

Université de Sherbrooke

**Analyse de la régulation de l'homéostasie des télomères et de la chromatine dans le maintien de l'intégrité génomique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Par

**David Faucher**

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

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 2010

Liste des évaluateurs :

**Dr Daniel Durocher**, Département de génétique médicale et microbiologie  
Université de Toronto – Évaluateur externe

**Dr Luc Gaudreau**, Département de biologie  
Évaluateur interne

**Dr Antonio Conconi**, Département de microbiologie et d'infectiologie Évaluateur interne

**Dr Raymund Wellinger**, Département de microbiologie et d'infectiologie Évaluateur interne



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: 978-0-494-62829-4  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-62829-4

**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.

---

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.

**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.

---

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**

## RÉSUMÉ

Toute l'information génétique octroyant l'existence à une cellule est encodée par les milliards de paires de bases d'ADN retrouvées principalement à l'intérieur du noyau. Toutefois, pour des raisons d'espace et d'accessibilité, tout cet ADN est soumis à de nombreuses étapes de compaction en plus d'être fractionné dans le but de former ultimement les chromosomes. Malgré que l'extrême compaction de l'ADN permette la protection des acides nucléiques contre la dégradation, certaines structures demeurent vulnérables et nécessitent une protection toute particulière. C'est le cas de séquences se retrouvant à l'extrémité des chromosomes, les télomères. Les télomères sont constitués de répétitions en tandem d'ADN non codant associées avec de nombreuses protéines spécialisées permettant une protection efficace contre la perte d'informations génétiques dû à la dégradation enzymatique ou à l'érosion naturelle. Ces structures télomériques sont normalement maintenues par une machinerie spécialisée, la télomérase, qui composée d'une sous unité ARN et de partenaires protéiques permet l'ajout de séquences télomériques spécifiquement aux extrémités. Cet enzyme essentielle est régulée par de nombreuses protéines et parmi celles-ci, de nombreuses observations font état du rôle essentiel joué par deux protéines kinases, les protéines Tel1p et Mec1p. Ces kinases occupent une double fonction; elles sont importantes pour la régulation de la taille des télomères, mais sont également au cœur de la réponse cellulaire face aux dommages à l'ADN. Étant donné la nature des télomères, soit des

extrémités d'ADN libres, ceux-ci sont identiques en de nombreux points aux cassures double brins d'ADN expliquant probablement la double implication de ces protéines.

Durant mes études, je me suis particulièrement intéressé à la double fonction jouée par les kinases Tel1p et Mec1p au niveau des télomères et du processus de réponse aux dommages à l'ADN. Dans un premier temps, avec l'aide d'un collègue j'ai pu démontrer l'étendue des fonctions télomériques et de réponses aux dommages à l'ADN jouées par Tel1p via l'isolation et la caractérisation d'un allèle de séparation de fonctions. Dans un deuxième temps, en poursuivant mes analyses génétiques sur la kinase Tel1p, j'ai pu déterminer que cette protéine possédait des fonctions indépendantes à celles octroyées par son domaine kinase, observation allant à l'encontre de l'idée générale que Tel1p sans fonction kinase opérationnelle simulait un allèle nul. Dans la même ligne de pensée, mes études ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de régulation de la télomérase essentiel joué par les kinases Mec1p et Tel1p.

En parallèle, je me suis intéressé aux mécanismes cellulaires permettant une régulation de l'enroulement global de l'ADN permettant son accessibilité à toutes les machineries cellulaires de transcription, de réparation et de réplication de l'ADN. Mes travaux ont permis d'identifier qu'une modification des histones, protéines critiques dans le processus de compaction de l'ADN, était extrêmement importante dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN. En effet la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 permet à la cellule de pouvoir efficacement réparer les dommages via la

réparation de bout non-homologue et permettait de stabiliser les fourches de réplifications soumises à un stress cellulaire.

Globalement mes résultats m'ont permis de mieux comprendre deux moyens distincts utilisés par les cellules pour maintenir l'intégrité de leur génome : les rôles joués par les kinases Tel1p et Mec1p aux télomères et dans la réparation des dommages à l'ADN, ainsi que l'implication de la modification d'histone H3K4me3 dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN.

**Mots clés :**

- Télomères
- Télomérase
- Kinase Tel1p
- Cassures doubles brins
- Chromatine
- Histones
- Modifications d'histones
- H3k4me3

## **LISTE DES ÉVALUATEURS**

**Dr Daniel Durocher**

Évaluateur externe à l'université

Professeur associé, Département de génétique  
médicale et microbiologie, Samuel Lunenfeld  
Research Institute, MSH, Université de Toronto

**Dr Luc Gaudreau**

Évaluateur externe au programme

Professeur titulaire, Département de biologie,  
Université de Sherbrooke

**Dr Antonio Conconi**

Président et responsable du programme

Professeur agrégé, Département de microbiologie  
et d'infectiologie, Université de Sherbrooke

**Dr Raymund Wellinger**

Directeur de thèse

Professeur titulaire, Département de microbiologie  
et d'infectiologie, Université de Sherbrooke

**Un brave général ne se rend jamais,  
même à l'évidence.**

Jean Cocteau

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTES DES FIGURES.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1. Les télomères.....	1
1.1 ADN et protéines télomériques.....	1
1.2 La télomérase et sa régulation .....	7
1.3 Les membres de la famille des kinases PI3K.....	12
1.4 Conséquences de l'absence de télomères fonctionnels .....	17
2. Principaux mécanismes de réparation de l'ADN .....	19
2.1 La ligation de bouts non homologues.....	20
2.2 La recombinaison homologue.....	22
3. La chromatine .....	26
3.1 Les histones et le nucléosome .....	28
3.2 Les modifications post-traductionnelles.....	29
3.2.1 La méthylation .....	29
3.2.2 L'ubiquitination.....	32
3.2.3 La phosphorylation .....	33
3.2.4 Les autres modifications .....	34
3.3 Le remodelage.....	36
3.3.1 Famille SWI/SNF.....	36
3.3.2 Famille Ino80/SWR.....	37
3.3.3 Familles ISWI et CHD.....	38
4. Plan de la thèse.....	39
<b>CHAPITRE I .....</b>	<b>40</b>
Avant-propos .....	40
Résumé .....	41



<b>CHAPITRE II</b> .....	<b>92</b>
Résumé .....	92
Matériel et méthodes.....	93
Résultats .....	96
<b>CHAPITRE III</b> .....	<b>111</b>
Avant-propos .....	111
Résumé .....	112
<b>CHAPITRE IV</b> .....	<b>181</b>
Résumé .....	181
Matériel et Méthodes.....	182
Résultats .....	184
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>188</b>
Fonctions de Tel1p dans le maintien de l'intégrité du génome.....	188
Rôles des kinases de la famille PI3 dans l'homéostasie des télomères. ....	192
Caractérisation de l'implication de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans le processus de traitement des dommages à l'ADN. ....	206
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>212</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>216</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>218</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Représentation schématique de l'extrémité d'un chromosome chez la levure du boulanger.....	3
Figure 2 :	Protéines liant l'extrémité des chromosomes de <i>S. cerevisiae</i> .....	7
Figure 3 :	Mécanismes de régulation de la télomérase.....	11
Figure 4 :	Principaux domaines protéiques des kinases Mec1p et Tel1p.....	14
Figure 5 :	Représentation schématique des télomères des survivants ne possédant pas de télomérase.....	19
Figure 6 :	Divers produits de réparation d'une cassure doubles brins via la ligation de bouts non homologues (NHEJ).....	21
Figure 7 :	Principales étapes de la réparation d'une cassure doubles brins par la recombinaison homologue.....	24
Figure 8 :	Divers degrés de compaction de l'ADN.....	27
Tableau 2-1 :	Souches utilisées dans cette étude.....	94
Tableau 2-2 :	Plasmides utilisés lors de cette étude.....	97
Figure 2-1 :	Analyse de la sénescence des divers mutants <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	98
Figure 2-2 :	Analyse des fragments de restrictions télomériques des cellules sénescents contenant seulement l'allèle kinase inactivée de <i>TEL1</i> comme source de kinases PI3.....	100

Figure 2-3 :	Croissance des cellules suite à la réintroduction des plasmides <i>tel1kd</i> provenant de cellules stabilisées suite à la première crise.....	102
Figure 2-4 :	Analyse des fragments de restrictions télomériques des cellules <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	104
Figure 2-5 :	Visualisation des deux mécanismes de régulation hypothétiques de Tel1p et Mec1p.....	106
Figure 2-6 :	Analyse de la sénescence des cellules <i>mec1Δ tel1Δ</i> en absence de régulateurs négatifs des télomères.....	108
Figure 2-7 :	Analyse de l'importance de la présence de la télomérase dans la survie des cellules <i>mec1Δ tel1Δ pif1Δ</i> .....	110
Tableau 4-1 :	Souches utilisées dans cette étude.....	183
Figure 4-1 :	Sensibilité des cellules n'ayant pas l'histone H2AZ ou le complexe SWR1 servant à l'incorporation de cette variante d'histone dans les nucléosomes en absence de <i>RAD50</i> .....	185
Figure 4-2 :	Les cellules n'ayant pas <i>CTK1</i> et <i>SET1</i> en absence de la recombinaison homologue démontrent une sensibilité aux dommages à l'ADN synergétique.....	186
Figure 4-3 :	L'absence de <i>SET2</i> , gène impliqué dans l'étape d'élongation du transcrit d'ARN par la RNAPII, n'augmente pas la sensibilité des cellules <i>rad50Δ</i> .....	187
Figure 9 :	Modèle de régulation de l'accessibilité de la télomérase versus l'hélicase Pif1p et les kinases Tel1p et Mec1p.....	200

## ABRÉVIATIONS

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
C	cytosine
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
CST	complexe formé des protéines Cdc13p-Stn1p-Ten1p
CTD	Domaine C-Terminal de la sous-unité Rpb1 de la RNAPII
C-terminal	carboxy terminal
G	guanine
H2BK123ub	Mono-ubiquitination de l'histone H2B sur la lysine 123
H3K4me3	Tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4
H3K9	Histone H3 lysine 9
H3K36	Histone H3 lysine 36
H3K79me3	Tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 79
HR	Recombinaison homologue
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
MRX	Complexe formé des protéines Mre11p-Rad50p-Xrs2p
NHEJ	Ligation de bouts non homologues
nm	nano mètre

nt	nucléotides
N-terminal	amino terminal
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PI3K	kinase phosphatidyl-3-Inositol
RNAPII	ARN polymérase II
sb	simple brin
T	thymine
<i>tel1kd</i>	allèle kinase inactivée de <i>TEL1</i>
TRF	fragment terminal de restriction
WT	type sauvage

## INTRODUCTION

### 1. Les télomères

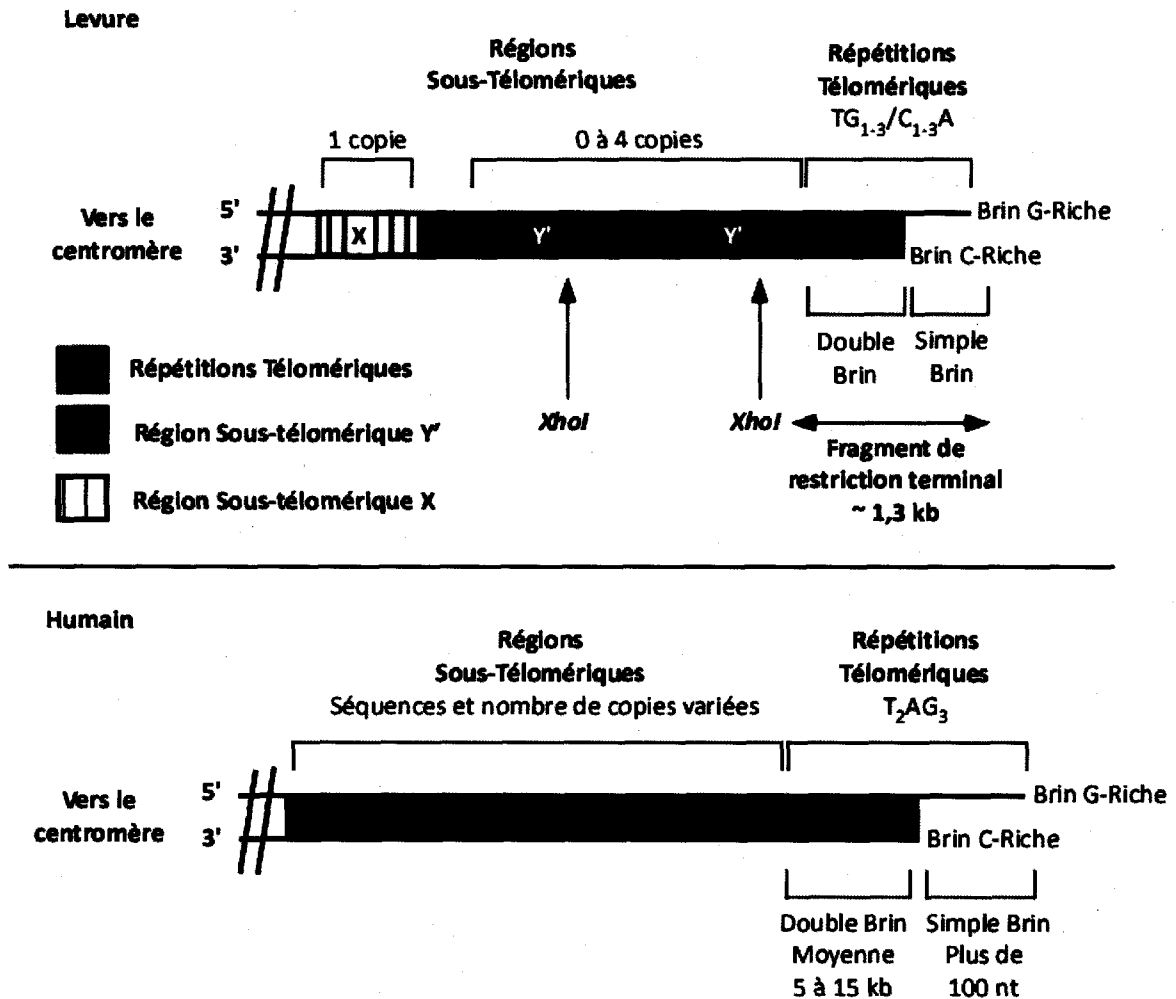
Le 5 octobre 2009, l'importance des travaux de recherche effectués par les Drs Jack Szostak, Elizabeth Blackburn et Carol Greider a été soulignée par la remise du prix le plus prestigieux remis aux scientifiques, soit le Prix Nobel de la Médecine 2009. Cette reconnaissance souligne des travaux et découvertes ayant eu un impact majeur sur la société. Ces trois chercheurs ont continué le travail amorcé par les Drs Muller et McClintock il y a plus de 75 ans (et perpétué par bon nombre de leurs collègues passés et présents), soit la caractérisation des structures terminales des chromosomes linéaires d'eucaryotes, les télomères (MULLER, 1938; MCCLINTOCK, 1939; SZOSTAK et BLACKBURN, 1982; GREIDER et BLACKBURN, 1985; GREIDER et BLACKBURN, 1987). Le travail de pionniers, entre autres, des laboratoires Blackburn et Szostak a permis de mieux comprendre les rôles cruciaux joués par les télomères dans la protection des chromosomes contre la dégradation nucléoprotéique et contre les fusions bout à bout et la recombinaison aberrante menant à l'instabilité génomique. Bref, le rôle majeur des télomères (entre autres par l'activité de la télomérase) est d'assurer l'intégrité de l'information génétique d'une cellule au fil des générations.

#### 1.1 ADN et protéines télomériques

Les télomères sont des structures retrouvées à l'extrémité des chromosomes eucaryotes et sont constitués de courtes séquences d'ADN répétées en tandem

associées à des protéines spécifiques (HENDERSON, 1995). Ces structures sont retrouvées chez la totalité des êtres vivants ayant des chromosomes linéaires. Les mécanismes de maintenance et la structure de ces répétitions télomériques sont à bien des égards identiques d'un organisme à l'autre. En raison de la conservation de nombreux gènes et des mécanismes moléculaires entre l'humain et la levure, en plus de l'étendue des analyses génétiques et biochimiques possibles avec ce dernier organisme, mon laboratoire d'accueil s'est tourné vers celui-ci. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, dont il sera question pour l'ensemble de cette thèse, les répétitions d'ADN télomériques ont comme séquence  $TG_{2-3}(TG)_{1-6}$ , ou sous forme abrégée  $TG_{1-3}/C_{1-3}A$  caractérisant les brins 5' et 3' respectivement. Chez les cellules de type sauvage cette séquence est répétée une centaine de fois environ à l'extrémité de chaque chromosome de manière à constituer les 300 paires de bases composant les télomères (SHAMPAY *et al.*, 1984). Cet ADN télomérique est en grande majorité sous forme double brins mis à part l'extrémité 3' saillante (le brin G-Riche). En direction du centromère et juxtaposées aux séquences télomériques sont retrouvées les deux principales séquences sous-télomériques soit les séquences Y' et X (CHAN et TYE, 1983). Les séquences Y' de 5,2 kb et 6,7 kb de longueur peuvent être présentes de 1 à 4 copies sur les deux tiers des télomères tandis que les séquences X de taille variant de 0,3 kb à 3,7 kb sont présentes sur la totalité des télomères. Des séquences télomériques sont souvent retrouvées entre deux éléments Y' et également entre les éléments Y' et X (WALMSLEY *et al.*, 1984). Jusqu'à maintenant, il n'y a pas de rôle précis joué par ces répétitions sous-télomériques mis à part l'observation d'amplification des séquences Y' lors de la maintenance des

télomères par recombinaison en absence de la télomérase (LOUIS et HABER, 1990; LUNDBLAD et BLACKBURN, 1993).



**Figure 1. Représentation schématique de l'extrémité d'un chromosome chez la levure du boulanger.** De chaque côté d'un chromosome se retrouvent les télomères composés de répétitions  $TG_{1.3}/C_{1.3}A$ . Sur le brin 5' du télomère se retrouve l'extension simple brin G-riche. De plus, en partant de ces séquences télomériques et en direction du centromère, il y a présence des régions sous-télomériques composées de une ou plusieurs régions Y' et de la région X dépendamment du chromosomes. L'enzyme de restriction *XhoI* clive dans la région Y', libérant un fragment d'environ 1300 nucléotides visible par buvardage de type Southern. Un télomère humain sert de comparaison avec celui de levure. Note: La figure n'est pas à l'échelle.

Cet aspect sera traité plus loin à la section 1.2. La figure 1 représente la structure des télomères de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la compare avec celle des humains.



Les séquences télomériques et sous-télomériques sont liées par des protéines spécifiques assurant la protection de l'ADN contre la dégradation par les nucléases, aidant à la formation de structure chromatinienne des télomères et favorisant le recrutement de la télomérase.

La protéine essentielle Cdc13p est le facteur de protection majeure du simple brin G-riche des télomères et forme avec les protéines Stn1p et Ten1p le complexe CST (VODENICHAROV et WELLINGER, 2007). Ce complexe empêche l'attaque du simple brin par les nombreuses nucléases, illustré par l'importante dégradation observée en absence d'un complexe CST fonctionnel (GARVIK *et al.*, 1995; GRANDIN *et al.*, 1997; VODENICHAROV et WELLINGER, 2006). De plus, il a été démontré que Cdc13p assurerait le recrutement de la télomérase, aspect qui sera traité plus loin (Section 1.2).

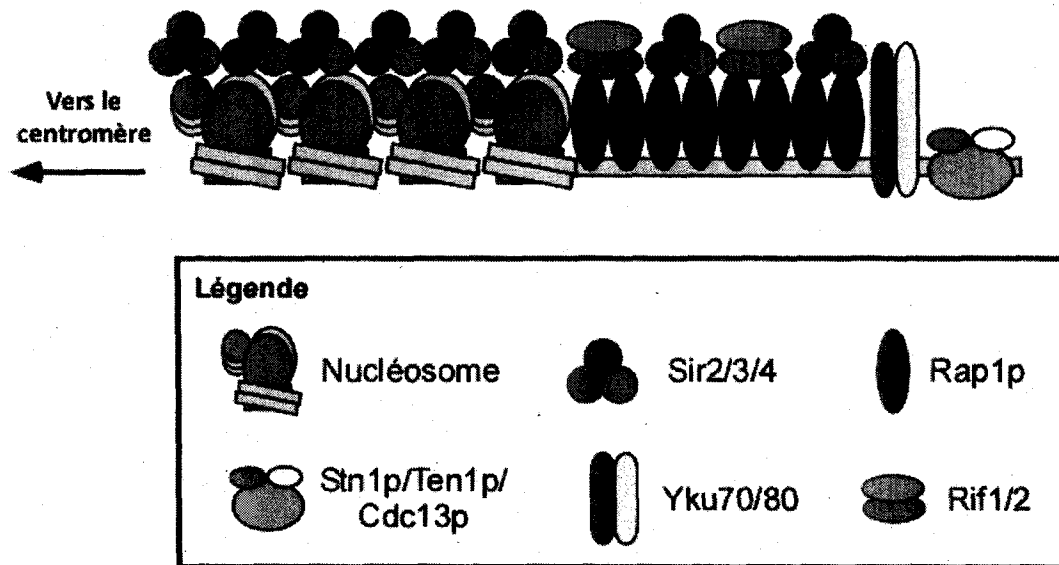
Tout comme Cdc13p, l'hétérodimère Ku70p/Ku80p joue également un rôle majeur dans la protection des télomères et dans le recrutement de la télomérase. En effet, la délétion d'un des membres de ce complexe provoque un raccourcissement marqué des télomères et l'apparition de longues extensions simple-brin G-Riche (GRAVEL *et al.*, 1998). Ce complexe joue également un rôle au niveau du processus de réparation des cassures doubles brins en les liant. En étant recruté à ce site, l'hétérodimère Ku protégerait les extrémités libres d'ADN contre une dégradation des exonucléases en plus de permettre le recrutement de la machinerie de la ligation de

bouts non homologues (NHEJ) (FEATHERSTONE et JACKSON, 1999). De plus, les travaux du laboratoire du Dr Daniel Gottschling ont démontré que le complexe Ku lie spécifiquement une tige-boucle de l'ARN Tlc1 permettant le recrutement de la télomérase (PETERSON *et al.*, 2001; STELLWAGEN *et al.*, 2003).

Le complexe MRX composé des protéines Mre11p, Rad50p et Xrs2p joue également un rôle majeur dans l'homéostasie des télomères. En effet, leur délétion provoque une diminution marquée de la taille des télomères (KIRONMAI et MUNIYAPPA, 1997).

Finalement, les répétitions télomériques sont également liées par le complexe Rap1 regroupant les protéines Rif1p, Rif2p et la protéine essentielle Rap1p. Il est proposé que ces protéines formeraient la base d'une structure chromatine télomérique appelée télosome et remplaceraient les nucléosomes retrouvés ailleurs dans le génome (WRIGHT *et al.*, 1992; GRUNSTEIN, 1998). Au cœur du télosome se retrouve la protéine essentielle Rap1p qui joue un rôle de protection du duplex télomérique, mais également au niveau de la régulation de la transcription pour de nombreux gènes (GILSON *et al.*, 1993; SHORE, 1994; SHORE, 1997). Les protéines Rif1p et Rif2p ne lient pas directement les télomères mais plutôt la protéine Rap1p (HARDY *et al.*, 1992; WOTTON et SHORE, 1997). L'absence de ces trois protéines soit par l'utilisation de mutants conditionnels ou des mutants de délétion a pour effet de provoquer un rallongement des télomères, d'où la qualification de ces protéines comme étant des régulateurs négatifs de la télomérase

(CONRAD *et al.*, 1990; LUSTIG *et al.*, 1990; HARDY *et al.*, 1992; WOTTON et SHORE, 1997). Le mécanisme d'action expliquant cette inhibition de la télomérase sera traité à la section 1.2. De plus, l'hétérotriplexe des protéines Sir (Sir2p, Sir3p et Sir4p)(SIR = Silent Information Regulator) est lié aux protéines Rap1p. Ces protéines sont importantes pour l'établissement de l'hétérochromatine télomérique (MORETTI *et al.*, 1994; STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). De plus, certaines observations laisseraient penser que ces protéines pourraient être impliquées dans le repliement des télomères de la levure *S. cerevisiae* sur eux-mêmes de manière à former une structure similaire au « T-loop » retrouvé chez les cellules humaines (GRIFFITH *et al.*, 1999) (GRUNSTEIN, 1997; PRYDE et LOUIS, 1999). Chez l'humain, la formation d'une telle structure nécessite de longues extensions simple brins 3' ainsi que la séquence répétée T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>, soit deux conditions non présentes chez la levure du boulanger (STANSEL *et al.*, 2001). Toutefois, un repliement de la chromatine télomérique au lieu d'une invasion du simple brin télomérique semblerait possible. Dans un premier temps, le groupe de Grunstein a proposé un repliement des télomères via 1) les protéines Sir liées aux télomères via leur interaction avec les protéines Rap1p et 2) les protéines Sir liant les histones situées distalement (GRUNSTEIN, 1997). Dans un deuxième temps, le groupe de Louis a proposé une interaction entre le complexe protéique Rap1p/Sir1p/Sir2p/Sir3p localisé aux télomères et des protéines liant les régions sous-télomériques X (PRYDE et LOUIS, 1999). Toutefois, le débat est toujours actif sur la présence, la nature ainsi que la fonction d'une telle structure. La figure 2 démontre la structure protéique télomérique actuellement proposée.



**Figure 2. Protéines liant l'extrémité des chromosomes de *S. cerevisiae*.** L'ADN télomérique est lié par de nombreuses protéines en fonction de la nature des séquences d'ADN. Le simple brin télomérique est lié par le complexe CST. Le duplex télomérique est lié par l'hétéroduplexe Yku ainsi que par les protéines Rap1p (elles-mêmes liées par les Rif et les Sir). Finalement, en direction du centromère se retrouvent les derniers nucléosomes étant eux-même liés par le complexe Sir. Liant également les télomères, mais non indiquées sur ce schéma, la protéine Tel1p, le complexe MRX ainsi que le complexe KEOPS.

## 1.2 La télomérase et sa régulation

Dans les années suivant la découverte des séquences télomériques de nombreux criblages génétiques ont permis la découverte de protéines essentielles pour la maintenance des télomères. Dans ces criblages, en sélectionnant les mutants qui démontraient un phénotype de sénescence dû à l'effritement et à la dégradation des séquences télomériques, les principales protéines formant et régulant la télomérase ainsi que celles assurant la protection des télomères furent découvertes (GREIDER et BLACKBURN, 1985; LUNDBLAD et SZOSTAK, 1989; SINGER et GOTTSCHLING, 1994;

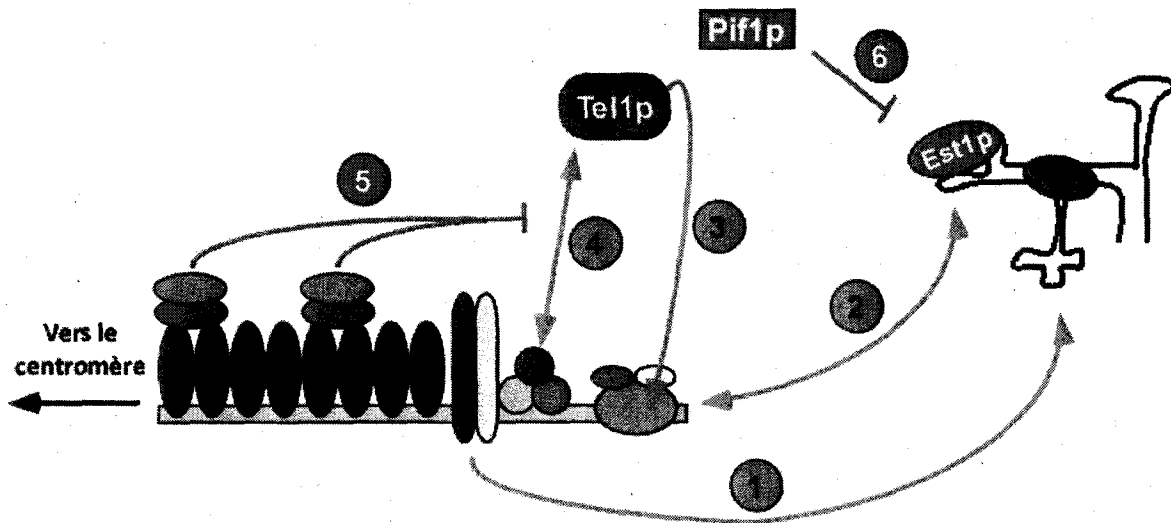
LENDVAY *et al.*, 1996). La télomérase chez la levure du boulanger est formée des protéines Est1p ayant un rôle de recrutement, Est2p étant la sous-unité catalytique, Est3p ayant un rôle de régulation et de la sous-unité matrice ARN Tlc1 (NUGENT et LUNDBLAD, 1998; MCEACHERN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2008). Toutes ces composantes (Est1p, Est2p, Est3p et Tlc1) sont essentielles pour permettre une activité télomérase *in vivo*, la délétion de chacune de ses sous-unités provoquant une sénescence cellulaire après environ 60 générations (LUNDBLAD et SZOSTAK, 1989; SINGER et GOTTSCHLING, 1994; LENDVAY *et al.*, 1996). Fait à noter, il est toutefois possible d'obtenir de l'activité télomérase *in vitro* par l'utilisation seulement de la composante ARN et de la sous-unité reverse transcriptase de la télomérase (LINGNER *et al.*, 1997). D'autres protéines sont également considérées comme membres de la télomérase. Il s'agit des protéines Sm ainsi que de l'hétérodimère Ku70p/Ku80p. Les protéines Sm situées à l'extrémité 3' de Tlc1 seraient impliquées dans la stabilité de l'ARN (SETO *et al.*, 1999). Quant à elles, les protéines Ku lient une structure tige-boucle de l'ARN Tlc1 permettant un recrutement de la télomérase à son substrat (SINGER et GOTTSCHLING, 1994; PETERSON *et al.*, 2001). En effet, pour que les protéines Est1p et Est2p soient liées efficacement aux télomères la présence des protéines Ku est essentielle (FISHER *et al.*, 2004).

Les mécanismes exacts régulant l'accessibilité et l'action de la télomérase sur les télomères les plus courts sont toujours nébuleux. Toutefois, il est connu que l'activité de la télomérase est étroitement liée au cycle cellulaire. En effet, des études ont démontré que les télomères étaient allongés de la fin de la phase S jusqu'au début de la phase

G2/M (DIEDE et GOTTSCHLING, 1999; MARCAND *et al.*, 2000). Bon nombre d'analyses génétiques et biochimiques ont permis d'identifier quelques moyens utilisés par les cellules pour réguler la télomérase. Le premier mécanisme de régulation concerne les protéines Ku, tel que discuté précédemment. L'hétérodimère Ku, via son interaction avec l'ARN Tlc1, permettrait un recrutement efficace de la télomérase aux télomères (FISHER *et al.*, 2004).

Un deuxième mécanisme de recrutement et de régulation de la télomérase s'effectuerait via les protéines Cdc13p et Est1p. Le laboratoire du Dr Lundblad a effectué la démonstration via des expériences de fusion de protéines et de mutagenèse compensatoire que la sous-unité de la télomérase Est1p liait le protéine télomérique Cdc13p (EVANS et LUNDBLAD, 1999). Dans une expérience subséquente ils ont fait la démonstration que l'abolition de la protéine Est1p pouvait être compensée par une fusion entre Cdc13p et la sous-unité catalytique de la télomérase Est2p, démontrant clairement que le rôle d'Est1p était de permettre le recrutement de la télomérase via Cdc13p (PENNOCK *et al.*, 2001). Cette interaction Est1p-Cdc13p a inspiré le laboratoire de Teng qui a pu identifier des résidus SQ/TQ potentiellement phosphorylés *in vitro* par les kinases Tel1p et Mec1p (TSENG *et al.*, 2006). Par ailleurs, certaines expériences génétiques semblent supporter ce mécanisme *in vivo* ; en effet, la déplétion de Tel1p ou du complexe MRX, complexe impliqué dans le recrutement de la kinase, provoquerait une diminution importante du recrutement de la télomérase aux télomères les plus courts (GOUDSOUZIAN *et al.*, 2006).

D'autres mécanismes de recrutement et d'activation de la télomérase impliquent la neutralisation d'inhibiteurs de la télomérase. Une récente étude a démontré que les protéines Rif1p et Rif2p associées aux télomères proportionnellement à leur taille, empêcheraient le recrutement de Tel1p aux télomères les plus longs qui seraient alors liés par de nombreuses protéines Rif (HIRANO *et al.*, 2009). De plus, les auteurs de cette étude ont également démontré que Rif2p et Tel1p seraient en compétition pour lier la même région de la protéine Xrs2p, protéine présente aux télomères les plus courts (HIRANO *et al.*, 2009). Ce mécanisme est en accord avec le modèle proposé il y a quelques années où l'activation de la télomérase se ferait suite à un décompte des protéines Rif1p, Rif2p et Rap1p liées aux séquences doubles brins télomériques (MARCAND *et al.*, 1997; RAY et RUNGE, 1999a; LEVY et BLACKBURN, 2004). En effet, les travaux de Marcand ont démontré qu'à mesure que l'on augmentait artificiellement la quantité de molécules Rap1p liées aux télomères ceux-ci diminuaient de taille proportionnellement (MARCAND *et al.*, 1997). Quelques années plus tard, le même phénomène a été observé par le groupe de Blackburn avec les protéines Rif1p et Rif2p (LEVY et BLACKBURN, 2004).



Légende	Complexe CST	Complexe MRX	Complexe Rap/Rif
	Stn1p/Ten1p	Xrs2p	Rif2p
			Rif1p
	Cdc13p	Rad50p/Mre11p	Rap1p
	Yku70/80	Tel1p	Téломérase
		Pif1p	

**Figure 3. Mécanismes de régulation de la télomérase.** Tel que décrit dans le texte, la cellule est dotée de nombreux mécanismes permettant d'accentuer ou de restreindre l'action de la télomérase sur les télomères. Décrit sur cette figure sont le recrutement de la télomérase via : (1) le complexe Yku, (2) l'interaction Cdc13p-Est1p, (3) la phosphorylation de Cdc13p par Tel1p et (4) la liaison de Tel1p avec Xrs2p (voir chapitre de la discussion). Tandis que l'inhibition de la télomérase serait dépendante de (5) la voie de Rap1p/Rif1p/Rif2p ainsi que (6) de l'hélicase Pif1p.

Un autre régulateur négatif de la télomérase est l'hélicase Pif1p qui a comme fonction de limiter l'action de la télomérase sur ses substrats. En effet, la délétion du gène encodant cette protéine provoque un rallongement significatif de la taille des télomères et à l'opposé une surexpression de ce même gène provoque un



raccourcissement de la taille des télomères ainsi qu'un défaut de croissance (SCHULZ et ZAKIAN, 1994; ZHOU *et al.*, 2000). Le laboratoire du Dr Zakian a démontré qu'*in vitro* l'hélicase Pif1p diminuait la processivité de la télomérase au niveau de sa capacité à ajouter des nucléotides en provoquant la dissociation de la télomérase aux séquences télomériques (BOULE *et al.*, 2005). *In vivo*, les conclusions sont les mêmes puisque l'absence de Pif1p provoque une augmentation de la sous-unité Est1p aux télomères, expliquée par l'augmentation des liaisons télomères-télomérase (BOULE *et al.*, 2005). Les principaux mécanismes de recrutement, d'activation et d'inhibition de la télomérase expliqués dans cette section sont démontrés dans la figure 3.

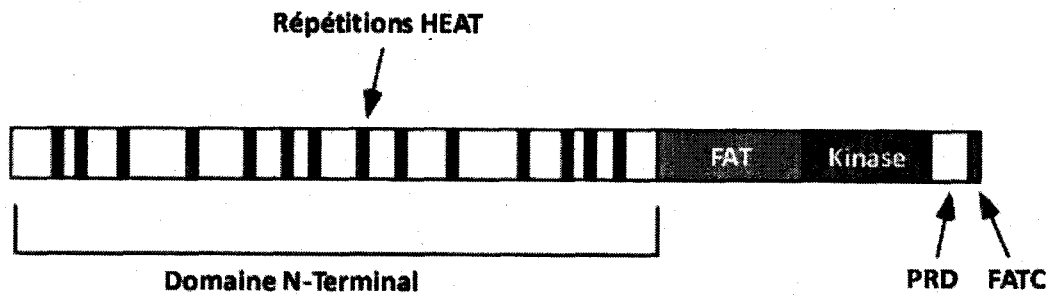
### **1.3 Les membres de la famille des kinases PI3K**

Chez les eucaryotes, une famille de protéines kinases joue un rôle central dans le processus de traitement des dommages à l'ADN; il s'agit de la famille des kinases phosphatidyl-3-Inositol (PI3K). Chez l'humain, les deux membres clefs de cette famille sont ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3-related). Ces kinases phosphorylent leur substrat sur un résidu sérine ou thréonine suivi d'un acide glutamique (Motif SQ/TQ) (PANDITA, 2002). Suite à un dommage, ATM se lierait rapidement à l'ADN au site de la cassure via une interaction avec le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (NAKADA *et al.*, 2003; FALCK *et al.*, 2005; LEE et PAULL, 2005). Cette liaison permettrait l'activation de la protéine kinase via son autophosphorylation sur la sérine 1981 et permettrait ainsi la phosphorylation de ses protéines effectrices

impliquées dans la réparation de l'ADN, dans la réplication et dans la maintenance de l'intégrité du génome (BAKKENIST et KASTAN, 2003; PELLEGRINI *et al.*, 2006; MATSUOKA *et al.*, 2007). Pour ce qui est d'ATR, l'autre kinase essentielle pour le processus de réponse aux dommages à l'ADN, cette kinase fonctionnerait en complexe avec la protéine ATRIP (CORTEZ *et al.*, 2001). L'activation de ce complexe permettrait au signal de dommage d'être amplifié et par la suite retransmis à ses protéines effectrices dans le but de permettre une réparation efficace des dommages à l'ADN (BROWN et BALTIMORE, 2003).

Les kinases ATM et ATR jouent également des rôles dans le maintien de l'homéostasie des télomères chez les humains, les mouches et les plantes. En effet, la délétion de ces protéines ainsi que l'utilisation de mutants provoque tantôt des fusions télomères-télomères, tantôt un raccourcissement des télomères et finalement induit la sénescence, l'instabilité génomique et l'apoptose des cellules (HANDE *et al.*, 2001; PANDITA, 2002; OIKEMUS *et al.*, 2004; BI *et al.*, 2005; VESPA *et al.*, 2007).

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'intégrité du génome est maintenue par les homologues de ATR et ATM, soit les protéines Mec1p et Tel1p respectivement. La structure primaire des deux kinases est très semblable et les principaux domaines caractérisés sont similaires.



**Figure 4. Principaux domaines protéiques des kinases Mec1p et Tel1p.** Ces protéines sont composées d'un large domaine N-terminal comportant de nombreuses répétitions HEAT, ainsi que du domaine FAT, kinase, PRD et FATC. Note : L'emplacement des répétitions HEAT ainsi que la taille des différents domaines ne sont pas à l'échelle.

