription du gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur *CYC1* tandis que la région I (-85 à -144) du promoteur de *TLC1* a la capacité d'activer la transcription dans ce même contexte (Figure 3)(Larose et al. soumis). Ces données pourraient expliquer pourquoi la délétion de la région I dans un contexte normal affecte la survie



de la cellule. Tout d'abord, en utilisant le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur *TLC1*, nous avons déterminé que la région HK soutient la transcription de LacZ, que la région IK soutient aussi la transcription de LacZ mais à un niveau plus élevé que le wt (confirmant les propriétés inhibitrices de la région H) tandis que la région JK n'est pas capable de soutenir la transcription de LacZ (Figure 3)(Larose et al. soumis). Globalement ces résultats suggèrent que lorsque la région activatrice I est déléetée, la région inhibitrice H se retrouve à proximité de la région JK réprimant la transcription et causant probablement le phénotype de sénescence observé.

Ayant déterminé certaines séquences pouvant inhiber ou activer la transcription de *Tlc1*, nous avons tenté d'identifier des facteurs pouvant lier ces séquences. Récemment, des criblages génétiques à grande échelle ont permis de démontrer que la délétion de nombreuses protéines, incluant entre autres plusieurs facteurs de transcription, affectait la taille des télomères (Askree et al. 2004; Gatbonton et al. 2006). Pour savoir si ces facteurs de transcription pouvaient potentiellement affecter l'expression de *Tlc1*, nous avons tout d'abord vérifié l'effet de la délétion de ces facteurs sur les niveaux d'expression de *Tlc1*. Curieusement, plusieurs facteurs de transcription affectant la taille des télomères identifiés dans ces deux études font partie du complexe SRB médiateur, un complexe impliqué tant au niveau de la répression que de l'activation de la transcription par la pol II (Hampsey 1998;

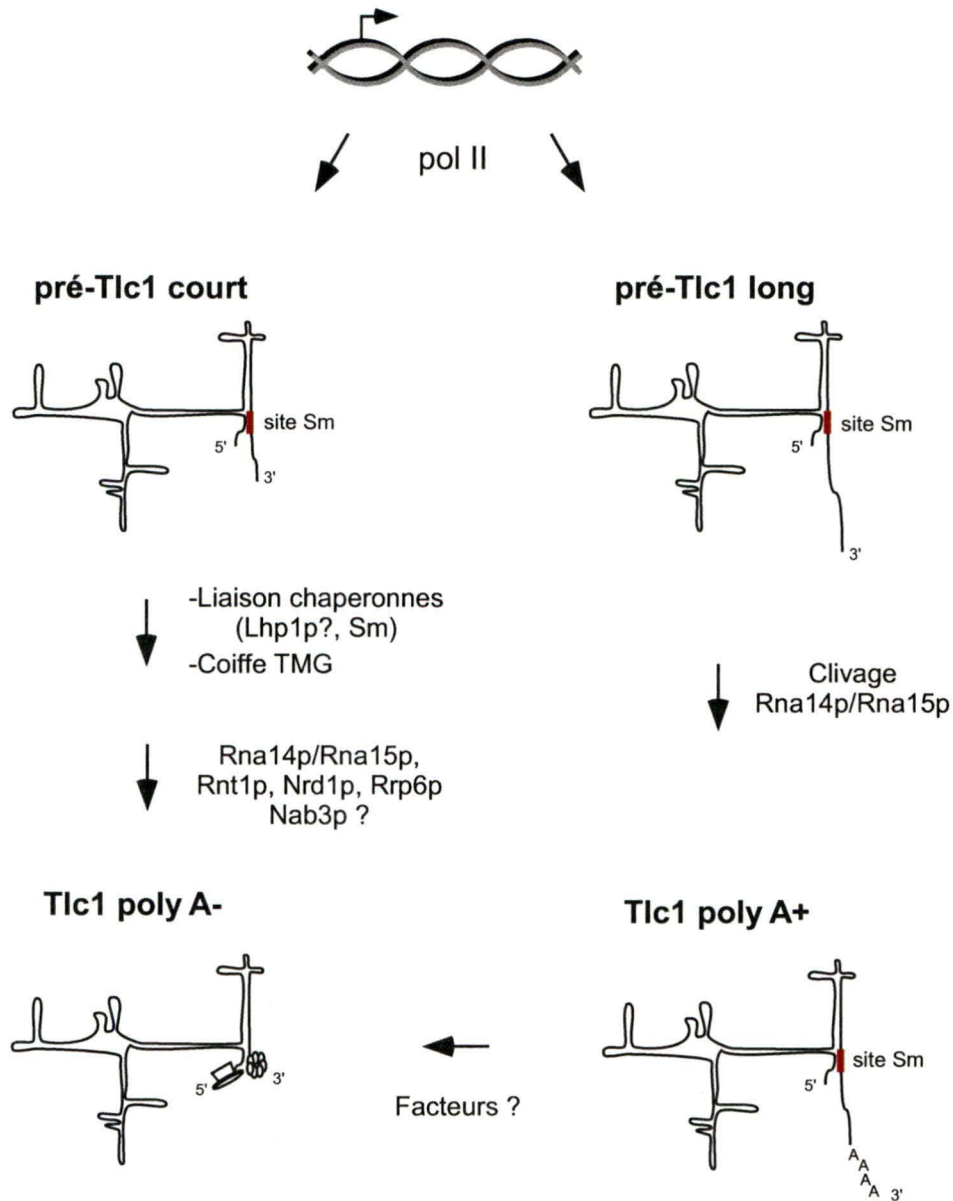
Askree et al. 2004; Gatbonton et al. 2006). Nous avons vérifié si Tlc1 était affecté par l'absence des protéines Srb8p, Srb9p et Srb11p faisant partie du complexe SRB médiateur, mais aucune différence n'a été observée (données non publiées, Larose S.). En analysant attentivement la région promotrice de Tlc1, une séquence CGCGAAA conservée parmi la majorité des espèces et similaire au site de liaison consensus des protéines Swi4p et Swi6p a pu être identifiée dans la région I, environ à -110 de l'extrémité 5' de Tlc1. Les protéines Swi4p/Swi6p et Mbp1p/Swi6p forment des complexes tous deux impliqués dans l'activation de la transcription durant la transition G1/S (Breedon 2003). Malgré le fait que Tlc1 ne semble pas être un ARN régulé durant le cycle cellulaire, une légère diminution de l'expression de Tlc1 est observée lorsque les cellules sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, suivie d'une légère augmentation lorsque les cellules entrent à nouveau dans le cycle cellulaire (données non publiées, Larose S.)(Chapon et al. 1997). Toutefois, en vérifiant l'expression de Tlc1 en absence des protéines Swi4p ou Swi6p, aucune différence n'a été observée pour une population cellulaire non synchronisée (données non publiées, Larose S.). Puisque les complexes Swi4p/Swi6p et Mbp1p/Swi6p peuvent être redondant au niveau de leur fonction, la délétion de chacune des protéines individuellement pourrait ne pas avoir d'effet (Breedon 2003). Des études plus approfondies, comme par exemple l'utilisation de doubles mutants ou de cellules synchronisées, seraient nécessaires pour déterminer si ces facteurs affectent l'expression de Tlc1.