Comme l'illustre la figure 4, ces kinases sont de très grandes protéines de plus de 2300 acides aminés (2368 pour Mec1p et 2787 pour Tel1p) possédant un très vaste domaine N-terminal peu caractérisé à l'exception des répétitions HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) (ANDRADE et BORK, 1995; LEMPIAINEN et HALAZONETIS, 2009). Ces répétitions HEAT sont en fait une paire d'hélices antiparallèles interagissant ensemble et reliées par un domaine flexible (ANDRADE *et al.*, 2001). Vers le milieu de la protéine se retrouve le domaine FAT (FRAP-ATM-TRRAP) composé de quatre hélices alpha. Il est proposé que les répétitions HEAT ainsi que le domaine FAT permettraient de réguler la fonction kinase de la protéine (LEMPIAINEN et HALAZONETIS, 2009). Juxtaposé au domaine FAT se retrouve le domaine catalytique de la protéine, soit le domaine kinase. De l'autre côté du domaine kinase, le domaine PRD (PIKK-Regulatory Domain) a récemment été caractérisé et sa délétion n'affecterait pas les fonctions basales des PI3 kinase, mais empêcherait plutôt son activation (MORDES *et al.*, 2008). Finalement, près de l'extrémité C-terminale, le dernier domaine des kinases de cette famille est une région de 30 acides aminés très conservés

formant le domaine FATC (FRAP-ATM-TRRAP-C-terminal). Ce domaine serait également très important pour la régulation de la fonction kinase de ces protéines (LEMPIAINEN et HALAZONETIS, 2009).

De nombreuses interactions génétiques et physiques existent entre les voies de signalisation orchestrées par les kinases Tel1p et Mec1p, interactions indiquant que ces kinases seraient partiellement redondantes et auraient des rôles se chevauchant (MORROW *et al.*, 1995; RITCHIE *et al.*, 1999; LONGHESE *et al.*, 2006). Toutefois, l'activation de la principale voie de signalisation chez *S. cerevisiae*, celle de Mec1p, dépendrait de la conversion des dommages à l'ADN en intermédiaires simple brin. Ces dommages à l'ADN peuvent être, entre autre, une oxydation, une alkylation ou encore une hydrolyse des bases de l'ADN, par des fourches de réplication se brisant, par des cassures double brins d'ADN non réparées, des pontages de protéines avec l'ADN ou encore des télomères déprotégés. Tous ces dommages seraient alors convertis en régions plus ou moins grandes de simple brin d'ADN. Ces extrémités d'ADN simple brin seraient alors rapidement liées par les protéines Rpa1p ce qui permettrait l'activation de la kinase Mec1p (ZHOU et ELLEDGE, 2000; ABRAHAM, 2001; IRA *et al.*, 2004; JAZAYERI *et al.*, 2006).

Tout comme chez son homologue humain ATM, la voie de signalisation de la protéine Tel1p répondrait majoritairement aux dommages à l'ADN non traités, donc à des bris d'ADN aux extrémités franches (cassure double brin) (NYBERG *et al.*, 2002).

Rapidement, après l'apparition d'une cassure double brin, le complexe protéique Mre11p-Rad50p et Xrs2p viendrait recouvrir le site de dommage dans le but de protéger les extrémités d'ADN contre une dégradation incontrôlée et permettant par la suite l'activation de la kinase Tel1p (USUI *et al.*, 2001). Toutefois, il est à noter que la protéine Tel1p joue un rôle beaucoup moins important que Mec1p dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN puisque les cellules *tel1Δ* ne démontrent pas de sensibilité aux agents endommageant l'ADN (MORROW *et al.*, 1995). Ces différences démontrent que ces deux voies de signalisation, dirigées par des kinases semblables, réagissent prioritairement à des types de dommages différents.

Une autre différence entre ces deux protéines kinases est au niveau de leur rôle dans la régulation de l'homéostasie télomérique. Tel1p jouerait un rôle primordial dans la maintenance des télomères alors que l'implication de Mec1p semble mineure (LONGHESE *et al.*, 2000). En effet, l'absence de Tel1p chez la levure provoque un raccourcissement dramatique de la taille des télomères, taille qui se stabilisera à une longueur critique court sans toutefois induire la mort des cellules (LUSTIG et PETES, 1986; GREENWELL *et al.*, 1995). De récentes études ont démontré que la kinase Tel1p était enrichie aux télomères les plus courts et que sa présence était essentielle pour que des niveaux normaux des protéines Est1p et Est2p soient atteints aux télomères (GOUDSOUZIAN *et al.*, 2006; BIANCHI et SHORE, 2007; SABOURIN *et al.*, 2007). Des études génétiques ont permis de placer les gènes du complexe MRX dans la même voie de régulation de la taille des télomères que Tel1p (RITCHIE et PETES, 2000).

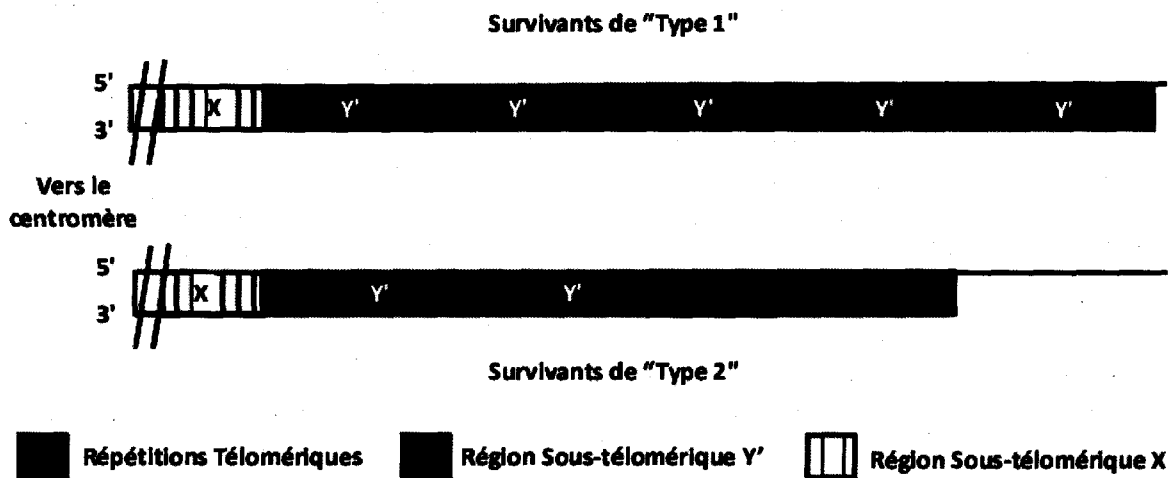
L'absence de la kinase Mec1p, quant à elle, ne provoquerait qu'une légère diminution de la taille des télomères. Toutefois, en absence de *TEL1*, la délétion de *MEC1* ou l'utilisation du mutant *mec1-21* induirait un raccourcissement dramatique des télomères et entre 60 et 80 générations plus tard, provoquerait l'entrée en sénescence des cellules (RITCHIE *et al.*, 1999). La kinase Mec1p pourrait donc jouer un rôle important dans la maintenance des télomères, rôle secondaire et redondant à celui joué par Tel1p. De plus, il a été démontré que les kinases Tel1p et Mec1p auraient une fonction essentielle dans le recrutement de la télomérase aux télomères les plus courts (ARNERIC et LINGNER, 2007; CHANG *et al.*, 2007; HECTOR *et al.*, 2007).

#### **1.4 Conséquences de l'absence de télomères fonctionnels**

La maintenance de la taille des télomères garde les télomères fonctionnels et donc est le mécanisme empêchant la sénescence des cellules. Par ce fait même ce mécanisme est essentiel à la viabilité des cellules. La télomérase est le moyen normalement utilisé par les cellules pour ajouter des nucléotides aux télomères les plus courts. Toutefois, dans certaines situations où la télomérase ne serait plus fonctionnelle, soit par exemple suite à une mutation dans un des gènes encodant pour une sous-unité de la télomérase, les cellules peuvent utiliser un mécanisme compensatoire pour maintenir la taille des télomères. Dans le jargon des levuristes travaillant sur les télomères, ces cellules deviennent alors des « survivants » (LUNDBLAD et BLACKBURN, 1993; LENDVAY *et al.*, 1996; LE *et al.*, 1999; TENG et ZAKIAN, 1999; TENG *et al.*, 2000;

CHEN *et al.*, 2001). Les survivants parviennent à compenser la perte de la télomérase par l'utilisation de la recombinaison homologue (HR) dans le but d'amplifier et de réorganiser les séquences télomériques et/ou sous-télomériques. D'ailleurs, en présence de dommages à l'ADN, la recombinaison homologue est également le mécanisme de réparation le plus important chez *S. cerevisiae* et sera décrite dans la section 2.2. Donc, tout dépendant de la séquence sémence, c'est-à-dire la séquence matrice qui sera amplifiée, il existe deux voies distinctes. Les survivants de « type 1 » sont des cellules ayant amplifié les séquences sous-télomériques Y' et possédant des télomères très courts, tandis que les survivants de « type 2 » sont générés via la recombinaison des séquences télomériques TG<sub>1-3</sub>/C<sub>1-3</sub>A produisant des télomères de taille variable allant jusqu'à 12 kb (TENG et ZAKIAN, 1999). La figure 5 démontre la structure télomérique de ces deux types de survivants. Fait à noter, ces deux voies sont dépendantes de la protéine au cœur de la recombinaison homologue, soit la protéine Rad52p (TENG et ZAKIAN, 1999). De plus, de nombreux membres des voies génétiques permettant la formation des survivants ont été identifiés. En effet, les survivants de « type 1 » sont entièrement dépendants des gènes *RAD51*, *RAD54* et *RAD57* tandis que les survivants de « type 2 » ont besoin de *RAD59*, *MRE11*, *RAD50*, *XRS2* et *SGS1* (LE *et al.*, 1999); (CHEN *et al.*, 2001); (COHEN et SINCLAIR, 2001); (HUANG *et al.*, 2001). Les récents travaux de Michel Larrivée dans le laboratoire ont permis de constater que les deux types de survivants possédaient également des cercles extra-chromosomaux contenant des séquences télomériques (LARRIVEE et WELLINGER, 2006). Dans le cas des survivants de « type 1 », ces cercles contiendraient des molécules encodant les séquences sous-

télomériques Y' pleine taille. Les survivants de « type 2 » quant à eux, possèdent des cercles partiellement simple brin de taille variée et contenant des séquences télomériques TG<sub>1-3</sub>/C<sub>1-3</sub>A. Il est d'ailleurs impossible de déterminer si l'extrémité des télomères comporte ou non de longues extensions simple-brin G-riche tel qu'indiqué sur la figure 5.



**Figure 5. Représentation schématique des télomères des survivants ne possédant pas de télomérase.** Les cellules n'ayant pas une télomérase active ne peuvent maintenir la taille de leurs télomères via le mécanisme habituel et doivent utiliser la recombinaison homologe afin de réaliser ce but. Les survivants de "Type 1" ont une amplification de leurs séquences sous-télomériques Y', tandis que les survivants de "Type 2" ont une amplification de leurs répétitions télomériques.

## 2. Principaux mécanismes de réparation de l'ADN

Tel que discuté précédemment les télomères sont des structures permettant la protection des chromosomes contre la dégradation nucléolytique, contre les fusions bout à bout ainsi que contre les recombinaisons aberrantes avec d'autres chromosomes. Les deux derniers points soulignent le rôle des télomères, des extrémités d'ADN semblables à des cassures d'ADN, à protéger l'extrémité des chromosomes contre la reconnaissance par les points de contrôle cellulaires. Les séquences télomériques ainsi

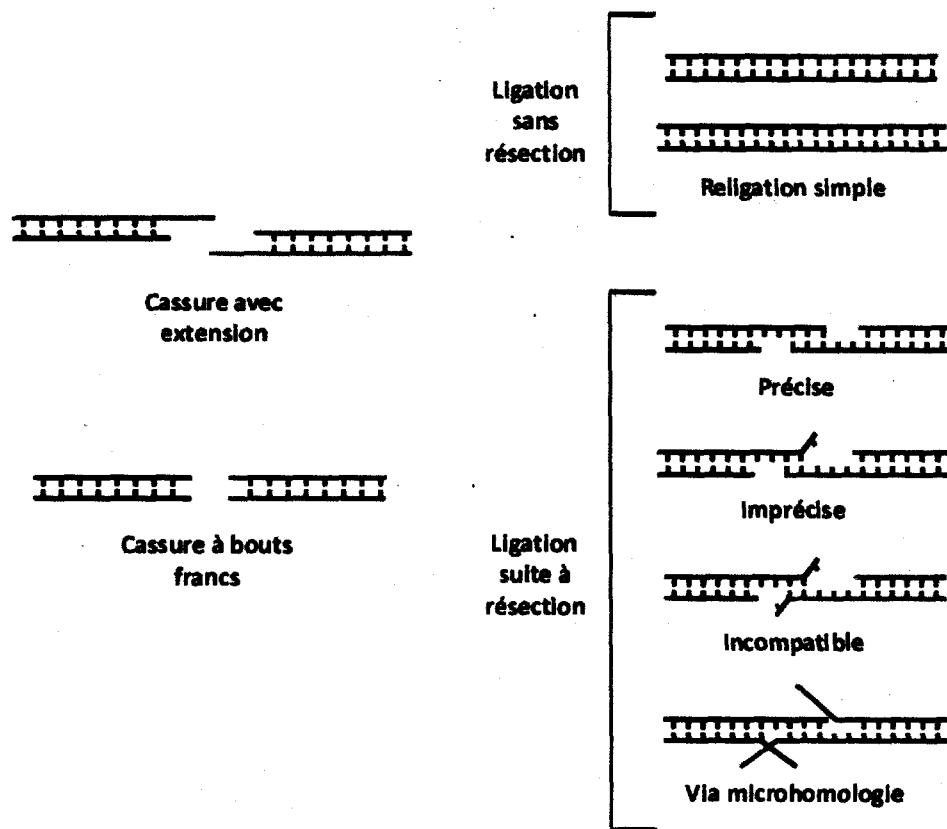


que les protéines les liant permettent donc de « cacher » le bout des chromosomes. En absence de la télomérase, ces télomères et la protection contre les points de contrôle associée sont perdus. Les extrémités des chromosomes sont alors reconnues comme étant des dommages à l'ADN et les principales voies de réparation sont alors activées via les points de contrôle (ABDALLAH *et al.*, 2009; KHADAROO *et al.*, 2009; LISBY et GELI, 2009). Ces dommages à l'ADN subis par les cellules sont une épée de Damoclès sur le maintien de l'intégrité de leur génome et plus important encore, sur la transmission d'informations génétiques erronées à la génération suivante. Il est donc primordial pour les cellules de rapidement réparer ces dommages et ce de manière la plus fidèle possible. Deux voies de réparation majeures existent, soit la ligation de bouts non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR). Chez la levure la voie de recombinaison est la voie majeure tandis que chez l'humain le NHEJ est la voie prédominante.

## **2.1 La ligation de bouts non homologues**

Durant la phase G1 du cycle cellulaire, donc en absence de chromosomes homologues, le principal mécanisme de réparation d'une cassure d'ADN est la ligation des bouts non homologues (DALEY *et al.*, 2005). Le NHEJ basal est le type de NHEJ le plus simple et ne fait que recoller ensemble les deux côtés d'une cassure doubles brins ayant des extensions parfaitement complémentaires (Figure 6 –en haut à droite). Par ce type de NHEJ, aucune séquence n'est ajoutée ou retirée. Dans la situation où les extrémités exposées ne sont pas complémentaires, un remaniement des extrémités est nécessaire

afin de pouvoir religuer correctement les deux extrémités de la cassure d'ADN. Cette étape supplémentaire provoque habituellement une diminution de la fidélité dans la réparation effectuée. En effet, tel que démontré dans la figure 6, des séquences d'ADN peuvent être enlevées ou rajoutées compromettant l'intégrité du message génétique encodé par ce bout d'ADN (DALEY *et al.*, 2005). Parmi les acteurs essentiels de ce mécanisme se retrouvent l'hétérodimère Ku70p/Ku80p qui entourerait les extrémités d'ADN libres au site de dommage, Dnl4p la ligase rejoignant les deux bouts d'ADN via ses partenaires protéiques Lif1p et Nej1p (WALKER *et al.*, 2001; DALEY *et al.*, 2005)



**Figure 6.** Divers type de produits de réparation d'une cassure doubles brins via la ligation de bouts non homologues (NHEJ). La cellule peut réparer une cassure doubles brins via le NHEJ et ce d'une manière précise ou non tout dépendant de la compatibilité des séquences de chaque côté du bris. Dans une situation où une des extrémités est endommagée, il y a résection de l'ADN. Cette résection peut mener à un gain ou une perte de séquences, mettant en danger la fidélité de la réparation.

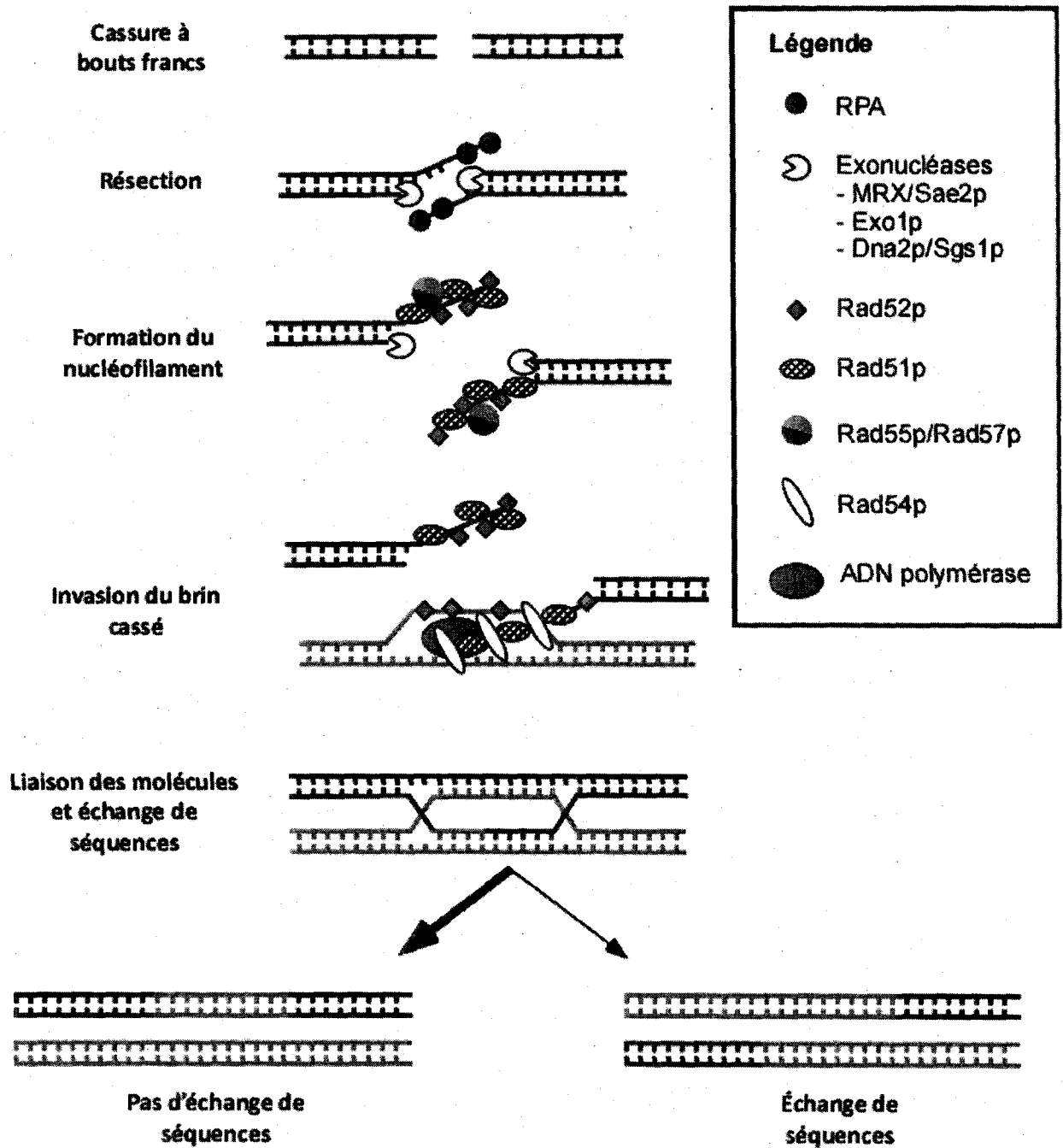
De plus, il a été démontré que le complexe MRX, composé des protéines Mre11p-Rad50p et Xrs2p serait impliqué autant dans le NHEJ que la recombinaison homologue (voir section suivante 2.2). Mre11p par son activité exonucléase serait importante pour la préparation des extrémités dans le but d'effectuer le NHEJ nécessitant un remaniement de séquences. Les protéines mentionnées ci-haut (l'hétérodimère Ku70p/Ku80p, Dnl4p, Lif1p, Nej1p, ainsi que le complexe MRX (Mre11p-Rad50p-Xrs2p) sont essentielles au bon déroulement de la ligation de bouts non homologues (PAQUES et HABER, 1999). D'autres protéines qualifiées « d'accessoires » telles que l'ADN polymérase 4 et l'endonucléase Rad27p aideraient au bon déroulement de cette voie de réparation, mais ne seraient pas essentielles à la réalisation du NHEJ (DALEY *et al.*, 2005).

## **2.2 La recombinaison homologue**

Deuxièmement, tel que brièvement discuté dans la section 1.4, la machinerie de recombinaison homologue a comme mission de restaurer l'information génétique altérée en se servant d'une séquence guide intacte retrouvée ailleurs dans le génome. Cette voie de réparation est presque exclusivement active vers la fin de la réplication et dans la phase G2/M du cycle cellulaire. Afin de réparer la lésion, de nombreuses étapes de préparation du dommage sont nécessaires via l'utilisation de nombreuses protéines différentes (Figure 7) (PAQUES et HABER, 1999; BARZEL et KUPIEC, 2008). Premièrement, très souvent les lésions provoquent des extrémités libres d'ADN n'offrant pas nécessairement le bon substrat pour les étapes subséquentes. Il faut donc qu'il y ait

initialement une étape de résection. Les complexes MRX (Mre11p-Rad50p-Xrs2p) ainsi que la protéine Sae2p sont alors recrutés au site de la cassure assurant alors la première étape de résection soit la production d'un simple brin 3' variant de 50 à 100 nucléotides de longueur (Revu dans (MIMITOU et SYMINGTON, 2009)). Dans la deuxième étape de résection, l'action indépendante de la protéine Exo1p ou du complexe Sgs1p-Dna2p augmentent la longueur du simple brin produit, permettant alors aux étapes subséquentes de la recombinaison homologue de se dérouler (Figure 7) (Revu dans (BERNSTEIN et ROTHSTEIN, 2009; MIMITOU et SYMINGTON, 2009)). L'extrémité simple brin exposée doit être immédiatement liée par des protéines RPA afin de protéger l'extension d'ADN contre les nucléases et pour permettre l'activation des points de contrôle (VAZE *et al.*, 2002); (ZOU et ELLEDGE, 2003); (JAZAYERI *et al.*, 2006). Dans une étape subséquente, les protéines RPA sont remplacées par les protéines Rad51p, formant le nucléofilament Rad51p.

Les protéines essentielles pour la formation du nucléofilament sont Rad52p, Rad55p et Rad57p (PAQUES et HABER, 1999; BARZEL et KUPIEC, 2008). L'étape suivante s'avère alors cruciale dans la réalisation de la recombinaison homologue et consiste à trouver dans tout le génome les séquences homologues à la région altérée. La manière exacte dont cette quête est effectuée reste nébuleuse à ce jour et demeure au cœur des recherches actuelles (BARZEL et KUPIEC, 2008).



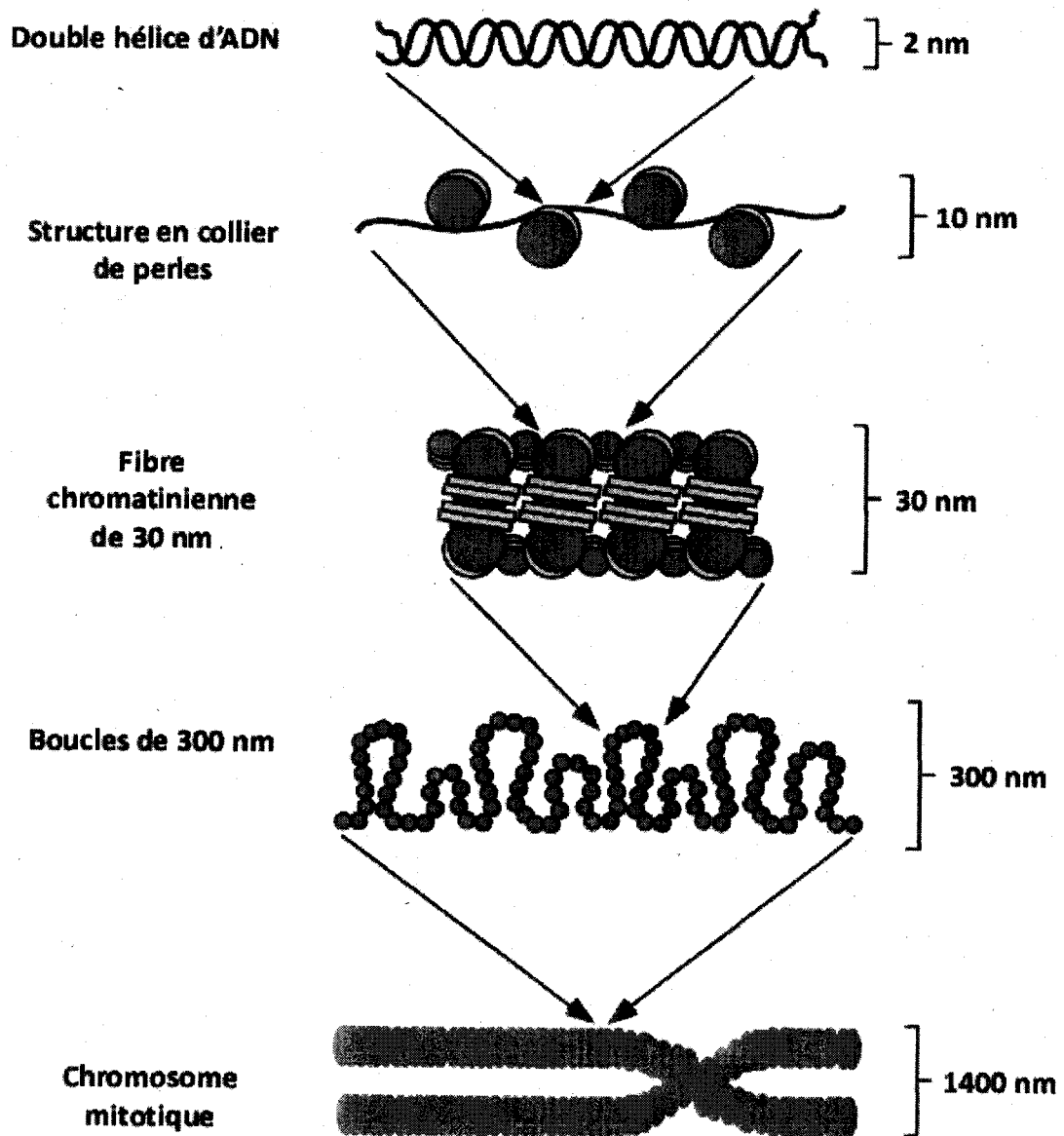
**Figure 7. Principales étapes de la réparation d'une cassure doubles brins par la recombinaison homologue.** La principale voie de réparation de la levure est la recombinaison homologue et ce mécanisme est possible seulement en présence de séquences homologues. La fidélité de ce mécanisme est excellente, mais il peut y avoir échange de séquences selon la manière dont la jonction de Holliday est résolue.

Par la suite, le nucléofilament Rad51p s'insère dans la séquence doubles brins d'ADN homologue via l'action de la protéine Rad54p, une hélicase membre de la famille des remodeleurs de chromatine SWI/SNF, qui ouvre la chromatine et permet la séparation des deux brins donneurs. L'invasion du simple brin d'ADN 3' à l'intérieur de l'hétéroduplexe produit une structure appelée la « boucle-D » et ce simple brin devient alors l'amorce pour la synthèse d'ADN qui permettra de réparer la lésion. Par la suite, le double brin d'ADN donneur se retrouve entrecroisé avec le double brin d'ADN réparé dans une structure ressemblant à une double jonction d'Holliday (Voir figure 7). Finalement, la réparation du dommage via la recombinaison homologue se termine par l'élimination de cette structure. Pour ce faire, les deux moyens existant sont via la dissolution de la structure ou via son clivage. Dans un premier temps, les protéines Sgs1p et Top3p permettent de dissoudre cette structure menant exclusivement à une absence d'échange de séquences (IRA *et al.*, 2003). Le clivage d'une double jonction d'Holliday implique l'action d'une résolvasse qui agit sur cette dernière structure, la clive, avant de lier à nouveau les brins d'ADN provoquant ou non un échange des séquences entre les brins donneurs et réparés (PAQUES et HABER, 1999; BARZEL et KUPIEC, 2008). Donc, dans la majorité des cas, il a absence d'échange de séquences suite à la réparation du dommage via la recombinaison homologue(IRA *et al.*, 2003).

### 3. La chromatine

L'information génétique contenue dans les chromosomes des cellules eucaryotes représente plusieurs milliards de paires de bases. Afin de réduire l'espace occupé par tout cet ADN, les cellules se sont dotées de plusieurs niveaux de compactions de l'ADN. Les différentes étapes de compaction sont illustrées par la figure 8. En effet, 146 paires de bases d'ADN sont enroulées autour de huit protéines structurales appelées les histones, cette entité ADN-protéines forme alors le nucléosome.

Par la suite, sous certaines conditions non physiologiques (Basses concentration de sel), l'ajout de l'histone H1 entre les nucléosomes jouerait un rôle essentiel afin d'augmenter la compaction de l'ADN en une structure en collier de perles de 10 nm (GUO et COLE, 1989b; GUO et COLE, 1989a; HANSEN, 2002). Toutefois, la combinaison nucléosome-histone H1 produirait *in vivo* la fibre de 30nm. Cette fibre comporterait de cinq à six nucléosomes par tour (BRADBURY, 2002). Il est généralement accepté que ce degré de compaction formerait en fait la chromatine des gènes transcrits, c'est-à-dire l'euchromatine. Lorsque ces fibres de 30nm se replieraient sur elles-mêmes et s'associeraient il y a alors formation de grosses structures oligomériques nommées boucles de 300nm. Ce dernier processus de repliement serait alors nommé condensation de la chromatine. Fait à noter, ces boucles de 300nm lorsque retrouvées sous une forme extrêmement condensée formeraient chromosomes mitotiques



**Figure 8. Divers degrés de compaction de l'ADN.** Lorsque les nucléosomes se lient à l'ADN en présence de l'histone H1, il y a formation d'une structures en collier de perles. En conditions physiologiques, cette structure devient la fibre de 30 nm et lorsque celle-ci se replie sur elle-même de nombreuses fois, il y a compaction jusqu'au niveau observé dans les chromosomes mitotiques.



### 3.1 Les histones et le nucléosome

Tel que démontré à la section précédente, les histones sont la pierre d'assise de tout le processus essentiel de compaction de l'ADN. Ce processus est possible par une particularité physico-chimique des histones étant donné que ces dernières sont des protéines très basiques ayant énormément d'affinité pour le squelette phosphodiester des acides désoxyribonucléiques. Le nucléosome est formé d'un tétramère central d'histones H3 et H4 et de deux autres hétérodimères d'histones H2A et H2B qui s'associent de chaque côté du tétramère. La structure ainsi formée serait relativement plane et pourrait accueillir environ 1,65 tours d'ADN (LUGER *et al.*, 1997). La cristallographie d'un nucléosome a permis de mieux comprendre la nature des liens histones-ADN. En effet, les chercheurs ont pu observer dans les histones la présence de structures secondaires, nommées les « plis d'histones ». Ces structures sont constituées d'une grande hélice alpha entourée de deux autres hélices alpha de plus petite taille ainsi que de quelques boucles permettant le contact avec l'ADN (LUGER *et al.*, 1997). De plus, les histones possèdent des extrémités saillantes à l'extérieur de l'octamère d'histones soit les queues d'histones C- et N-terminales. Les queues N-terminales auraient une longueur variant de 16 à 44 acides aminés et seraient composées de nombreuses arginines et lysines (LUGER et RICHMOND, 1998; SPENCER et DAVIE, 1999). La régulation des histones via des modifications posttraductionnelles se ferait principalement sur ces queues N-terminales. La section suivante traitera abondamment de ce mécanisme de régulation. Pour ce qui est des queues C-terminales, l'histone H2A serait la seule à posséder une queue de taille significative (HANSEN, 2002). Il est

également étonnant de constater que les histones, en plus d'être essentielles, ont des motifs extrêmement conservés d'un organisme à l'autre au cours de l'évolution allant des archéobactéries jusqu'aux mammifères (WOLFFE et PRUSS, 1996; LUGER *et al.*, 1997).

En résumé, la chromatine, ce mélange compact d'ADN, d'histones et de protéines non-histones, constitue une limitation au passage des machineries de la réplication, de la transcription et de la réparation de l'ADN (LUGER *et al.*, 1997). Il devient donc extrêmement important pour les cellules de pouvoir contrôler précisément l'accessibilité de la chromatine aux différents complexes protéiques. Un des moyens utilisés par les cellules est d'ajouter ou d'enlever des groupements réactifs à la queue N-terminale des histones. De ce fait, la chromatine se retrouve bouleversée, provoquant une modification de cette structure tout dépendant le type des modifications retrouvées (NARLIKAR *et al.*, 2002). Finalement, un moyen utilisé par les cellules pour enlever, repousser ou déplacer des nucléosomes est via l'utilisation d'enzymes de remodelage de la chromatine. Les différentes familles de remodeleurs seront décrites dans la section 3.3.

## **3.2 Les modifications post-traductionnelles**

### **3.2.1 La méthylation**

La méthylation des histones survient habituellement sur les lysines et les arginines des queues N-terminales des histones via l'action de méthyltransférases

spécialisées. En effet, la méthylation des lysines implique l'action d'un enzyme ayant un domaine SET (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) sauf pour le cas de la méthylation de H3K79 via la protéine *S.c.* Dot1p qui ne contient pas de domaine SET (NG *et al.*, 2002; VAN LEEUWEN *et al.*, 2002). Pour ce qui est des PRMT (Protein Arginine Methyltransferase), celles-ci ajoutent des groupements méthyles aux arginines (ZHANG et REINBERG, 2001; KOUZARIDES, 2002).

Une lysine peut accepter un, deux ou trois groupements méthyles. La méthylation d'une protéine ne change pas sa charge nette mais induit la liaison de protéines spécialisées à ce site (JENUWEIN, 2001). C'est le cas de l'histone H3 qui peut être méthylée sur plusieurs de ses lysines de la queue N-terminale (H3K4, H3K9 et H3K36) (SARMA et REINBERG, 2005). La lysine 79 de l'histone H3, résidu qui contrairement aux autres est située au cœur de l'histone, peut être méthylée par Dot1p (BANNISTER *et al.*, 2002). Quant à elles, les arginines de la queue N-terminale peuvent être mono- ou diméthylées de manière symétrique ou asymétrique. Le prochain paragraphe décrira plus en détail certaines de ces méthylations d'histones (BANNISTER *et al.*, 2002).

L'histone H3 peut être mono-, di- ou tri- méthylée sur sa lysine 4 via l'action de la méthyltransférase Set1p, un membre du complexe COMPASS composé de 8 protéines (MILLER *et al.*, 2001; KROGAN *et al.*, 2002; NAGY *et al.*, 2002). Des études ont démontré que la présence de H3K4me3 serait associée avec une activation transcriptionnelle donc

à une chromatine permissive à la transcription (SANTOS-ROSA *et al.*, 2002). De plus des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine hybridée sur puces à ADN (ChIp-on-ChIp) ont permis de constater que la méthyltransférase Set1p serait localisée majoritairement aux promoteurs des gènes actifs (NG *et al.*, 2003). Dernièrement, H3K4me3 aurait été retrouvée au site de cassures méiotiques et jouerait un rôle important dans la création de ces cassures essentielles à l'augmentation de diversité génétique (BORDE *et al.*, 2009). Dans la même ligne de pensée, certains de mes travaux ont permis de démontrer l'importance capitale de cette modification dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN (cassures simple brin, cassures double brins, alkylation de l'ADN, blocage des fourches de réplication) (Voir chapitre 3).

La méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 aurait de nombreux rôles au niveau de l'activation des points de contrôle suite à l'induction de dommages à l'ADN et au niveau de la réparation des bris. En effet, de récents articles ont démontré que H3K79me3 serait importante pour que les cellules puissent activer correctement les points de contrôle de la phase G1 et intra-S (GIANNATTASIO *et al.*, 2005; WYSOCKI *et al.*, 2005). En effet, la phosphorylation de Rad53p, kinase centrale dans l'activation des points de contrôle chez la levure, était grandement affectée en absence de cette modification d'histones. Via des études génétiques, il a été démontré que la protéine Rad9p impliquée dans l'activation de Rad53p pourrait potentiellement lier H3K79me3 via ses domaines Tudor (WYSOCKI *et al.*, 2005). Dans un autre ordre d'idée, il a été démontré que H3K79me3 aurait un rôle important dans la répression transcriptionnelle

retrouvée aux télomères en influençant négativement la liaison des protéines Sir2p et Sir3p (NG *et al.*, 2002; VAN LEEUWEN *et al.*, 2002). Toujours selon les mêmes études, il a été estimé qu'environ 90% des histones H3 seraient méthylées sur la lysine 79 sauf dans les régions hétérochromatiques.

### 3.2.2 L'ubiquitination

Chez la levure une monoubiquitination est retrouvée chez les histones et contrairement à la polyubiquitination impliquée dans la dégradation des protéines, l'ajout d'une seule ubiquitine, protéine composée de 76 acides aminés extrêmement conservés, serait important pour l'activation de certaines voies métaboliques (PHAM et SAUER, 2000). En effet, l'ajout de l'ubiquitine sur la queue d'histone provoquerait un changement conformationnel de la chromatine. Il a été démontré que l'ubiquitination de l'histone H2B par le complexe ubiquitine ligase Lge1-Bre1-Rad6 sur la lysine 123 était essentielle pour la di- et triméthylation consécutive des histones H3K4 et H3K79 (SUN et ALLIS, 2002; WOOD *et al.*, 2003b; SHAHBAZIAN *et al.*, 2005). Un article récent a possiblement permis d'élucider le lien entre cette ubiquitination de l'histone H2B et la polyméthylation de H3K4 (LEE *et al.*, 2007). En effet, selon le groupe de Shilatifard, la monoubiquitination de H2B via le complexe Lge1-Bre1-Rad6 serait importante pour que la sous-unité essentielle Cps35p puisse lier la méthyltransférase Set1p (LEE *et al.*, 2007).

### 3.2.3 La phosphorylation

L'ajout d'un groupement phosphate sur une protéine (habituellement sur une sérine ou une thréonine) est un mécanisme de régulation extrêmement utilisé par les cellules dans de nombreuses voies de signalisation, que ce soit pour la régulation de leurs voies métaboliques, des points de contrôle, du cycle cellulaire et bien d'autres. La phosphorylation peut donc activer ou réprimer la protéine ciblée de manière réversible. Toutefois, il n'est pas clair pour l'instant quel est l'effet structural sur la chromatine de l'ajout de ce groupement phosphate, quoique il est envisageable que l'ajout d'une charge négative (le groupement phosphate) aux histones puisse affaiblir les interactions ADN-histones. De nombreux résidus des queues N-terminales de différentes histones peuvent être phosphorylés, c'est le cas par exemple de la thréonine 4, de la sérine 10 et de la sérine 28 pour l'histone H3 (LO *et al.*, 2001). De plus, la queue C-terminale peut également être phosphorylée comme c'est le cas de l'histone H2A qui est phosphorylée sur la sérine 129 produisant le pendant levure de  $\gamma$ -H2AX (ROGAKOU *et al.*, 1998). Chez les mammifères  $\gamma$ -H2AX est une variante d'histone ressemblant à tous niveaux à l'histone H2A de levure sauf au niveau de sa queue C-terminale (REDON *et al.*, 2002). Cette variante d'histone phosphorylée a été initialement découverte au site de cassures doubles brins créé par la radiation gamma (ROGAKOU *et al.*, 1998; PAULL *et al.*, 2000). Il a été démontré que cette modification s'étendrait sur de grandes distances de chaque côté du site de cassures et servirait à établir une région chromatinienne particulière (ROGAKOU *et al.*, 1998; ROGAKOU *et al.*, 1999; SHROFF *et al.*, 2004). Cette histone modifiée par les protéines kinases ATM et ATR (Tel1p et Mec1p chez *S.cerevisiae*)

permettrait le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine dans le but d'ouvrir la chromatine et de permettre l'accessibilité des protéines de réparation telles que le complexe MRN (homologue de MRX), BRCA1 et Rad51 (PETERSON et COTE, 2004).

### 3.2.4 Les autres modifications

En plus de la méthylation, de l'ubiquitination et de la phosphorylation mentionnées précédemment, les queues des histones de la levure sont soumises à de nombreuses autres modifications telles que l'acétylation, la sumoylation et l'isomérisation des prolines. L'acétylation de la queue des histones a un effet majeur sur l'état de la chromatine. Les nombreuses études sur cette modification ont permis de découvrir que l'ajout d'un groupement acétyle sur la queue N-terminale des histones permettrait d'annuler la charge négative des lysines et de modifier la chromatine à ce locus précis (STERNER et BERGER, 2000; ROTH *et al.*, 2001). En effet, il a été calculé que l'acétylation de 10% des lysines de la queue terminale d'une histone empêcherait la compaction maximale de la chromatine en fibre de 300nm (HANSEN, 2002). L'acétylation des histones via les acétyltransférases est donc associée à de nombreux mécanismes moléculaires nécessitant un accès à l'ADN, que ce soit la transcription, la réparation, la recombinaison et la réplication (ROTH *et al.*, 2001; DELGOSHAIE *et al.*, 2009; GLOZAK et SETO, 2009). À ce jour, à l'exception de l'histone H2A, tous les autres histones pourraient être méthylées sur quatre à cinq résidus distincts par histone (DAVIE et SPENCER, 1999).

La sumoylation est une modification nouvellement découverte et qui ressemble énormément à l'ubiquitination des histones. L'ajout d'un groupement sumo, groupement de poids similaire aux histones (11 kDa), se retrouve dans moins de 5% des extrémités des quatre histones majeures chez la levure. L'impact de cette modification est toujours nébuleux quoique certaines observations faisant état de la diminution de la transcription en présence d'histones sumoylées (GARCIA-DOMINGUEZ et REYES, 2009).

Récemment, il a été démontré que l'histone H3 pouvait subir une modification jusqu'à ce moment inconnue. En effet, le groupe de Kouzarides a démontré que les prolines P30 and P38 de l'histone H3 subissaient un processus d'isomérisation *in vitro* (NELSON *et al.*, 2006). Il ont par la suite découvert que l'isomérisation de la proline 38 était essentielle à la méthylation subséquente de H3K36 et qu'il y avait alors une augmentation de la transcription à ce locus (NELSON *et al.*, 2006).

Un nombre impressionnant de diverses modifications d'histones ont été caractérisés sur les quatre histones canoniques ainsi que la plupart des variantes d'histones connues. De plus, il a été constaté que bon nombre de ces modifications des histones dépendent d'une autre modification d'histone ou encore influencent la présence d'une modification d'histone subséquente (STRAHL et ALLIS, 2000). Par exemple, la phosphorylation de H3S10 produit une présence accrue de H3K14 acétylée (LO *et al.*, 2001). Un autre exemple est que le niveau d'acétylation de H4K16 est inversement proportionnel au niveau de méthylation de H4K20 (RICE *et al.*, 2002). De plus, l'interrelation entre ces



modifications ne se produit pas obligatoirement sur la même histone mais peut être dépendante d'une modification retrouvée sur une autre histone. En effet, une démonstration de ce fait est l'ubiquitination de l'histone H2B sur la lysine 123 étant essentielle pour les méthylations subséquentes des résidus lysine 4 et 79 de l'histone H3 (SUN et ALLIS, 2002). Un autre fait intéressant à noter est la très grande conservation des histones ainsi que de bon nombre des modifications retrouvées des levures aux humains pouvant permettre de penser que les mécanismes moléculaires associés à ces modifications seraient également conservés (FUCHS *et al.*, 2006; MARINO-RAMIREZ *et al.*, 2006).

### 3.3 Le remodelage

En plus des modifications d'histone qui peuvent passivement modifier la chromatine, le remodelage de la chromatine est un autre mécanisme utilisant l'énergie produite suite à l'hydrolyse de l'ATP pour agir mécaniquement sur les nucléosomes. Les enzymes responsables du remodelage de la chromatine sont subdivisés en quatre familles soit : SWI/SNF (mating type **SW**itching/**S**ucrose **N**on **F**ermenting), ISWI (Imitation of **SW**itch), INO80 (**INO**sitol) et CHD (**CH**romo**D**omain Helicase /ATPase DNA binding) (TSUKIYAMA, 2002).

#### 3.3.1 Famille SWI/SNF

La famille des remodeleurs de chromatine de type SWI/SNF, est composée de deux principaux complexes soit SWI/SNF et RSC (**R**emodels the **S**tructure **C**hromatin).

SWI/SNF est un complexe composé de nombreuses protéines dont Swi2/Snf2 est la sous-unité ATPase (MOHRMANN et VERRIJZER, 2005). Le mode de fonctionnement de ce remodeleur serait de faire glisser et d'enlever les nucléosomes de l'ADN (CLAPIER et CAIRNS, 2009). Du côté du complexe de remodelage RSC, ce dernier comporte plus de 15 sous-unités dont plusieurs sont essentielles à la survie de la cellule (*RSC4*, *RSC6*, *RSC8*, *RSC9*, *RSC10*, *RSC11* et *STH1*) (OLAVE *et al.*, 2002). De nombreux articles font état de l'implication des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et RSC dans l'activation de la transcription, dans la ségrégation des chromosomes, dans la réplication, dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que dans le processus de réparation des dommages à l'ADN (FISHER *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2007; CLAPIER et CAIRNS, 2009). Sur ce dernier mécanisme, soit l'implication du remodeleur de chromatine RSC dans la réparation des dommages à l'ADN, le groupe de Lee a publié deux articles démontrant que la délétion d'une sous-unité non essentielle du complexe de remodelage RSC, la sous-unité Rsc30p, provoquerait un défaut de réparation via la voie de ligation de bouts non homologues et de recombinaison homologue (SHIM *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2007).

### **3.3.2 Famille Ino80/SWR**

Les remodeleurs de la famille INO80, qui est subdivisée en deux sous-catégories soit les remodeleurs de la famille INO80 et de la famille SWR1. Ino80p et Swr1p sont les deux sous-unités catalytiques de complexes regroupant respectivement 12 et 14 protéines en plus de se partager quatre sous-unités (SHEN *et al.*, 2000; MIZUGUCHI *et*

*al.*, 2004). Ces deux remodeleurs sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et sont rapidement recrutés au site de cassure (MORRISON *et al.*, 2004; VAN ATTIKUM *et al.*, 2004; PAPAMICHOS-CHRONAKIS *et al.*, 2006). De plus, INO80 jouerait un rôle important dans la stabilisation des fourches de réplication bloquées, dans la recombinaison homologue ainsi que dans la transcription (CLAPIER et CAIRNS, 2009). Quant à SWR1, ce complexe est responsable de l'échange entre le dimère H2A/H2B situé sur la chromatine avec un dimère contenant H2A et la variante d'histone H2AZ (MIZUGUCHI *et al.*, 2004). En plus d'avoir Swr1p comme sous-unité catalytique, ce complexe, contient également la sous-unité Yaf9p dont il sera question dans le chapitre 4.

### 3.3.3 Familles ISWI et CHD

Les remodeleurs de la famille ISWI, initialement découverts chez la drosophile, joueraient des rôles cellulaires variés tels que dans l'assemblage de la chromatine, dans la transcription ainsi que dans la réplication (CLAPIER et CAIRNS, 2009).

Finalement, nous avons très peu d'informations sur la famille des remodeleurs CHD mis à part son rôle joué dans la transcription. En effet, Chd1p serait retrouvé au site des gènes transcrits et interagirait physiquement et fonctionnellement avec des facteurs d'élongation de la transcription (CLAPIER et CAIRNS, 2009). De plus, un récent rapport fait état d'un nouveau rôle joué par le complexe CHD. En effet, un rôle négatif serait joué par ce complexe dans la réplication de l'ADN (SIMIC *et al.*, 2003; BISWAS *et al.*, 2008).

#### 4. Plan de la thèse

En première partie de cette thèse nous explorerons l'implication de la protéine kinase Tel1 dans ses nombreux rôles joués au niveau de la maintenance de l'intégrité du génome. Dans un premier temps, sa fonction de point de contrôle en présence de dommages à l'ADN sera traitée (Chapitre 1). Dans une deuxième partie, c'est plutôt le rôle de maintenance de l'homéostasie des télomères joué par Tel1p et par Mec1p qui sera démontré (Chapitre 2). Les deux derniers chapitres aborderont toujours le maintien de l'intégrité du génome mais au niveau de la chromatine. Le chapitre 3 démontrera l'implication d'une modification de la chromatine, H3K4me3, dans le processus de traitement des dommages à l'ADN, modification jusqu'à présent peu impliquée dans ce processus. Finalement, le dernier chapitre de cette thèse, chapitre qui se veut plus exploratoire par ses données préliminaires, traitera de l'hypothèse que le processus de transcription des gènes semblerait important dans le processus de réparation des dommages à l'ADN (Chapitre 4).

## CHAPITRE I

### Avant-propos

Chakhparonian, M., Faucher, D., Wellinger RJ. 2005. A mutation in yeast Tel1p that causes differential effects on the DNA damage checkpoint and telomere maintenance. *Current Genetics* 48: 310–322.

Pour le premier article de cette thèse ce-dernier a été publié dans la revue « *Current Genetics* » en 2005 où je me retrouve deuxième auteur. J'ai principalement contribué aux expériences menant à l'isolation de l'allèle en question dans l'article ainsi qu'à sa caractérisation. De plus, j'ai participé à la réalisation d'une figure dans l'article ainsi qu'à la rédaction de ce-dernier.

## Résumé

Ce manuscrit démontre que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, malgré qu'en présence de dommages à l'ADN (cassures simple brin, cassures double brins, alkylation de l'ADN) le point de contrôle majeur soit la protéine kinase Mec1p, son orthologue Tel1p peut également jouer un rôle important dans le processus de réparation des dommages à l'ADN. En effet, via un criblage génétique de létalité synthétique utilisant le mutant thermosensible *mec1-ts*, nous avons pu isoler un allèle de *TEL1*, nommé *tel1-11*. Une caractérisation extensive de ce mutant nous a permis de constater qu'il s'agissait d'un allèle de séparation de fonctions. En effet, chez ce mutant incubé à température restrictive de 37°C sa fonction de maintien des télomères caractérisée de « basale » (absence de sénescence) était normale, tandis qu'aucune activation des points de contrôle n'était détectable. Le même phénotype de séparation de fonctions est également observable à température semi permissive de 26°C où les télomères de ces cellules ont alors des phénotypes similaires en tous points à celle du type sauvage (longueur, absence de sénescence) sans toutefois avoir la capacité de pouvoir activer les points de contrôle en présence de dommages à l'ADN. Les résultats de cette étude évoquent donc la possibilité que les cellules aient besoin de différents niveaux d'efficacité de la fonction kinase de Tel1p afin d'accomplir ses fonctions de maintenance des télomères et d'activation des points de contrôle.

**A Mutation in Yeast Tel1p That Causes Differential Effects on the  
DNA Damage Checkpoint and Telomere Maintenance.**

**Mikhail Chakhparonian, David Faucher and Raymund J. Wellinger\***

## ABSTRACT

ATM/ATR homologs have been shown to be central elements of genome surveillance mechanisms in many organisms, including yeasts, flies and mammals. In *Saccharomyces cerevisiae*, most checkpoint responses depend on the ATR ortholog Mec1p. The yeast ATM ortholog, Tel1p, so far has been implicated in a specific DNA damage checkpoint during S-phase as well as in telomere homeostasis. In particular, yeast cells lacking only Tel1p harbor short but stable telomeres, while cells lacking both Tel1p and Mec1p are unable to maintain telomeric repeats and senesce. Here, we present the characterization of a new mutation in the *TEL1*-gene, called *tel1-11*, which was isolated by virtue of a synthetic lethal interaction at 37°C with a previously described *mec1-ts* mutation. Interestingly, telomere and checkpoint functions are differentially affected by the mutant protein Tel1-11p. The Tel1p-dependent checkpoint response is undetectable in cells containing Tel1-11p and incubated at 37°C, but basic telomere function is maintained. Further, when the same cells are incubated at 26°C, Tel1-11p confers full proficiency for all telomere functions analyzed, whereas the TM-checkpoint is clearly affected. The results thus strongly suggest that the different cellular pathways affected by Tel1p do not require the same level of Tel1p to be fully functional.

**KEY WORDS:** ATM/ATR, *TEL1*, TM-checkpoint, telomeres, yeast



## INTRODUCTION

In eukaryotes, maintaining genome integrity relies on a set of surveillance mechanisms, called checkpoints. These checkpoints are responsible for proper detection and repair of DNA damage caused by environmental stresses or irregularities during DNA replication. Pivotal elements of all known eukaryotic checkpoints are homologs of mammalian ATM/ATR kinases (ataxia-telangiectasia-mutated/ATM and Rad3-related; (Nyberg et al. 2002). In budding yeast, Mec1p, an ATR ortholog, plays a prevalent role in G1, S and G2/M checkpoints. In addition to sensitivity to all DNA damaging agents, Mec1p-deficient cells display increased gross chromosomal rearrangements (GCR) and aberrant patterns of DNA replication (Santocanale and Diffley 1998; Myung et al. 2001; Cha and Kleckner 2002). A downstream target of Mec1p-dependent phosphorylation is another essential kinase, Rad53p (Sanchez et al. 1996). The essential function of Mec1p and Rad53p is thought to be up-regulation of nucleotide pools in response to replication and DNA damage, as alleviation of inhibition of nucleotide synthesis in *sm11* mutants rescues the lethality of cells lacking Mec1p or Rad53p (Zhao et al. 1998).

The checkpoint function of Tel1p, the budding yeast ortholog of ATM, appears more furtive, as Tel1p-deficient cells do not suffer from obvious sensitivity to DNA damaging agents and there is no major defect in genome stability, as assessed by GCR rates (Morrow et al. 1995; Myung et al. 2001). In addition, Telp1 appears not to be involved in the induction of nucleotide synthesis, at least after DNA damage (Zhu and

Xiao 2001). Tel1p's contribution to cellular checkpoint activity might be masked by the prevailing activity of Mec1p. For example, a Tel1p deficiency exacerbates checkpoint defects and causes large increases of GCR rates displayed by *mec1* mutants (Morrow et al. 1995; Myung et al. 2001). Furthermore, in response to DNA damage, Rad53p can be phosphorylated in both a Mec1p and a Tel1p-dependent manner, although Tel1p's dependent phosphorylation is minor and is detectable mainly in cells lacking Mec1p (Sanchez et al. 1996; Vialard et al. 1998; Clerici et al. 2001; Nakada et al. 2003b).

According to a current view, most DNA damage is converted to DNA intermediates with single-stranded DNA (ssDNA). These intermediates are readily sensed by ATR-dependent pathways; whereas the ATM-dependent pathway is thought to respond to DNA double-strand breaks (DSB). By extension, this might explain why the checkpoint function provided by Mec1p prevails over that of Tel1p (Nyberg et al. 2002). Supporting this view, a striking demonstration of a Tel1p-dependent checkpoint function could be made in yeast cells in which conversion of DSB into ssDNA intermediates is blocked by *sae2* or *rad50S* mutations. In mitotic cells lacking both Mec1p and Sae2p, the sensitivity to methyl methanesulfonate (MMS) is partially suppressed and such cells are capable of Rad53p phosphorylation and cell cycle arrest. It was shown that these checkpoint functions are dependent on Tel1p and Mre11p (also referred to as Tel1p- and Mre11p-dependent checkpoint or TM-checkpoint; (Usui et al. 2001). However, Mre11p has multiple implications in G1 and G2/M checkpoints (D'Amours and Jackson 2002) and

it remains unclear how specific its implication in a S-phase DNA-damage checkpoint is. In yeast, Mre11p forms a complex with Rad50p and Xrs2p, called the MRX-complex. Interestingly, under particular conditions and in response to DNA damage, both Mre11p and Xrs2p have been reported to be phosphorylated in a Tel1p-dependent fashion (D'Amours and Jackson 2001; Usui et al. 2001; Nakada et al. 2003b).

An additional challenge for DNA replication and therefore genomic stability is the faithful maintenance of chromosomal termini, the telomeres. As could be predicted, subsets of proteins involved in checkpoint pathways have a role to play in telomere maintenance. Indeed, certain mutations in *MEC1* or *RAD53* cause a shortening of telomeric repeat tracts and a decrease in telomere position effect (TPE, telomeric chromatin-dependent transcriptional inhibition) (McAinsh et al. 1999; Ritchie et al. 1999). Furthermore, mutations in genes of the Rad17p-Mec3-Ddc1 complex, which is involved in the Mec1p-dependent pathway, can also affect telomere length (Corda et al. 1999; Longhese et al. 2000; Dionne and Wellinger, unpublished data). Furthermore, Mec1p has been shown to associate with telomeres during late S phase (Takata et al. 2004). More recent data on the assembly of repair complexes at DNA ds breaks as well as studies on the association of proteins at telomeres suggest that the MRX-complex and Telp1p are amongst the first factors to associate to such DNA-ends (Lisby et al. 2004; Takata et al. 2005). Taken together, while a deficiency in the Mec1p-dependent pathway

clearly has some influence at telomeres, no telomere-specific function could be assigned to its components yet.

In contrast, both Tel1p and its mammalian ortholog ATM have been directly implicated in telomere homeostasis (Pandita 2002). Both in mice and human cells, an ATM deficiency provokes accelerated telomere loss and other phenotypic changes such as genomic instability (Metcalfe et al. 1996; Wong et al. 2003). In yeast, the *TEL1* gene had initially been identified in a screen for mutations affecting telomere length and Tel1p-deficient cells have very short telomeric repeat tracts (Lustig and Petes 1986). Later genetic analyses placed *TEL1* and the genes encoding the MRX-complex) in the same pathway as telomerase (Ritchie et al. 1999; Ritchie and Petes 2000). The same analyses showed that in the absence of these proteins, cells rely on Mec1p to maintain short but stable telomeres, which suggests that the function of Mec1p at telomeres is redundant with or masked by the Tel1p and the MRX-complex in normal cells. In the complete absence of ATM-like kinases, yeast cells are not able to maintain telomeric DNA and senesce after about 60 to 80 generations, a phenotype also displayed by cells lacking telomerase components (Ritchie et al. 1999; Chan et al. 2001). One characteristic of this senescence phenotype is the emergence of survivors: these are cells that can maintain telomeric DNA in a telomerase-independent fashion but relying on homeologous recombination (Lundblad and Blackburn 1993). Finally, telomerase and Tel1p have recently been associated with a chromosome protective function that may be

independent of active telomere lengthening (Chan and Blackburn 2003). Intriguingly, the two ATM-like kinases, Mec1p and Tel1p, show mutually exclusive association with telomeres at distinct stages of the cell cycle (Takata et al. 2004). However, the molecular mechanisms for Mec1p- or Tel1p-dependent telomere dynamics remain unclear and hypotheses are dependent on model systems and conditions used (Takata et al. 2004); reviewed in (Chakhparonian and Wellinger 2003). It would therefore be of interest to be able to analyze mutant Tel1p proteins that cause deficiencies in only one pathway, but not for others. There is a precedence suggesting that the functions of proteins involved in DNA-damage checkpoint and in telomere homeostasis may be separable. Cells expressing a particular mutant Mre11p protein, called Mre11-ts, display short telomeres, similar to those observed in cells lacking Mre11p altogether (Chamankhah et al. 2000). However, these cells are not sensitive to an exposure to MMS when grown at 24°C, while they are sensitive to MMS at 34°C. These data show that the various functions of Mre11p can be affected in a differential fashion and perhaps separable.

Here we describe the characterization of a mutation in the *TEL1* gene, generating a protein we call Tel1-11p. Cells harboring this protein display properties that are consistent with the hypothesis that the functions of Tel1p at telomeres and in the DNA-damage checkpoint have different requirements for Tel1p function. We analyzed three parameters to characterize the effects of the Tel1-11p on cells. Checkpoint functionality was assessed as resistance to MMS-exposure and induction of Rad53p-phosphorylation

in cells that contained the Tel1-11p in combination with *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* mutations. Telomere functions were assessed as overall telomere length and, independently, the ability to stably maintain a certain telomeric repeat tract when Tel1-11p expression is combined with *mec1 sml1Δ* mutations. The results show that when the cells are grown at 26°C, Tel1-11p confers completely wild-type telomere homeostasis and its checkpoint function is slightly affected. Upon growth of the cells at 37°C, telomeres are somewhat shortened, but still stably maintained, even in the absence of Mec1p. However, the checkpoint function is severely impaired or absent at this temperature, since after exposure of cells to MMS, Rad53p phosphorylation is undetectable. These data thus strongly suggest a differential requirement for Tel1p activity in telomere maintenance as compared to the checkpoint function.

## MATERIALS AND METHODS

*Strains and Plasmids:* *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All yeast cells were grown at temperatures indicated in either complete YPD supplemented at need with nourseothricin at 100 µg/ml (WERNER Bioagents, Germany) or G-418 at 150 µg/ml (Sigma). Alternatively, synthetic medium YC supplemented with required amino acids and bases was used. Genetic manipulations were as described (Zakian and Scott 1982; Rose et al. 1990). Transformations were performed according to a modified lithium acetate method (Gietz et al. 1995).

Haploid strains were produced by micro-dissection and genotypes confirmed by marker segregation and Southern analyses, if needed. For construction of the diploid RWY51 (Table 1), the *mec1-ts* allele (Weinert et al. 1994) was recreated in diploid BY4705 (Brachmann et al. 1998) by integrating a copy of *mec1-ts* linked to the *HIS3* gene into the *MEC1* locus, creating *mec1::mec1-ts::HIS3* (T. Weinert, unpublished data). Subsequently, the *tel1Δ::LEU2* and *sml1Δ::TRP1* deletions were introduced into that strain by successively replacing the open reading frames (ORF) of the corresponding genes with the respective selection markers using a PCR-mediated gene disruption method (Brachmann et al. 1998). The same technique was used to introduce the *sae2Δ::kanMX4* and *rad52Δ::kanMX4* deletions into strains as indicated in Table 1. *E. coli* strain DH5α was used for plasmid manipulation according to standard procedures (Sambrook et al. 1989).

*Screen for Mutations Conferring Conditional Synthetic Lethality with mec1-ts* (see Fig. 1 for a general outline). RWY51-24A cells (*mec1-ts ade2 ura3*) carrying a p[*MEC1, ADE2, URA3*] plasmid were subjected to EMS-induced mutagenesis. Briefly, exponentially growing cells were collected, washed twice and resuspended in 1.5 ml of 0.01M potassium phosphate buffer at pH 7.0, sonicated lightly and incubated 30 minutes in presence of 2% EMS, leading to about 40-50% lethality. They were then washed in water three times, plated on YC medium containing 10mg/L adenine and incubated at 37°C. An aliquot of cells was also incubated at 26°C as a scoring control. Cell growth at 37°C was observed up to 7 days after plating and white non-sectored colonies were selected as clones dependent on the plasmid. About 50 000 colonies were screened in this manner. In order to purify the background and select clones that were affected at a single locus, candidate strains were back-crossed to wild type 3 times. Since these backcrosses involved at least two loci (the *mec1-ts* allele and the unknown mutation, *xxx*), haploid segregants after microdissection were expected to follow the segregation ratio of 4:1:1 (tetratype:parental ditype:non-parental ditype). For example, for the strain leading to the eventual identification of the *tel1-11* allele, 34 tetrads scored yielded 24:6:4 (T:PD:NPD) tetrads. Next, we assessed whether selected clones contained a mutation in any of the genes known to display synthetic lethality with *mec1-ts* at 37°C, namely *TEL1*, *MRE11*, *XRS2*, *RAD50* or *RAD52*. This was achieved by 1) crossing candidate double mutants (*mec1-ts, xxx*) with respective double mutants and checking the viability of diploids at 37°C; and 2) by complementing haploid double mutants (*mec1-ts, xxx*) with plasmids carrying one of the genes above (Fig. 1A). These experiments identified at least



one mutation in *RAD50* and two in *TEL1*. Haploid cells harboring the mutation in *RAD50*, or one of the mutations in *TEL1*, together with the *mec1-ts* allele displayed short telomeres when grown at 26°C, as expected, whereas one of the *TEL1* alleles named *tel1-11*, conferred wt telomere lengths (Fig. 1B). This latter allele was isolated and re-introduced into the genome as described below.

**Figure 1. Chakhparonian et al.**

**A)**

**Starting strain RWY51-23A:**

*mec1-ts ura3 ade2* + p[*MEC1, URA3, ADE2*] : Growth at all temperatures

↓ EMS mutagenesis

↓ Primary screen for clones dependent on the plasmid at 37°C

*mec1-ts ura3 ade2 xxx*

growth at 26°C; inviable at 37°C

↓ 3x back-cross with WT

↓ Verification of expected genes, e.g. *RAD50* and *TEL1*, as:

*mec1-ts xxx*

growth at 37°C rescued by p[*TEL1*]

↓ *mec1-ts/mec1Δ xxx/tel1Δ*

growth at 26°C; inviable at 37°C

*mec1-ts xxx*

growth at 37°C rescued by p[*RAD50*]

↓ *mec1-ts/mec1Δxxx/rad50Δ*

growth at 26°C; inviable at 37°C

↓

**Telomere length analysis (see B)**

Figure 1.

Chakhparonian et al.

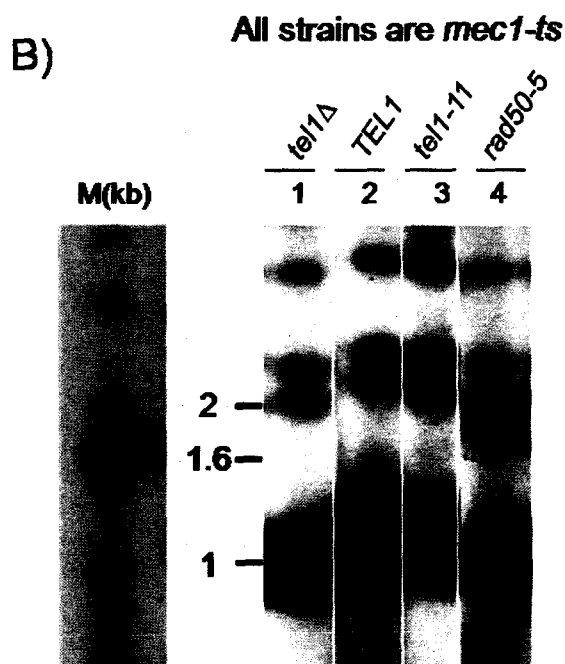
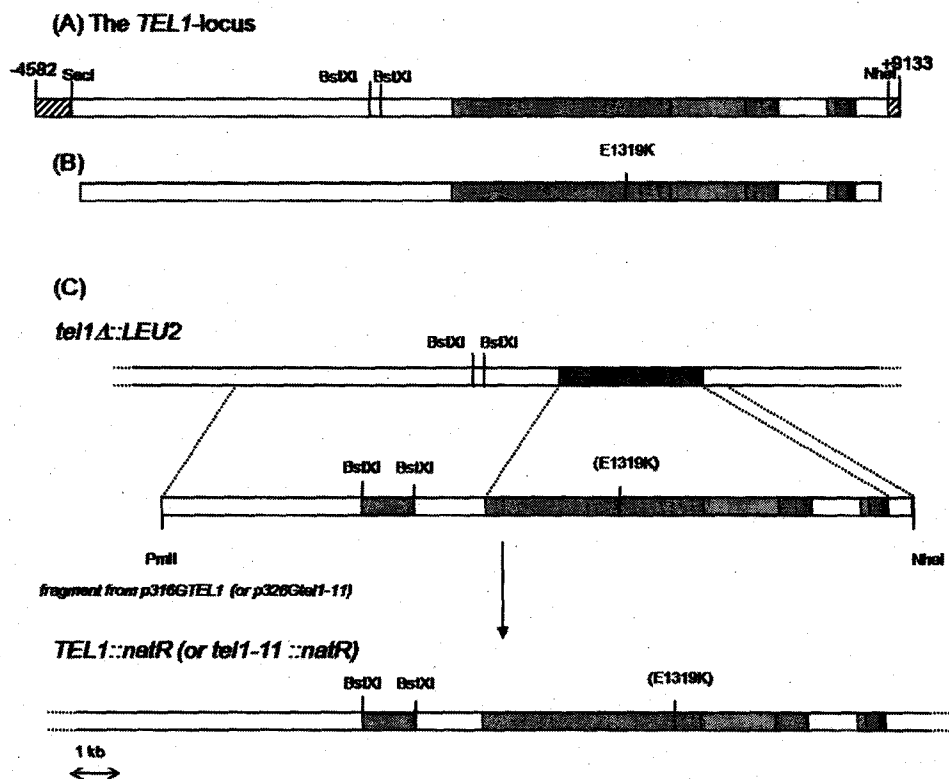


Figure 1. Schematic presentation of the conditional synthetic lethality screen that allowed identification of the *tel1-11* allele. (A) Experimental chart flow. XXX and xxx stand respectively for normal and mutant alleles of candidate genes conferring synthetic lethality at 37°C if combined with the *mec1-ts* allele. (B) Cells with the indicated genotypes were grown for at least 90 generations at 26°C on plates and then allowed to grow for an additional 5 generations in liquid culture prior to DNA extraction and TRF analyses. Lane 1: RWY51-23A (*mec1-ts tel1Δ*); lane 2: RWY51-24A (*mec1-ts TEL1*); lane 3: clone 11 (*mec1-ts tel1-11*); lane 4: clone 5 (*mec1-ts rad50-5*).

*Allele Rescue and Sequencing.* Plasmid p316TGR contains the *TEL1* gene region fragments – 4582 to – 4159 and -388 to +9133 with respect to the translation initiation codon. These regions were connected by a polylinker containing a *SacII* recognition site and the fragment was inserted into the *SacI* - *Sall* sites of pRS316 (Sikorski and Hieter 1989). For allele rescue, p316TGR was digested with *SacII* and *NheI* to create a gap in *TEL1* from – 4159 to +8830 and the gapped plasmid was transformed into yeast strains carrying either *TEL1* or the *tel1-11* allele. The plasmids resulting from this allele rescue (Fig. 2B) were named p316GRtel1-11 and p316GRTEL1, respectively. The complete *tel1-11* coding region derived from the p316GRtel1-11 plasmid was sequenced using flanking T3, T7 and/or internal *TEL1* primers at least twice and the assembled sequence revealed a single point mutation (G3955A), leading to a E to K change at amino acid position 1319. In order to be able to follow *TEL1*-alleles through crosses, plasmids p316GRtel1-11natR and p316GRTEL1natR were constructed by inserting a PCR-amplified *natR* selection marker (conferring resistance to nourseothrecin (Goldstein and McCusker 1999) into the *BstXI* sites upstream of the *TEL1* gene of p316GRtel1-11 and p316GRTEL1 plasmids, respectively (Fig. 2C). Integration of the such *natR*-linked *tel1-11* or *TEL1* alleles into the genome was performed by transformation of the RWY51-23A strain with a *PmlI*-*Sall* fragments (Fig. 2C). Replacement of *tel1Δ::LEU2* by *tel1-11::natR*, *TEL1::natR* or *tel1Δ::LEU2::natR* was verified by Southern blotting and phenotype analysis of the corresponding strains (data not shown). Strains without or with the *natR* gene integrated upstream from different alleles of *TEL1* gene behaved similarly in all assays used (data not shown). Plasmid p316TEL1 contained a *TEL1* genomic fragment -808 to ~+9133 in the

*SpeI-SalI* sites of pRS316 and was used indiscriminately with p316GRTEL1 in complementation assays.

**Figure 2.** Chakhparonian et al.



**Figure 2.** Organization of *TEL1* locus. (A) *TEL1* genomic region; (B) Fragments recovered by gap repair from *TEL1* or *tel-11* carrying strains (mutation in *tel1-11* is indicated); (C) Introduction of *tel-11::natR* or *TEL1::natR* into the genome. Featured are *TEL1* ORF (grey box), domains: FAT (green box), kinase (yellow box) and FATC (blue box) (Bosotti et al. 2000), *LEU2* (dark blue box), *natR* (orange box); and flanking fragments used for gap repair (hatched boxes). Vertical bars represent: E1319K – the position of the mutation revealed by sequencing, *BstXI* – the sites delimiting the region that was replaced by *natR*; *PmlI*, *SacI* and *NheI* – sites used for gap repair.

*Yeast Senescence Assays and Growth Tests:* Senescence was assessed by visual analysis of colony formation and growth on solid rich medium (YPD) under given conditions for a number of generations, and further confirmed by telomere analysis (see below and (Lundblad and Szostak 1989). Formation of an average colony from a single cell was estimated to require ~ 20 divisions, and growth in a 5 ml liquid culture to saturation ~ 5 generations. Overall ability to grow was evaluated by “spot dilution tests”. The cell concentration of an initial liquid culture was determined by measuring the OD600 and corresponding numbers of cells were spotted in serial 10-fold dilutions on YPD medium.

*MMS sensitivity assays:* Stationary cultures were diluted to ~  $0.5 - 1.5 \times 10^6$  cells/ml and allowed to re-grow to exponential phase (~  $0.5-1.5 \times 10^7$  cells/ml). For permanent exposure to MMS, cell growth was assessed by spot dilution tests on YPD medium containing indicated concentrations of MMS. Scoring was generally performed after a 3 or 4-day growth before MMS concentration declined due to its degradation. For acute exposure to MMS, MMS was added directly (final concentration 0.01%) to a culture which was usually 5 to 20ml. These MMS-treated cultures were incubated for 90 min at the indicated temperatures, then washed 3 times with water and survival was assessed by spot dilution tests on YPD medium lacking MMS. Colony scoring was generally performed after a 3-day growth, as no distinct additional colonies appeared later.

*Analysis of Telomere Length:* Telomere length was analyzed as described (Wellinger et al. 1993). Briefly, isolated genomic DNA was digested with the *Xho*I restriction enzyme, which cuts once in the conserved telomere proximal Y' repeat element. Many yeast

telomeres contain such a Y'-element and this digestion releases a diagnostic ~ 1.2 kb terminal restriction fragment (TRF), which includes the terminal ~ 0.35 kb TG<sub>1-3</sub> repeats. This DNA is then analyzed by Southern blotting using specific TG<sub>1-3</sub>-repeat probes, as described previously (Wellinger et al. 1993).

*Western Analysis:* After acute exposure to MMS (see above), protein extracts from 5 to 20 ml aliquots of the cultures were prepared using a modified TCA method. The same cultures were also used to assess survival by spot dilution tests. Proteins were separated on an 8% acrylamid-bisacrylamid gel (ratio 37.5:1) according to standard techniques (Sambrook et al. 1989) and transferred onto Hybond-P membrane according to supplier's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Anti-Rad53p polyclonal rabbit antibody was a kind gift from Frederic Sweeney and Daniel Durocher (Samuel Lunenfeld Research Institute, University of Toronto). Chemiluminescent detection of antigen-antibody complexes was carried out with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies in combination with ECL+ detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech).

## RESULTS

*Isolation of a mutation in the TEL1 gene that is lethal when combined with a mec1-ts mutation.* Cells harboring the *mec1-ts* allele grow normally at 26°C and are only mildly impaired at 37°C (Fig. 3). They are moderately resistant to the DNA-damaging agent MMS at both 26°C and 37°C, and arrest properly upon a single HO-induced DSB at 26°C, but not at 36°C (Weinert et al. 1994). Interestingly, the *mec1-ts* mutation confers lethality when combined with a deletion of *TEL1* (Fig. 3), *MRE11* or *RAD50* (data not shown). This suggests that an essential function of Mec1p is provided by these genes in *mec1-ts* cells at 37°C. The lethality of *mec1-ts tel1Δ* cells at 37°C is suppressed by a deletion of *SML1* or over-expression of *RNR1* (data not shown), indicating that this essential function is related to regulation of nucleotide synthesis (Zhao et al. 1998). However, it is not clear to which extent the essential function of the *mec1-ts* encoded protein is compromised, as the *mec1-ts* allele has not been characterized in full detail. We initially wished to determine which, if any, other genes would belong to the same pathway as the *TEL1* and *MRX*-genes. Therefore, we performed a plasmid-loss based genetic screen (Kranz and Holm 1990) for mutations that would cause lethality when combined with the *mec1-ts* mutation at 37°C, but not at 26°C. Primary candidate mutants were identified as *mec1-ts* cells that could not lose a plasmid harboring a wild-type copy of *MEC1* gene at 37°C, but could lose same at 26°C (see Material and Methods). As expected, we recovered single-locus mutants that affected the *RAD50* and *TEL1* genes. Curiously however, one of the single recessive mutations isolated in our screen, clone 11, while genetically linked to *TEL1*, conferred normal TRF sizes when the

cells were grown at 26°C (see below). These initial results indicated that this mutation in *TEL1* did not yield a short telomere phenotype at 26°C, yet it conferred synthetic lethality when combined with the *mec1-ts* allele at 37°C.

In order to ensure that the mutation indeed occurred in the *TEL1* gene, the mutated gene was cloned by gap repair using a plasmid bearing a gapped copy of *TEL1* (see Materials and Methods). The complete region corresponding to a functional *TEL1* gene was sequenced and shown to contain one single nucleotide divergence with the *TEL1* wild type sequence. The detected guanine to adenine substitution is predicted to provoke the amino acid change E1319K in the Tel1p sequence. The corresponding allele was thus named *tel1-11* and the protein encoded by it Tel1-11p.

In order to further characterize this mutant protein, we integrated the *tel1-11* into the genome of the strain RWY51-23A in replacement of *tel1Δ::LEU2* as described in Methods. The analysis of the resultant strain proved that *tel1-11* conferred synthetic lethality with *mec1-ts* at 37°C, but did not impair the growth of *mec1-ts* cells at 26°C (Fig. 3). We then characterized Tel1-11p with respect to three functions that the Tel1p protein is known to accomplish: normal telomere length maintenance, maintenance of telomeres in *mec1Δ sml1Δ* cells and activation of a DNA-damage checkpoint.



Figure 3.

Chakhparonian et al.