## Étude de la biogénèse de l'ARN de la télomérase Tlc1.

L'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae* possède plusieurs caractéristiques des petits ARN nucléaires. Comme la majorité des snARN, Tlc1 est transcrit par la pol II, son extrémité 5' possède une coiffe TMG et les protéines Sm s'associent à son extrémité 3' via le site Sm (Chapon et al. 1997; Seto et al. 1999). Une étude précédente a suggéré que Tlc1 serait transcrit sous forme d'un précurseur polyadénylé qui subirait ensuite des étapes de maturation pour donner un ARN majeur non polyadénylé (Chapon et al. 1997). Cette maturation ressemblerait en partie à la maturation des snARN. Ces derniers sont habituellement transcrits sous forme de longs précurseurs qui subissent par la suite des étapes de clivage et de maturation (Will et Luhrmann 2001). Toutefois, contrairement à Tlc1, ces précurseurs sont normalement non polyadénylés (Will et Luhrmann 2001). Curieusement, même s'il a été proposé que le poly A+ serait un précurseur au poly A-, la forme polyadénylée de Tlc1 coexiste avec la forme non polyadénylée chez la levure (Chapon et al. 1997). De plus, la forme la plus abondante de Tlc1, soit la forme poly A-, serait la molécule mature présente dans le complexe télomérase actif (Bosoy et al. 2003). Dans le but de mieux comprendre la biogénèse de Tlc1, nous avons entamé l'étude de la formation de son extrémité 3' par des analyses en *cis* et en *trans*.

Contrairement aux mammifères, la formation de l'extrémité 3' des snARN chez la levure ne dépend pas de la région promotrice (Kiss 2004). En accord avec ces données, la formation de l'extrémité 3' de Tlc1 n'est pas affectée par la substitution de son promoteur avec un promoteur hétérologue ou par différentes mutations dans sa région promotrice (données non publiées Larose S.)(Larose et al. soumis). Une situation semblable est observée avec l'ARN de la télomérase humaine puisque cet ARN peut être transcrit à partir de différents promoteurs sans affecter la formation de son extrémité 3' (Fu et Collins 2003). L'extrémité 3' de Tlc1 avait précédemment été déterminée à deux endroits différents, soit 7-8 nt en aval du site Sm ou environ 90 nt en aval toujours du site Sm (Chapon et al. 1997; Bosoy et al. 2003). En utilisant une technique de protection à la RNase sur de l'ARN fractionné sur colonne oligo(dT) nous permettant de séparer le poly A- et le poly A+, nous avons pu confirmer l'existence des ces deux extrémités polyadénylées ou non. Plus précisément, nous avons déterminé que la forme poly A- se termine à 7-8 nt en aval du site Sm tandis que la forme poly A+ se termine environ à 90 nt en aval du site Sm (Larose et al. soumis). Pour mieux comprendre la relation existant entre la forme poly A+ et la forme poly A- de Tlc1, différentes cassettes ont été introduites entre ces deux extrémités dans le but de modifier ou d'empêcher la production de la forme poly A+. Suite à l'insertion d'une cassette contenant une portion de la séquence codante du gène *ACT1* et ne contenant pas de signaux de polyadénylation, aucune forme d'ARN Tlc1 polyadénylé n'a été détectée (Larose et al. soumis). Remarquablement,

l'extrémité 3' de la forme poly A- n'a pas été affectée par cette insertion. De plus, l'insertion d'un terminateur *ADH1* ou de mutations dans les signaux de polyadénylation proximaux n'ont pas affecté l'extrémité 3' de la forme mature (Larose et al. soumis). Toutefois, ces deux modifications ont provoqué l'utilisation de signaux de polyadénylation différents du contexte normal (Larose et al. soumis). Globalement, ces résultats suggèrent que la forme mature Tlc1 poly A- peut être produite indépendamment des séquences en aval du site Sm et plus particulièrement, sans la nécessité d'un précurseur polyadénylé. D'après nos résultats et selon des données précédentes, Tlc1 poly A- pourrait être produit à partir de deux voies de maturation différentes (Chapon et al. 1997; Larose et al. soumis). Voir Figure 18. Tlc1 pourrait être transcrit par la pol II sous forme de deux précurseurs différents, un se terminant à proximité du site Sm dans les séquences en amont des signaux de polyadénylation (pré-Tlc1 court) et une continuité de la transcription pourrait engendrer un autre précurseur se terminant en aval des signaux de polyadénylation (pré-Tlc1 long). Une situation semblable est observée avec le snARN U5. Dans un état stable, deux formes de U5 coexistent (U5S et U5L) et diffèrent par une extension observée à l'extrémité 3' (Patterson et Guthrie 1987). Dans ce cas-ci, la présence de ces deux formes courtes et longues serait due à une maturation alternative engendrée par différents clivages de l'endoribonucléase Rnt1p (Chanfreau et al. 1997). Concernant la maturation de Tlc1, le pré-Tlc1 court pourrait ensuite être lié par les protéines Sm et une maturation finale pourrait avoir lieu à son extrémité 3' impliquant



**Figure 18. Modèle de maturation des formes poly A- et poly A+ de l'ARN Tlc1.** Tlc1 pourrait être transcrit par la polymérase II sous forme de deux précurseurs différents, un se terminant dans les séquences en aval du site Sm mais en amont des signaux de polyadénylation (pré-Tlc1 court) et un autre précurseur se terminant en aval des signaux de polyadénylation (pré-Tlc1 long). Le pré-Tlc1 court serait ensuite lié par les protéines Sm et une maturation finale pourrait avoir lieu à son extrémité 3' impliquant divers facteurs, suivi de l'ajout d'une coiffe en 5'. Le pré-Tlc1 long pourrait de son côté être polyadénylé et pourrait à son tour subir diverses étapes de maturation en 3'. Une maturation alternative pourrait aussi avoir lieu de la forme poly A+ vers la forme poly A-. Voir texte pour une description plus détaillée.

divers facteurs, suivi de l'ajout d'une coiffe en 5'. Cette maturation ressemblerait beaucoup à la maturation de la forme courte de U5 (U5S) puisque l'extrémité 3' de U5S se termine très près du site Sm et il a été suggéré que la liaison des protéines Sm empêcherait la dégradation de cet ARN par les exonucléases (Chanfreau et al. 1997). Il a d'ailleurs été démontré que l'exosome était requis pour la maturation de U5 suite au clivage de Rnt1p (Allmang et al. 1999a). De plus, le site Sm serait seulement important pour l'accumulation de la forme poly A- de Tlc1 puisqu'une étude a démontré que la délétion du site Sm de Tlc1 abolit la formation de la forme poly A- mais non la forme poly A+ qui serait toujours présente (Seto et al. 1999). Cette étude a aussi démontré que la forme mature poly A- était préférentiellement enrichie suite à une immunoprécipitation avec des anticorps anti-TMG. De son côté, le pré-Tlc1 long pourrait subir diverses étapes de maturation en 3' (indépendantes du site Sm) menant éventuellement à la polyadénylation de son extrémité 3' dû à la présence des signaux de polyadénylation. Une maturation alternative de la forme poly A+ vers la forme poly A- pourrait aussi avoir lieu comme il a été suggéré précédemment (Chapon et al. 1997). Lorsque Tlc1 est sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose, l'induction de la transcription de ce gène produit un ARN majoritairement polyadénylé. Par contre, 1 heure après l'induction, on observe autant d'ARN poly A- que d'ARN poly A+, suggérant ainsi une relation précurseur-produit entre les deux formes de Tlc1 (Chapon et al. 1997). Deux voies de maturation pourraient donc être responsables de

la formation de l'ARN mature poly A- de Tlc1. La signification biologique de ces deux voies demeure toutefois nébuleuse. Malgré le fait que la forme poly A+ de Tlc1 coexiste avec la forme mature poly A-, nos résultats suggèrent que la forme poly A+ n'est pas essentielle puisque la levure est capable de maintenir ses télomères de façon stable (Larose et al. soumis). Remarquablement, deux récentes études rapportant l'identification et la caractérisation de l'ARN de la télomérase Ter1 chez *S. pombe* viennent appuyer le modèle décrit ci-haut (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). Tout comme Tlc1, deux formes de Ter1 ont aussi été identifiées : une forme plus courte, abondante, non polyadénylée et une forme plus longue, moins abondante, polyadénylée (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). L'extrémité 3' de la forme majeure se termine à proximité du site Sm et serait la forme retrouvée dans la fraction active de la télomérase (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). De plus, comparativement à la forme mineure poly A+, la forme majeure poly A- de Ter1 possède une coiffe TMG et le site Sm est essentiel à sa présence (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). Ces résultats suggèrent que la biogénèse de l'ARN de la télomérase serait conservée chez la levure. Par ailleurs, deux formes d'ARN ont également été détectées chez la levure de phylogénie plus distante *K. lactis* et chez les levures s'apparentant au groupe des *sensu stricto*, toutefois dans ce cas il n'a pas été démontré si ces formes étaient polyadénylées ou non (Chapon et al. 1997; Dandjinou et al. 2004). La forme poly A+ de l'ARN de la télomérase semble être conservée chez plusieurs levures par contre l'importance



fonctionnelle de cet polyadénylation n'est pas très claire. Par exemple, la forme poly A+ pourrait être utilisée comme voie alternative de production de la forme mature poly A-. Curieusement, la présence d'un signal de dimérisation a récemment été démontré chez la levure entre l'extrémité 3' de la forme poly A- et la forme poly A+ de Tlc1 (Gipson et al. 2007). Contrairement aux résultats suggérés par notre étude, des mutations dans le signal de dimérisation affectent la taille des télomères (Gipson et al. 2007). Dans ce cas-ci, ces mutations pourraient peut-être interférer avec la maturation de la forme mature poly A- de l'ARN; il aurait été intéressant pour les auteurs de cette étude de vérifier la présence de l'ARN Tlc1 de façon à pouvoir distinguer le poly A- et le poly A+.

Puisque nos résultats suggèrent que la forme mature poly A- de Tlc1 peut être produite indépendamment de la forme polyadénylée, nous avons voulu déterminer si des facteurs de maturation habituellement impliqués dans la formation 3' des snARN pouvaient affecter différemment les deux formes de Tlc1. La majorité des facteurs étudiés se retrouvent dans le schéma de la Figure 9, c'est-à-dire le modèle de maturation des snARN. Tel qu'attendu, la délétion/inactivation des exonucléases 5' → 3' Xrn1p et Rat1p n'a pas affectée la formation de l'extrémité 5' de Tlc1. Il a été démontré que ces exonucléases sont impliquées dans la maturation de l'extrémité 5' de certains snoARN et que suite à leur maturation, les snoARN perdent leur coiffe TMG (Chanfreau et al. 1998b; Lee et al. 2003a). De plus, il n'a jamais été

démontré que les snARN subissaient des étapes de maturation à leur extrémité 5' mais plutôt, que l'extrémité 5' serait directement le site d'initiation de la transcription (Ares 1986). Puisque la forme mature de Tlc1 possède une coiffe TMG, il aurait été étonnant que les exonucléases Xrn1p et Rat1p soient impliquées dans la formation de son extrémité 5'. Curieusement, une analyse d'extension d'amorce de l'extrémités 5' de Tlc1 a permis de révéler quelques extensions mineures en 5' (Figure 10). De plus, l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase Ter1 chez *S. pombe* semble aussi être hétérogène (Leonardi et al. 2008; Webb et Zakian 2008). Ces extrémités pourraient être différents sites d'initiation de la transcription et il serait intéressant de vérifier si les extensions se terminant avec un G possèdent une coiffe TMG. Concernant l'extrémité 3' de Tlc1, nos résultats suggèrent que certains facteurs de maturation pourraient affecter différemment les formes poly A+ et poly A- de Tlc1. Tel qu'attendu (puisque ces facteurs sont impliqués tant au niveau de la formation de l'extrémité 3' des ARNm que des sn/snoARN), l'inactivation des facteurs de clivage/polyadénylation Rna14p et Rna15p a causé une importante diminution de la forme poly A + de Tlc1 ainsi qu'une légère diminution de la forme poly A-. Par contre, aucune extension 3' de Tlc1 n'a été détectée suite à l'inactivation de ces facteurs comme observé avec d'autres sno/snARN (Figure 13) (Fatica et al. 2000; Morlando et al. 2002). D'ailleurs, les mêmes observations ont été faites suite à la délétion ou l'inactivation de certains facteurs impliqués dans la terminaison de la transcription ou dans la maturation de l'extrémité 3' (Figures 14, 15, 16).

Contrairement à ce que l'on aurait pu s'attendre, en absence des protéines Rnt1p, Nrd1p, Sen1p ou Rrp6p, aucune extension 3' n'a été détectée (Chanfreau et al. 1997; Abou Elela et Ares 1998; Allmang et al. 1999a; Steinmetz et al. 2001; Ursic et al. 2004). Par contre, la quantité d'ARN Tlc1 poly A- était augmentée en absence de Rnt1p comme démontré précédemment et encore plus en absence de Rnt1p-Nrd1p ou Rnt1p-Rrp6p (Larose et al. 2007). D'un autre côté, la simple inactivation des protéines Nrd1p ou Rrp6p n'a pas affecté la quantité de Tlc1. Curieusement, même si une augmentation de la quantité de Tlc1 est observée en absence de Rnt1p, aucune structure double brin coiffée par une tétraboucle NGNN n'a été observée à l'extrémité 3' de Tlc1 (Chanfreau et al. 2000). Comme il a été discuté précédemment, Rnt1p pourrait affecter Tlc1 en régulant son promoteur ou encore, via un clivage effectué à l'aide de protéines chaperonnes. De plus, une structure secondaire de type tige-tétraboucle (substrat de Rnt1p) pourrait être formée par des interactions entre certaines séquences éloignées à l'extrémité 3'.