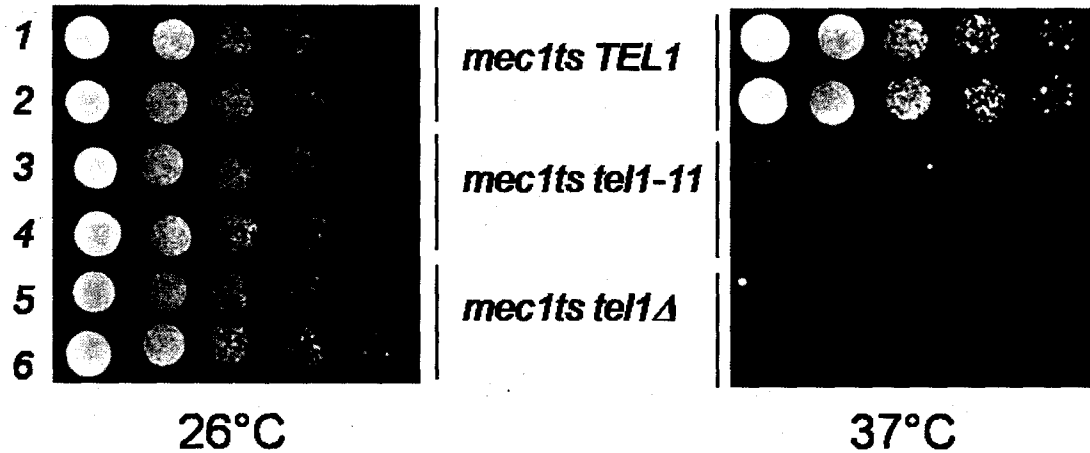


Figure 3. At 37°C the *tel1-11* mutation is lethal when combined with the *mec1-ts* mutation. Growth tests of integrative mutants were performed as described in Methods. About 10 cells were plated on the most diluted spots. Strains used are: 1 MCY56-4 (*mec1-ts TEL1*); 2 MCY56-10 (*mec1-ts TEL1*); 3 MCY511-1 (*mec1-ts tel1-11*); 4 MCY511-3 (*mec1-ts tel1-11*); 5 MCY56-3 (*mec1-ts tel1Δ*); 6 MCY511-9 (*mec1-ts tel1Δ*).

*In cells expressing Tel1-11p, telomere lengths are normal at 26°C and shortened at 37°C. In order to assess the telomere functions of Tel1-11p, congenic spores bearing corresponding alleles of TEL1 were derived from diploid heterozygous strains MCY751 (MEC1/*mec1-ts tel1Δ/tel1-11*) or RWY51 (MEC1/*mec1-ts TEL1/tel1Δ*). These heterozygous diploids, when grown at 26°C, possessed normal telomeres (data not shown). Haploid segregants were sub-cultured by re-streaking on plates at 26°C or 37°C*

followed by a liquid culture at the same conditions, genomic DNA was isolated and subjected to TRF analysis. Upon a complete loss of the *TEL1* gene, telomeres shorten to attain a minimal stable length within 25 generations (Ritchie et al. 1999); although the telomeres in cells harboring certain *TEL1* mutations attain their minimum length only after about 150 generations (Lustig and Petes 1986). After growth for 145 generations at 26°C, the presence of Tel1-11p still conferred stable telomere lengths, which were indistinguishable from cells containing the wild-type Tel1p (Fig. 4A). When the cells were subcultured at 37°C, telomeres of *tel1-11* strains gradually shortened, but after about 145 generations, they were still slightly longer than those of cells lacking Tel1p altogether (Fig. 4B, lanes 7-12). When these *tel1-11* cells were shifted back to 26°C, their telomeres regained wild-type length within 45 generations (Fig. 4B, lanes 1-6). These data indicate that Tel1-11p confers some temperature sensitivity in terms of normal telomere length maintenance: this function appears to be fully supplied when cells are grown at 26°C, but compromised at 37°C.

Figure 4.

Chakhparonian et al.

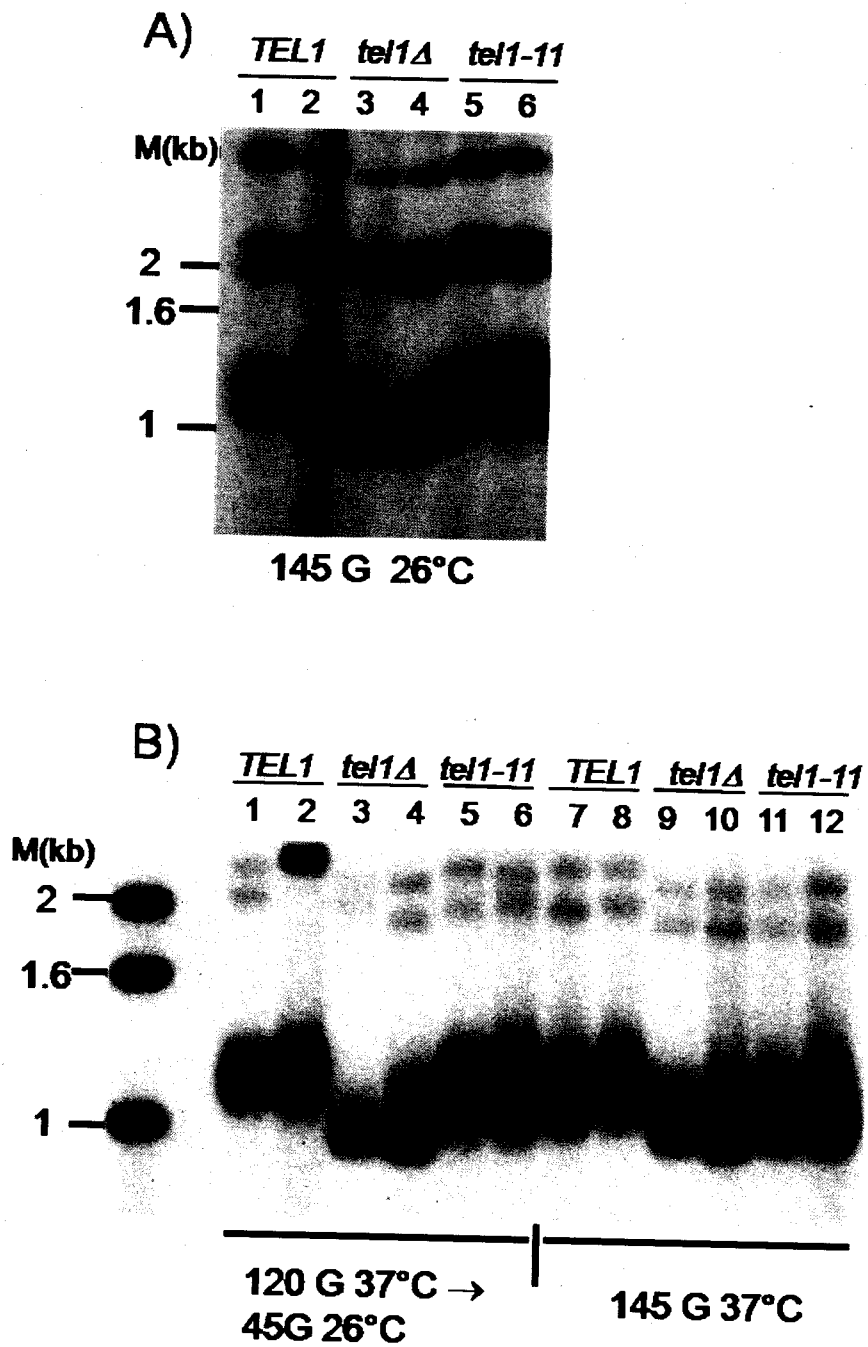


Figure 4. The Tel1-11p confers a normal telomere length phenotype at 26°C and shortened telomeres at 37°C.

(A) Cells harboring the indicated alleles of the *TEL1* gene were cultivated at 26°C for 145 generations and TRF lengths were assessed as described in Methods.

(B) Cells as in A) were cultivated for 120 generations at 37°C, then split into two subcultures; one was kept for an additional 25 generations at 37°C (lanes 7-12, right), the other was cultivated for the next 45 generations at 26°C (lanes 1-6, left). M - molecular weight marker, G - generations. Signals between 1.0 and 1.6 kb are TRFs from Y' telomeres; some non-Y' TRFs of >1.6kb can be seen. Strains used are 1, 7 RWY51-7B (*TEL1*); 2, 8 RWY51-28C (*TEL1*); 3, 9 MCY751-1A (*tel1Δ*); 4, 10 MCY751-2C (*tel1Δ*); 5, 11 MCY751-1D (*tel1-11*); 6, 12 MCY751-2B (*tel1-11*).

*Mec1Δ sml1Δ tel1-11* cells can maintain short, but stable telomeres at 37°C. As a second criterion for the functioning of Tel1-11p at telomeres, we asked whether *tel1-11* cells depended on Mec1p to maintain a critical telomere length without entering a senescence crisis. To that end, we first compared the growth and telomere TRF length patterns of cells that were grown at 37°C with the following genotypes: *mec1Δ sml1Δ TEL1 rad52Δ*, *mec1Δ sml1Δ tel1-11 rad52Δ* and *mec1Δ sml1Δ tel1Δ RAD52*. No striking difference could be observed in the growth of Mec1-deficient cells possessing a *TEL1* or

*tel1-11* allele for 120 generations analyzed, whereas cells with a *tel1Δ* allele displayed a clear senescent phenotype after ~ 60 generations (Fig. 5A). Furthermore, at the end of the analyses, *mec1Δ sml1Δ tel1-11 rad52Δ* cells harbored short and stable telomeres (Fig. 5B). As a possible indication of a stable maintenance of the telomeres in this strain, they were clearly longer than those of *mec1Δ sml1Δ tel1Δ* cells and there was no indication of telomeric rearrangements typical for survivors, which maintain their telomeres by homeologous recombination [Fig. 5B, (Lundblad and Blackburn 1993; Teng and Zakian 1999)]. These data indicate that even when cells were grown continuously at 37°C, cells lacking Mec1p and expressing Tel1-11p can stably maintain telomeric repeats and do not display phenotypes that would indicate a complete loss of telomerase activity at the telomeres, such as observed in cells completely lacking both Mec1p and Tel1p. Thus, although Tel1-11p cannot fully supply the function to maintain normal length telomeres at 37°C, this protein is proficient in providing the functions required for stable maintenance of telomeric repeats in the absence of Mec1p at all temperatures.

Figure 5.

Chakhparonian et al.

A)

37°C



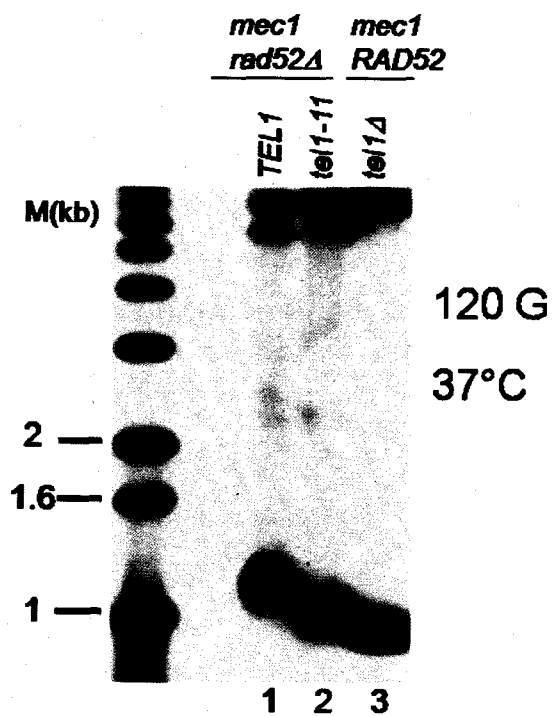
60 G



180 G

<i>mec1Δ</i> <i>sml1Δ</i> <i>rad52Δ</i> <i>tel1Δ</i>	<i>mec1Δ</i> <i>sml1Δ</i> <i>rad52Δ</i> <i>TEL1</i>
<i>mec1Δ</i> <i>sml1Δ</i> <i>rad52Δ</i> <i>tel1-11</i>	<i>mec1Δ</i> <i>sml1Δ</i> <i>rad52Δ</i> <i>tel1-11</i>

B)



**Figure 5.** In the absence of Mec1p, Tel1-11p does not confer a senescence phenotype even when the cells are grown at 37°C.

(A) Subculturing of strains on plates were performed at 37°C for the indicated number of generations as described in Methods. To the right, the relevant genotypes of the strains cultured in the respective quadrants of the plates are indicated. Note that *mec1Δ sml1Δ tel1Δ rad52Δ* cells (top left quadrant) did not grow beyond 80 generations. Strains used are: MCY1700-7A (*mec1Δ sml1Δ rad52Δ tel1Δ*); MCY1700-2C (*mec1Δ sml1Δ rad52Δ TEL1*); MCY111-6A, MCY111-10A (*mec1Δ sml1Δ tel-11 rad52Δ*).

(B) Cells with the indicated genotypes were grown for at least 120 generations at 37°C on plates and were then allowed to grow for an additional 5 generations in liquid culture prior to DNA extraction and TRF analyses as described in Methods. Lane 1: MCY1700-2C (*mec1Δ sml1Δ rad52Δ TEL1*); lane 2: MCY111-6A (*mec1Δ sml1Δ rad52Δ tel-11*); lane 3: DFY 030 (*mec1Δ sml1Δ RAD52 tel1Δ*).

*The DNA-damage checkpoint function is undetectable in cells expressing Tel1-11p grown at 37°C.* In the presence of Mec1p, strains expressing Tel1-11p did not display any obvious growth defects or MMS sensitivity at either 26°C or 37°C (data not shown). This was expected though, since otherwise wild-type cells but lacking Tel1p altogether were shown to behave similarly (Sanchez et al. 1996). However, the contribution of Tel1p to the DNA-damage checkpoint was demonstrated in cells that contain *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* mutations (Usui et al. 2001). We therefore introduced the *tel1-11* allele into that

background by crossings (see Table 1). In this setting, cells possessing a functional checkpoint provided by Tel1p are relatively resistant to MMS exposure and able to phosphorylate Rad53p. Unfortunately, we could not use *mec1 sml1Δ sae2Δ tel1Δ* cells in tests for checkpoint function, as cells with this combination of mutations displayed a very early onset of senescence (see Fig. 6 for example). Thus, growth of *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* cells expressing Tel1-11p was compared to *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* cells expressing wild-type Tel1p in the presence of MMS (Fig. 6). At 26°C, *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells were no more sensitive to 0.01% MMS than *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* cells (Fig. 6, bottom left). At 37°C, *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells clearly were more sensitive to 0.01% MMS exposure than *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* cells (Fig. 6, bottom right).



Figure 6.

Chakhparonian et al.

All strains are *mec1Δ sml1Δ sae2Δ*

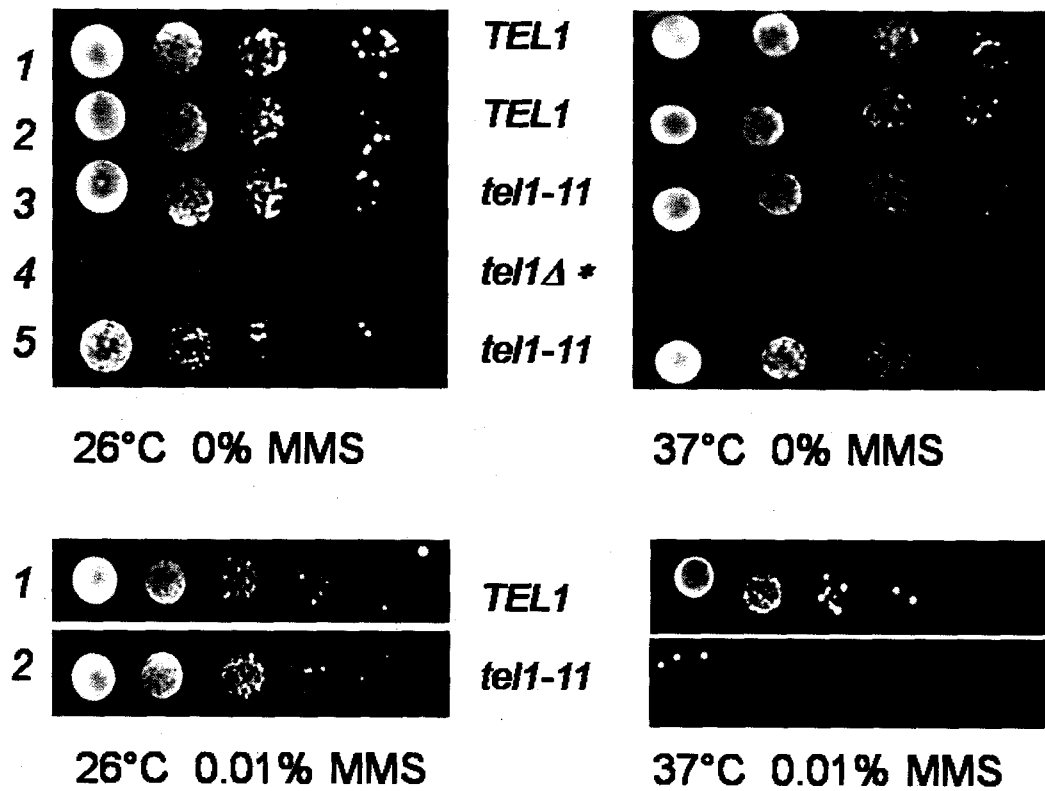


Figure 6. At 37°C , the *tel1-11* allele confers sensitivity to MMS exposure when combined with *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* mutations.

(Top) Growth tests in the absence of MMS by spot dilution were performed as described in Methods. Cells used for these tests were grown for ~ 30 generations before plating. About 10 cells were plated on the most diluted spots. \* Note the senescence of cells lacking all ATM-like kinases (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1Δ*). Strains used are: 1 MCY7411-4B (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1*); 2 MCY7412-18A (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1*); 3 MCY7412-18B (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11*); 4 MCY7422-7B (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1Δ*); 5 MCY7422-7C (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11*).

(Bottom) Growth tests of strains in presence of MMS were performed as described in Methods. About 1 cell was plated on the most diluted spots. Strains used are: 1 MCY7412-18A (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1*); 2 MCY7412-18B (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11*).

In a parallel assay, the cells were exposed to 0.01% MMS for a limited time (90 min, acute exposure) at 26°C or 37°C and the extent of Rad53p phosphorylation was analyzed in total protein extracts from the cells exposed to these conditions. Phosphorylation was deduced from the appearance of slowly migrating forms of Rad53p using an anti-Rad53 antibody (Vialard et al. 1998). After acute exposure to MMS at 26°C, Rad53p was nearly completely phosphorylated in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* cells and at least partially phosphorylated in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells (Fig. 7). When these same cells were replated after the acute exposure on media without MMS at 26°C, a

slight reduction in viability was observed for the *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells when compared to the in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* cells (data not shown), which correlates well with the incomplete phosphorylation of Rad53p (Fig. 7). In contrast, at 37°C, Rad53p phosphorylation could only be detected in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* cells, but not in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells (Fig. 7) and the latter cells did not re-grow on plates without MMS incubated at 37°C (data not shown). This correlation between analyses of re-growth and Rad53p-phosphorylation upon exposure to MMS demonstrates that in the genetic backgrounds used here, cells expressing Tel1-11p are severely compromised for the DNA-damage checkpoint at 37°C, while this function is quite proficient, when the assays were performed at 26°C.

**Figure 7. Chakhparonian et al.**

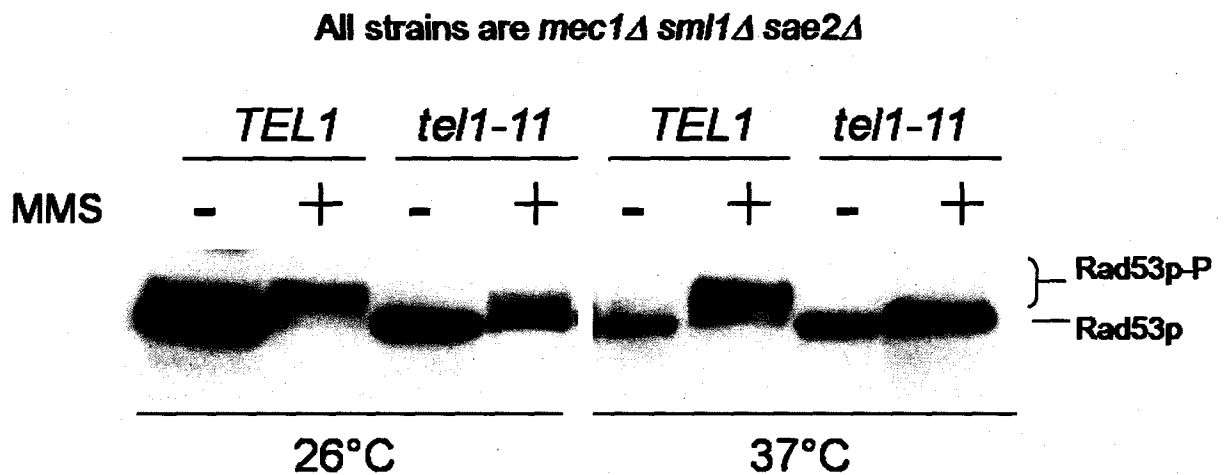


Figure 7. Absence of detectable Rad53p phosphorylation in cells expressing Tel1-11p at 37°C. Phosphorylation of Rad53p in *mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1* or *mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11* cells exposed to 0.01% MMS for 90 min at 26°C or 37°C. Assay conditions and detection of non-phosphorylated Rad53p (Rad53p) and phosphorylated Rad53p (Rad53p-P) was performed as described in Methods. Strains used are: MCY7412-18A (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ TEL1*); MCY7412-18B (*mec1Δ sml1Δ sae2Δ tel1-11*).

## DISCUSSION

Tel1p has been implicated in both telomere maintenance and a DNA-damage checkpoint, sometimes referred to as TM-checkpoint (Greenwell et al. 1995; Usui et al. 2001). In addition, the MRX-complex has been associated with Tel1p for both of these functions (Tsukamoto et al. 2001; Usui et al. 2001). Although the first indication that these functions can be separated was provided by the discovery of an *mre11(ts)* allele (Chamankhah et al. 2000), it remained unclear whether Tel1p contributes differentially to telomere maintenance and the DNA-damage checkpoint or whether its functions at telomeres are dependent on the same type and level of activity also required for the checkpoint. Here, we show that Tel1p contributes differentially to normal and basic telomere functions and DNA-damage checkpoints.

This conclusion is derived from analyses of phenotypes conferred to cells by a new mutation in the *TEL1* gene, called *tel1-11*. The mutation was isolated by virtue of its synthetic lethal interaction with a *mec1-ts* allele at 37°C. First, to assess the functions of *tel1-11* encoded protein (Tel1-11p) in terms of maintenance of telomeric repeats, we analyzed two different phenotypes. The first relates to the ability of Tel1p to maintain a telomeric repeat tract of wild-type length, which we will refer to as the normal telomere function. The second is operationally defined as the activity which, in the absence of Mec1p, is required to maintain a stable telomeric repeat tract for more than 120 generations with the cells not undergoing a senescence crisis; we will call this activity the basic telomere function of Tel1p. Both of these functions are absent in cells completely

lacking Tel1p (Figs. 4 and 5). Intriguingly, Tel1-11p provides proficiency in both normal and basic telomere function when cells are grown at 26°C. However in cells grown at 37°C, the mutation clearly affects normal telomere function, although not as severely as a *tel1Δ* mutation (Fig. 4). On the other hand and most significantly, in cells expressing Tel1-11p, the basic telomere function remains intact at all temperatures (Fig. 5). Second, we assayed the DNA-damage checkpoint functions conferred by Tel1-11p, as defined by phosphorylation of Rad53p and cell survival in a *mec1Δ sm/1Δ sae2Δ* background upon exposure to MMS. Compared to cells expressing wild-type Tel1p, cells harboring Tel1-11p display a reduction of the level of Rad53p phosphorylation already at 26°C; and there is no phosphorylated Rad53p detectable, when the checkpoint functions are assayed in this setting at 37°C (Fig. 7). The sensitivities of these cells to DNA-damage induced by MMS parallel these findings quite well (Fig. 6 and data not shown). We conclude that DNA-damage checkpoint functions conferred by Tel1-11p are reduced at 26°C and virtually abolished at 37°C. These data are summarized in Table 2.

Hence and most strikingly, at 37°C, the basic telomere function of Tel1p is maintained by Tel1-11p even in the absence of detectable induction of a DNA-damage checkpoint. This differential requirement for Tel1p activity in terms of the basic telomere function and the TM-checkpoint function can be rationalized in several ways. For example, these two functions could be carried out by different activities of Tel1p, or there are different targets of a common Tel1p activity, such as its kinase activity. In this latter scenario, Tel1-11p could be deficient in interactions required to activate the checkpoint, but still able to perform its activity on the targets required for maintaining

telomeric repeats in the absence of Mec1p. Alternatively, the checkpoint and the basic telomere functions could have differential requirements for a common Tel1p activity on the same target. For example, even when the cells are grown at 37°C, Tel1-11p could supply a minimal kinase activity, just sufficient to phosphorylate a critical substrate to allow the basic telomere function. However, this minimal level of activity would not be sufficient to activate the DNA-damage pathway, at least in terms of detectable Rad53p phosphorylation or resistance to genotoxic stress.

These two hypotheses are not mutually exclusive, since the mutation may actually affect different activities to different extents. The known genetic and physical interactions of Tel1p with other components of cellular checkpoint and repair mechanisms are consistent with either possibility, even though the MRX-complex has been placed in the same epistasis group as Tel1p with respect to its functions in the checkpoint as well as with respect to its functions at telomeres (Ritchie and Petes 2000; Usui et al. 2001), suggesting a common function. However, these genetic interactions may not necessarily reflect the same functional interactions. For example, recent data suggest that in vivo, the MRX-complex associates efficiently with DSBs in wild-type as in cells lacking Tel1p (Nakada et al. 2003a). The bound MRX-complex then interacts with Tel1p via a C-terminal domain of the Xrs2p, since the association of Tel1p with the breaks is dependent on this domain (Nakada et al. 2003a). On the other hand, telomeres isolated from asynchronously growing cells do not seem to be bound by the MRX-complex at an appreciable level, as long as Tel1p or Mec1p are present (Mieczkowski et al. 2003). Therefore, on telomeres, an activity that can be supplied by Mec1p or Tel1p

appears to restrict and/or regulate the binding of the MRX-complex (Mieczkowski et al. 2003). As one possible interpretation of all the data, we speculate that the mutated Tel1-11p analyzed here may be severely impaired in its interactions at DSBs, but much less affected in its telomere-related activity. This would explain the drastic loss of the checkpoint activity while the basic telomere function remained intact in cells harboring this protein (Table 2).

Qualitatively, the degree of impairment of the normal telomere function conferred by Tel1-11p at 37°C lies between that of the basic telomere functions and the TM-checkpoint, and this function is unaffected at 26°C, as discussed above (Table 2). These data reinforce the idea that the normal telomere function as well does not require a fully functional checkpoint (Morrow et al. 1995). However, given that in cells grown at 37°C, telomeric repeat tracts are not quite as long as in wild-type cells, it is difficult to predict whether this phenotype is caused by the impairment of the checkpoint activity or is the consequence of the mutation affecting another function of Tel1p. There is circumstantial evidence that Tel1p is involved in a Mec1-dependent, but MRX-independent G2/M-checkpoint signaling cascade (Giannattasio et al. 2002), and Tel1p has also been implicated in a chromosome capping function that prevents DSB to telomere fusions (Chan and Blackburn 2003). However, the latter issue is complicated by the fact that frequencies of direct telomere to telomere fusions are not increased in the absence of only Tel1p (Mieczkowski et al. 2003). It will be important to assess whether all of these functions depend on an active kinase function of Tel1p or whether some of them are dependent on other functions of Tel1p (see above).



Taken together, our data establish that Tel1p contributes differently to normal and basic telomere functions versus the DNA-damage checkpoint. This reinforces the idea that in wild-type cells, this yeast ATM-like kinase is involved in an important regulatory step during telomere replication and this function may be separable from the checkpoint function. ATM-lacking mammalian cells also display telomere-specific phenotypes, such as increased frequencies of chromosome end-fusions and accelerated loss of telomeric repeat DNA (Metcalf et al. 1996; Pandita 2002). Given our results, it is possible that ATM-functions required at mammalian telomeres are different and separable from other cellular Atm functions. In fact, a recent phenotypic analysis of *Terc*<sup>-/-</sup> *Atm*<sup>-/-</sup> mice raised a similar possibility (Wong et al. 2003). Therefore, an in-depth analysis of separation-of-function alleles of ATM-like kinases in yeast could yield hints about the molecular defects in A-T patients.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank R. Rothstein, D. Durocher and T. Weinert for generously providing yeast strains, plasmid constructs or antibodies used in this study. This project was actually initiated by I. Dionne, whom we thank for providing unpublished data. The work was supported by the Canadian Cancer Society (NCIC research grant 013235). M.C. was supported by a post-doctoral fellowship by the Swiss National Science Fund and R.J.W. is a Chercheur National from the FRSQ.

## REFERENCES:

- Brachmann CB et al. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14:115-132
- Cha RS, Kleckner N (2002) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* 297:602-606
- Chakhparonian M, Wellinger RJ (2003) Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* 19:439-446
- Chamankhah M, Fontanie T, Xiao W (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* mre11(ts) allele confers a separation of DNA repair and telomere maintenance functions. *Genetics* 155:569-576
- Chan SW, Blackburn EH (2003) Telomerase and ATM/Tel1p Protect Telomeres from Nonhomologous End Joining. *Mol Cell* 11:1379-1387
- Chan SW, Chang J, Prescott J, Blackburn EH (2001) Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* 11:1240-1250
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110:119-122
- Clerici M, Paciotti V, Baldo V, Romano M, Lucchini G, Longhese MP (2001) Hyperactivation of the yeast DNA damage checkpoint by TEL1 and DDC2 overexpression. *Embo J* 20:6485-6498
- Corda Y et al. (1999) Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. *Nat Genet* 21:204-208
- D'Amours D, Jackson SP (2001) The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* 15:2238-2249
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-327
- Giannattasio M et al. (2002) A dominant-negative MEC3 mutant uncovers new functions for the Rad17 complex and Tel1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12997-13002
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-360
- Goldstein AL, McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1541-1553

- Greenwell PW, Kronmal SL, Porter SE, Gassenhuber J, Obermaier B, Petes TD (1995) TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82:823-829
- Kranz JE, Holm C (1990) Cloning by function: an alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6629-6633
- Longhese MP, Paciotti V, Neecke H, Lucchini G (2000) Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. *Genetics* 155:1577-1591
- Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1-* senescence. *Cell* 73:347-360
- Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57:633-643
- Lustig AJ, Petes TD (1986) Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1398-1402
- McAinsh AD, Scott-Drew S, Murray JA, Jackson SP (1999) DNA damage triggers disruption of telomeric silencing and Mec1p-dependent relocation of Sir3p. *Curr Biol* 9:963-966
- Metcalfe JA et al. (1996) Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet* 13:350-353
- Mieczkowski PA, Mieczkowska JO, Dominska M, Petes TD (2003) Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10854-10859
- Morrow DM, Tagle DA, Shiloh Y, Collins FS, Hieter P (1995) TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 82:831-840
- Myung K, Chen C, Kolodner RD (2001) Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 411:1073-1076
- Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K (2003a) ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* 17:1957-1962
- Nakada D, Shimomura T, Matsumoto K, Sugimoto K (2003b) The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Res* 31:1715-1724
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. *Annu Rev Genet* 36:617-656

- Pandita TK (2002) ATM function and telomere stability. *Oncogene* 21:611-618
- Ray A, Runge KW (2001) Yeast telomerase appears to frequently copy the entire template in vivo. *Nucleic Acids Res* 29:2382-2394
- Ritchie KB, Mallory JC, Petes TD (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:6065-6075
- Ritchie KB, Petes TD (2000) The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* 155:475-479
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271:357-360
- Santocanale C, Diffley JF (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395:615-618
- Takata H, Kanoh Y, Gunge N, Shirahige K, Matsuura A (2004) Reciprocal Association of the Budding Yeast ATM-Related Proteins Tel1 and Mec1 with Telomeres In Vivo. *Mol Cell* 14:515-522
- Teng SC, Zakian VA (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:8083-8093
- Tsukamoto Y, Taggart AK, Zakian VA (2001) The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* 11:1328-1335
- Usui T, Ogawa H, Petrini JH (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* 7:1255-1266
- Vialard JE, Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF (1998) The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *Embo J* 17:5679-5688
- Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 8:652-665

- Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA (1993) Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* 13:4057-4065
- Wong KK et al. (2003) Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* 421:643-648
- Zakian VA, Scott JF (1982) Construction, replication, and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA. *Mol Cell Biol* 2:221-232
- Zhao X, Muller EG, Rothstein R (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* 2:329-340
- Zhu Y, Xiao W (2001) Two alternative cell cycle checkpoint pathways differentially control DNA damage-dependent induction of MAG1 and DDI1 expression in yeast. *Mol Genet Genomics* 266:436-444

TABLE 1: Strains used in this study.

Strain	Genotype	Source / Remarks
BY4705 (diploid)	<i>MAT<math>\alpha</math></i> / <i>MATa ade2<math>\Delta</math>::hisG / ade2<math>\Delta</math>::hisG his3<math>\Delta</math>200 / his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>0 / leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 / lys2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 / met15<math>\Delta</math>0 trp1<math>\Delta</math>63 / trp1<math>\Delta</math>63 ura3<math>\Delta</math>0 / ura3<math>\Delta</math>0</i>	(BRACHMANN <i>et al.</i> 1998)
U953-61A	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 mec1<math>\Delta</math>::TRP1 sml1<math>\Delta</math>::HIS3</i>	R. Rothstein, (ZHAO <i>et al.</i> 1998)
RWY51	same as BY4705, addition of <i>mec1::mec1ts::HIS3 / MEC1 tel1<math>\Delta</math>::LEU2 / TEL1 sml1<math>\Delta</math>::TRP1 / SML1</i>	This study (derived from BY4705, see Materials and Methods)
RWY51-7B	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2<math>\Delta</math>::hisG his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 trp1<math>\Delta</math>63 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Spore of RWY51
RWY51-28C	same as RWY51-7B	Spore of RWY51
RWY51-7D	same as RWY51-7B but <i>tel1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	Spore of RWY51
RWY51-27A	same as RWY51-7D but <i>MATa</i>	Spore of RWY51
RWY51-23A	same as RWY51-7B but <i>mec1::mec1ts::HIS3 tel1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	Spore of RWY51
MCY5122	same as RWY51, addition of <i>sae2<math>\Delta</math>::kanMX4 / SAE2</i>	This study
RWY51-24A	same as RWY51-7B but <i>mec1::mec1ts::HIS3</i>	This study
clone 11	Clone of RWY51-24A after EMS mutagenesis, original clone harboring <i>tel1-11</i>	This study

clone 5	Clone of RWY51-24A after EMS mutagenesis, original clone harboring a mutation in <i>RAD50</i>	This study
MCY5125	same as MCY5122	This study
MCY5122-7C	<i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 mec1::mec1ts::HIS3 sml1Δ::TRP1 tel1Δ::LEU2 sae2Δ::kanMX4</i>	Spore of MCY5122
MCY5125-11A	same as MCY5122-7C	Spore of MCY5125
MCY5122-3D	<i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 mec1::mec1ts::HIS3 TEL1 sml1Δ::TRP1 sae2Δ::kanMX4</i>	Spore of MCY5122
RWY517	<i>MATa / MATα ade2-1 / ade2Δ::hisG ura3-1 / ura3Δ0 his3-11 / his3Δ200 trp1-1 / trp1Δ63 leu2-3,112 / leu2Δ0 mec1Δ::TRP1 / MEC1 sml1Δ::HIS3 / SML1 TEL1 / tel1Δ::LEU2</i>	Diploid formed by mating of U953-61A with RWY51-7D
RWY517-5B	<i>MATa ade2 ura3 his3 trp1 leu2 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1Δ::LEU2</i>	Spore of RWY517
RWY51-30C	<i>ade2 ura3 his3 trp1 leu2 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 TEL1</i>	Spore of RWY517
MCY511-1	Same as RWY51-23A in which the <i>tel1Δ::LEU2</i> allele was changed by integration of the <i>tel1-11::natR</i> allele	This study
MCY511-3	same as MCY511-1	This study
MCY56-4	Same as RWY51-23A in which the <i>tel1Δ::LEU2</i> allele was changed by integration of the <i>TEL1::natR</i> allele	This study
MCY56-10	same as MCY56-4	This study
MCY511-9	Same as RWY51-23A in which the <i>tel1Δ::LEU2</i>	This study



---

	allele was changed by integration of the <i>natR</i> gene	
MCY56-3	same as MCY511-9	This study
MCY721	<i>MATa / MATα ade2 / ade2Δ::hisG ura3 / ura3Δ0 his3 / his3Δ200 trp1 / trp1Δ63 leu2 / leu2Δ0 mec1Δ::TRP1 / mec1::mec1-ts::HIS3 sml1Δ::HIS3 / SML1 tel1Δ::LEU2 / tel1-11::natR</i>	Diploid formed by mating of MCY511-1 with RWY517-5B
MCY721-1B	<i>ade2 ura3 his3 trp1 leu2 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1-11::natR</i>	Spore of MCY721
MCY741	<i>MATa / MATα ade2Δ::hisG / ade2 his3Δ200 / his3 leu2Δ0 / leu2 lys2Δ0 / lys2 met15Δ0 / met15 trp1Δ63 / trp1 ura3Δ0 / ura3 mec1::mec1ts::HIS3 / mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 / sml1::HIS3 tel1Δ::LEU2 / tel1-11::natR sae2Δ::kanMX4 / SAE2</i>	Diploid formed by mating MCY721-1B and MCY5122-7C
MCY742	<i>MATa / MATα ade2Δ::hisG / ade2 his3Δ200 / his3 leu2Δ0 / leu2 lys2Δ0 / lys2 met15Δ0 / met15 trp1Δ63 / trp1 ura3Δ0 / ura3 mec1::mec1ts::HIS3 / mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 / sml1::HIS3 TEL1 / tel1-11::natR sae2Δ::kanMX4 / SAE2</i>	diploid formed by mating of MCY721-1B with MCY5125-11A
MCY743	same as MCY742	diploid formed by mating of MCY721-1B with MCY5122-3D
MCY7412-18B	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 sae2Δ::kanMX4 tel1-11::natR</i>	Spore of MCY741
MCY7422-7C	same as MCY7412-18B	Spore of MCY742
MCY7431-11A	same as MCY7412-18B	Spore of MCY743
MCY7412-	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3</i>	Spore of MCY741

---

---

18A	<i>mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 sae2Δ::kanMX4 TEL1</i>	
MCY7411-4B	same as MCY7412-18A	Spore of MCY741
MCY7422-7B	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 sae2Δ::kanMX4 tel1Δ::LEU2</i>	Spore of MCY742
MCY7431-16D	same as MCY7422-7B	Spore of MCY743
MCY751	same as BY4705 but <i>mec1::mec1ts::HIS3 / MEC1 tel1-11::natR / tel1Δ::LEU2</i>	Diploid formed by mating of MCY511-1 with RWY51-27A
MCY751-1D	<i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 tel1-11::natR</i>	Spore of MCY751
MCY751-2B	same as MCY751-1D	Spore of MCY751
MCY751-1A	<i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 tel1Δ::LEU2</i>	Spore of MCY751
MCY751-2C	same as MCY751-1A	Spore of MCY751
MCY1700	Same as RWY517 with the addition of <i>RAD52 / rad52Δ::kanMX4</i>	This study
MCY1700-7A	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1Δ rad52Δ::kanMX4</i>	Spore of MCY1700
MCY1700-2C	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 TEL1 rad52Δ::kanMX4</i>	Spore of MCY1700
MCY11	<i>MATa / MATα ade2 / ade2 his3 / his3 leu2 / leu2 lys2 / lys2 met15 / met15 trp1 / trp1 ura3 / ura3 mec1Δ::TRP1 / MEC1 sml1Δ::HIS3 /</i>	Diploid formed by mating of MCY751-1D with RWY51-30C

---

---

	<i>SML1 TEL1 / tel1-11::natR</i>	
MCY111	Same as MCY11 with the addition of <i>RAD52 / rad52Δ::kanMX4</i>	This study
MCY111-6A	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1-11::natR rad52Δ::kanMX4</i>	Spore of MCY111
MCY111-10A	same as MCY111-6A	Spore of MCY111
DFY030	<i>ade2 his3 leu2 lys2 met15 trp1 ura3 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1Δ::LEU2 RAD52</i>	Spore of MCY1700

---

TABLE 2: Summary of phenotypes conferred by Tel1p vs Tel1-11p.

Protein	Temp. (°C)	TM - checkpoint <sup>a</sup>	Normal telomere length <sup>b</sup>	Absence of senescence in <i>mec1Δ sml1Δ</i> cells <sup>c</sup>
Tel1p wt	26°	+	+	+
Tel1p wt	37°	+	+	+
Tel1-11p	26°	-+	+	+
Tel1-11p	37°	--	-+	+
( <i>tel1Δ</i> )	26°	--	--	--
( <i>tel1Δ</i> )	37°	--	--	--

Note: -- severely impaired, -+ moderately impaired, + normal function.

a) assessed by MMS sensitivity and Rad53p phosphorylation when the indicated Tel1p protein is expressed in a *mec1Δ sml1Δ sae2Δ* background;

b) assessed by Southern hybridization;

c) assessed by growth observation and telomere analysis by Southern hybridization when the indicated Tel1p protein is expressed in a *mec1Δ sml1Δ rad52Δ* background.

## **SUPPLEMENTARY DATA**

### **MATERIALS AND METHODS**

Tagging of Tel1p and Tel1-11p. Strains RWY51-28C and MCY751-1D expressing Tel1p and Tel1-11p, respectively, were transformed with the pML285 plasmid in order to produce strains expressing three tandem hemagglutinin (HA3) epitope-tagged versions of the respective proteins, as previously described (Clerici et al. 2001). The resulting strains were MCY8401 and MCY 8402 for HA3-Tel1p; MCY8411 and MCY8412 for HA3-Tel1-11p (see supplemental Table 1 below).

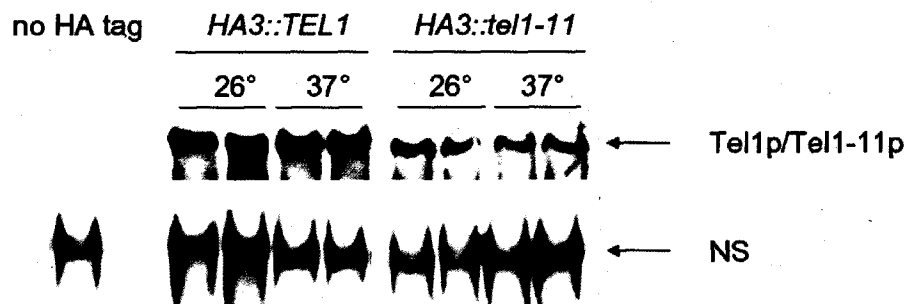
Western analysis. Proteins extracted from strains MCY8401, MCY 8402, MCY8411 and MCY8412 were subjected to Western analysis as described previously (Clerici et al. 2001). Briefly, proteins were extracted from cultures growing exponentially at 26°C or 37°C, separated on a 5% acrylamid-bisacrylamid gel (ratio 29:1) according to standard techniques (Sambrook et al. 1989) and transferred onto Hybond-P membrane according to supplier's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Anti-HA monoclonal mouse 12CA5 antibody was used (Roche). Chemiluminescent detection of antigen-antibody complexes was carried out with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibodies in combination with ECL+ detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech).

**Supplemental Table 1: Strains for the supplemental western study.**

MCY8401	MAT $\alpha$ <i>ade2<math>\Delta</math>::hisG his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 trp1<math>\Delta</math>63 ura3<math>\Delta</math>0 URA3::HA3::TEL1</i>	This Study
MCY8402	same as MCY8401	This Study
MCY8411	<i>ade2<math>\Delta</math>::hisG his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 trp1<math>\Delta</math>63 ura3<math>\Delta</math>0 URA3::HA3::tel1-11::natR</i>	This Study
MCY8412	same as MCY8411	This Study

## RESULTS

One possible explanation of the fact that the *tel1-11* allele differentially affects telomere and checkpoint functions at different temperatures would be an altered Tel1-11p stability at 26°C and 37°C. In such a case, one would expect to detect different levels of Tel1-11p expression at 26°C and 37°C. However, the expression of a HA3-tagged Tel1-11p is about equal at these temperatures with no detectable thermosensitivity (Suppl. Figure 1). On the other hand, the tagged version of Tel1-11p is detected at a lower level than the tagged version of Tel1p at all temperatures. Nevertheless, these data are inconsistent with the idea that the phenotypes conferred by *tel1-11* are caused by temperature dependent protein expression. The interpretation of these data has to be cautioned though as the addition of the HA3-tag can affect the function of Tel1p (M.-P. Longhese, personal communication).



Supplementary Figure 1.

The expression of HA3-tagged Tel1-11p is not thermosensitive. Western analysis was performed as described in Materials and Methods. Strains used are: RWY51-28C (no HA tag); MCY8401, MCY8402 (HA3::TEL1); MCY8411, MCY8412 (HA3::tel1-11). NS - a non specific signal used to assess protein loading and transfer.

**REFERENCES:**

Clerici M, Paciotti V, Baldo V, Romano M, Lucchini G, Longhese MP (2001) Hyperactivation of the yeast DNA damage checkpoint by TEL1 and DDC2 overexpression. *Embo J* 20:6485-6498

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor





## CHAPITRE II

Caractérisation de la kinase Tel1p et de son rôle dans l'homéostasie des télomères.

### Résumé

Dans cette étude, nous caractérisons tout d'abord la fonction dite « basale » de Tel1p, c'est-à-dire la fonction minimale permettant aux cellules dépourvues de la kinase Mec1p de ne pas entrer dans une sénescence cellulaire. Par de nombreuses analyses génétiques, il a été possible de déterminer premièrement que la fonction kinase était essentielle pour l'activité basale de Tel1p et deuxièmement qu'un autre domaine de cette protéine était également important pour maintenir les télomères d'un mutant *tel1* déficient pour sa fonction kinase.

Au cours des expériences, nous nous sommes également posé des questions sur les raisons pour lesquelles des cellules dépourvues des protéines kinases Tel1p et Mec1p démontrent un phénotype de sénescence. Nos analyses génétiques prédisent que ces kinases seraient importantes pour le recrutement de la télomérase en régulant possiblement les activateurs et les répresseurs de la télomérase. Des résultats préliminaires pointent vers une interaction génétique entre Tel1p/Mec1p et l'hélicase Pif1p.

## Matériel et méthodes

### Souches, conditions de croissance et manipulations génétiques

Les souches utilisées pour ce projet sont énumérées dans le tableau 2-1. Ces souches sont dérivées de la lignée de levures S288C (BRACHMANN *et al.*, 1998). Généralement, les souches étaient incubées sur milieu riche YEPD ou sur milieu minimal Yc-Uracile à température de croissance de 30°C (ZAKIAN et SCOTT, 1982; ROSE MD, 1990). La formation d'une colonie de taille moyenne à partir d'une cellule unique était évaluée à environ 20 générations tandis qu'une culture liquide saturée était évaluée à 5 générations. Les transformations d'ADN dans les levures furent effectuées selon la méthode de lithium acétate (GIETZ *et al.*, 1995). Les bactéries DH5 $\alpha$  ont été utilisées pour les amplifications de plasmides selon les protocoles usuels (SAMBROOK *et al.*, 1989). Les délétions ciblées de gènes furent effectuée en intégrant des fragments de PCR remplaçant le gène par un marqueur de sélection (BRACHMANN *et al.*, 1998). Les souches haploïdes ont été produites par micromanipulation des diploïdes et les génotypes des spores isolées ont été analysés par vérification de la ségrégation des marqueurs. Dans certaines situations où des mutants possédant de multiples délétions devaient être sélectionnés, la technique d'analyse de spores au hasard (Random spore analysis) a été utilisée (ROCKMILL *et al.*, 1991).

**Tableau 2-1. Souches utilisées lors de cette étude**

Souche	Génotype	Référence
RWY517	<i>MATa/MATa ade2-1/ade2Δ::hisG ura3-1/ura3Δ0 his3-11/his3Δ200 trp1-1/trp1Δ63 leu2-3,112/leu2Δ0 mec1Δ::TRP1/MEC1 sml1Δ::HIS3/SML1 TEL1/tel1Δ::LEU2</i>	CHAKHPARONI AN et al., 2005
MCY1700	Dérivé de RWY517 mais avec <i>RAD52/rad52Δ::KmX</i>	CHAKHPARONI AN et al., 2005
DFY047	MCY1700 + pRS316 Clone 1	Cette étude
DFY048	MCY1700 + pRS316 Clone 2	Cette étude
DFY049	MCY1700 + pRS316- <i>TEL1</i> Clone 1	Cette étude
DFY050	MCY1700 + pRS316- <i>TEL1</i> Clone 2	Cette étude
DFY051	MCY1700 + p649 (pRS316- <i>tel1kd</i> ) Clone 1	Cette étude
DFY052	MCY1700 + p649 (pRS316- <i>tel1kd</i> ) Clone 2	Cette étude
DFY053	MCY1700 + pRS316- <i>MEC1</i> Clone 1	Cette étude
DFY054	MCY1700 + pRS316- <i>MEC1</i> Clone 2	Cette étude
DFY055	RWY517 mais avec <i>RIF1/rif1Δ::KmX</i>	Cette étude
DFY056	RWY517 mais avec <i>RIF1/rif1Δ::KmX</i>	Cette étude
DFY057	RWY517 mais avec <i>PIF1/pif1Δ::KmX</i>	Cette étude
DFY058	RWY517 mais avec <i>PIF1/pif1Δ::KmX</i>	Cette étude
DFY059	DFY057 mais avec <i>EST1/est1Δ::URA3</i>	Cette étude
DFY060	DFY058 mais avec <i>EST1/est1Δ::URA3</i>	Cette étude
DFY061	Spore de DFY047 mais sans plasmide	Cette étude
DFY062	Spore de DFY048 mais sans plasmide	Cette étude
MCY751-2C	<i>ade2ΔhisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 tel1Δ::LEU2</i>	(CHAKHPARONI AN et al., 2005)
MCY742	<i>MATa/MATa ade2Δ::hisG /ade2 his3Δ200 /his3 leu2Δ0 /leu2 lys2Δ0 /lys2 met15Δ0 /met15 trp1Δ63 /trp1 ura3Δ0 /ura3 mec1::mec1ts::HIS3 /mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 /sml1::HIS3 TEL1 /tel1-11::natR sae2Δ::kanMX4 /SAE2</i>	Chakhparonian et al., 2005

### **Analyse de la sénescence des levures**

La sénescence des cellules a été vérifiée visuellement par la formation de colonies à la taille et aux contours hétérogènes sur des géloses. Par la suite, l'analyse du patron de fragments de restriction télomérique est venu confirmer ou non la sénescence des cellules (Voir prochain paragraphe et LUNDBLAD et SZOSTAK 1989.)

### **Analyse de la taille des télomères**

Cette analyse a été effectuée selon le protocole établi par Wellinger (WELLINGER *et al.*, 1993). L'ADN de levure était extrait et digéré par l'enzyme de restriction *XhoI*, enzyme coupant dans les régions sous-télomériques Y' (Voir figure 1) et libérant un fragment terminal d'environ 1300 paires de bases (dont environ 300 à 400 paires de bases de répétitions télomériques). Cet ADN était par la suite analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose (0,6%) neutre et transféré sur une membrane selon le protocole de buvardage de type Southern. La visualisation des fragments de restriction télomérique était possible grâce à l'utilisation de sondes radioactives hybridant l'élément Y' ou contre les répétitions télomériques (WELLINGER *et al.*, 1993).

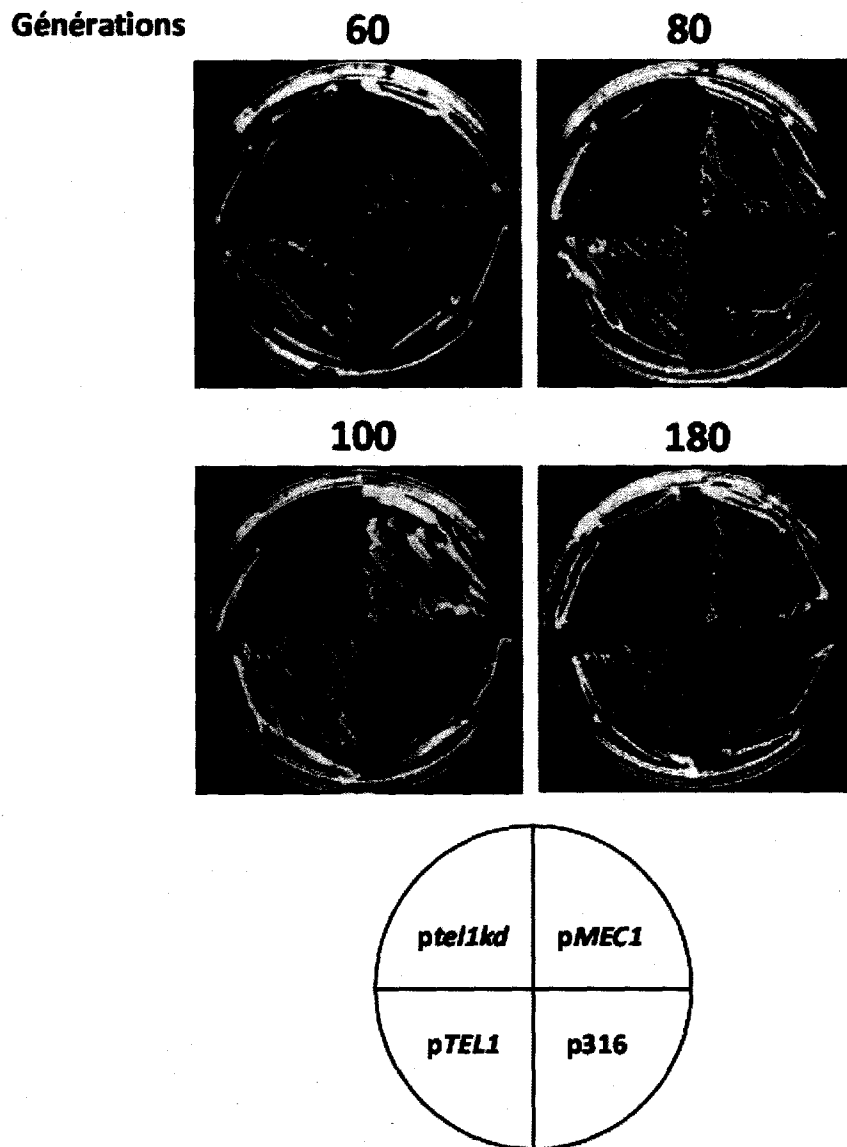
## Résultats

**Le domaine kinase de Tel1p est essentiel pour assurer la fonction basale de maintenance des télomères.** Les cellules dépourvues des protéines kinases Mec1p et Tel1p démontrent un phénotype de sénescence cellulaire entre 60 et 80 générations, phénotype également retrouvé lors de la suppression des sous-unités de la télomérase (LUNDBLAD et SZOSTAK, 1989; SINGER et GOTTSCHLING, 1994; LENDVAY *et al.*, 1996; RITCHIE *et al.*, 1999). Initialement, nous avons voulu identifier quelle était l'implication de la protéine Tel1p dans cette fonction télomérique. Pour ce faire, nous avons utilisé un allèle de cette protéine possédant deux mutations dans son domaine kinase (*tel1kd*), mutations éliminant toute phosphorylation par ce mutant (NAKADA *et al.*, 2003). Cet allèle contenu sur un plasmide centromérique fut incorporé dans un diploïde hétérozygote pour les délétions de *MEC1*, *TEL1*, *SML1* et *RAD52* et le diploïde fut par la suite microdisséqué. En parallèle, les mêmes manipulations furent effectuées avec les témoins contenant soit les versions de type sauvage de *TEL1* et *MEC1* ou un plasmide ne contenant aucun insert (voir tableau 2-2). Suite à l'isolation des quadruples mutants (nommé cellules *mec1Δ tel1Δ* pour la suite du manuscrit) contenant l'allèle mutant *tel1kd*, nous pouvons observer sur la figure 2-1 que dès 60 générations ces cellules démontrent des difficultés de croissance et un début de sénescence tel qu'observé avec le témoin négatif, soit les cellules ayant le plasmide ne contenant aucun insert (pRS316).

**Tableau 2-2. Plasmides utilisés lors de cette étude**

pRS316	-----	(Sikorski and Hieter 1989).
pRS316- <i>TEL1</i>	pRS316 + fragment <i>TEL1</i> génomique (-808 à +9133)	CHAKHPARONI AN et al., 2005
p649	YEP- <i>tel1-KN-HA</i> (aussi nommé <i>ptel1kd</i> )	NAKADA et al., 2003
p316- <i>MEC1</i>	pRS316 + fragment <i>MEC1</i> génomique + <i>ADE2</i>	CHAKHPARONI AN et al., 2005

Ce phénotype est fort différent de ce qui est observé pour les cellules contenant une version de type sauvage de *TEL1* et de *MEC1* qui ne démontrent pas cette sénescence. Les quelques cellules réussissant à croître dans la région où le plus grand nombre de cellules avait été inoculées ont été restriées sur une nouvelle boîte pour le passage suivant. Toujours selon la figure 2-1, il est à noter qu'au fil des restriages subséquents nous sommes parvenus à rétablir une bonne croissance des cellules ayant le plasmide *tel1kd* ainsi que celles ayant le plasmide ne contenant aucun insert (pRS316) (pétris à 180 générations). Cette croissance était similaire à celle des cellules témoins. Nous pouvons donc constater qu'en absence de *MEC1*, la fonction kinase de Tel1p est essentielle pour éviter la sénescence des cellules. Toutefois, suite à cette crise, cette sénescence semble s'estomper et les cellules *mec1Δ tel1Δ* peuvent rétablir leur croissance.

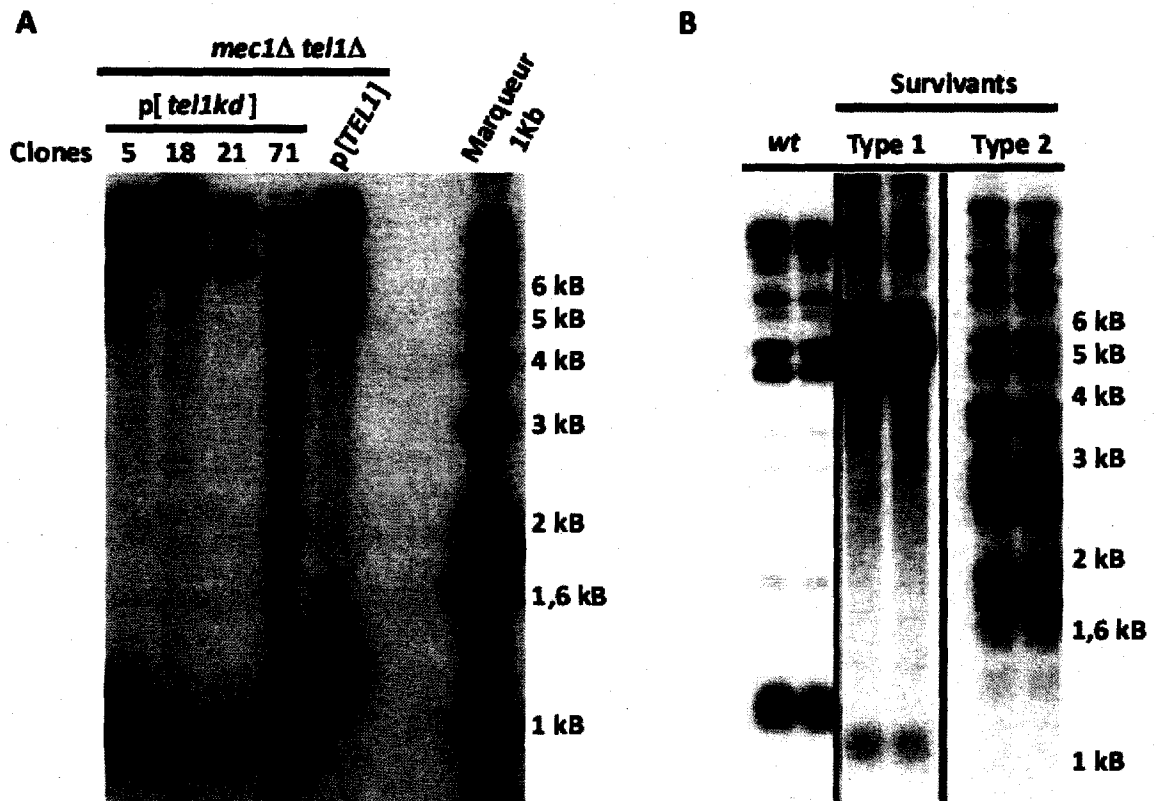


**Figure 2-1. Analyse de la sénescence des divers mutants de *mec1Δ tel1Δ*.** Passage des levures *mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 tel1Δ::LEU2 rad52Δ::KmX* contenant soit un plasmide sans insert, une version de type sauvage du gène *TEL1*, une version kinase inactivée de *TEL1* ou encore le gène *MEC1* (DFY047 à DFY054). Les souches contenant le gène *TEL1* ou *MEC1* servent de témoin positif. Striage sur milieu Yc-Uracile à 30°C.

Les cellules *mec1Δ tel1Δ* contenant l'allèle *tel1* kinase inactivée ne sont pas des survivants classiques. L'explication la plus logique de la survie des cellules *mec1Δ tel1Δ* était l'utilisation d'une voie alternative pour la maintenance de leurs télomères. Par l'utilisation de la recombinaison homologue, les cellules sans télomérase peuvent

allonger leurs télomères via un mécanisme de copier coller. Toutefois, le gène *RAD52* s'avère essentiel pour que le processus de recombinaison homologue puisse avoir lieu et les levures utilisées dans cette expérience (*mec1Δ sml1Δ tel1Δ rad52Δ*) en étaient dépourvues. Malgré cette absence, nous avons voulu confirmer que ces cellules *mec1Δ tel1Δ* contenant la version kinase inactivée de *TEL1* n'étaient pas des survivants en analysant leur patron télomérique. Selon la figure 2-2, nous pouvons voir que chez les cellules contenant la version de type sauvage de *TEL1* (*pTEL1* sur la figure), il y a présence du fragment de restriction terminal d'environ 1300 paires de base (incluant les 300 paires de bases de répétitions télomériques) ainsi que des régions sous-télomériques Y'. Dans les divers clones testés, ceux contenant l'allèle *tel1kd* démontrent des télomères extrêmement courts avec moins de 50 paires de bases de répétitions télomériques et il semble y avoir perte des bandes Y' dans certains cas. En comparant avec le patron télomérique des survivants de « type 1 » ou de « type 2 » sur le gel de la figure 2-2B, les télomères des clones contenant la version kinase inactivée de *TEL1* sont différents de ceux des survivants « classiques ». Donc, il semble que suite à leur sénescence, les cellules *mec1Δ tel1Δ* ne rétablissent pas leur croissance via la voie des survivants classiques. Toutefois, nous ne pouvons écarter que ces cellules mutantes soient des survivants utilisant une voie mineure de maintenance de leur télomères du même type que décrit dans les travaux des groupes de Harrington et Charbonneau (GRANDIN et CHARBONNEAU, 2009; LEBEL *et al.*, 2009).

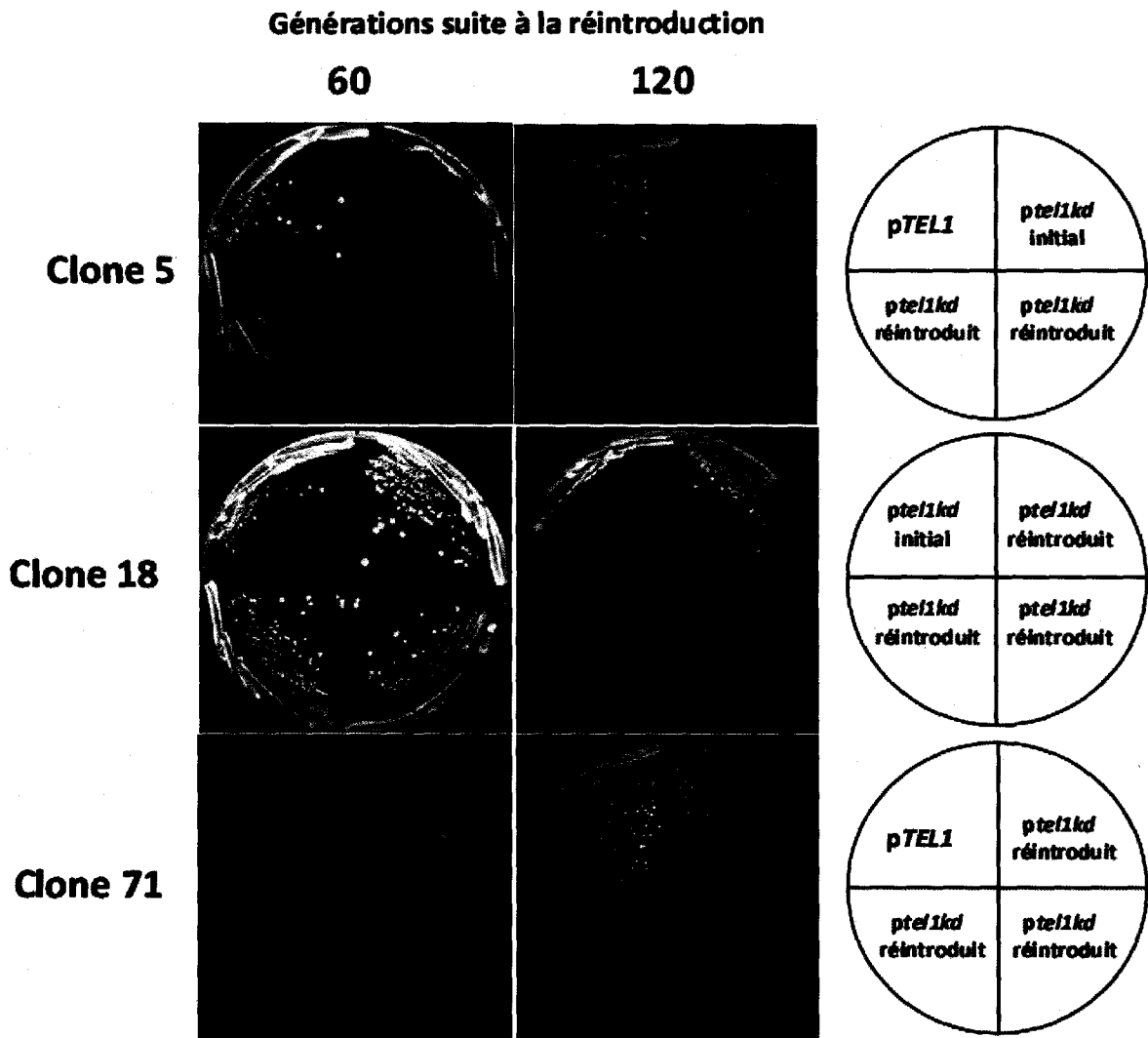




**Figure 2-2. Analyse des fragments de restriction télomériques des cellules sénescents contenant seulement l'allèle kinase inactivée de *TEL1* comme source de kinases PI3. (A) Buvarbage de type Southern de l'ADN des cellules *mec1Δ tel1Δ* à 120 générations contenant la version kinase inactivée de *TEL1*. La membrane fut hybridée avec une sonde liant les répétitions sous-télomériques *Y'*. (B) Image modifiée de (LARRIVÉE et WELLINGER 2006). Patron des fragments de restriction terminaux télomérique des survivants classiques de type 1 et de type 2. La membrane dérivée d'un buvarbage de type Southern fut hybridée avec une sonde ciblant les répétitions télomériques TG1-3.**

Des domaines autres que le domaine kinase de *TEL1* confèrent un avantage de croissance aux cellules *mec1Δ tel1Δ* en sénescence. Les résultats précédents nous ayant permis de constater que le domaine kinase de *TEL1* était essentiel pour la maintenance de la fonction télomérique basale, nous avons décidé d'analyser plus attentivement les plasmides *tel1kd* des clones initiaux ayant gardé leur plasmide pour 180 générations (Voir figure 2-1). Ces cellules ayant traversé la première crise de sénescence, nous nous sommes demandé si ces cellules avaient acquis des mutations sur le plasmide *tel1kd* ou

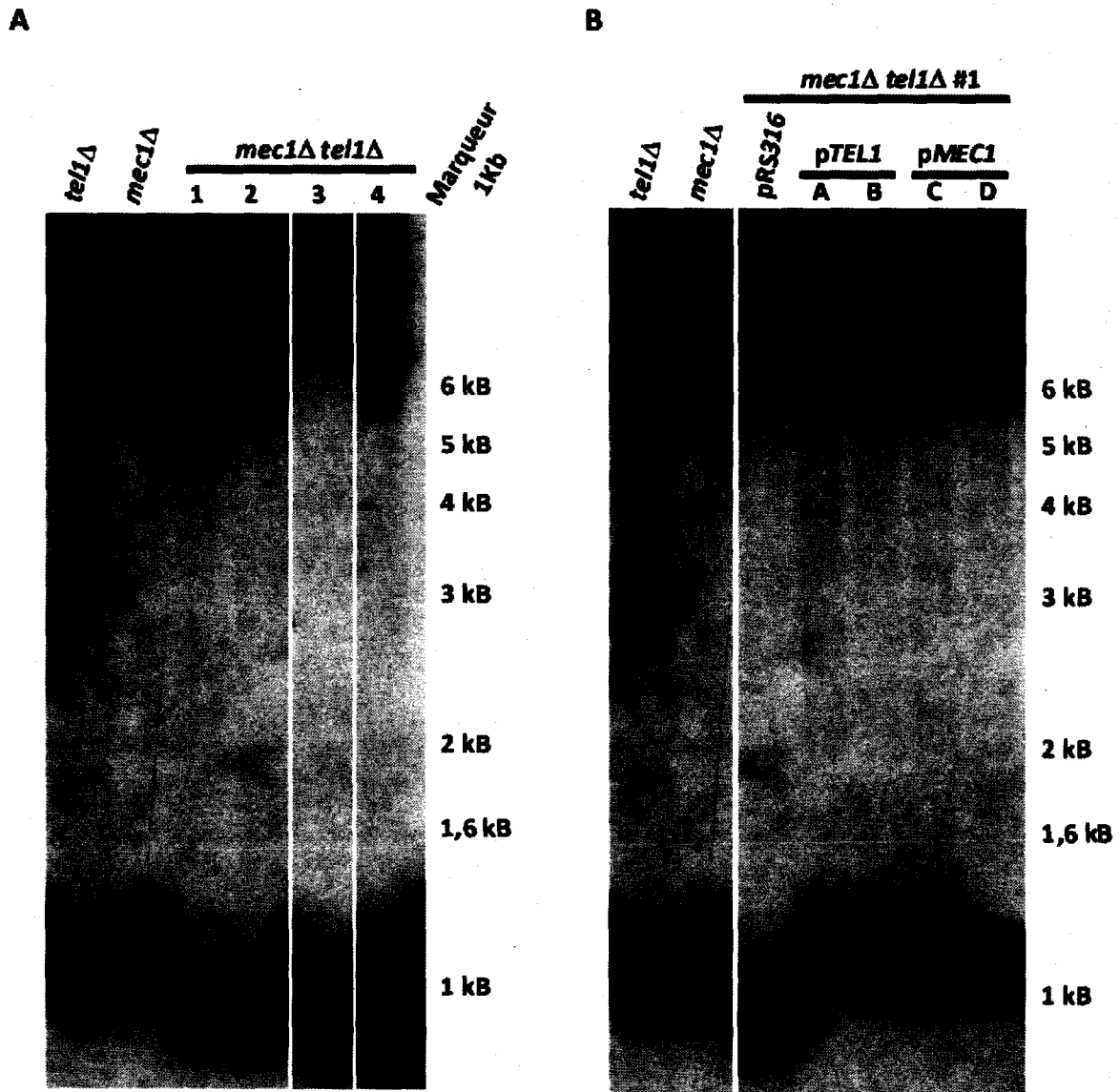
encore si une mutation dans le génome rendait la viabilité possible en présence de l'allèle *tel1kd*. Pour ce faire, le plasmide initial fut extrait et retransformé dans des levures *mec1Δ tel1Δ*. Dans deux clones sur cinq (clone #18 et #71), il semble que des mutations sur le plasmide *tel1kd* soient présentes, puisque les levures avec le plasmide réintroduit n'entrent pas en sénescence comme dans le cas des levures contenant le plasmide *tel1kd* initial (Figure 2-3). Des analyses de séquençage subséquentes avec les plasmides réintroduits nous ont permis de constater qu'il ne s'agissait pas de réversion de la mutation dans le domaine kinase (D. Faucher, résultats non publiés). Le séquençage complet de ces plasmides n'a pu être effectué à ce jour, donc les mutations dans le plasmide *tel1kd* protégeant les levures *mec1Δ tel1Δ* contre la sénescence restent encore inconnues.



**Figure 2-3. Croissance des cellules suite à la réintroduction des plasmide *tel1kd* provenant de cellules stabilisées suite à la première crise. Les plasmides *tel1kd* provenant entre autre des levures utilisées pour la figure 2-1 furent réintroduits dans les cellules *mec1Δ tel1Δ*. Cette figure donne le résultat pour les clones *ptel1kd* 5, 18 et 71 à 60 et 120 générations où *pTEL1* sert de témoin positif et *ptel1kd* initial de témoin négatif. Les cellules furent transformées et restriées sur milieu Yc-Uracile incubé à 30°C.**

Les cellules *mec1Δ tel1Δ* sont viables et possèdent des télomères de type « normaux ». Au cours de ces analyses, nous avons découvert que des cellules sans aucune kinase Mec1p et Tel1p pouvaient être viables suite à une sénescence. Les cellules *mec1Δ tel1Δ* ayant le plasmide ne contenant aucun insert en sont de bons exemples

(Voir figure 2-1 avec le plasmide vide). Nous avons voulu vérifier le profil télomérique de ces mutants à savoir s'il s'agissait de survivants ou non. La figure 2-4A (Lignes 1 à 4) démontre que ces cellules *mec1Δ tel1Δ* possèdent des fragments de restriction terminaux de taille inférieure à celle d'une cellule *tel1Δ*. Par ailleurs, les télomères de chaque clone mutant sont de tailles très homogènes ce qui est dénoté par l'absence de trainée sur le gel. De plus, nous pouvons constater que ces cellules ont perdu leur séquence Y' courte dans trois clones sur quatre. De plus, puisque le gène *RAD52* impliqué dans la recombinaison homologue est absent dans ces cellules, nous pouvons donc de nouveau affirmer que ces cellules *mec1Δ tel1Δ* ne semblent pas maintenir leurs télomères via la voie de recombinaison homologue classique.

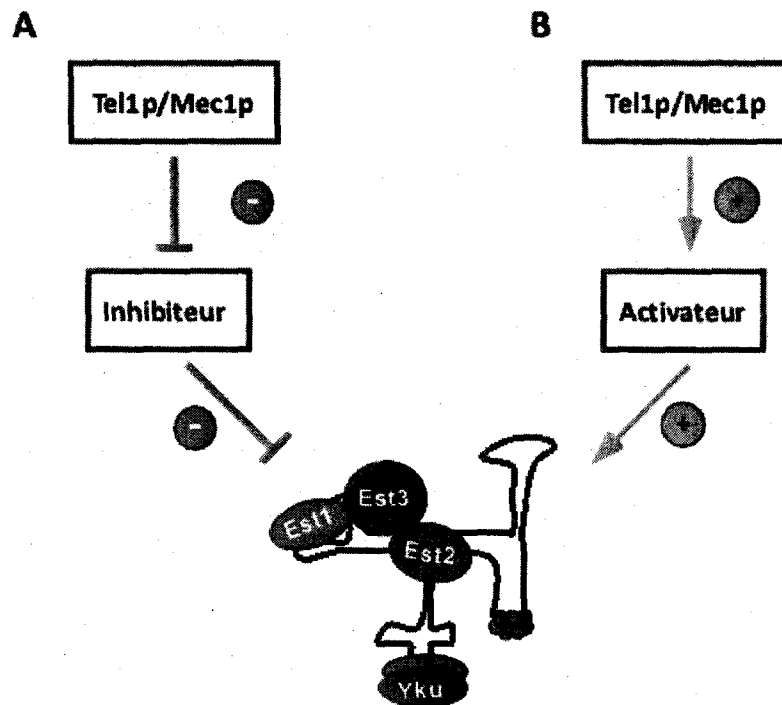


**Figure 2-4. Analyse des fragments de restriction télomériques des cellules *mec1Δ tel1Δ*.** Buvarbage de type Southern de l'ADN des cellules : (A) *mec1Δ tel1Δ* à 100 générations (lignes 1 à 4) et (B) Télomères du clone *mec1Δ tel1Δ* #1 ayant reçu un plasmide pRS316 sans insert, le plasmide pTEL1 (A et B) ou pMEC1 (C et D). La sonde Y' fut utilisée. Les cellules *tel1Δ* et *mec1Δ* sont des témoins dans ces expériences. Les cellules utilisées sont MCY751-2C, une spore de MCY742 ainsi que différentes colonies de DFY061 et DFY062 ayant reçu ou non les plasmides pTEL1 ou pMEC1.

Les phénotypes télomériques observés dans les cellules *mec1Δ tel1Δ* sont réversibles. Nous avons voulu vérifier si en réintroduisant une version de type sauvage des gènes *MEC1* ou *TEL1* nous pourrions rétablir les phénotypes normaux pour la taille

des télomères et la réapparition des séquences Y'. Rapidement suite à la réintroduction du plasmide pTEL1, soit après 20 générations, nous pouvons constater que les télomères regagnent leur taille normale soit aux alentours de 300 paires de bases de séquences télomériques (fragment de restriction terminal total d'environ 1,3 kb). Toutefois, étonnamment, la réintroduction du gène *MEC1* dans les cellules *mec1Δ tel1Δ* provoque également un rallongement de la taille des télomères malgré que ces cellules aient le gène *TEL1* de supprimé (Figure 2-4B lignes A à D). De plus, nous pouvons observer que le fragment Y' court réapparaît suite à la réintroduction des kinases.

**La mutation d'un inhibiteur de la télomérase empêche la sénescence des cellules *mec1Δ tel1Δ*.** Tel que démontré précédemment, les cellules sans les kinases Tel1p et Mec1p entrent en crise après 40 à 60 générations suivant la perte de ces protéines mais parviennent éventuellement à surmonter ce défaut de croissance. Nous avons alors posé l'hypothèse que Tel1p (et Mec1p en absence de Tel1p) pourrait activer un activateur de la télomérase ou inhiber un inhibiteur de la télomérase (Voir figure 2-5).



**Figure 2-5. Visualisation des deux mécanismes de régulation hypothétiques de Tel1p et Mec1p.** En A, les kinases pourraient inhiber un inhibiteur de la télomérase, prédisant que la télomérase des cellules *mec1Δ tel1Δ* seraient toujours inhibée. En B, Tel1p et Mec1p pourraient activer un activateur de la télomérase. L'absence de ces kinases rendrait l'activation de la télomérase difficile. Voir le texte pour plus de détails.