Globalement, la forme poly A- de Tlc1 semble être affectée par la délétion/inactivation des protéines Rnt1p, Rna14p/Rna15p ainsi que par la double délétion/inactivation de Rnt1p-Nrd1p et Rnt1p-Rrp6p, tandis que la forme poly A+ semble être affectée par l'inactivation de Rna14p/Rna15p seulement. Nos résultats suggèrent donc qu'il pourrait y avoir une maturation alternative des formes poly A- et poly A+, ce qui est en accord avec les

résultats précédents démontrant que la forme poly A- peut être produite indépendamment de la forme poly A+ (Larose et al. soumis). Voir Figure 18. Une question soulevée par ces résultats est : pourquoi aucune extension n'est détectée en absence des facteurs de maturation Rnt1p, Nrd1p et Rrp6p? Une hypothèse pour expliquer ces résultats serait l'existence de plusieurs processus de maturation redondants. Par exemple, puisque le complexe exosome est formé par de multiples exonucléases 3' → 5', la délétion de Rrp6p serait masquée par d'autres exonucléases pouvant être responsables de la maturation de Tlc1 (Allmang et al. 1999b). De plus, puisque Tlc1 poly A- peut aussi être formé à partir du poly A+, cette voie de maturation alternative pourrait impliquer d'autres facteurs et mener quand même à la formation d'une extrémité mature. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser les effets de la délétion des facteurs de maturation mentionnés précédemment sur la maturation d'un ARN Tlc1 exclusivement poly A- (via l'utilisation du clone ayant la cassette *ACT1* insérée en 3'). Nous pourrions peut-être observer des extensions dans ces conditions. De plus, il serait intéressant de vérifier si la délétion des facteurs Nab3p ou Lhp1p affecte la formation de l'extrémité 3' de Tlc1. Il a été démontré que la protéine Nab3p interagit avec la protéine Nrd1p et que ces deux protéines lient des séquences spécifiques à l'extrémité 3' des pré-snARN pour empêcher la continuité de la transcription (Conrad et al. 2000; Steinmetz et al. 2001). Curieusement, des sites de liaison pour ces deux protéines se retrouvent en aval de l'extrémité 3' mature de Tlc1 soit : UCUU (Nab3p) et GUA(A/G)

(Nrd1p) (Carroll et al. 2004; Carroll et al. 2007). Il serait donc intéressant de vérifier si des mutations dans ces signaux de liaison affectent la formation de l'extrémité 3' de Tlc1. L'analyse des séquences en aval de l'extrémité 3' mature de Tlc1 a aussi révélé la présence de plusieurs résidus uracile, soit une caractéristique du site de liaison de la protéine La, l'homologue de Lhp1p chez l'humain (Stefano 1984). D'ailleurs, il a été suggéré que Lhp1p pourrait agir comme protéine chaperonne permettant de stabiliser l'extrémité 3' des pré-snARN pour ensuite faciliter la liaison des protéines Sm (Xue et al. 2000). Les protéines Nab3p et Lhp1p seraient donc deux candidats intéressants à tester au niveau de leur implication potentielle dans la formation de l'extrémité 3' de Tlc1. Nos résultats suggèrent donc que la maturation de l'extrémité 3' de Tlc1 est un processus complexe pouvant être effectué à partir de différentes voies de maturation plus ou moins redondantes et impliquant divers facteurs. D'autres analyses seront toutefois requises pour déterminer précisément la biogénèse de Tlc1.

## CONCLUSION

Mes travaux ont permis de révéler de nouveaux mécanismes contrôlant l'expression des sous-unités de la télomérase et influençant le maintien des télomères. Les résultats de cette étude suggèrent que l'activité de la télomérase serait régulée par une combinaison d'événements transcriptionnels et post-transcriptionnels. Il a été démontré que l'endoribonucléase Rnt1p régule négativement l'expression des sous-unités de la télomérase et est requise pour le maintien des télomères. En absence de Rnt1p ou en présence d'un mutant catalytique de Rnt1p, l'expression des sous-unités de la télomérase est augmentée. De plus, Rnt1p contribue à la dégradation de l'ARNm Est1 durant le cycle cellulaire (régulation post-transcriptionnelle) et pourrait aussi contribuer à la régulation de Tlc1 via son promoteur (régulation transcriptionnelle). Il serait intéressant de déterminer si les ARNm des autres composantes de la télomérase sont régulés de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle par Rnt1p. Les résultats de cette étude ont également démontré une régulation importante de la transcription de l'ARN Tlc1. Suite à une analyse détaillée de la région promotrice de Tlc1, des éléments ayant la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de Tlc1 ont été identifiés. Suite à l'identification de ces éléments, il serait maintenant intéressant de déterminer les facteurs pouvant lier ces régions et influençant l'expression de Tlc1. De plus, une analyse détaillée de la région 3' de Tlc1 a permis de caractériser une nouvelle voie de maturation de cet ARN, voie indépendante à la présence d'un précurseur polyadénylé comme

précédemment suggéré. Toutefois, plusieurs points restent encore à clarifier quant à la biogénèse de l'ARN de la télomérase comme par exemple : les facteurs impliqués dans la maturation de l'extrémité 3' ainsi que la signification biologique de la forme polyadénylé de Tlc1. Globalement, cette étude a permis de révéler différents niveaux de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la télomérase importants pour sa fonction et pour le maintien des télomères. Compte tenu des liens entre le cancer et une mauvaise régulation de la télomérase, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la télomérase pourront éventuellement aider à établir de meilleurs diagnostics et thérapies.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de recherche Sherif et Raymund pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire; leur rigueur scientifique est pour moi un exemple et m'a permis de faire avancer un projet de recherche stimulant au cours des dernières années. Mes remerciements vont aussi aux Drs Chantal Autexier, Eric Massé et Antonio Conconi pour avoir accepté de constituer le jury d'évaluation de ma thèse. Je tiens à remercier tous mes collègues de laboratoire présents et passés avec qui j'ai eu la chance de discuter science à maintes reprises. Un merci particulier à Mathieu Catala pour la correction scientifique de cette thèse. Merci aux secrétaires Carole et Sylvie pour leur aide si précieuse. Un très gros merci à ma famille pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études, merci aussi pour l'assistance grammaticale. Et enfin, merci David pour tes encouragements au quotidien et pour ton soutien moral qui a grandement contribué à parcourir cette étape, merci aussi pour la correction scientifique de cette thèse.



## RÉFÉRENCES

- Abou Elela, S. and Ares, M., Jr. 1998. Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J* **17**(13): 3738-3746.
- Abou Elela, S., Igel, H., and Ares, M., Jr. 1996. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* **85**(1): 115-124.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. 1999a. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**(19): 5399-5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. 1999b. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev* **13**(16): 2148-2158.
- Amberg, D.C., Goldstein, A.L., and Cole, C.N. 1992. Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* **6**(7): 1173-1189.
- Ammerer, G. 1983. Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol* **101**: 192-201.
- 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**(10): 3474-3487.
- Ares, M., Jr. 1986. U2 RNA from yeast is unexpectedly large and contains homology to vertebrate U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Cell* **47**(1): 49-59.
- Arneric, M. and Lingner, J. 2007. Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO Rep* **8**(11): 1080-1085.
- Askree, S.H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M., and McEachern, M.J. 2004. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8658-8663.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1997. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khorauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**(5851): 798-801.
- Barbour, L., Zhu, Y., and Xiao, W. 2000. Improving synthetic lethal screens by regulating the yeast centromere sequence [In Process Citation]. *Genome* **43**(5): 910-917.
- Beernink, H.T., Miller, K., Deshpande, A., Bucher, P., and Cooper, J.P. 2003. Telomere maintenance in fission yeast requires an Est1 ortholog. *Curr Biol* **13**(7): 575-580.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**(6818): 363-366.
- Berthiau, A.S., Yankulov, K., Bah, A., Revardel, E., Luciano, P., Wellinger, R.J., Geli, V., and Gilson, E. 2006. Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *EMBO J* **25**(4): 846-856.
- Bianchi, A. and Shore, D. 2007. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev* **21**(14): 1726-1730.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* **16**(7): 1785-1794.
- 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**(2): 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**(7): 1294-1303.
- 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**(1): 33-53.
- Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunencko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. 2001. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure (Camb)* **9**(12): 1225-1236.

- Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., and Lue, N.F. 2003. Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *J Biol Chem* **278**(6): 3882-3890.
- Boule, J.B., Vega, L.R., and Zakian, V.A. 2005. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* **438**(7064): 57-61.
- 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**(23): 4639-4648.
- Boulton, S.J. and Jackson, S.P. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* **17**(6): 1819-1828.
- 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**(2): 115-132.
- Bradshaw, P.S., Stavropoulos, D.J., and Meyn, M.S. 2005. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* **37**(2): 193-197.
- Breeden, L.L. 2003. Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr Biol* **13**(1): R31-38.
- 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**(11): 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**(17): 4240-4248.
- Buchman, A.R., Lue, N.F., and Kornberg, R.D. 1988. Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **8**(12): 5086-5099.
- Carmell, M.A. and Hannon, G.J. 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **11**(3): 214-218.
- Carroll, K.L., Ghirlando, R., Ames, J.M., and Corden, J.L. 2007. Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3 with RNA polymerase II terminator elements. *RNA* **13**(3): 361-373.

- Carroll, K.L., Pradhan, D.A., Granek, J.A., Clarke, N.D., and Corden, J.L. 2004. Identification of cis elements directing termination of yeast nonpolyadenylated snoRNA transcripts. *Mol Cell Biol* **24**(14): 6241-6252.
- Catala, M., Lamontagne, B., Larose, S., Ghazal, G., and Elela, S.A. 2004. Cell cycle-dependent nuclear localization of yeast RNase III is required for efficient cell division. *Mol Biol Cell* **15**(7): 3015-3030.
- Catala, M., Tremblay, M., Samson, E., Conconi, A., and Abou Elela, S. 2008. Deletion of Rnt1p Alters the Proportion of Open Versus Closed rDNA Repeats in Yeast. *Mol Cell Biol* **28**(2): 619-629.
- Cesare, A.J., Groff-Vindman, C., Compton, S.A., McEachern, M.J., and Griffith, J.D. 2008. Telomere loops and homologous recombination-dependent telomeric circles in a *Kluyveromyces lactis* telomere mutant strain. *Mol Cell Biol* **28**(1): 20-29.
- Chan, C.S. and Tye, B.K. 1983. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**(2): 563-573.
- Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. 2000. Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3142-3147.
- Chanfreau, G., Elela, S.A., Ares, M., Jr., and Guthrie, C. 1997. Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev* **11**(20): 2741-2751.
- Chanfreau, G., Legrain, P., and Jacquier, A. 1998b. Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J Mol Biol* **284**(4): 975-988.
- Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. 1998a. Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J* **17**(13): 3726-3737.
- Chang, M., Arneric, M., and Lingner, J. 2007. Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **21**(19): 2485-2494.
- Chapon, C., Cech, T.R., and Zaug, A.J. 1997. Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* **3**(11): 1337-1351.
- Chappell, A.S. and Lundblad, V. 2004. Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* **24**(17): 7720-7736.

- Chen, J.L., Blasco, M.A., and Greider, C.W. 2000. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**(5): 503-514.
- Cohn, M. and Blackburn, E.H. 1995. Telomerase in yeast. *Science* **269**(5222): 396-400.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**(2): 223-233.
- 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**(4): 739-750.
- Conrad, N.K., Wilson, S.M., Steinmetz, E.J., Patturajan, M., Brow, D.A., Swanson, M.S., and Corden, J.L. 2000. A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II. *Genetics* **154**(2): 557-571.
- 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. *Nature* **385**(6618): 744-747.
- 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**(17): 9202-9207.
- Court, D. 1993. *RNA processing and degradation by RNase III*. Academic Press, New York.
- Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R.M., Terns, M.P., and Lingner, J. 2007a. Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* **27**(6): 882-889.
- Cristofari, G., Sikora, K., and Lingner, J. 2007b. Telomerase unplugged. *ACS Chem Biol* **2**(3): 155-158.
- d'Adda di Fagagna, F., Teo, S.H., and Jackson, S.P. 2004. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**(15): 1781-1799.
- Dahlseid, J.N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M.J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M.R., and Berman, J. 2003. mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2**(1): 134-142.

- Dandjinou, A.T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Abou Elela, S., and Wellinger, R.J. 2004. A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* **14**(13): 1148-1158.
- Danin-Kreiselman, M., Lee, C.Y., and Chanfreau, G. 2003. RNase III-mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol Cell* **11**(5): 1279-1289.
- Das, B., Butler, J.S., and Sherman, F. 2003. Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5502-5515.
- 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**(21): 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**(6816): 109-113.
- de Lange, T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**(18): 2100-2110.
- 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**(7): 723-733.
- Doma, M.K. and Parker, R. 2007. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* **131**(4): 660-668.
- 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**(9): 3037-3048.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., and Reddel, R.R. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* **26**(4): 447-450.
- Engelke, D.R., Krikos, A., Bruck, M.E., and Ginsburg, D. 1990. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **191**(2): 396-400.
- Evans, S.K. and Lundblad, V. 1999. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**(5437): 117-120.
- Evans, S.K. and Lundblad, V. 2000. Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3357-3364.

- Fatica, A., Morlando, M., and Bozzoni, I. 2000. Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus. *EMBO J* **19**(22): 6218-6229.
- 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**(5228): 1236-1241.
- Ferreira, M.G., Miller, K.M., and Cooper, J.P. 2004. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* **13**(1): 7-18.
- Ferrezuelo, F., Steiner, B., Aldea, M., and Fitcher, B. 2002. Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Mol Cell Biol* **22**(17): 6046-6055.
- Fisher, T.S., Taggart, A.K., and Zakian, V.A. 2004. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1198-1205.
- Fisher, T.S. and Zakian, V.A. 2005. Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)* **4**(11): 1215-1226.
- Fourel, G., Revardel, E., Koering, C.E., and Gilson, E. 1999. Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J* **18**(9): 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**(21): 2863-2874.
- Friedman, K.L., Heit, J.J., Long, D.M., and Cech, T.R. 2003. N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol Biol Cell* **14**(1): 1-13.
- Fu, D. and Collins, K. 2003. Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. *Mol Cell* **11**(5): 1361-1372.
- Fu, D. and Collins, K. 2006. Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association. *Genes Dev* **20**(5): 531-536.
- Gan, J., Tropea, J.E., Austin, B.P., Court, D.L., Waugh, D.S., and Ji, X. 2006. Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell* **124**(2): 355-366.
- 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**(11): 6128-6138.

- Gatbonton, T., Imbesi, M., Nelson, M., Akey, J.M., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., Simon, J.A., and Bedalov, A. 2006. Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet* **2**(3): e35.
- Gaudin, C., Ghazal, G., Yoshizawa, S., Elela, S.A., and Fourmy, D. 2006. Structure of an AAGU tetraloop and its contribution to substrate selection by yeast RNase III. *J Mol Biol* **363**(2): 322-331.
- Ge, D., Lamontagne, B., and Elela, S.A. 2005. RNase III-Mediated Silencing of a Glucose-Dependent Repressor in Yeast. *Curr Biol* **15**(2): 140-145.
- Ghazal, G. and Elela, S.A. 2006. Characterization of the reactivity determinants of a novel hairpin substrate of yeast RNase III. *J Mol Biol* **363**(2): 332-344.
- Ghazal, G., Ge, D., Gervais-Bird, J., Gagnon, J., and Abou Elela, S. 2005. Genome-wide prediction and analysis of yeast RNase III-dependent snoRNA processing signals. *Mol Cell Biol* **25**(8): 2981-2994.
- Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., and Schmitt, M.E. 2004. RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol Cell Biol* **24**(3): 945-953.
- Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. 2001. Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease. *EMBO J* **20**(23): 6856-6865.
- Gipson, C.L., Xin, Z.T., Danzy, S.C., Parslow, T.G., and Ly, H. 2007. Functional characterization of yeast telomerase RNA dimerization. *J Biol Chem* **282**(26): 18857-18863.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**(4): 386-401.
- 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**(4): 751-762.
- Goudsouzian, L.K., Tuzon, C.T., and Zakian, V.A. 2006. *S. cerevisiae* Tellp and Mrellp are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association. *Mol Cell* **24**(4): 603-610.