De cette manière, une cellule sans Tel1p (ou Mec1p) ne pourrait pas soit activer ou soit empêcher l'inhibition de la télomérase par une autre protéine. Nous avons par la suite, convenu que la suppression d'une protéine ayant une action négative sur le recrutement ou l'activité de la télomérase devrait vraisemblablement provoquer un rallongement de la taille des télomères, tandis que l'inverse devrait être observé avec la suppression d'un activateur de la télomérase. Deux criblages génétiques ont récemment permis l'identification de nombreux gènes affectant le maintien de la taille des télomères (ASKREE *et al.*, 2004; GATBONTON *et al.*, 2006). De ces criblages, la majorité des mutations identifiées provoquaient un raccourcissement de la taille des télomères,

tandis qu'une plus petite quantité de mutations différentes induisaient un rallongement de la taille des télomères. Puisqu'il était techniquement plus facile de tester les gènes ayant une influence négative sur la télomérase à cause du faible nombre de candidats et que certains de ces candidats étaient des candidats logiques pour subir une régulation via la protéine kinase Tel1p, nous avons décidé de vérifier cette voie. Pour ce faire, une souche ayant une délétion des gènes *TEL1*, *MEC1* (*SML1*) et soit *RIF1* ou *PIF1* fut créée et microdisséquée de manière à obtenir des cellules haploïdes *mec1Δ tel1Δ rif1Δ* ou *mec1Δ tel1Δ pif1Δ*. La sénescence de ces cellules fut comparée avec celle des cellules *mec1Δ tel1Δ RIF1* ou *mec1Δ tel1Δ PIF1* respectivement. La figure 2-6A, démontre que la délétion du gène *RIF1* ne modifie pas l'entrée en sénescence des cellules *mec1Δ tel1Δ*. Toutefois, dans la totalité des clones n'ayant pas l'hélicase *PIF1*, il semble que cette absence protège les cellules contre la sénescence puisque celles-ci ne démontrent aucune difficulté de croissance (Figure 2-6B). L'analyse des télomères de ces mutants nous a permis de constater que ces cellules n'étaient pas des survivants. Toutefois, entre les cellules *mec1Δ tel1Δ pif1Δ* et *mec1Δ tel1Δ PIF1* il n'y avait pas de différences significatives au niveau de la taille des télomères ou de leur homogénéité. Il semble donc que Tel1p, par sa régulation de l'hélicase Pif1p, un inhibiteur de la télomérase, permette à la cellule d'éviter la sénescence cellulaire.



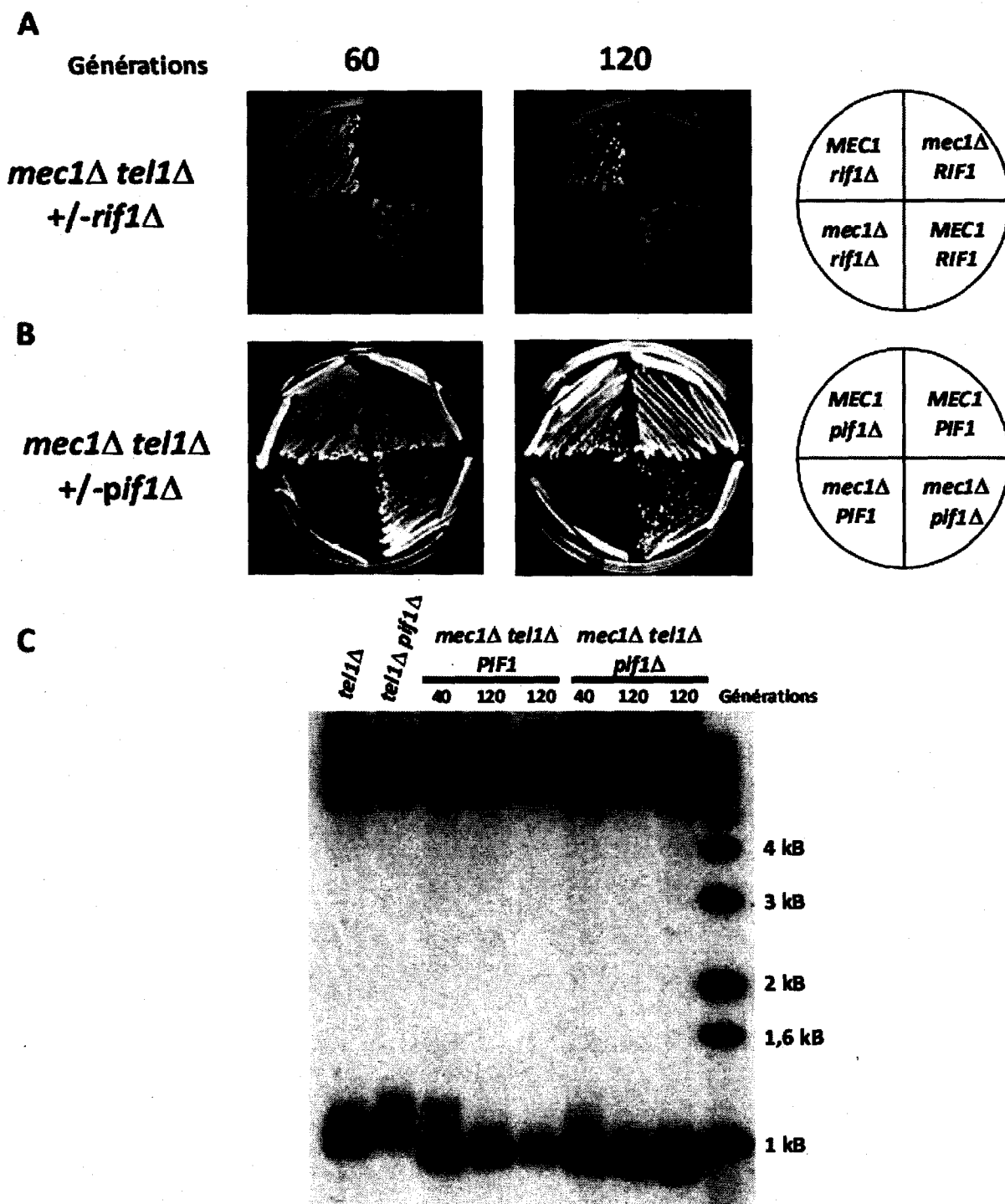


Figure 2-6. Analyse de la sénescence des cellules *mec1Δ tel1Δ* en absence de régulateurs négatifs des télomères. (A) Le gène *RIF1* fut déléte dans les cellules *mec1Δ tel1Δ* et ces cellules furent striées jusqu'à 120 générations. (B) La même expérience fut réalisée mais en absence de l'hélicase *PIF1*. Pour A et B, les cellules avec *MEC1* de type sauvage servent de témoins positifs. Les cellules ont été incubées à 30°C sur milieu YEPD. (C) Comparaison de la taille des fragments de restriction terminaux télomériques des cellules utilisées en (B) et poussées pour 40 et 120 générations respectivement (2 clones différents ont été analysés). La sonde Y' a été utilisée pour ce buvardage de type Southern. Les spores des souches DFY055 à DFY058 furent utilisées.

La présence de la télomérase est importante pour la survie des cellules *mec1Δ tel1Δ pif1Δ* stabilisées. Basé sur les phénotypes télomériques des cellules *mec1Δ tel1Δ*, que ce soit en présence ou en absence de l'hélicase PIF1, qui étaient caractérisés par des télomères au patron de restriction normal sans amplifications, nous avons posé l'hypothèse que ces télomères étaient maintenus par la télomérase. Afin de démontrer cette implication de l'enzyme, nous avons supprimé le gène *EST1*, soit une sous-unité essentielle de la télomérase impliquée dans le recrutement de l'enzyme et nous avons vérifié si ces cellules entraient ou non en sénescence. La figure 2-7A, démontre que l'absence du gène *EST1* provoque une sénescence cellulaire du clone ayant la kinase Mec1p (cadran du pétri en haut à gauche), nous confirmant que la télomérase est inactive dans ces cellules. Nous pouvons constater dans la figure 2-7B que les cellules *mec1Δ tel1Δ pif1Δ est1Δ* entrent également en sénescence cellulaire contrairement aux cellules ayant leur télomérase active. La viabilité des cellules *mec1Δ tel1Δ* serait donc dépendante de la présence d'une télomérase active.

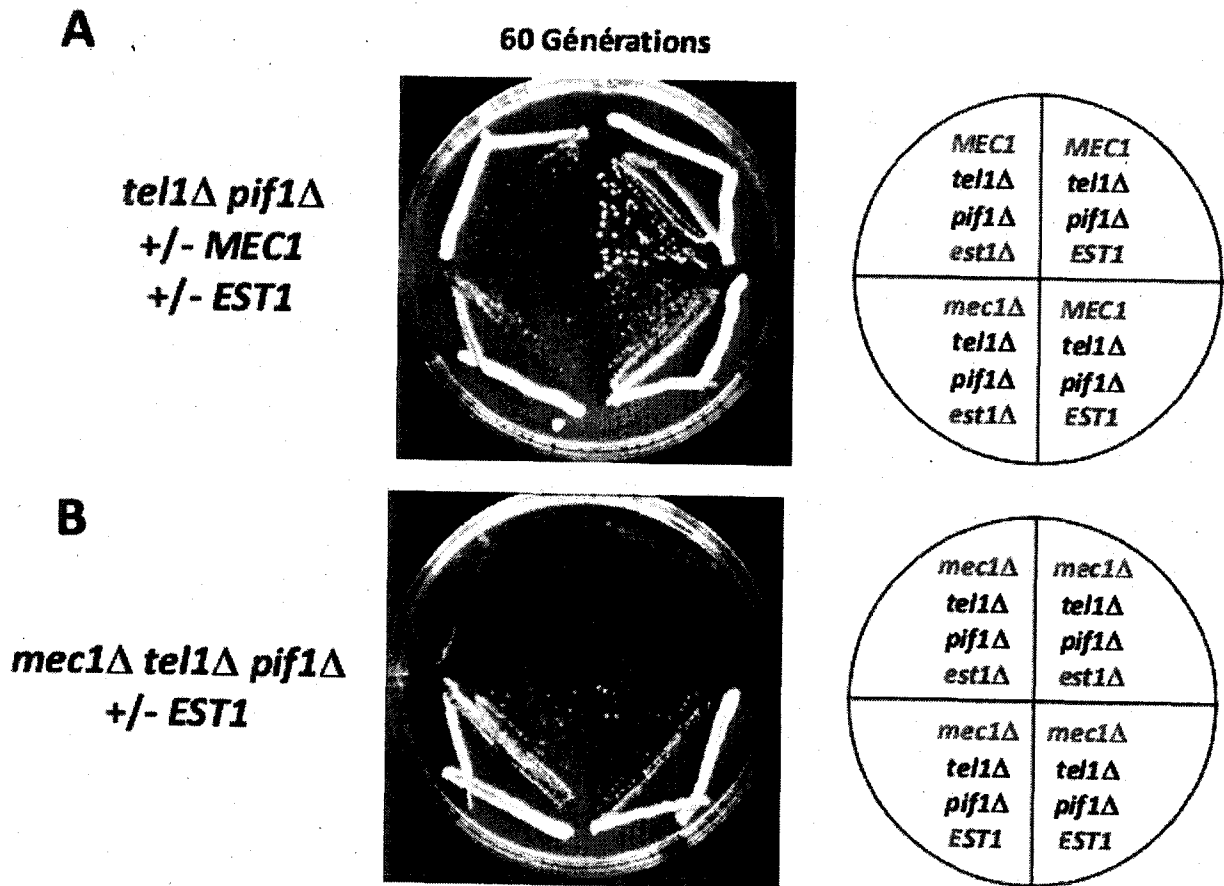


Figure 2-7. Analyse de l'importance de la présence de la télomérase dans la survie des cellules *mec1Δ tel1Δ pif1Δ*. Le gène *EST1* encodant une sous-unité essentielle de la télomérase fut supprimé des cellules *MEC1 tel1Δ pif1Δ* en guise de cellules témoins et des cellules *mec1Δ tel1Δ pif1Δ*. Les cellules furent striées sur milieu YEPD incubé à 30°C afin d'apprécier la sénescence cellulaire.

### CHAPITRE III

#### Avant-propos

Faucher, D. et Wellinger RJ. Methylated H3K4, a transcription associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. (*Soumis à la revue Plos Genetics 2010*).

Dans le deuxième article inclus dans cette thèse, en plus de mon directeur de recherche, je suis le seul auteur. En effet, j'ai réalisé la totalité des expériences, j'ai effectué l'analyse des résultats ainsi que l'écriture de l'article.

## Résumé

Dans cette étude nous démontrons qu'une modification d'histone qui était jusqu'à maintenant principalement associée à la transcription aurait également un rôle majeur à jouer dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN. En effet, la monoubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B ainsi que la méthylation subséquente sur les lysines 4 de l'histone H3 sont essentielles pour que la cellule puisse survivre à des agents endommageant l'ADN en absence de la voie de réparation de la recombinaison homologue. La délétion de la méthyltransférase Set1p ou l'utilisation de mutants de l'histone H3 ne pouvant être méthylés sur la lysine 4 provoquent une diminution de l'efficacité de ces cellules à réparer des cassures doubles brins par ligation de bouts non homologues en plus de provoquer une sensibilité des cellules aux stress réplicatifs. De plus, nous avons pu détecter par immunoprécipitation de la chromatine un recrutement de la méthyltransférase Set1p ainsi que de son substrat H3K4me3 au site d'une cassure doubles brins induite. Des analyses supplémentaires nous ont également permis de constater que le recrutement de Set1p (et l'apparition de H3K4me3) à une cassure d'ADN était dépendante de la présence du complexe de remodelage RSC (Remodels the Structure Chromatin). Ce manuscrit vient donc démontrer que H3K4me3, en plus de son rôle dans la transcription, aurait une fonction essentielle pour le maintien de l'intégrité génomique.

**Methylated H3K4, a transcription associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway.**

**David Faucher and Raymund J. Wellinger\***

Dept. of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

**Running head:**

H3-K4me3 is crucial for proper DNA damage response.

**Keywords:**

Histone modification, H3K4me3, DNA replication, NHEJ, yeast

**Corresponding author Address**

Raymund J. Wellinger

Groupe ARN/RNA Group

Dept. of Microbiology and Infectious Diseases

Faculty of Medicine

3001 12th Ave N.

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec J1H 5N4

Canada

## ABSTRACT

Histone modifications are associated with regulatory aspects executed by chromatin and all transactions on genomic DNA are dependent on them. Here we show that the monoubiquitylation of histone H2B and the trimethylation of histone H3 on lysine 4 (H3K4me3), both known for their involvement in transcription, are crucial for a proper response of budding yeast cells to DNA damaging agents and the passage through S-phase. Cells that cannot methylate H3K4 display an important defect in double strand break (DSB) repair by non-homologous end joining. Furthermore, if such cells incur DNA damage or encounter a stress during replication (Hydroxyurea treatment), they very rapidly lose viability, underscoring the functional importance of the modification. Analyses of replication intermediates suggest that replication fork stability is compromised in such cells. Remarkably, the Set1p methyltransferase as well as the H3K4me3 mark become detectable on a newly created DSB. This recruitment of Set1p to the DSB is dependent on the presence of the RSC complex, arguing for an important contribution in the ensuing DNA damage repair process. Taken together, our results demonstrate that Set1p and its substrate H3K4me3, which has been reported to be important for the gene transcription, also plays a crucial role in genome stability of yeast cells.



## INTRODUCTION

Genomes of living organisms are continuously exposed to DNA damaging agents such as ultraviolet light, ionizing radiation, reactive oxygen intermediates or other chemical mutagens. These agents can cause mutations and ultimately genome instability. For mammalian cells, it has been estimated that endogenous DNA damage occurs at a rate of 10 000 events per day (Rouse and Jackson 2002). Of the observed DNA damages, double strand breaks (DSBs) potentially are the most deleterious and therefore must be efficiently detected and repaired. Eukaryotic cells have developed multiple mechanisms in order to respond adequately to such DNA damage and many of those mechanisms are highly conserved (Zhou and Elledge 2000; Evan and Vousden 2001; Rouse and Jackson 2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, the appearance of DSBs triggers DNA damage checkpoints which ultimately lead to arrest of the cell cycle (Sanchez et al. 1997). It is thought that this controlled arrest provides sufficient time for the repair machinery to locate the break and properly repair the lesion by one of two major DSB repair pathways. During S and G2/M phases of the cell cycle, DSBs are primarily repaired by homologous recombination (HR) between sister chromatids or homologous chromosomes. In G1 and if there is no homology available elsewhere, non-homologous end joining (NHEJ) can repair DSBs by direct religation of the break. This pathway however is much more discrete in yeast.

The repair of DNA damage has to occur in the context of chromatin and its local composition, modification and configuration does affect DNA repair (Green and

Almouzni 2002). Therefore, DNA compaction by chromatin must be tightly and locally regulated in order to allow access of protein complexes associated with DNA transactions. There are two key mechanisms to regulate relative opening and closing of chromatin for example at a site of DNA damage: chromatin remodelling and histone modifications (van Attikum et al. 2004; Wurtele and Verreault 2006; Altaf et al. 2007; Osley et al. 2007). Chromatin remodelling is achieved by dedicated complexes that hydrolyse ATP in order to remove or mobilize nucleosomes in the area of a DSB (SNF2-type ATPases, see van Attikum and Gasser 2005a; Osley and Shen 2006, for reviews). It is thought that this creates a discrete change in the general chromatin architecture that allows more efficient repair (Fyodorov and Kadonaga 2001). In budding yeast, a number of chromatin remodelers such as Ino80, RSC, Swi/Snf and Swr1 have been associated with the DSB repair process (Krogan et al. 2003; Morrison et al. 2004; van Attikum et al. 2004; Chai et al. 2005; Shim et al. 2005; Shim et al. 2007; Papamichos-Chronakis and Peterson 2008). These complexes are rapidly recruited to a DSB and some directly interact with the DNA damage repair machinery.

Modifying histone proteins is a second possibility by which cells can change the chromatin at the site of a DSB (van Attikum and Gasser 2005b; Wurtele and Verreault 2006; Altaf et al. 2007). Histones can be the target of a number of covalent modifications, including acetylation, phosphorylation, methylation, ubiquitination, ADP-ribosylation and sumoylation (van Attikum and Gasser 2005b; Wurtele and Verreault 2006). An example of such a modification is the phosphorylation of histone H2A on

residue S129 which can be documented very rapidly after the formation of even a single DSB (Downs et al. 2000). A histone modification involved in a number of chromatin-regulated pathways in yeast is the ubiquitination of histone H2B on lysine 123 (H2BK123ub) (Weake and Workman 2008). This modification in fact is a necessary prerequisite for the methylation on K4, K36 and K79 of histone H3 (Sun and Allis 2002; Hwang et al. 2003; Wyce et al. 2007). Methylation of K79 by Dot1p has been associated with DNA damage resistance and the ability to induce the DNA damage checkpoint (Giannattasio et al. 2005; Wysocki et al. 2005). Trimethylation of H3K4 (H3K4me3) by Set1p on the other hand is found in the 5'-area of many highly transcribed genes and is thought to be a marker for recent transcriptional activity (Bernstein et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2002; Ng et al. 2003, reviewed in Ruthenburg et al. 2007). A possible association of Set1p with DNA repair has been invoked (Corda et al. 1999; Giannattasio et al. 2005, reviewed in Dehe and Geli 2006), but no clear evidence has emerged. Furthermore, it has been shown that the Dot1p-mediated effect on DNA repair is distinct and separate from any possible Set1p effect (Wysocki et al. 2005).

Here, we show that H3K4 methylation by Set1p indeed is a crucial event for efficient DNA DSB repair. Consistent with previous results, Bre1p- and Lge1p-dependent ubiquitylation of H2BK123 is also required. The results show that *set1Δ* cells are strongly impaired in NHEJ and appear unable to stabilize arrested replication forks. Further, Set1p as well as H3K4me3 accumulate at an inducible DNA DSB and the appearance of Set1p is dependent on the presence of the RSC-complex. These data thus show that H3K4

**methylation has an important role to play in modulating chromatin at the site of a DNA damage and significantly broadens the functional importance of this modification.**

## RESULTS

***A strong synthetic interaction between LGE1/BRE1 or SET1 and the MRX complex*** In an attempt to find potential new regulators of telomere homeostasis, a synthetic genetic array experiment was performed using *mre11Δ* and *rad50Δ* mutants as baits and looking for lethality or growth delay in double mutants (Tong et al. 2001). The screen yielded, *lge1Δ* (YPL055C) as displaying a synthetic slow growth phenotype at 23°C when combined with the deletion of any member of the *MRE11/RAD50/XRS2* (MRX) complex (Fig. 1A and Supp. Fig. S1A). Lge1p has been shown to interact genetically and biochemically with the RING finger domain protein Bre1p (Ho et al. 2002; Hwang et al. 2003). Yeast Lge1p and Bre1p thus have been suggested to form an ubiquitin ligase complex (E3) that binds to Rad6p (E2) in order to monoubiquitylate histone H2B (Hwang et al. 2003; Wood et al. 2003). Given these interactions, we asked if *BRE1* would display the same genetic interaction with *MRX* as *LGE1*. Indeed, double mutant *bre1Δ MRXΔ* cells display a very similar synthetic slow growth phenotype as *lge1Δ MRXΔ* cells (Fig. 1A). Interestingly, both *lge1Δ tel1Δ* and *bre1Δ tel1Δ* mutants do not display such synthetic slow growth (Fig. 1A and Supp. Fig. S1A), suggesting that for this particular phenotype, *TEL1* is in a different genetic pathway than MRX. This contrasts with the fact the MRX complex and *TEL1* have been shown to be in the same genetic pathway with respect to telomere maintenance and DNA damage checkpoints (Ritchie et al. 1999; Usui et al. 2001). These experiments indicate that both Lge1p and Bre1p act in a genetic pathway parallel to MRX and which is important for normal growth of the cells.

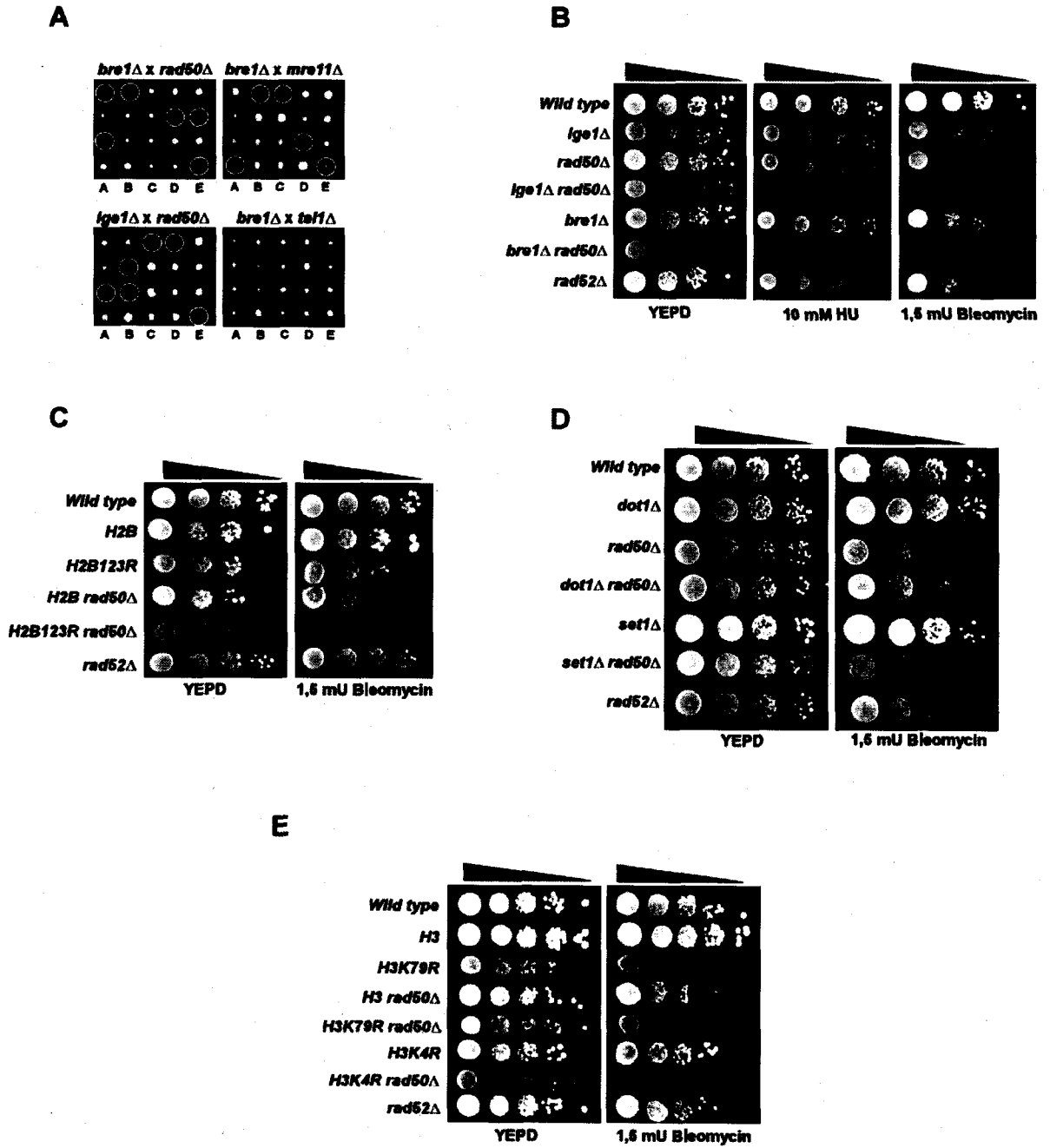
In the course of these genetic analyses, we also discovered that *bre1Δ rad50Δ* cells were highly sensitive to DNA damaging agents. Both *lge1Δ rad50Δ* and *bre1Δ rad50Δ* display dramatically reduced viability when treated with the IR-mimetic drug bleomycin, UV light or the DNA replication inhibitor hydroxyurea (HU) (Fig. 1B and data not shown)(CHABES *et al.*, 2003; KOC *et al.*, 2004). Note that the conditions used for inducing replication stress (replication forks stalling) or DNA damage were relatively mild such that in these experiments, even *rad52Δ* or *rad50Δ* cells display only a minor growth defect as compared to a wild type strain (see Fig. 1B, for example). Consistent with the observed growth properties at 23°C, a hyper-sensitivity to DNA damage was not observed in *bre1Δ tel1Δ* double-mutants (Supp. Fig. S1B). These data thus suggest that in the absence of MRX, DNA damage survival is dependent on the presence of *LGE1* and *BRE1*.

Previously, the *BRE1* and *LGE1* had been characterized as a key player for modulation of gene transcription in yeast (reviewed in Weake and Workman 2008). These genes, together with *RAD6*, are required for monoubiquitylation of histone H2B on the lysine residue 123 which in turn is required for the methylation of histone H3 on lysines 4 and 79 (Hwang *et al.* 2003; Wood *et al.* 2003; Weake and Workman 2008). Set1p and Dot1p are the two methyltransferases that methylate, respectively, histone H3K4 and H3K79. Given this known cascade of histone modifications, the downstream effect of the absence of Bre1p or Lge1p could be dependent on this histone modification

pathway or occur via a new and histone-independent pathway. We therefore tested whether an absence of histone modifications also sensitizes *MRXΔ* cells to DNA damage. Cells harbouring a combination of *rad50Δ* and a mutant allele of histone H2B that can not be ubiquitinated (*H2BK123R*) are as sensitive to bleomycin as *bre1Δ MRXΔ* or *Ige1Δ MRXΔ* cells (Fig. 1C). Therefore, the DSB sensitivity of *bre1Δ MRXΔ* cells can be explained by the incapacity of the cells to ubiquitinate histone H2B on lysine 123. Further, in *MRXΔ* cells, neither the deletion of *DOT1* nor the mutation of its substrate histone H3K79 sensitizes the cells to bleomycin (Figs. 1D, E). On the other hand, deletion of the methyltransferase *SET1* or the presence of a H3 allele that can not be methylated on lysine 4, H3K4R, combined with an absence of the MRX complex lead to an indistinguishable sensitivity as observed in *Ige1Δ/bre1Δ MRXΔ* cells (Figs. 1D, E). Finally and as expected, *set1Δ* and H3K4R appear to act in the same genetic pathway (see below Fig. 5A). We conclude that in the absence of the MRX complex, Set1p and the methylation of H3K4 are crucial for the survival of the cells in presence of DNA damage.

**FIGURE 1**

**FAUCHER AND WELLINGER**





**Figure 1.**

**Genetic interactions between a histone modification pathway and the MRX complex.**

A) Tetrad analysis of spores derived from diploids micro-dissected on YEPD plates and allowed to grow for 3 days at 23°C. Circled colonies are double mutants. Diploids DFY001, DFY002, DFY004 and DFY005 respectively, were used as starting strains. B)-E) Serial ten-fold dilution growth tests of exponentially growing cultures on plates with the indicated compounds. YEPD: control plates without drug; B) Growth of cells with a deletion of members of the Ubiquitin-Ligase complex in combination with a deletion of *RAD50* (spores derived from diploids DFY002 and DFY007); C) Growth of cells with a mutant that cannot be monoubiquitylated (H2BK123R) (strains YZS276, YZS246, DFY008, DFY009 and MT0-73); D) Growth of cells with deletions of *DOT1* or *SET1* genes in combination with absence of *RAD50* (spores derived from diploids DFY010 and DFY012); and E) Growth of cells with a mutant histone H3 that cannot be methylated (H3K79R or H3K4R) and combined with an absence of *RAD50* (strains YZS267, DFY013, DFY015, DFY016, DFY017 and DFY018).

***Set1p mediated H3K4 methylation is involved in DSB repair by NHEJ*** Because cells lacking both *SET1* and the MRX complex are very sensitive to DSB, we decided to verify whether the main DSB repair pathways, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) were affected in cells lacking Set1p. In order to test whether *SET1* indeed is involved in NHEJ, *set1Δ*-cells were analyzed for NHEJ efficiency. A plasmid religation assay was performed using a transformation assay with linearized vector DNA. The circularization efficiency in strains deleted for *YKU70* and *DNL4* was about 5% of that obtained in *wt* cells, confirming their importance in this assay (Fig. 2A). Notably, the absence of *SET1* also caused an important decrease in the capacity of cells to complete NHEJ and to religate the plasmid: overall religation efficiency in these cells was reduced to about 30% of that seen in *wt* (Fig. 2A).

In addition, we used strain JKM179 harbouring the HO endonuclease controlled by a galactose-inducible promoter. In this strain, the natural donor sequences usually used for homologous recombination, after the HO recognition site is cut, are deleted from the genome. Therefore, upon induction of expression of the HO endonuclease, these cells can only repair the DSB at the mating type locus by NHEJ (Lee et al. 1999). Deletion of *SET1* in this strain background and exposing the strains to galactose resulted in a modest decrease of the viability of the cells as compared to *wt*, albeit not to the level of sensitivity of *yku70Δ* cells that display the expected dramatic decrease in viability due to an almost complete absence of NHEJ (Fig. 2B).

To confirm the involvement of *SET1* in the NHEJ repair pathway, we also used a strain that contains a cassette flanked by two *HO* cleavage sites (Wilson 2002; Della et al. 2004). Following *HO* endonuclease induction by addition of galactose to growth media, both *HO* cleavage sites are cut and, given the absence of homology in the rest of the genome for sequences on either side of the cassette, the cell has to repair the gap by NHEJ (See Fig. 2C). When grown in liquid culture containing galactose as carbon source, strains with a deletion of *SET1* display a similar extended lag-time before growth recovery as strains deleted for *YKU70* or *DNL4* (Fig. 2D). In these conditions, growth recovery is dependent on error-prone NHEJ; i.e. the *HO*-recognition site must be lost such the *HO* enzyme can not continuously induce the DSB. The results obtained with the liquid culture assays were paralleled by results obtained with the same strain, but using a colony color assay for error-free and error-prone assays (Wilson 2002; Della et al. 2004, Fig. 2E). These experiments firmly establish that in *set1Δ* cells, NHEJ and particularly the error-prone branch of this repair pathway is severely reduced when compared to wild type cells.

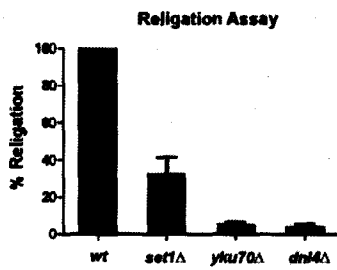
Abolition of the two DSB repair pathways (NHEJ and HR) at the same time leads to synergetic sensitivity of the cells to DNA damaging agents. As an example, this can be observed for cells harbouring deletions of both *DNL4* and *RAD52* and in which NHEJ and HR are lacking (Siede et al. 1996, Fig. 2F). Thus, we combined deletions of *DNL4* and/or *RAD52* with *set1Δ* and tested the sensitivity of the resulting cells to bleomycin. At the

bleomycin concentration used in this experiment, neither *set1Δ* nor *dnl4Δ* single mutants display a significant sensitivity and grow as well as wild type cells. As mentioned above, *rad52Δ* cells were only mildly affected (Fig. 2F). The *set1Δ dnl4Δ* double mutant cells also were not sensitive to this bleomycin concentration, which would be consistent with the possibility that these two genes act in the same genetic pathway. Yet, double mutant *set1Δ rad52Δ* and particularly the triple mutant *set1Δ dnl4Δ rad52Δ* cells displayed a sensitivity to DSB that is even higher than that of *dnl4Δ rad52Δ* cells (Fig. 2F). This result confirms that *SET1* is involved in the NHEJ repair pathway and suggests that Set1p may even have additional roles in maintaining genome stability, particularly in the presence of DNA damage.

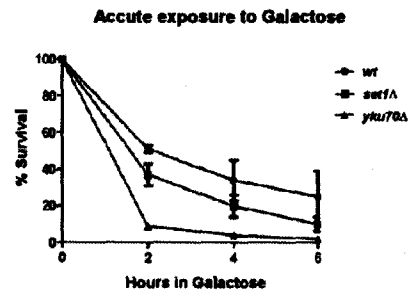
FIGURE 2

FAUCHER AND WELLINGER

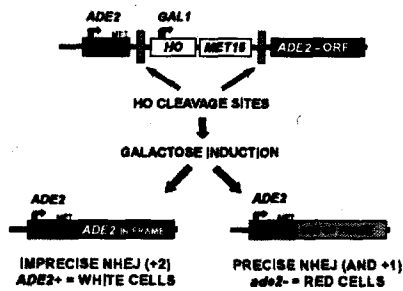
A



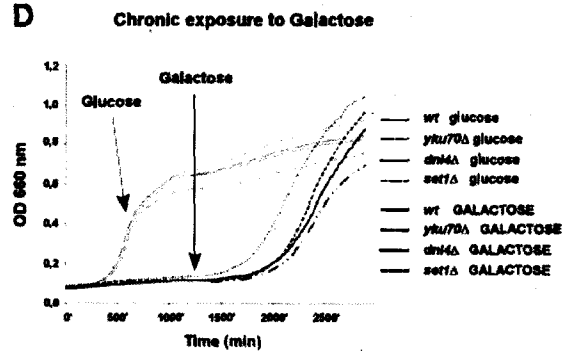
B



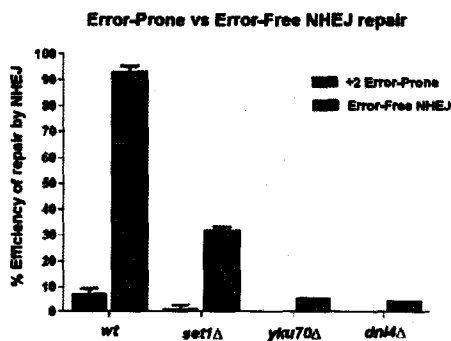
C



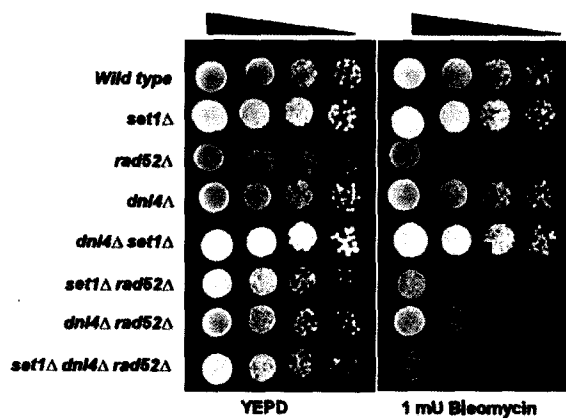
D



E



F



**Figure 2.**

The *LGE1-BRE1-SET1* histone modification pathway is involved in DSB repair by non-homologous end joining (NHEJ). A) *set1Δ* cells display a deficiency in a plasmid religation assay. Linearized plasmid pRS316 was transformed into wild type cells (*wt*, YW1276), *set1Δ* (DFY021), *yku70Δ* (YW1283) or *dnl4Δ* cells (DFY022). Overall percentage of religation was calculated using transformation efficiency normalization. B) Survival of *wt* (JKM179), *set1Δ* (DFY023) or *yku70Δ* cells (JKM181) following induction of a DSB. Cells were held in galactose media for the indicated time and then plated on glucose medium, shutting off HO endonuclease expression. In these strains, the induced DSB at the mating type locus can only be repaired by NHEJ. C) Schematic of the gal-HO region flanked by two HO-recognition sites in strain YW1276. Upon cleavage of the NHEJ can occur in a precise fashion which will not recreate the *ADE2* ORF, resulting in red colonies or the *ADE2orf* can be reconstituted by imprecise (+2) NHEJ, yielding white colonies. D) Growth curves of *wt* (YW1276), *set1Δ* (DFY021), *yku70Δ* (YW1283), and *dnl4Δ* cells (DFY022) exposed to a constant expression of HO endonuclease. E) Overall percentages of precise and imprecise NHEJ as determined in wild type cells (*wt*, YW1276), *set1Δ* (DFY021), *yku70Δ* (YW1283) or *dnl4Δ* (DFY022) cells. Note that total surviving colonies (precise plus imprecise NHEJ) in wild-type cells was set to 100% and the fraction of colonies of the respective mutant cells were expressed in relation to that. F) Sensitivity to DNA damage of cells harbouring deletions of genes affecting, respectively, NHEJ (*DNL4*) or

homologous recombination (*RAD52*) when combined with a deletion of *SET1*. Strains used were spores of DFY020.

***Recruitment of the SET1 methyltransferase and detection of H3K4me3 at newly created DSBs*** It is well documented that H3K4 trimethylation is present on H3 in nucleosomes at a majority of promoters and 5' parts of active genes (Bernstein et al. 2002; Ng et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2002; Dehe and Geli 2006; Guenther et al. 2007; Ruthenburg et al. 2007). Based on our above observations highlighting the importance of H3K4me3 in the DNA damage repair process, we asked whether or not this histone modification could be induced at the site of DNA damage. First, we tested whether there was a global increase in H3K4me3 in chromatin following DNA damage. Exposure to phleomycin of wild type cells did not result in an increase in the global amount of H3K4me3 (Fig. 3A). Moreover, the levels of phosphorylated H2AS129 did not significantly vary between *set1Δ* cells and wild type cells, indicating that this part of the chromatin modification at a DNA damage site seems to be by en large properly activated in this mutant (Fig. 3A). The failure to be able to detect an increase in H3K4me3 after DNA damage induction by phleomycin could be explained by an already relatively high level of H3K4me3 that is associated with active transcription. A slight further increase of that global level in this experiment may simply be undetectable by western blotting. We therefore turned to an assay that verifies the potential recruitment of the Set1p methyltransferase to a specific DSB by direct ChIP analysis. Fortunately, Set1p and H3K4me3 are virtually absent from the endogenous HO cut site located at the mating type locus (Hwang et al. 2003; Fig. 3B). In our setting, the HO endonuclease was induced

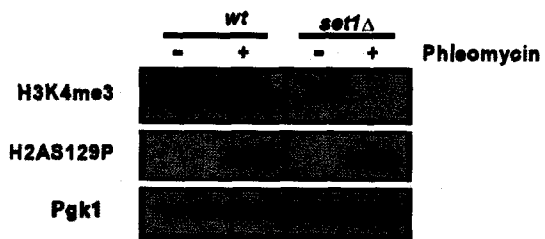
in wild type or *bre1Δ* cells, both also harbouring a functional Set1p-HA allele. Chromatin was immunoprecipitated with an anti-HA antibody (Hwang et al. 2003) or a H3K4me3-specific antibody. As expected, irrespective of whether HO is induced or not, Set1p and H3K4me3 can be detected on the promoter of *PYK1*, a gene known to be highly expressed throughout the cell cycle (Fig. 3B, Hwang et al. 2003). On the other hand, neither was detectable at the centromere of chromosome 4, an area that is transcriptionally repressed in a constitutive fashion (SNYDER *et al.*, 1988). Finally, when the cells were grown in glucose and in the absence of the HO endonuclease, Set1p and H3K4me3 were not detected at the MAT locus, while after induction of HO by galactose, the both became detectable at this same locus (Fig. 3B). These results therefore show that Set1p associates with a newly created DSB *in vivo* and induces *de novo* trimethylation of histone H3 at the site.



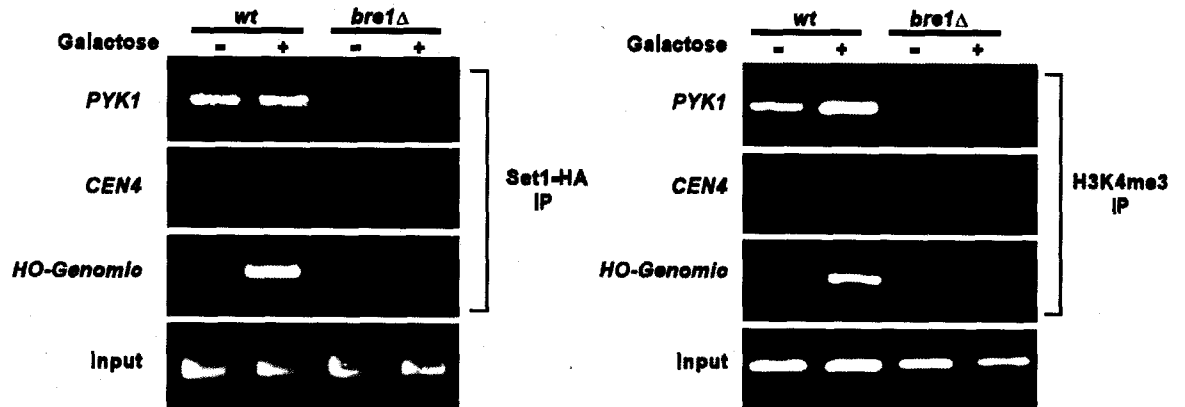
FIGURE 3

FAUCHER AND WELLINGER

A



B



**Figure 3.**

**Site specific recruitment of the Set1p methyltransferase and detection of H3K4me3 at a DSB.** A) Western blot of proteins derived from *wild type* and *set1Δ* cells that were treated (+) or not (-) with phleomycin.

Top: Trimethylated H3K4 was detected with an antibody against H3K4me3; Middle: detection of phosphorylated H2AS129 as a positive control for phleomycin treatment; and Bottom: anti-Pgk1p antibody as a loading control. Strains used were *wt* (DFY024) and *set1Δ* (DFY026). B) Left: Recruitment of HA-tagged Set1p methyltransferase to the mating type locus was tested by ChIP analysis using an anti-HA antibody. HO endonuclease was expressed for 90 min in G1-arrested *wt* (DFY027) or *bre1Δ* cells (DFY028). DNA was extracted from immunoprecipitates and PCR amplified with specific primers adjacent to the HO cleavage site, primers in the promoter region of the highly expressed gene *PYK1*, or primers specific for the transcriptionally repressed *CEN4* locus. Right: Same experiment as in left panel, except that instead of the anti-HA antibody, an antibody specific for H3K4me3 was used for the immunoprecipitation.

### ***Intra-S retention of set1Δ mutants following exposure to DNA damaging agents***

In order to verify whether cell cycle transitions that are controlled by checkpoint activation are normal in mutants where H3K4 trimethylation was abrogated, we analyzed cell cycle progression of cells after exposure to DSB inducing agents (Fig. 4A). Cells were arrested in G1, treated with 10μg/ml of phleomycin for 90 min, then washed two times with sterile water in order to remove all traces of the DNA damaging agent as well as the α-mating factor and finally released into fresh media lacking drugs. Compared to untreated wild type cells, phleomycin exposed cells were delayed for 30 min before entry into S-phase, as expected (Fig. 4A). However, once the G1 checkpoint delay overcome, the majority of cells resumed their cell cycle and went on to the G2/M phase. Exposure of the G1-synchronized mutant *set1Δ* to the same concentration of DNA damaging agent resulted in a retention of the majority of the cells in G1 or early S phase of the cell cycle (Fig. 4A) and these cells without the H3K4me3 modification actually failed to reach the G2/M phases of the cycle.

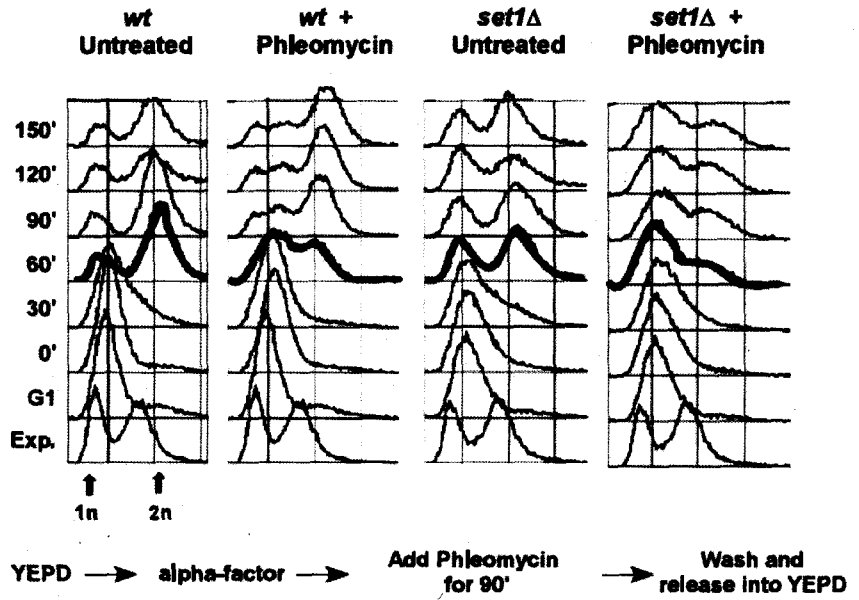
From these FACS analyses, it was not possible conclusively to deduce whether treated *set1Δ* cells remained arrested in G1 or actually did enter but could not complete S-phase. Therefore, in order to determine more precisely the exact phase of the cell cycle where these cells were arrested, we decided to analyze mRNA expression profiles of the G1/S cyclin Cln2p (HADWIGER *et al.*, 1989), the S-phase specific transcript for histone H2A (HTA1) (HEREFORD *et al.*, 1981) and the G2/M cyclin Clb2p (SURANA *et al.*, 1991). Aliquots of cells were taken at 30 min intervals after release from the G1-arrest

and mRNA was extracted. In untreated samples, both for wild type and *set1Δ* cells the expected oscillations of the expression of Cln2 or Clb2 RNA through the cell cycle can be observed (Fig. 4B, top and third rows). Peak expression levels for these two cyclins are temporally separated and occur at the expected time after G1 release indicating properly cycling cultures. Following exposure to phleomycin, both wild type and mutant cells display an induction of the Cln2 RNA at 30 min whereas Clb2 RNA increases after about 60 min, but there is no detectable mRNA peak at later time points, (Fig. 4B). These data are consistent with the FACS profiles as they confirm that such cells do not complete further cell cycles. The expression profiles of the S-phase specific histone H2B mRNA strongly suggest that bleomycin treated *set1Δ* cells in fact do enter S-phase and are not blocked at the G1/S boundary: Hta1 mRNA is induced at the 30 min timepoint and remains at an elevated level for about 60 min (Fig. 4B). This induction of the Hta1 mRNA strongly suggests actual entry into S and the assessment of budding indexes during a similar experimental protocol supports this notion (Supp. Fig. S2). Collectively, these data clearly show that cells abrogated for their H3K4me3 and exposed to DNA damaging agents can enter S-phase but encounter difficulty traversing it.

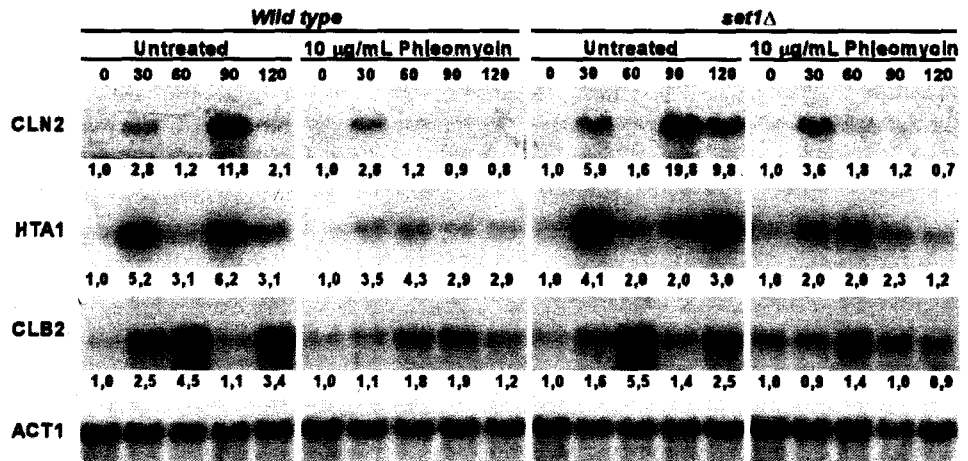
FIGURE 4

FAUCHER AND WELLINGER

A



B



**Figure 4.**

**Set1Δ cells exposed to DNA damage in G1 are retained in S-phase.** A) *wt* (DFY024) and *set1Δ* cells (DFY026) were arrested in G1 phase of the cell cycle and exposed to phleomycin (see experimental scheme at bottom). Cells were then released and cell cycle progression was monitored by flow cytometry of samples at regular intervals. Time 0 min represents the release of cells into rich medium immediately following the phleomycin treatment. B) In a separate release experiment, northern blot analysis was performed in order to confirm the expression of cell-cycle specific mRNAs: *Cln2* for G1, *Hta1* for S-phase and *Clb2* for G2/M specific RNA expression. A probe specific for the *Act1*-mRNA was used as a total mRNA loading control (bottom). The number below each lane indicates the change of the signal intensity for the particular RNA; time 0 was set as 1.

### ***Evidence for unstable replication forks in set1Δ cells exposed to genotoxic stress***

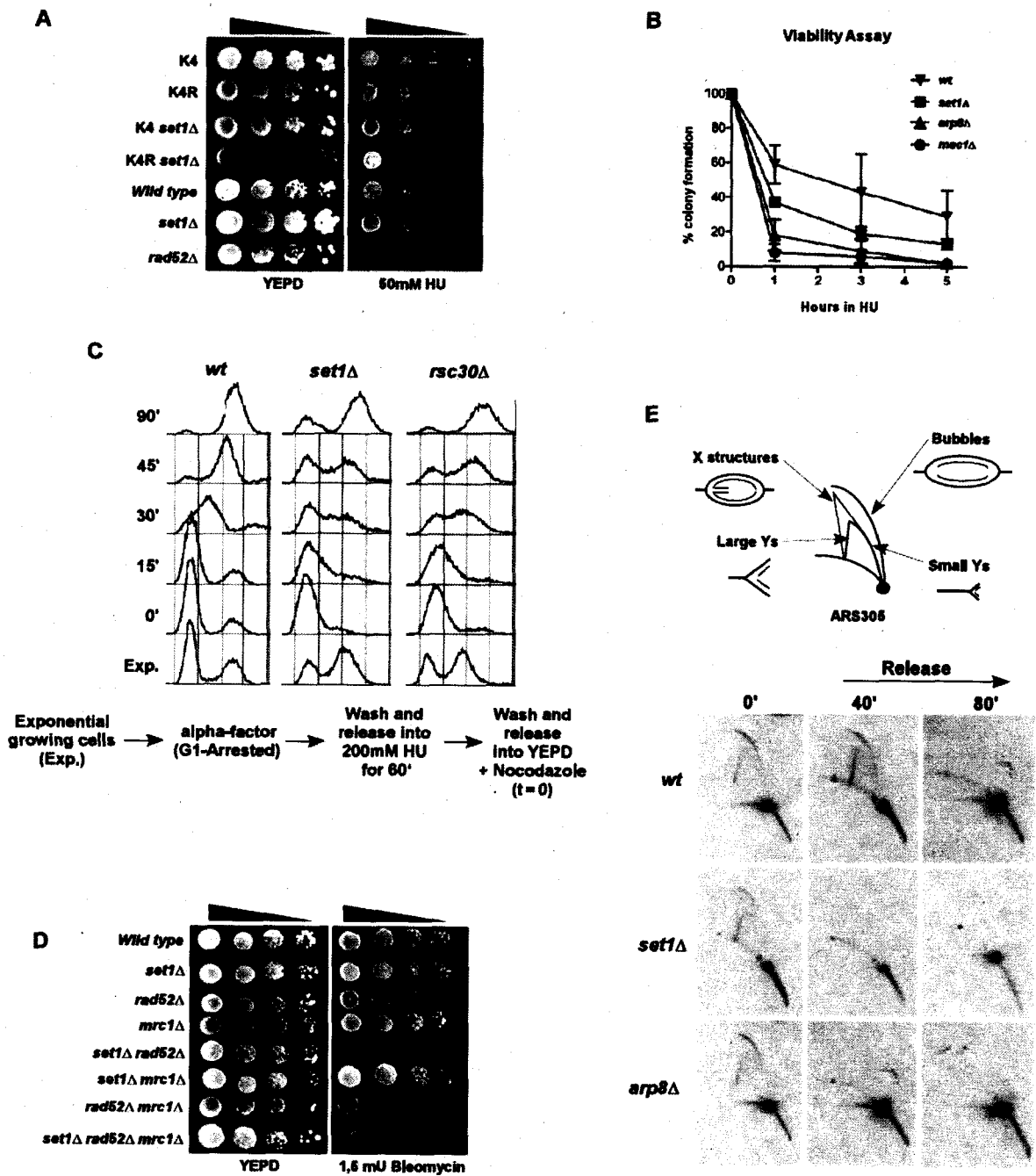
The above experiments show that after genotoxic treatments, cells without the ability to introduce the H3K4me3 chromatin mark experience problems in S-phase. One hypothesis that could explain these results is that replication of damaged DNA in *set1Δ* cells is severely compromised. Indeed, *set1Δ* cells and cells expressing H3K4R are sensitive to hydroxyurea, a compound affecting DNA replication, confirming that trimethylation of H3K4 is important for the passage through S in the presence of genotoxic stress (Fig. 5A, B) (CHABES *et al.*, 2003; KOC *et al.*, 2004). The *set1Δ*, H3K4R double mutant displays a similar sensitivity as each single mutant, suggesting that they act in the same genetic pathway in terms of HU-sensitivity (Fig. 5A). Next, we analyzed S-phase progression in wild type and *set1Δ* cells after a transient exposure to HU. Cells were arrested in G1, then released into S in the presence of 200 mM HU and finally HU was washed out and cells released into rich media containing Nocodazole (Fig. 5C). In wild type cells, this situation causes some delay in S-phase resumption (data not shown), but after 30 min, most cells resumed and they completed S-phase after 45 min (Fig. 5C, left). For *set1Δ* cells, the progression profile is delayed by about 15 min and many cells have not reached G2 even 90 min after the release (Fig. 5C, middle). Further, a mutant known to enter but incapable to traverse S-phase, *arp8Δ*, a member of the INO80-complex (Morrison *et al.* 2004; van Attikum *et al.* 2004; Papamichos-Chronakis and Peterson 2008), and exposed to similar experimental conditions showed a comparable phenotype as *set1Δ* cells (Supp. Fig. S3).

These results, including the striking similarity between *set1Δ* and *arp8Δ* cells in such assays, pointed to the possibility that replication forks may be compromised in the absence of Set1p. Furthermore, *set1Δ rad52Δ* and *mrc1Δ rad52Δ* cells displayed a very similar sensitivity to exposure to a low dose of bleomycin, while either deletion alone or a combination of *set1Δ mrc1Δ* did not display any significant sensitivity (Fig.5D). Mrc1p is involved in the activation of the Rad53 kinase during the S-Phase checkpoint (Alcasabas et al. 2001; Osborn and Elledge 2003) and also has an independent function in the stabilization of stalled replication forks (Szyjka et al. 2005; Tourriere et al. 2005; Lou et al. 2008). Given that a defect in stabilizing replication forks after fork stalling similar to the one seen in *mrc1Δ*-cells has been described for *arp8Δ*-cells (Morrison et al. 2004; van Attikum et al. 2004; Papamichos-Chronakis and Peterson 2008), we analyzed replication fork stability in *set1Δ* cells, using *arp8Δ* cells as control for cells known to have unstable forks (Fig. 5E). The probe used in these two-dimensional gels targeted the early firing origin ARS305 and immediately following the release from the HU block, all samples initiated replication at this replication origin as seen by the bubble arcs (left panels). These bubble arcs were detected at comparable intensities in all samples, arguing that replication initiation was occurring at a similar efficiency for wild type and mutant cells. Furthermore, in wild type cells, the signals for replication intermediates persisted for at least 40 min after the release before disappearing. In stark contrast, in *set1Δ* and *arp8Δ* mutants no signals for replication intermediates were detectable after 40 min of the release (Fig. 5E and Supp. Fig. S4 for a longer exposure). The similarity of this phenotype observed for *set1Δ* and *arp8Δ* cells suggests that in both strains, stalled forks cannot



resume replication and collapse (Morrison et al. 2004; van Attikum et al. 2004; Papamichos-Chronakis and Peterson 2008).

**FIGURE 5 FAUCHER AND WELLINGER**



**Figure 5.**

**Replication defects in *set1Δ* cells.** A) Serial ten-fold dilution growth test of strains with the relevant genetic setup on plates with 50mM HU. Strains used were YZS267, DFY017, DFY038, DFY039, DFY024, DFY026 and MT0-73. B) Viability curves of the indicated strains exposed to 1M HU for the indicated time. Strains used *wt* (DFY024), *set1Δ* (DFY026), *arp8Δ* (DFY030), *mec1Δ* (DFY044). C) *wt* (DFY024), *set1Δ* (DFY026) or *rsc30Δ* (DFY029) cells were arrested in G1 phase of the cell cycle and released into a synchronous S-phase in the presence of 200mM HU for 60 min. The HU block was removed by washout and cell cycle progression was analyzed by FACS. Time 0 min represents the release of cells into rich medium plus Nocodazole immediately following the HU treatment. D) Viability of strains with indicated genotype and derived from strain DFY032 were grown in liquid media and ten-fold serial dilutions were plated onto YEPD control plates or onto a plate containing bleomycin, as indicated. E) Top: Schematic of the detected patterns of replication intermediates on two-dimensional agarose gels. Bottom: Detection of DNA replication intermediates. DNA was derived from *wt* (DFY024), *set1Δ* (DFY026) or *arp8Δ* (DFY030) cells at indicated time points after release from an HU block and digested with the *NcoI* restriction enzyme. The probe detects the early firing origin ARS305.

***SET1 acts in conjunction with the RSC remodelling complex.*** The above results show that binding of Set1p and methylation at H3K4 are important events at sites of DNA damage in S-phase. Thus, we speculated that the methylated histone H3 may be important for the subsequently necessary chromatin remodelling and DNA repair activities. Methylated histones can bind or stabilize the association of various proteins that contain bromodomains, tudor domains alongside chromodomains or plant homeodomain (PHD)-finger motifs (Kim et al. 2006; Ruthenburg et al. 2007). Selected yeast candidate genes containing such domains and having the potential to bind H3K4me3 were tested for a genetic interaction with *RAD50*, similar to the one of the genes in H2BK123ub/H3K4me3 pathway in the presence of DNA damage. Amongst the genes tested in this fashion were *CTI6* (SAGA-complex), *CHD1* (SAGA and SLIK-complexes), *SAS3* and *YNG1* (Nua3-complex), *EAF3* (Nua4-complex), *ISW1*, *RDH54* and *RAD54*; none of which showed an interaction comparable to *SET1* (see Supp. Fig.S5 for *YNG1* as an example). The one exception in this regard was a non-essential component of yeast RSC remodelling complex, *RSC30*. When the *rsc30Δ* mutation was combined with *rad50Δ*, the cells displayed a DNA damage sensitivity that was very similar to that of *set1Δ rad50Δ* cells (Fig. 6A). In addition the *rsc30Δ set1Δ rad50Δ* triple mutant cells were as sensitive as each double mutant, which is consistent with the idea that *SET1* and *RSC30* act in the same genetic pathway (Fig. 6A).

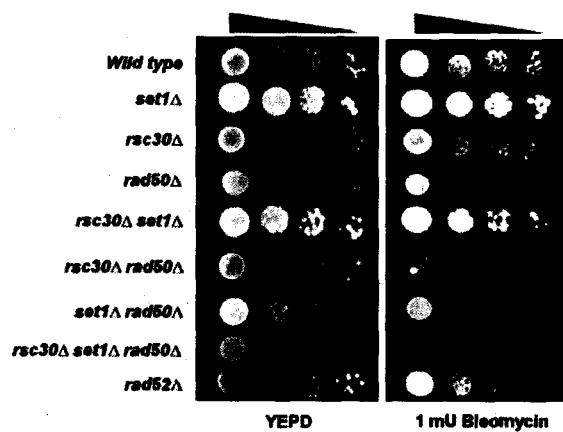
In order to further examine whether cells lacking *RSC30* or *SET1* behave in a similar fashion, cell cycle synchrony experiments were performed (Fig. 5C). *Rsc30Δ* cells

were synchronized in G1, released into a synchronous S-phase in the presence of hydroxyurea for 90 min and then released by washing out the drug. As observed for *set1Δ* cells, *rsc30Δ* cells experienced an S-phase delay (compare *wt* and *rsc30Δ* cells at 45 min after release, Fig. 5C, see also Supp. Fig. S3). The above experiments thus establish a number of intriguing correlations between the RSC complex and Set1p: their association with newly created DSBs, their absence causing strongly compromised NHEJ and also an increased sensitivity to genotoxic agents if HR is also compromised (Figs. 2, 3, 6A and Shim et al. 2005). We therefore investigated whether the recruitment of Set1p to DSBs was dependent on RSC or vice versa. As shown above (Fig. 3), Set1p localization to an induced DSB at *MAT* is readily detectable in *wt*, but abrogated in *bre1Δ* cells (Fig. 6B). In addition, similar to the situation in *bre1Δ* cells, Set1p recruitment was also undetectable in *rsc30Δ* cells (Fig. 6B). On the other hand, myc-tagged Sth1p, another subunit of the RSC-complex, can be detected on DSBs in *wt* and *set1Δ* cells (Fig. 6B and data not shown). Consistent with the genetic data above (Fig. 6A), these results strongly suggest that Set1p recruitment to a DSB is dependent on the proper function of the RSC-complex.

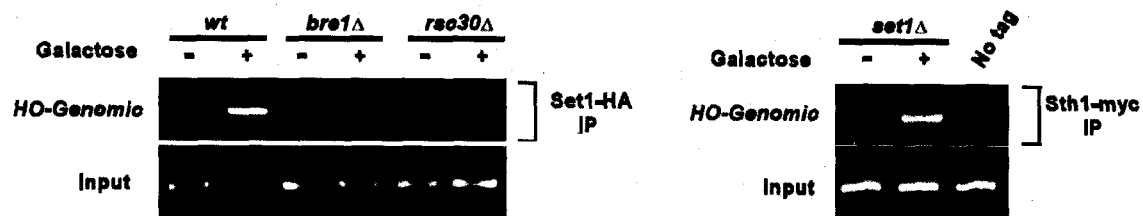
FIGURE 6

FAUCHER AND WELLINGER

A



B



**Figure 6.**

**Functional interactions between the RSC complex and *SET1*.** A) Growth of cells with a deletion of a member of the RSC complex in combination with a deletion of *RAD50* and/or *SET1* (spores derived from diploid DFY034). Serial ten-fold dilution growth tests of exponentially growing cultures on plates containing DNA damaging agent bleomycin. YEPD: control plates without treatment. B) Left: ChIP experiments assessing the presence of Set1p in cells lacking either *BRE1* or *RSC30*. Right: ChIP of an essential RSC-component in cells lacking *SET1*. The ChIP experiments essentially were conducted as described in Fig. 3.

## Discussion

Appropriate regulation of chromatin modification and chromatin remodelling is essential for efficient transcription, replication and repair of DNA (Reviewed in Ruthenburg et al. 2007; Weake and Workman 2008). Here we demonstrate that in budding yeast, the methylation of lysine 4 on histone H3 (H3K4me3) is crucial for genome stability. Strains lacking the respective methyltransferase Set1p display three specific phenotypes that support this statement: a strongly reduced efficiency of NHEJ (Fig. 2), *de novo* Set1p as well as H3K4me3 appearance at a site of an induced DSB (Fig. 3), and an incapacity to stabilize stalled forks (Fig. 5). These effects, when combined with an absence of HR lead to an extreme hypersensitivity to DNA-damaging agents (Figs. 1, 2, 5, 6). Although the reported effects are also seen in strains that harbour mutations not allowing ubiquitylation of H2B (Figs. 1 and 5), this fact can be explained by the dependence of H3K4 methylation on previous H2B modification (Lee et al. 2007; Vitaliano-Prunier et al. 2008). However, while H2BK123ub is also required for H3K79 methylation by Dot1p, our data demonstrate that loss of NHEJ-efficiency and the synthetic interactions with MRX are specific to a lack of H3K4me3 and not H3K79me3 (Fig. 1). Therefore, our data clearly establish that the roles played by Set1p in genome stability are quite different from those of the Dot1p methyltransferase (Giannattasio et al. 2005; Wysocki et al. 2005).

This is one of the first reports directly linking H3K4me3, a chromatin modification extensively described for its involvement in marking transcriptionally active loci, to DNA damage repair processes. Given that our results document the *de novo* occurrence of Set1p and the H3K4me3 mark on an induced DSB (Fig. 3), we do not think that the effects observed in *set1Δ*-cells are indirect consequences of a change in transcriptional activity. Furthermore, analyses of microarray data of RNA derived from cells harbouring H3K4R, a mutated version of H3 that can not be methylated, or from cells lacking either of Bre1p, Lge1p, Rad6p and Set1p do not indicate important transcription variation of genes implicated in the DNA damage checkpoints or repair (Bernstein et al. 2002; Laribee et al. 2005, M.-A. Osley, personal communication; see also <http://www.utoronto.ca/greenblattlab/BUR.xls>). In fact, one study reported a potential increase of repair genes in the absence of Set1p, which would be the opposite effect and could not explain our results (Schramke et al. 2001). In yeast, there is ample evidence for transcription-mark independent functions of Set1p. For example, a number of described subtle cellular phenotypes associated with a *SET1* deletion could be independent of transcriptional changes (Nislow et al. 1997). More recently, Set1p has been shown to methylate Ipl1p and be involved in chromosome segregation, an effect that is independent of its transcriptional regulation (Zhang et al. 2005). Finally, recent data does implicate H3K4me3 at sites of active meiotic DSB formation independently of the transcriptional state of the local genomic area (Borde et al. 2009). Intriguingly, the results on an involvement of Set1p in the regulation of meiosis in yeast have parallels in mouse, where a meiosis-specific H3K4 methyltransferase called Meisetz/*PRDM9* is



required for passage through meiosis. Remarkably, meiotic cells in mice lacking Meisetz also display a strong deficiency in DSB repair (Hayashi et al. 2005).

Our present hypothesis stipulates that the H3K4me3 chromatin mark is crucial for adequate repair of DSBs, whether they occur accidentally during vegetative growth or are induced in meiosis. For example, if there is a DSB occurring at a specific site in *wt* cells and the H3K4me3 mark is not already present due to a recent transcriptional activity, Set1p is recruited to it in a RSC-dependent fashion (Fig. 6). Either concomitant to this recruitment or thereafter, Set1p will induce *de novo* methylation of H3K4 on the nucleosomes surrounding the site (Fig. 3). RSC, a SWI/SNF type chromatin remodelling complex, has recently been shown to associate with DSB very early. Similar as shown here for Set1p, the recruitment of Mre11p, another protein involved in early recognition DNA damage, is also RSC-dependent (Liang et al. 2007). In addition, cells lacking Rsc30p, a non-essential member of RSC, display a number of indistinguishable phenotypes as cells lacking Set1p: an important reduction of NHEJ repair and an increased sensitivity to chronic exposure to HO endonuclease (Fig. 2, Shim et al. 2005) and a marked sensitivity to HU mediated S-phase arrest (Fig. 5C). Consistent with a close relationship between RSC, Set1p and the H3K4me3 mark, the respective genes genetically appear to be in the same epistasis group in terms of sensitivity to genotoxic agents (Fig. 6). Clearly, a relative opening of the chromatin by H3K4 methylation could be beneficiary for the ensuing nucleosome remodelling by the RSC-complex in preparation of repair mechanisms. However, we failed to be able to demonstrate a direct physical interaction between

H3K4me3 and the RSC catalytic subunit Sth1p by coimmunoprecipitation (data not shown).

The results also show that the presence of H3K4me3 at a site of DNA damage is exquisitely important during S-phase, presumably when replication forks encounter the site of DNA damage (Fig. 5). Recent evidence suggests that the MRX complex, in addition to its roles in damage recognition and checkpoint control, also stabilizes stalled replication forks (Tittel-Elmer et al. 2009). Interestingly, that effect is independent of the S-phase checkpoint and our data show that in the presence of DNA damage, cells with a *SET1* deletion display a high degree of synthetic lethality with MRX mutants, but not *TEL1* (, Fig. 1 and Supp. Fig. S1). It is therefore plausible that MRX and *SET1* define two independent pathways important for DNA replication fork stability in the presence of damage, which would explain our synthetic interaction data (Figs. 1, 2, 5). A very comparable genetic interaction between the MRX complex and *SET1* as the one reported here for budding yeast has also been found in *S. Pombe* (Roguev et al. 2008), which is consistent with the idea that this convergence of two pathways on replication fork stability is conserved.

Set1p has also been shown to interact with and somehow modify the activity of Mec3p, a conserved checkpoint protein (Corda et al. 1999). In addition, in mammals, there is increasing evidence for an association of tumour suppressor genes with H3K4me3. For example, both the *ING1* and *ING4* proteins that are associated with DNA

repair and cellular transformation bind to H3K4me3 (Pena et al. 2008; Hung et al. 2009). These findings hint to a widespread conservation of this alternate function of the H3K4me3 histone modification brought about by Set1p and homologous proteins in genome stability mechanisms.

This report highlights the complexity of downstream effects due to histone modifications and the occurrence of separate influences on major biological processes such as transcription, DNA replication and DNA damage repair. H3K4me3 generally is accepted as a very important mark in the genome of active promoters and the occurrence of recent transcription (Ng et al. 2002; Guenther et al. 2007; Kundu et al. 2007). Here we clearly delineate another, independent and crucial role for this chromatin modification: perhaps combined with the recruitment of chromatin remodeling activities it acts as a key player in the pathways governing genome stability in case of DNA damage.

## Materials and Methods

**Nomenclature.** We use the proposed histone modification nomenclature (Turner 2005). Trimethylation of the histone H3 on the lysine residue 4 becomes H3K4me3.

**Strains, plasmids and common methodology.** All individual *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Supplementary Table 1. All genetic manipulations of yeast strains followed standard procedures and are detailed in the Supplementary Materials and Methods section.

FACS analyses, Cell Sensitivity Assays, Assays for NHEJ efficiency as well as Westerns and Northernblots were performed using standard and published procedures (see Supplemental Information).

**Chromatin ImmunoPrecipitations (ChIP).** DFY027 or DFY028 cells were arrested in G1 phase with  $\alpha$ -factor for three hours in Yc-Ura + 2% raffinose and the expression of the HO- endonuclease was induced or re-repressed by the addition of 2% galactose or 2% glucose, respectively. Chromatin samples were prepared essentially as described (Vodenicharov and Wellinger 2006). Slight modifications include: following formaldehyde-mediated crosslinking, cells were resuspended in 4 ml of ChIP buffer (Vodenicharov and Wellinger 2006) and dropped into liquid nitrogen in order to form “popcorn-like” particles. Such frozen cell pellets were then lysed using a SPEX CertiPrep 6850 Freezer Mill to produce deep frozen powdered whole cell extracts. Extracts were

thawed on ice and sonicated (30 x 15 pulses, setting 2, 40% output power) using a Branson Sonifier. Detection of the indicated loci was achieved by PCR using the following primers:

HO cleavage site at mating type = ATTCTTAGCATCATTCTTTGTC and TCCAATCTGTGCACAATGAAG;

CENIV = ATGTTGAAGGAACAGCTGGG and AGGCTCAATGTTGACTAGCC;

PYK1 = GAAACGATAAGTGCTACTCCGTCCTA and GGTCATCTATGGGGCTTGAATCT.

***Neutral-Neutral Two-Dimensional Agarose gels.*** DNA was isolated from indicated strains as previously described (Shimada et al. 2008) and the two-dimensional agarose gel analyses for DNA replication intermediates were performed as published (Dandjinou et al. 2006). DNAs were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond XL, GE HealthCare) and hybridized to sequences specific for the budding yeast ARS305 locus.

## **Acknowledgments**

We thank J. Haber, M. Raghuraman, F. Robert, K. Struhl, Z.W. Sun, A. Verreault and T. Wilson for strains and reagents. D. Durocher, P.É. Jacques and members of the Pasero and Wellinger laboratory, particularly M. Vodenicharov and S. Gravel, contributed with helpful discussions. We are also grateful to M. Peter (ETH Zürich, Switzerland) who allowed us to perform the initial SGA screen in his laboratory. This work was supported by a grant from the CIHR (grant #MOP-12616). The authors have no competing interests.

## References

- Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JF, Carr AM, Elledge SJ. 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nature Cell Biology* **3**: 958-965.
- Altaf M, Saksouk N, Cote J. 2007. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutation Research* **618**: 81-90.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8695-8700.
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Geli V, Nicolas A. 2009. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO Journal* **28**: 99-111.
- Chai B, Huang J, Cairns BR, Laurent BC. 2005. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes & Development* **19**: 1656-1661.
- Corda Y, Schramke V, Longhese MP, Smokvina T, Paciotti V, Brevet V, Gilson E, Geli V. 1999. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions.[see comment]. *Nature Genetics* **21**: 204-208.
- Dandjinou AT, Larrivee M, Wellinger RE, Wellinger RJ. 2006. Two-dimensional agarose gel analysis of DNA replication intermediates. *Methods in Molecular Biology* **313**: 193-208.
- Dehe PM, Geli V. 2006. The multiple faces of Set1. *Biochemistry & Cell Biology* **84**: 536-548.
- Della M, Palmbo PL, Tseng HM, Tonkin LM, Daley JM, Topper LM, Pitcher RS, Tomkinson AE, Wilson TE, Doherty AJ. 2004. Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* **306**: 683-685.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**: 1001-1004.
- Evan GI, Vousden KH. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-348.
- Fyodorov DV, Kadonaga JT. 2001. The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* **106**: 523-525.
- Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M. 2005. The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 9879-9886.
- Green CM, Almouzni G. 2002. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Reports* **3**: 28-33.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells.[see comment]. *Cell* **130**: 77-88.
- Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y. 2005. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**: 374-378.

- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K et al. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- Hung T, Binda O, Champagne KS, Kuo AJ, Johnson K, Chang HY, Simon MD, Kutateladze TG, Gozani O. 2009. ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Molecular Cell* **33**: 248-256.
- Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD. 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular Cell* **11**: 261-266.
- Kim J, Daniel J, Espejo A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Reports* **7**: 397-403.
- Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, Haw RA, Pootoolal J, Tong A, Canadien V et al. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular Cell* **12**: 1565-1576.
- Kundu S, Horn PJ, Peterson CL. 2007. SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes & Development* **21**: 997-1004.
- Larabee RN, Krogan NJ, Xiao T, Shibata Y, Hughes TR, Greenblatt JF, Strahl BD. 2005. BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Current Biology* **15**: 1487-1493.
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A. 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS.[see comment]. *Cell* **131**: 1084-1096.
- Lee SE, Paques F, Sylvan J, Haber JE. 1999. Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Current Biology* **9**: 767-770.
- Liang B, Qiu J, Ratnakumar K, Laurent BC. 2007. RSC functions as an early double-strand-break sensor in the cell's response to DNA damage. *Curr Biol* **17**: 1432-1437.
- Lou H, Komata M, Katou Y, Guan Z, Reis CC, Budd M, Shirahige K, Campbell JL. 2008. Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint.[see comment]. *Molecular Cell* **32**: 106-117.
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair.[see comment]. *Cell* **119**: 767-775.
- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K. 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes & Development* **16**: 806-819.
- . 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**: 709-719.
- Nislow C, Ray E, Pillus L. 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Molecular biology of the cell* **8**: 2421-2436.



- Osborn AJ, Elledge SJ. 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes & Development* **17**: 1755-1767.
- Osley MA, Shen X. 2006. Altering nucleosomes during DNA double-strand break repair in yeast. *Trends in Genetics* **22**: 671-677.
- Osley MA, Tsukuda T, Nickoloff JA. 2007. ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mutation Research* **618**: 65-80.
- Papamichos-Chronakis M, Peterson CL. 2008. The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability.[see comment]. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**: 338-345.
- Pena PV, Hom RA, Hung T, Lin H, Kuo AJ, Wong RP, Subach OM, Champagne KS, Zhao R, Verkhusha VV et al. 2008. Histone H3K4me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. *Journal of Molecular Biology* **380**: 303-312.
- Ritchie KB, Mallory JC, Petes TD. 1999. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 6065-6075.
- Roguev A, Bandyopadhyay S, Zofall M, Zhang K, Fischer T, Collins SR, Qu H, Shales M, Park HO, Hayles J et al. 2008. Conservation and rewiring of functional modules revealed by an epistasis map in fission yeast. *Science* **322**: 405-410.
- Rouse J, Jackson SP. 2002. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* **297**: 547-551.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular Cell* **25**: 15-30.
- Sanchez Y, Zhou Z, Huang M, Kemp BE, Elledge SJ. 1997. Analysis of budding yeast kinases controlled by DNA damage. *Methods in Enzymology* **283**: 398-410.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
- Schramke V, Neecke H, Brevet V, Corda Y, Lucchini G, Longhese MP, Gilson E, Geli V. 2001. The set1Delta mutation unveils a novel signaling pathway relayed by the Rad53-dependent hyperphosphorylation of replication protein A that leads to transcriptional activation of repair genes. *Genes & Development* **15**: 1845-1858.
- Shim EY, Hong SJ, Oum JH, Yanez Y, Zhang Y, Lee SE. 2007. RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Molecular & Cellular Biology* **27**: 1602-1613.
- Shim EY, Ma JL, Oum JH, Yanez Y, Lee SE. 2005. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Molecular & Cellular Biology* **25**: 3934-3944.
- Shimada K, Oma Y, Schleker T, Kugou K, Ohta K, Harata M, Gasser SM. 2008. Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Current Biology* **18**: 566-575.