- 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**(5): 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**(4): 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**(5364): 741-744.
- Greider, C.W. 1991. Telomerase is processive. *Mol Cell Biol* **11**(9): 4572-4580.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-413.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**(6): 887-898.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205): 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**(4): 503-514.
- Guarente, L. and Mason, T. 1983. Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**(4): 1279-1286.
- Guarente, L. and Ptashne, M. 1981. Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome *c* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(4): 2199-2203.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. 1991. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A., and Guarente, L. 1989. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5718-5722.
- Hampsey, M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 465-503.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**(5): 887-901.
- Hardy, C.F., Sussel, L., and Shore, D. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6**(5): 801-814.
- Hatfield, L., Beelman, C.A., Stevens, A., and Parker, R. 1996. Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**(10): 5830-5838.
- Hector, R.E., Shtofman, R.L., Ray, A., Chen, B.R., Nyun, T., Berkner, K.L., and Runge, K.W. 2007. Telp preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol Cell* **27**(5): 851-858.
- Henderson, E. 1995. Telomere DNA structure. In *Telomeres* (ed. E.H. Blackburn and C.W. Greider). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*: pp. 11-34.
- Henikoff, S. and Eghtedarzadeh, M.K. 1987. Conserved arrangement of nested genes at the *Drosophila* Gart locus. *Genetics* **117**(4): 711-725.
- Hieronimus, H. and Silver, P.A. 2004. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* **18**(23): 2845-2860.
- Hiley, S.L., Babak, T., and Hughes, T.R. 2005. Global analysis of yeast RNA processing identifies new targets of RNase III and uncovers a link between tRNA 5' end processing and tRNA splicing. *Nucleic Acids Res* **33**(9): 3048-3056.
- Horton, R.M., Ho, S.N., Pullen, J.K., Hunt, H.D., Cai, Z., and Pease, L.R. 1993. Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol* **217**: 270-279.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 529-539.
- 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**(22): 2807-2812.
- Hsu, M., McEachern, M.J., Dandjinou, A.T., Tzfati, Y., Orr, E., Blackburn, E.H., and Lue, N.F. 2007. Telomerase core components protect *Candida* telomeres from aberrant overhang accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11682-11687.

- Hug, N. and Lingner, J. 2006. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* **115**(6): 413-425.
- 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**(13): 809-812.
- Jacobsen, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. 1999. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**(23): 5231-5243.
- Jady, B.E., Bertrand, E., and Kiss, T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* **164**(5): 647-652.
- Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. 2006. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* **17**(2): 944-954.
- Johnson, A.W. 1997. Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol* **17**(10): 6122-6130.
- Kaminker, P.G., Kim, S.H., Taylor, R.D., Zebarjadian, Y., Funk, W.D., Morin, G.B., Yaswen, P., and Campisi, J. 2001. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* **276**(38): 35891-35899.
- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., and Lingner, J. 2002. Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci* **27**(11): 572-579.
- Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *EMBO J* **14**(14): 3572-3584.
- 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**(12): 2011-2019.
- Kim, S.H., Beausejour, C., Davalos, A.R., Kaminker, P., Heo, S.J., and Campisi, J. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* **279**(42): 43799-43804.
- Kipling, D. and Cooke, H.J. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**(6291): 400-402.

- Kironmai, K.M. and Muniyappa, K. 1997. Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **2**(7): 443-455.
- Kiss, T. 2004. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5949-5951.
- 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**(5): 3015-3019.
- Kuai, L., Das, B., and Sherman, F. 2005. A nuclear degradation pathway controls the abundance of normal mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13962-13967.
- Kufel, J., Allmang, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. 2000. Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5415-5424.
- Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* **5**(7): 909-917.
- 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**(11): 5159-5173.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**(5): 713-724.
- Lamontagne, B. and Abou Elela, S. 2001. *Purification and characterization of Saccharomyces cerevisiae Rnt1p nuclease*. Academic Press, San diego, CA.
- Lamontagne, B. and Abou Elela, S. 2007. Short RNA guides cleavage by eukaryotic RNase III. *PLoS ONE* **2**(5): e472.
- Lamontagne, B. and Elela, S.A. 2004. Evaluation of the RNA determinants for bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J Biol Chem* **279**(3): 2231-2241.
- Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Elela, S.A. 2003. Sequence dependence of substrate recognition and cleavage by yeast RNase III. *J Mol Biol* **327**(5): 985-1000.
- Lamontagne, B., Hannoush, R.N., Damha, M.J., and Abou Elela, S. 2004. Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic RNase III:

- discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast Rnt1p. *J Mol Biol* **338**(2): 401-418.
- Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., and Elela, S.A. 2001. The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* **3**(4): 71-78.
- Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. 2000. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1104-1115.
- Larose, S., Dandjinou, A.T., Abou Elela, S., and Wellinger, R.J. 2008. Identification of Sequence Elements Required for the Transcription and Polyadenylation of Yeast Telomeres RNA. *Soumis*.
- Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R.J., and Elela, S.A. 2007. RNase III-dependent Regulation of Yeast Telomerase. *J Biol Chem* **282**(7): 4373-4381.
- Larrivee, M., LeBel, C., and Wellinger, R.J. 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**(12): 1391-1396.
- 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**(1): 143-152.
- Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. 2001. Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p RNA processing. *EMBO J* **20**(24): 7250-7258.
- LeBel, C., Larrivee, M., Bah, A., Laterreur, N., Lvesque, N., and Wellinger, R.J. 2006. Assessing telomeric phenotypes. *Methods Mol Biol* **313**: 265-316.
- LeBel, C. and Wellinger, R.J. 2005. Telomeres: what's new at your end? *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2785-2788.
- Lee, A., Henras, A.K., and Chanfreau, G. 2005. Multiple RNA surveillance pathways limit aberrant expression of iron uptake mRNAs and prevent iron toxicity in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **19**(1): 39-51.
- Lee, C.Y., Lee, A., and Chanfreau, G. 2003a. The roles of endonucleolytic cleavage and exonucleolytic digestion in the 5'-end processing of *S. cerevisiae* box C/D snoRNAs. *RNA* **9**(11): 1362-1370.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. 2003b. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**(6956): 415-419.
- 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**(4): 1399-1412.
- Leonardi, J., Box, J.A., Bunch, J.T., and Baumann, P. 2008. TER1, the RNA subunit of fission yeast telomerase. *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 26-33.
- Levy, D.L. and Blackburn, E.H. 2004. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol Cell Biol* **24**(24): 10857-10867.
- Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. 2000. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**(5): 471-483.
- Lin, J. and Blackburn, E.H. 2004. Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes Dev* **18**(4): 387-396.
- Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T.G., and Blackburn, E.H. 2004. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14713-14718.
- 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**(24): 13760-13765.
- 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**(20): 10712-10717.
- 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**(21): 11190-11195.
- 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**(5312): 561-567.
- Liu, D., Safari, A., O'Connor, M.S., Chan, D.W., Laegeler, A., Qin, J., and Songyang, Z. 2004. PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**(7): 673-680.

- Livengood, A.J., Zaug, A.J., and Cech, T.R. 2002. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2366-2374.
- Loayza, D. and de Lange, T. 2004. Telomerase regulation at the telomere: a binary switch. *Cell* **117**(3): 279-280.
- Louis, E.J. and Haber, J.E. 1990. Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**(3): 547-559.
- Louis, E.J., Naumova, E.S., Lee, A., Naumov, G., and Haber, J.E. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* **136**(3): 789-802.
- Luche, R.M., Sumrada, R., and Cooper, T.G. 1990. A cis-acting element present in multiple genes serves as a repressor protein binding site for the yeast CAR1 gene. *Mol Cell Biol* **10**(8): 3884-3895.
- Lundblad, V. and Blackburn, E.H. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**(2): 347-360.
- Lundblad, V. and Szostak, J.W. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**(4): 633-643.
- Luo, W., Johnson, A.W., and Bentley, D.L. 2006. The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev* **20**(8): 954-965.
- Lustig, A.J., Kurtz, S., and Shore, D. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**(4980): 549-553.
- Lustig, A.J. and Petes, T.D. 1986. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(5): 1398-1402.
- Ly, H., Xu, L., Rivera, M.A., Parslow, T.G., and Blackburn, E.H. 2003. A role for a novel 'trans-pseudoknot' RNA-RNA interaction in the functional dimerization of human telomerase. *Genes Dev* **17**(9): 1078-1083.
- Lykke-Andersen, J., Aagaard, C., Semionenkova, M., and Garrett, R.A. 1997. Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution. *Trends Biochem Sci* **22**(9): 326-331.
- Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. 2004. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**(6989): 318-322.

- MacRae, I.J. and Doudna, J.A. 2007. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **17**(1): 138-145.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **311**(5758): 195-198.
- Marcand, S., Brevet, V., Mann, C., and Gilson, E. 2000. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* **10**(8): 487-490.
- Marcand, S., Gilson, E., and Shore, D. 1997. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**(5302): 986-990.
- Matera, A.G. and Shpargel, K.B. 2006. Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 317-324.
- McClintock, B. 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **25**: 405-416.
- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234-282.
- Meier, U.T. 2005. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma* **114**(1): 1-14.
- 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**(4): 785-795.
- Minvielle-Sebastia, L., Preker, P.J., and Keller, W. 1994. RNA14 and RNA15 proteins as components of a yeast pre-mRNA 3'-end processing factor. *Science* **266**(5191): 1702-1705.
- Minvielle-Sebastia, L., Winsor, B., Bonneaud, N., and Lacroute, F. 1991. Mutations in the yeast RNA14 and RNA15 genes result in an abnormal mRNA decay rate; sequence analysis reveals an RNA-binding domain in the RNA15 protein. *Mol Cell Biol* **11**(6): 3075-3087.
- Mitchell, J.R., Cheng, J., and Collins, K. 1999. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* **19**(1): 567-576.



- Mitchell, P. and Tollervey, D. 2000. mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **10**(2): 193-198.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**(19): 2257-2269.
- Morin, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**(3): 521-529.
- Morlando, M., Greco, P., Dichtl, B., Fatica, A., Keller, W., and Bozzoni, I. 2002. Functional analysis of yeast snoRNA and snRNA 3'-end formation mediated by uncoupling of cleavage and polyadenylation. *Mol Cell Biol* **22**(5): 1379-1389.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J., and Bordonne, R. 2002. Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol Cell* **9**(4): 891-901.
- 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)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6622-6626.
- Mozdy, A.D. and Cech, T.R. 2006. Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* **12**(9): 1721-1737.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **8**: 182-195, 198.
- Muller, T., Gilson, E., Schmidt, R., Giraldo, R., Sogo, J., Gross, H., and Gasser, S.M. 1994. Imaging the asymmetrical DNA bend induced by repressor activator protein 1 with scanning tunneling microscopy. *J Struct Biol* **113**(1): 1-12.
- Munholland, J.M., Kelly, J.K., and Wildeman, A.G. 1990. DNA sequences required for yeast actin gene transcription do not include conserved CCAAT motifs. *Nucleic Acids Res* **18**(20): 6061-6068.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M., and Lusty, C.J. 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**(3): 299-310.
- Nagel, R. and Ares, M., Jr. 2000. Substrate recognition by a eukaryotic RNase III: the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds RNA containing a 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA* **6**(8): 1142-1156.

- 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**(5328): 955-959.
- Nicholson, A.W. 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* **23**(3): 371-390.
- 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**(5285): 249-252.
- Nugent, C.I. and Lundblad, V. 1998. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* **12**(8): 1073-1085.
- Olivas, W.M., Muhlrad, D., and Parker, R. 1997. Analysis of the yeast genome: identification of new non-coding and small ORF-containing RNAs. *Nucleic Acids Res* **25**(22): 4619-4625.
- Olovnikov, A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**(1): 181-190.
- Opresko, P.L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kolvraa, S., May, A., Seidman, M.M., and Bohr, V.A. 2004. The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **14**(6): 763-774.
- Osterhage, J.L., Talley, J.M., and Friedman, K.L. 2006. Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* **13**(8): 720-728.
- Pannone, B.K., Xue, D., and Wolin, S.L. 1998. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *EMBO J* **17**(24): 7442-7453.
- Pardue, M.L. and DeBaryshe, P.G. 2003. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet* **37**: 485-511.
- Patterson, B. and Guthrie, C. 1987. An essential yeast snRNA with a U5-like domain is required for splicing in vivo. *Cell* **49**(5): 613-624.
- Pederson, T. 2004. Can telomerase be put in its place? *J Cell Biol* **164**(5): 637-639.
- Pennock, E., Buckley, K., and Lundblad, V. 2001. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**(3): 387-396.

- Perbal, B. 1988. *A Practical Guide to Molecular Cloning*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 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**(1): 64-67.
- Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., and Tollervey, D. 1998. Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Mol Cell Biol* **18**(3): 1181-1189.
- 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**(23): 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**(14): 831-834.
- 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**(4): 582-585.
- Prescott, J. and Blackburn, E.H. 1997a. Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* **11**(21): 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**(4): 528-540.
- Pryde, F.E., Gorham, H.C., and Louis, E.J. 1997. Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* **7**(6): 822-828.
- Pryde, F.E. and Louis, E.J. 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J* **18**(9): 2538-2550.
- 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**(14): 1777-1788.
- Qu, L.H., Henras, A., Lu, Y.J., Zhou, H., Zhou, W.X., Zhu, Y.Q., Zhao, J., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M., and Bachellerie, J.P. 1999. Seven novel methylation

- guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1144-1158.
- Rasmussen, T.P. and Culbertson, M.R. 1998. The putative nucleic acid helicase Sen1p is required for formation and stability of termini and for maximal rates of synthesis and levels of accumulation of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**(12): 6885-6896.
- 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**(1): 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**(7): 568-574.
- Robertson, H.D., Webster, R.E., and Zinder, N.D. 1968. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **243**(1): 82-91.
- Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. 1990. *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Rotondo, G. and Frendewey, D. 1996. Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2377-2386.
- Sabourin, M., Tuzon, C.T., and Zakian, V.A. 2007. Telomerase and Tellp preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **27**(4): 550-561.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A. 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* **10**(2): 228-236.
- 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**(1): 46-54.
- Schulz, V.P. and Zakian, V.A. 1994. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**(1): 145-155.
- Seipelt, R.L., Zheng, B., Asuru, A., and Rymond, B.C. 1999. U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids Res* **27**(2): 587-595.

- Seto, A.G., Livengood, A.J., Tzfati, Y., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. 2002. A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* **16**(21): 2800-2812.
- Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., and Cech, T.R. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**(6749): 177-180.
- Shampay, J. and Blackburn, E.H. 1988. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2): 534-538.
- Shampay, J., Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**(5973): 154-157.
- Shore, D. and Nasmyth, K. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**(5): 721-732.
- Singer, M.S. and Gottschling, D.E. 1994. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**(5184): 404-409.
- Singer, V.L., Wobbe, C.R., and Struhl, K. 1990. A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev* **4**(4): 636-645.
- Singh, S.M. and Lue, N.F. 2003. Ever shorter telomere 1 (EST1)-dependent reverse transcription by *Candida* telomerase in vitro: evidence in support of an activating function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5718-5723.
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* **72**: 449-479.
- Smith, S. and de Lange, T. 2000. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* **10**(20): 1299-1302.
- Smogorzewska, A. and de Lange, T. 2004. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208.
- 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**(8): 698-704.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**(12): 3273-3297.

- Stefano, J.E. 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* **36**(1): 145-154.
- Steinmetz, E.J. and Brow, D.A. 1996. Repression of gene expression by an exogenous sequence element acting in concert with a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein, Nrd1, and the putative helicase Sen1. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6993-7003.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. 2001. RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* **413**(6853): 327-331.
- 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**(1): 83-93.
- Taggart, A.K., Teng, S.C., and Zakian, V.A. 2002. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**(5583): 1023-1026.
- Taggart, A.K. and Zakian, V.A. 2003. Telomerase: what are the Est proteins doing? *Curr Opin Cell Biol* **15**(3): 275-280.
- Takata, H., Kanoh, Y., Gunge, N., Shirahige, K., and Matsuura, A. 2004. Reciprocal association of the budding yeast ATM-related proteins Tel1 and Mec1 with telomeres in vivo. *Mol Cell* **14**(4): 515-522.
- Takata, H., Tanaka, Y., and Matsuura, A. 2005. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **17**(4): 573-583.
- Teixeira, M.T., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. 2004. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states. *Cell* **117**(3): 323-335.
- Teixeira, M.T., Forstemann, K., Gasser, S.M., and Lingner, J. 2002. Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* **3**(7): 652-659.
- 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**(12): 8083-8093.
- Teo, S.H. and Jackson, S.P. 2001. Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast yku80 mutant. *EMBO Rep* **2**(3): 197-202.

- Theimer, C.A., Jady, B.E., Chim, N., Richard, P., Breece, K.E., Kiss, T., and Feigon, J. 2007. Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Mol Cell* **27**(6): 869-881.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**(4): 619-630.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-4680.
- Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. 2006. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* **17**(2): 955-965.
- Torchet, C., Badis, G., Devaux, F., Costanzo, G., Werner, M., and Jacquier, A. 2005. The complete set of H/ACA snoRNAs that guide rRNA pseudouridylations in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **11**(6): 928-938.
- Tremblay, A. 2002. Étude de la fonction de la RNase III eucaryote et identification de ses partenaires cellulaires dans un criblage double-hybrides. In *Department of Microbiology*. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Tremblay, A., Lamontagne, B., Catala, M., Yam, Y., Larose, S., Good, L., and Elela, S.A. 2002. A physical interaction between Gar1p and Rnt1p is required for the nuclear import of H/ACA small nucleolar RNA-associated proteins. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4792-4802.
- Ursic, D., Chinchilla, K., Finkel, J.S., and Culbertson, M.R. 2004. Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic Acids Res* **32**(8): 2441-2452.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. 2000. Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol* **20**(2): 441-452.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**(3): 401-413.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. 2005. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* **3**(6): e189.

- Vega, L.R., Phillips, J.A., Thornton, B.R., Benanti, J.A., Onigbanjo, M.T., Toczyski, D.P., and Zakian, V.A. 2007. Sensitivity of yeast strains with long G-tails to levels of telomere-bound telomerase. *PLoS Genet* **3**(6): e105.
- Vignais, M.L. and Sentenac, A. 1989. Asymmetric DNA bending induced by the yeast multifunctional factor TUF. *J Biol Chem* **264**(15): 8463-8466.
- 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**(24): 3094-3104.
- Vodenicharov, M.D. and Wellinger, R.J. 2006. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol Cell* **24**(1): 127-137.
- Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**(94): 197-201.
- Webb, C.J. and Zakian, V.A. 2008. Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA. *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 34-42.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J., and Zakian, V.A. 1993. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**(1): 51-60.
- Will, C.L. and Luhrmann, R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3): 290-301.
- 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**(6): 748-760.
- Wright, J.H., Gottschling, D.E., and Zakian, V.A. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* **6**(2): 197-210.
- Wright, J.H. and Zakian, V.A. 1995. Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**(9): 1454-1460.
- Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., and Shay, J.W. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**(21): 2801-2809.
- Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. 2004. Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8307-8312.



- Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J., and Crooke, S.T. 2000. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**(47): 36957-36965.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., Libri, D., and Jacquier, A. 2005. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* **121**(5): 725-737.
- Xue, D., Rubinson, D.A., Pannone, B.K., Yoo, C.J., and Wolin, S.L. 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *EMBO J* **19**(7): 1650-1660.
- Yang, D., Lu, H., and Erickson, J.W. 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in drosophila embryos [In Process Citation]. *Curr Biol* **10**(19): 1191-1200.
- Ye, J.Z., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., and de Lange, T. 2004a. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**(45): 47264-47271.
- Ye, J.Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T., and de Lange, T. 2004b. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**(14): 1649-1654.
- 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. *Nature* **344**(6262): 126-132.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**(1): 25-33.
- Zappulla, D.C. and Cech, T.R. 2004. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10024-10029.
- Zappulla, D.C., Goodrich, K., and Cech, T.R. 2005. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1072-1077.
- Zer, C. and Chanfreau, G. 2005. Regulation and surveillance of normal and 3'-extended forms of the yeast aci-reductone dioxygenase mRNA by RNase III cleavage and exonucleolytic degradation. *J Biol Chem* **280**(32): 28997-29003.

- Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., and de Lange, T. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol Cell Biol* **12**(11): 4834-4843.
- Zhou, D., Friendewey, D., and Lobo Ruppert, S.M. 1999. Pac1p, an RNase III homolog, is required for formation of the 3' end of U2 snRNA in *Schizosaccharomyces pombe* [In Process Citation]. *RNA* **5**(8): 1083-1098.
- Zhou, J., Hidaka, K., and Futcher, B. 2000a. The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Mol Cell Biol* **20**(6): 1947-1955.
- Zhou, J., Monson, E.K., Teng, S.C., Schulz, V.P., and Zakian, V.A. 2000b. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* **289**(5480): 771-774.
- Zhou, X.Z. and Lu, K.P. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107**(3): 347-359.
- Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H., and de Lange, T. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**(3): 347-352.
- Zhu, X.D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H., and de Lange, T. 2003. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* **12**(6): 1489-1498.
- Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. 2004. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell* **15**(1): 81-90.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3406-3415.