- Siede W, Friedl AA, Dianova I, Eckardt-Schupp F, Friedberg EC. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics* **142**: 91-102.
- Sun ZW, Allis CD. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104-108.
- Szyjka SJ, Viggiani CJ, Aparicio OM. 2005. Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell* **19**: 691-697.
- Tittel-Elmer M, Alabert C, Pasero P, Cobb JA. 2009. The MRX complex stabilizes the replisome independently of the S phase checkpoint during replication stress. *EMBO J* **28**: 1142-1156.
- Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Page N, Robinson M, Raghibizadeh S, Hogue CW, Bussey H et al. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364-2368.
- Tourriere H, Versini G, Cordon-Preciado V, Alabert C, Pasero P. 2005. Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53. *Mol Cell* **19**: 699-706.
- Turner BM. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 110-112.
- Usui T, Ogawa H, Petrini JH. 2001. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Molecular Cell* **7**: 1255-1266.
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM. 2004. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair.[see comment]. *Cell* **119**: 777-788.
- van Attikum H, Gasser SM. 2005a. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **4**: 1011-1014.
- . 2005b. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 757-765.
- Vitaliano-Prunier A, Menant A, Hobeika M, Geli V, Gwizdek C, Dargemont C. 2008. Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation.[see comment]. *Nature Cell Biology* **10**: 1365-1371.
- Vodenicharov MD, Wellinger RJ. 2006. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Molecular Cell* **24**: 127-137.
- Weake VM, Workman JL. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**: 653-663.
- Wilson TE. 2002. A genomics-based screen for yeast mutants with an altered recombination/end-joining repair ratio. *Genetics* **162**: 677-688.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF et al. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Molecular Cell* **11**: 267-274.
- Wurtele H, Verreault A. 2006. Histone post-translational modifications and the response to DNA double-strand breaks. *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 137-144.

- Wyce A, Xiao T, Whelan KA, Kosman C, Walter W, Eick D, Hughes TR, Krogan NJ, Strahl BD, Berger SL. 2007. H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell* **27**: 275-288.
- Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Cote J, Kron SJ. 2005. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Molecular & Cellular Biology* **25**: 8430-8443.
- Zhang K, Lin W, Latham JA, Riefler GM, Schumacher JM, Chan C, Tatchell K, Hawke DH, Kobayashi R, Dent SY. 2005. The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* **122**: 723-734.
- Zhou BB, Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION:

### Additional Information on Methods used:

The strain used for SGA analysis was MLY532 (Mata *rad50::NatR can1::MFA1pr-HIS3-MFalpha1pr-LEU2 his3Δ leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lys2Δ0*). To create this strain, Y3556 (Mata *can1::MFA1pr-HIS3-MFalpha1pr-LEU2 his3Δ leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lys2Δ0*) Tong et al. 2004 was transformed with a plasmid pJH1032-ad50D-NatR linearized by *Clal*. pJH1032-rd50D-NatR was constructed using pJH1032 (former name pNKY1070 Alani et al. 1989) in which the *NatR* marker gene replaces a *Xba1* fragment of *RAD50*. MLY530 (Mata *mre11::NatR can1::MFA1pr-HIS3-MFalpha1pr-LEU2 his3Δ leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lys2Δ0*) was created by transforming a *BamH1+Xho1* fragment of plasmid pRS313-MRE11d-NatR. To construct pRS313-MRE11d-NatR, *MRE1* coding sequences were amplified using oligos CTCGAAACTAGTGGATCTCAAACA and CTTGCTATACGAATTCAAGAGCAAAG harbouring respectively *SpeI* and *EcoRI* restriction sites. This fragment was then cloned into pRS313 using the added restriction sites. The resulting plasmid was digested with *HpaI* and we replaced the excised 2135 bp fragment with a blunted *NatR* fragment creating pRS313-MRE11d-NatR.

These strains were crossed with the library of nearly 4700 individual haploid strains with the a mating type (background strain BY4741) purchased from Invitrogen Life Technologies. Information is available at the Saccharomyces Deletion project Website. In order to confirm potential hits, we created diploid strains DFY001, DFY002, DFY004 by

crossing haploid strains MLY530 and MLY532 with the respective strain from the yeast deletion library.

Strain DFY06 (*hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ rad50Δ::NatR pMS329 (HHT1-HHF1 CEN URA3)*) was derived from MSY421 (*hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ pMS329 (HHT1-HHF1 CEN URA3)*) (Briggs et al. 2001). DFY07 and DFY08 were obtained by a plasmid shuffle introducing plasmids encoding the wild type or mutated versions of histone H3: pZS136 (*HHT2-HHF2 CEN TRP1*), pZS138 (*hht2-K4R-HHF2 CEN TRP1*) and pZS138 (*hht2-K79R-HHF2 CEN TRP1*) (Sun and Allis 2002, obtained from Brian Strahl, UNC-Chapel Hill) with strain DFY06. Transformation of plasmids and DNA into yeast was performed as described (Gietz et al. 1995).

Mutant haploid strains were constructed by replacing the ORF of the targeted gene in parental strain LLY33 (for MT0-73, DFY003, DFY006, DFY011, DFY024), YW1276 (DFY021, DFY022), JKM179 (for DFY023), yFR016 (DFY027, DFY028, DFY037), YZS267 (DFY038), DFY017 (DFY039) and a spore of DFY042 (DFY044) with the indicated selection markers using a PCR-mediated gene disruption method (Brachmann et al. 1998). The LLY33 strain was created by micro-dissection of the diploid BY4705 (Brachmann et al. 1998). Strains DFY008, DFY009 and DFY014 were constructed by the integration of a digested fragment derived from the *rad50Δ::NatR* plasmid into the genomic locus (Larrivee et al. 2004). All strains used in this study had their mutations confirmed by marker segregation and PCR analysis.

### **General yeast growth conditions.**

Cells were grown on standard rich YEPD media containing, if needed, 100ug/ml of nourseothricin (Clonat, WERNER Bioagents, Germany) or G418 at 150ug/ml (Sigma). In some cases, synthetic medium YC supplemented with needed amino acids and bases was used. All genetic manipulations were performed as described previously (Zakian and Scott 1982; Rose et al. 1990).

### **Flow cytometry analysis**

Cell synchronizations were performed as published with minor modifications (Wellinger et al. 1993b; Wellinger et al. 1993a). Following a three hours cell synchronization in G1 using  $\alpha$ -factor, phleomycin was added to cultures to reach indicated final concentrations and cells were further incubated for 90 min. In order to remove the DNA damaging agent and the  $\alpha$ -factor, cells were washed two times with sterile water and resuspended in fresh growth media. At the respective time points of the specific experiments, aliquots were processed for FACS analyses (Gravel et al. 1998) or budded cells were counted using an hemacytometer and percentage of budded cells was calculated as the ratio of budded cells over all cells. For the S-phase release experiments, cells were synchronized in G1 phase for three hours as above, washed two times using sterile water in order to remove the pheromone and resuspended in YEPD media containing 200 mM Hydroxyurea (HU). Cells were left in this media for 60 min, washed again using sterile water and finally resuspended in fresh YEPD media containing Nocodazole for the rest of the experiment. Aliquots were again prepared for FACS analyses at the indicated time points.

### **Drug sensitivity assays**

Cell sensitivity to damaging agents was verified by spot tests on YEPD media containing the indicated concentrations of MMS (Sigma), HU (Sigma) and Bleomycin (BLENOXANE, Bistol Meyers). Mid-log cultures were spotted in serial 10-fold dilutions and were allowed to grow for 3 to 4 days, before documentation.

For viability experiments after exposure to HU, cells were grown to log phase in YEPD at 30°C and then arrested in G1 with  $\alpha$ -factor for three hours. Such synchronized cultures were then washed three times and released into S-phase by resuspension in YEPD to which HU was added to yield a final concentration of 1M. Aliquots of cells were taken after 1, 3 and 5 hours of incubation, cell density determined by counting and aliquots of  $2 \times 10^3$  cells were plated on YEPD plates. Viability is expressed as the percentage of colonies with respect to the counted cells.

For sensitivity to DNA breaks induced by the HO-endonuclease, JKM179 cells and derivative strains were grown to log phase in YEP-media supplemented with 2% raffinose. Cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/ml in YEPGal media and cells were incubated for 2, 4 or 6 hrs. Cells were then counted and  $2 \times 10^3$  cells were plated on YEPD media and incubated at 30°C for 2 days. The survival rate of *wt* cells was determined by dividing the number of colonies obtained by the number of cells plated. All mutant survival rates were compared to the wild type rate which was set to 1.

### Assays for NHEJ efficiency

*Plasmid religation assay.* In general, the experiment was performed as described previously (Lee et al. 1999). The centromeric plasmid pRS316 was digested with the *BamHI* restriction enzyme and then transformed into yeast cells. The transformation of undigested plasmid done in parallel was used to assess transformation efficiency of each sample. Efficiency of religation was determined by the number of colonies that were able to grow on a media selecting for the marker contained on the plasmid and was normalized by the transformation efficiency for each sample. All religation efficiencies in mutant cells were compared to wild type cells which were set to 100% and *yku70Δ* and *lig4Δ* cells were used as controls.

*HOSD(+1) NHEJ assay.* Essentially, the experiments were done as previously described (Della et al. 2004). Wild type, control strains carrying deletions of genes known to be involved in NHEJ (*yku70Δ* and *lig4Δ*) and *set1Δ* cells were grown in Yc-Met media containing Raffinose as carbon source for 16 hours. For an observation of a chronic exposure to break induction,  $4 \times 10^4$  cells were incubated in media containing either glucose or galactose and their re-growth characteristics monitored over 48 hrs using an automatic plate incubator and reader (see Toussaint et al. 2006, for details).

Error-prone/ Error-Free NHEJ-ratio was obtained by growing cells for 2 days in Yc-Met+Ade + 2% raffinose media, followed by a dilution into Yc-complete supplemented with 2% galactose. Cells were allowed to grow for 2 days and then plated at appropriate dilutions onto Yc-complete + 2% glucose plates to obtain the total of viable cells, and onto Yc-Ade + 2% glucose plates in order to reveal the +2 imprecise NHEJ events. Results



were determined by dividing the number of colonies on Yc-Ade plates (imprecise NHEJ) by the total colonies on Yc-complete (all NHEJ events).

### **Western analyses**

Midlog cell cultures were either exposed to 10 µg/ml of Phleomycin for one hour or left untreated and protein extracts were prepared using a modified TCA method (Knop et al. 1999). Proteins were separated on an 8% and 15% acrylamid-bisacrylamid gels (ratio 29:1) using standard techniques (Sambrook et al. 1989). Gels were transferred onto a PVDF membrane and treated according to manufacturer's instructions (Perkin Elmer). Anti-H3K4me3 polyclonal antibody was purchased from Abcam (Ab8580) and used at a 1: 5000 dilution. H3K4me0 peptide (a kind gift of Alain Verreault) was used with Ab8580 in order to reduce non-specific binding of the antibody. Polyclonal anti Phospho-H2AS129 (Ab15083) was purchased from Abcam and used at a 1:750 dilution. Signals were detected using horseradish-peroxidase-coupled anti-rabbit secondary antibodies (GE Healthcare) and enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer). Monoclonal anti-Pgk1p was obtained from Molecular Probes and used at a 1/20000 dilution.

### **Northern analyses.**

RNA extraction and Northern blots were performed as previously described (Larose et al. 2007). Cln2 and Hta1 RNAs were detected using radiolabeled probes prepared by a random priming method using the following primers:

Cln2 = TAACAGCAATAACGCAACCA and CCGCAACGGCGCATTACCT

Hta1= ATGTCCGGTGGTAAAGGTGG and TCTTGAGAAGCCTTGGTAGC

**Supplementary Table1**

Strain	Genotype	Reference
Y3656	<i>can1Δ::MFA1pr-HIS3-Mha1pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Tong et al. 2001
MLY532	<i>MATα rad50Δ::NatR can1Δ::MFA1pr-HIS3-Mha1pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	This study
MLY530	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mre11Δ::NatR can1Δ::MFA1pr-HIS3-Mha1pr-LEU2</i>	This study
BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	INVITROGEN
BY4705	<i>MATα/MATα ade2ΔhisG/ADE2 his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 trp1Δ63/TRP1 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Brachmann et al. 1998
BY4741 YPL055C	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lge1ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YDL074C	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bre1ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YHR119W	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YDR440W	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dot1ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YHR056W	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rsc30ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YOR141C	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 0 arp8ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YCL060C	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 0 mrc1ΔKmX</i>	INVITROGEN
BY4741 YOR064C	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yng1ΔKmX</i>	INVITROGEN
DFY001	<i>MATα/MATα met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ +/bre1Δ::KmX</i>	This study
DFY002	<i>MATα/MATα met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ +/lge1Δ::KmX</i>	This study
DFY003	<i>met15Δ0 ura3Δ0 rad50Δ::NatR lge1Δ::KmX</i>	This study
DFY004	<i>MATα/MATα met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 mre11Δ::NatR/+ +/bre1Δ::KmX</i>	This study
MCY751-2C	<i>ade2ΔhisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 tel1Δ::LEU2</i>	Chakhparonian et al. 2005
DFY005	<i>MATα/MATα tel1Δ::LEU2/+ bre1Δ::KmX/+ ade2ΔhisG/+ his3Δ1/his3Δ2000 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	This study

LLY33	MATa <i>his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	This study
DFY006	MATa <i>his3Δ200 lys2Δ0 ura3Δ0 bre1ΔLEU2</i>	This study
DFY007	MATa/MATα <i>met15Δ0/+ lys2Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ +/bre1Δ::LEU2</i>	This study
MT0-73	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad52Δ::LEU2</i>	Toussaint et al. 2006
YZS276	MATa ( <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::LEU2</i> + pZS145( <i>HTA1-FLAG-HTB1 CEN HIS3</i> ))	Sun and Allis 2002
DFY008	MATa ( <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::LEU2 rad50Δ::NatR</i> + pZS145( <i>HTA1-FLAG-HTB1 CEN HIS3</i> ))	This study
YZS246	MATa ( <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::LEU2</i> + pZS140( <i>HTA1-FLAG-htb1-K123R 2μ HIS3</i> ))	Sun and Allis 2002
DFY009	MATa ( <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::LEU2 rad50Δ::NatR</i> + pZS140( <i>HTA1-FLAG-htb1-K123R 2μ HIS3</i> ))	This study
DFY010	MATa/MATα <i>met15Δ0/+ lys2Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ dot1Δ::KmX/+</i>	This study
DFY011	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1ΔURA3</i>	This study
DFY012	MATa/MATα <i>met15Δ0/+ lys2Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ set1ΔURA3/+</i>	This study
MSY421	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) + pMS329( <i>HHT1-HHF1 CEN URA3</i> )	Sun and Allis 2002
YZS267	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) + pZS136( <i>HHT1-HHF1 CEN TRP1</i> )	Sun and Allis 2002
DFY013	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) + p[ <i>hht2-K79R-HHF2 CEN TRP1</i> ]	Brian Strahl UNC
DFY014	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) <i>rad50Δ::NatR</i> + pMS329( <i>HHT1-HHF1 CEN URA3</i> )	This study
DFY015	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) <i>rad50Δ::NatR</i> + pMS329( <i>HHT1-HHF1 CEN TRP1</i> )	This study
DFY016	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) <i>rad50Δ::NatR</i> + p[ <i>hht2-K79R-HHF2 CEN TRP1</i> ]	This study
DFY017	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) + pZS138( <i>hht2-K4R-HHF2 CEN TRP1</i> )	This study
DFY018	MATa ( <i>hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ</i> ) <i>rad50Δ::NatR</i> + pZS138( <i>hht2-K4R-HHF2 CEN TRP1</i> )	This study
DFY019	MATa/MATα <i>his3Δ1/his3Δ1 lys2Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0 met15Δ0/+ leu2Δ0/leu2Δ0 rad52Δ::LEU2/+ set1ΔURA3/+</i>	This study
DFY020	MATa/MATα <i>his3Δ1/his3Δ1 lys2Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0 met15Δ0/+ leu2Δ0/leu2Δ0 rad52Δ::LEU2/+ set1ΔURA3/+ +/dnl4ΔKmX</i>	This study
YW1276	MATα-inc <i>ade2::HOSD(+1)::STE3-MET15 his3Δ1 leu2Δ0</i>	Della et al.

	<i>met15Δ0 ura3Δ0</i>	2004
YW1283	YW1276 <i>yku70ΔHIS3</i>	Della et al. 2004
DFY021	YW1276 <i>set1ΔKmX</i>	This study
DFY022	YW1276 <i>dnl4ΔKmX</i>	This study
JKM179	<i>hoΔ MATα hmlΔ::ADE1 hmrΔ::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 trp1::hisG' lys5 ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Lee et al. 1999
JKM181	JKM179 <i>yku70ΔURA3</i>	Lee et al. 2003
DFY023	JKM179 <i>set1ΔKmX</i>	This study
DFY024	<i>MATα his3Δ200 lys2Δ0 ura3Δ0 bar1ΔHIS3</i>	This study
DFY025	<i>MATα/MATα his3Δ200/his3Δ200 lys2Δ0/lys2Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 bar1ΔHIS3 set1ΔURA3</i>	This study
DFY026	<i>MATα his3Δ200 lys2Δ0 leu2Δ0 bar1ΔHIS3 set1ΔURA3</i>	This study
yFR016	<i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56 3XHA-SET1</i> (Also named FT4 3XHA-SET1)	Ng et al. 2002
DFY027	<i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56 3XHA-SET1 bar1ΔHIS3 + YcpHocut4</i>	This study
DFY028	<i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56 3XHA-SET1 bar1ΔHIS3 bre1Δ::KmX + YcpHocut4</i>	This study
DFY029	<i>MATα his3Δ200 lys2Δ0 ura3Δ0 bar1ΔHIS3 rsc30ΔKmX</i>	This study
DFY031	<i>MATα his3Δ200 lys2Δ0 ura3Δ0 bar1ΔHIS3 arp8ΔKmX</i>	This study
DFY032	<i>MATα/MATα his3Δ200/his3Δ200 lys2Δ0/lys2Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 mrc1ΔKmX set1ΔURA3 rad52Δ::LEU2</i>	This study
DFY033	<i>MATα/MATα met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 rad50Δ::NatR/+ yng1ΔmX/+</i>	This study
DFY034	<i>MATα/MATα his3Δ200/his3Δ200 lys2Δ0/lys2Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 bar1ΔHIS3/+ set1ΔLEU2/+ rad50Δ::NatR/+ rsc30ΔKmX/+</i>	This study
FT4 Sth1-9myc	<i>MATα ura3-52 trp1- Δ63 his3- Δ200 leu2::PET56 9XMYC-STH1</i> (Also named FT4 9XMYC-STH1)	Ng et al. 2002
DFY035	FT4 9XMYC-STH1 <i>bar1ΔHIS3</i>	This study
DFY036	FT4 9XMYC-STH1 <i>bar1ΔHIS3 set1ΔKmX + YcpHocut4</i>	This study
DFY037	<i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2::PET56 3XHA-SET1 bar1ΔHIS3 rsc30ΔKmX + YcpHocut4</i>	This study
DFY038	<i>MATα (hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ) set1ΔKmX + pZS136(HHT1-HHF1 CEN TRP1)</i>	This study
DFY039	<i>MATα (hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ) set1ΔKmX + pZS138(hht2-K4R-HHF2 CEN TRP1)</i>	This study
MCY742	<i>MATα/MATα ade2Δ::hisG / ade2 his3Δ200 / his3 leu2Δ0 / leu2 lys2Δ0 / lys2 met15Δ0 / met15 trp1Δ63 / trp1 ura3Δ0</i>	Chakhparonian et al., 2005

	<i>/ura3 mec1::mec1ts::HIS3 /mec1Δ::TRP1 sml1Δ::TRP1 / sml1::HIS3 TEL1 /tel1-11::natR sae2Δ::kanMX4 /SAE2</i>	
DFY040	<i>MATa/MATα +/bre1ΔKmx +/mec1ΔTRP +/sml1ΔHIS his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3</i>	This study
DFY041	<i>bre1ΔKmx mec1ΔTRP sml1ΔHIS his3 leu2 ura3</i>	This study
DFY042	<i>MATa/MATα +/lge1ΔKmx +/mec1ΔTRP +/sml1ΔHIS his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3</i>	This study
DFY043	<i>lge1ΔKmx mec1ΔTRP sml1ΔHIS his3 leu2 ura3</i>	This study
DFY044	<i>mec1ΔTRP sml1ΔHIS bar1ΔKmx his3 leu2 ura3</i>	This study
DFY045	<i>MATa/MATα met15Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 mre11Δ::NatR/+ +/lge1Δ::KmX</i>	This study

#### Yeast strains used:

All strains are isogenic with the S288c background; except strains JKM179, JKM181, YZS276, YZS246, DFY023, yFR016, DFY027, DFY028 FT4 Sth1-9myc, DFY035, DFY036 and DFY037 that were derived from a W303 background. Plasmid YCpHOcut4 has been described before (Raghuraman et al. 1994).

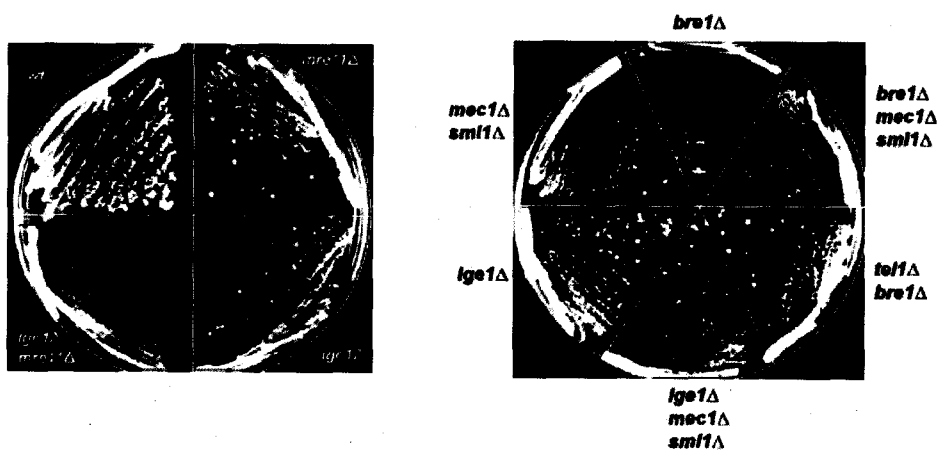
### Supplementary References:

- Alani, E., Subbiah, S., and Kleckner, N. 1989. The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. *Genetics* **122**(1): 47-57.
- 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.
- Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F., and Allis, C.D. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **15**(24): 3286-3295.
- Chakhparonian, M., Faucher, D., and Wellinger, R.J. 2005. A mutation in yeast Tel1p that causes differential effects on the DNA damage checkpoint and telomere maintenance. *Current Genetics* **48**(5): 310-322.
- Della, M., Palmboos, P.L., Tseng, H.M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E., and Doherty, A.J. 2004. Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* **306**(5696): 683-685.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**(4): 355-360.
- 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.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**(10B): 963-972.
- Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R.J., and Elela, S.A. 2007. RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *Journal of Biological Chemistry* **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 & Development* **18**(12): 1391-1396.
- Lee, S.E., Paques, F., Sylvan, J., and Haber, J.E. 1999. Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Current Biology* **9**(14): 767-770.
- Lee, S.E., Pelliccioli, A., Vaze, M.B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., and Haber, J.E. 2003. Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Molecular & Cellular Biology* **23**(23): 8913-8923.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes & Development* **16**(7): 806-819.

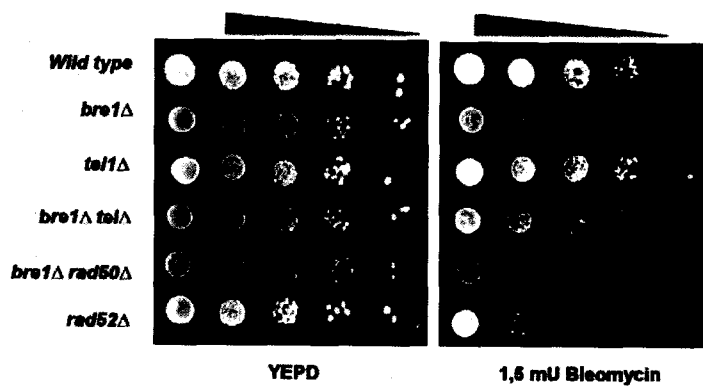
- Raghuraman, M.K., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. 1994. Activation of a yeast replication origin near a double-stranded DNA break. *Genes & Development* **8**(5): 554-562.
- Rose, M., Winston, F., and Hieter, P. 1990. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893): 104-108.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibzadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M., and Boone, C. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**(5550): 2364-2368.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D.S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J.N., Lu, H., Menard, P., Munyana, C., Parsons, A.B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S.L., Zhang, L.V., Zhu, H., Burd, C.G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F.P., Brown, G.W., Andrews, B., Bussey, H., and Boone, C. 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network.[see comment]. *Science* **303**(5659): 808-813.
- Toussaint, M., Levasseur, G., Gervais-Bird, J., Wellinger, R.J., Elela, S.A., and Conconi, A. 2006. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutation Research* **606**(1-2): 92-105.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J., and Zakian, V.A. 1993a. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**(1): 51-60.
- . 1993b. Structural and temporal analysis of telomere replication in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **58**: 725-732.
- Zakian, V.A. and Scott, J.F. 1982. Construction, replication, and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from Saccharomyces cerevisiae chromosomal DNA. *Molecular & Cellular Biology* **2**(3): 221-232.

**A**

YEPD 23 °C



**B**



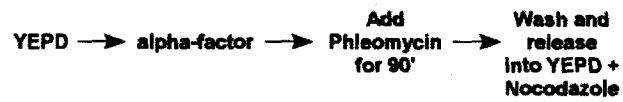
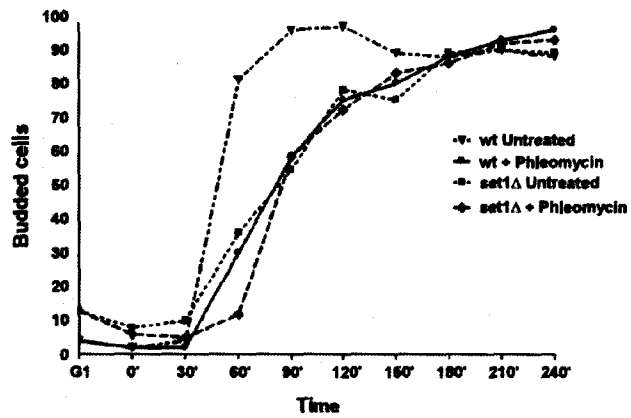


Supplementary Figure S1.

Assays for genetic interactions. A) Left: Growth assays for all four spores of a tetrad type meiotic ascus of diploid DFY045 on rich plates at 23°C in the absence of genotoxic agents. Note the slow growth phenotype of the *lge1Δ mre11Δ* strain. Right: strains with the indicated genotypes were streaked onto rich media as on left. Note the absence of slow growth in the combinations of *LGE1* or *BRE1* with either *TEL1* or *MEC1 SML1* (Strains used were spores of DFY005, spores of DFY042, DFY041, DFY043 and DFY044). B) Spot dilution test of *bre1Δ tel1Δ* double mutant cells on plates containing the indicated concentration of Bleomycin (right) or no drug (left). (Spores of DFY005)

**SUPPLEMENTARY FIGURE S2**

**FAUCHER AND WELLINGER**

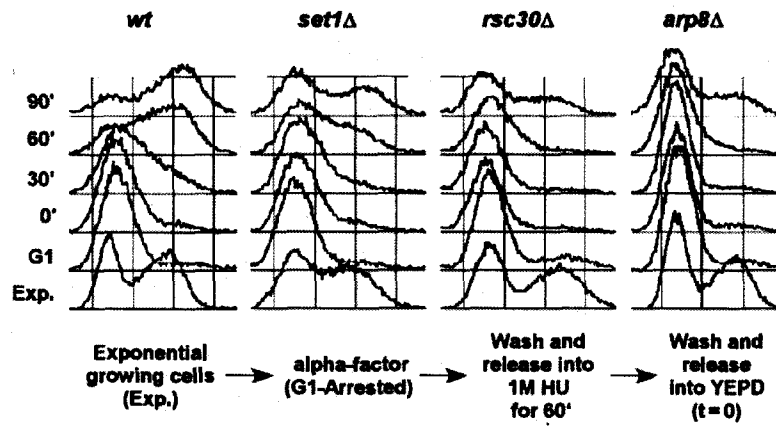


**Supplementary Figure S2.**

**Budding indexes of wt (DFY024) and *set1*Δ cells (DFY026) subjected to a cell synchrony and release experiment as outlined below the curves. Note that the final media did contain Nocodazole to prevent cells to traverse multiple cycles and that explains why the indexes stay high at the end of the experiment.**

SUPPLEMENTARY FIGURE S3

FAUCHER AND WELLINGER

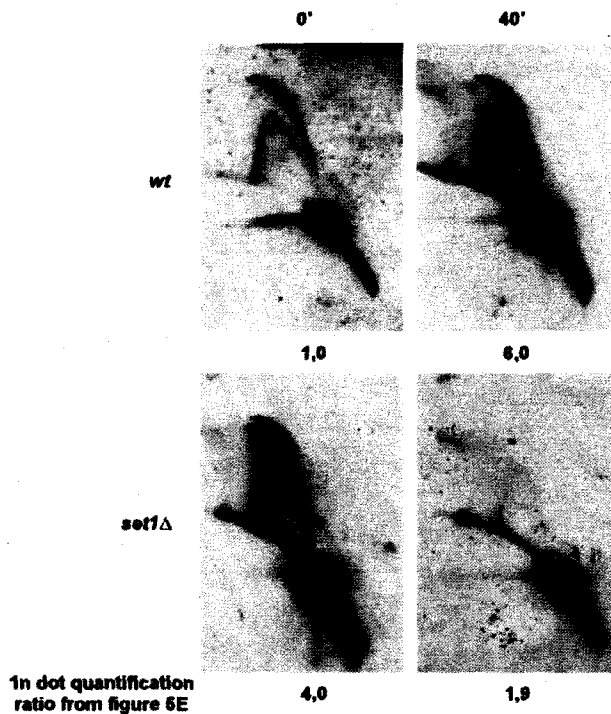


Supplementary Figure S3.

FACS analyses of *wt* (DFY024), *set1Δ* (DFY026), *rsc30Δ* (DFY029) and *arp8Δ* cells (DFY030) that were arrested in G1 phase of the cell cycle and released into a synchronous S-phase in the presence of 1M hydroxyurea for 60 min. Alpha-factor and the HU block were removed by two separate set of washouts and cell cycle progression was analyzed by FACS. Exp.: exponentially growing cells; G1: alpha factor arrested G1 cultures. Time 0 min represents the release of cells into rich medium immediately following the HU treatment.

**SUPPLEMENTARY FIGURE S4**

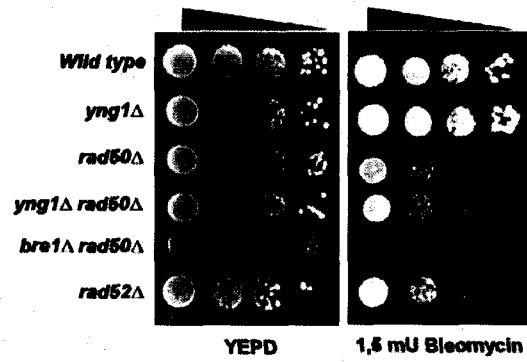
**FAUCHER AND WELLINGER**



#### Supplementary Figure S4.

Longer exposures of some of the two-dimensional gels shown in Fig. 5E. Gels had been exposed to X-ray film and scanned images are shown here. The same filters were also exposed to Phosphorimager cassettes and images from that analysis are shown in Fig. 5E. The data from the Phosphorimager were also used for the determination of image intensity of the 1N spot and relative values for them are indicated underneath each panel as loading control here. The 1N spot for the wt at time 0 was set as 1. Note that while the gel for set1 $\Delta$  -cells after 40 min (bottom right) received about two fold more DNA than the wt at time 0 (upper left), virtually no replication intermediates are detectable in the former.

**A**





Supplementary Figure S5.

Example of a spot dilution - colony viability assay performed to uncover genes displaying a similar DNA damage sensitivity enhancement as *set1Δ* in absence of homologous recombination. Note that *yng1Δ* scored here is negative, the *bre1Δ rad50Δ* serves as positive control; strains used are spores of DFY033.

## **CHAPITRE IV**

**Analyse de l'implication de la transcription dans le traitement des dommages à l'ADN en absence de la recombinaison homologue.**

### **Résumé**

Au cours de la caractérisation de la fonction de H3K4me3 dans la réparation des dommages à l'ADN, des données génétiques très préliminaires nous permettent de penser que le processus d'initiation de la transcription serait crucial pour la survie des cellules ne pouvant pas réparer leurs dommages par la recombinaison homologue.

## Matériel et Méthodes

### Souches, conditions de croissance et manipulations génétiques

La souche de levure utilisée pour cette étude est S288C (BRACHMANN *et al.*, 1998). Les différentes souches construites pour ce chapitre sont listées dans le tableau 4-1. Principalement, les mutants de délétion utilisés proviennent de la librairie de délétion des gènes non essentiels chez *Saccharomyces cerevisiae* (Souche BY4741 - INVITROGEN). Les cellules *rad50Δ* ont été caractérisées dans le chapitre 3. Les levures ont été incubées à 30°C sur des milieux décrits ici-bas. Les cellules *set1ΔURA3* ont été créées par le remplacement du gène par un marqueur de sélection via la technique de délétion d'un gène en une étape (BRACHMANN *et al.*, 1998).

### Analyse de la sensibilité des cellules mutantes à la bléomycine par dilutions successives sur pétri.

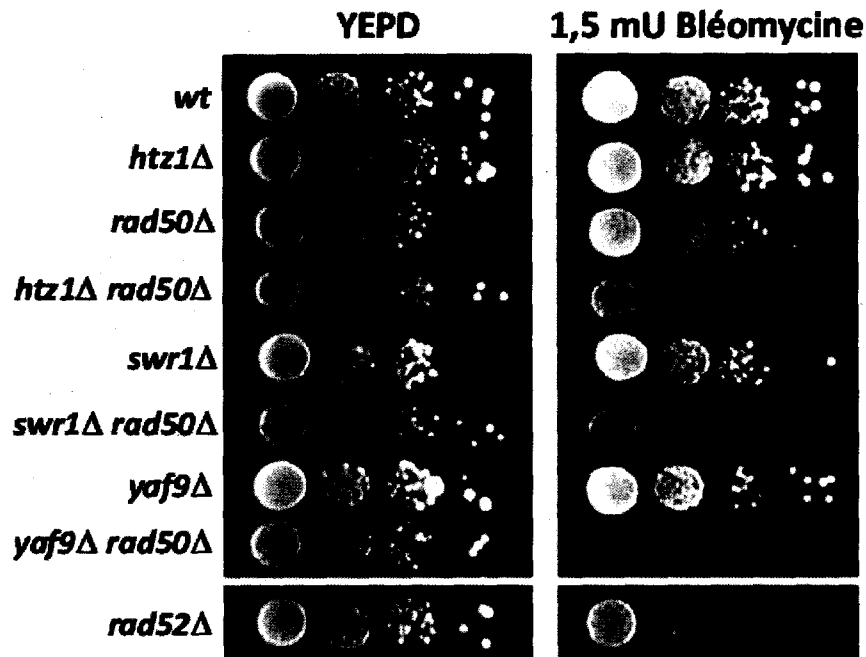
Afin de vérifier la sensibilité des cellules à un agent endommageant l'ADN, soit la bléomycine (BLENOXANE, Bistol Meyers), les cultures ont été mises en croissance jusqu'au milieu de la phase exponentielle. Par la suite, ces cellules ont été diluées par des facteurs de 10 (première dilution 30 000 cellules jusqu'à la dernière dilution de 3 cellules) et placées par gouttes successives sur un milieu riche et sur un milieu contenant 1 ou 1,5 milliunité (mU) de bléomycine. Ces cellules ont par la suite été mises en croissance de trois à quatre jours.

**Tableau 4-1. Souches utilisées lors de cette étude**

Souche	Génotype	Référence
MLY532	MAT $\alpha$ <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR can1</i> $\Delta$ :: <i>MFA1pr-HIS3-Mha1pr-LEU2 his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Chapitre 3
BY4741	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0	INVITROGEN
BY4741 YHR119W	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>set1</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
BY4741 YOL012C	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>htz1</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
BY4741 YKL139W	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ctk1</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
BY4741 YJL168C	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>set2</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
BY4741 YDR334W	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>swr1</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
BY4741 YNL107W	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>yaf9</i> $\Delta$ KmX	INVITROGEN
DFY012	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/+ <i>lys2</i> $\Delta$ 0/+ <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ <i>set1</i> $\Delta$ URA3/+	Chapitre 3
DFY063	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ +/ <i>htz1</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude
MT0-73	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad52</i> $\Delta$ ::LEU2	(TOUSSAINT et al., 2006)
DFY064	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad52</i> $\Delta$ ::LEU2/+ +/ <i>ctk1</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude
DFY065	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad52</i> $\Delta$ ::LEU2/+ +/ <i>ctk1</i> $\Delta$ ::KmX <i>set1</i> $\Delta$ URA3/+	Cette étude
DFY066	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ +/ <i>set2</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude
DFY067	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ <i>set1</i> $\Delta$ URA3/+ +/ <i>set2</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude
DFY068	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ +/ <i>swr1</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude
DFY069	MATa/MAT $\alpha$ <i>met15</i> $\Delta$ 0/ <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>rad50</i> $\Delta$ :: <i>NatR</i> /+ +/ <i>yaf9</i> $\Delta$ ::KmX	Cette étude

## Résultats

Un dernier élément non traité dans le chapitre 3 est la similitude entre les phénotypes générés par les cellules *set1Δ*/H3K4me3R et des cellules manquant certains gènes impliqués dans la transcription. Bien que nos analyses démontrent clairement que les phénotypes observés par les cellules sans *SET1* ne sont pas seulement causés par une déficience de la transcription des gènes, nous ne pouvons écarter des effets indirects de la transcription qui pourraient influencer la réparation des dommages à l'ADN. Au cours de la recherche de protéines pouvant possiblement lier H3K4me3, nous avons découvert qu'une relation génétique existant entre H3K4me3 et la variante d'histone H2AZ. En effet, les cellules *bre1Δ htz1Δ* ainsi que *set1Δ htz1Δ* sont respectivement synthétiques létales et ont une croissance lente synthétiques (HWANG *et al.*, 2003; VENKATASUBRAHMANYAM *et al.*, 2007). Nous avons donc posé l'hypothèse que ces deux gènes devaient avoir des fonctions essentielles agissant en parallèle. L'analyse de la sensibilité des cellules *htz1Δ* aux dommages à l'ADN en absence de la recombinaison homologue a permis de constater qu'elle était identique à celle observée pour les cellules *set1Δ rad50Δ* (Figure 4-1). Fait intéressant, le phénotype de sensibilité était exactement le même en absence des membres du complexe de remodelage SWR1, impliqué dans l'incorporation de H2AZ dans la chromatine (Figure 4-1). Une autre similarité entre la modification H3K4me3 ainsi que la variante d'histone H2AZ serait que tous deux sont localisés au promoteur des gènes actifs en plus d'avoir un certain rôle dans la transcription des gènes (ADAM *et al.*, 2001; GUILLEMETTE *et al.*, 2005); (VENKATASUBRAHMANYAM *et al.*, 2007).

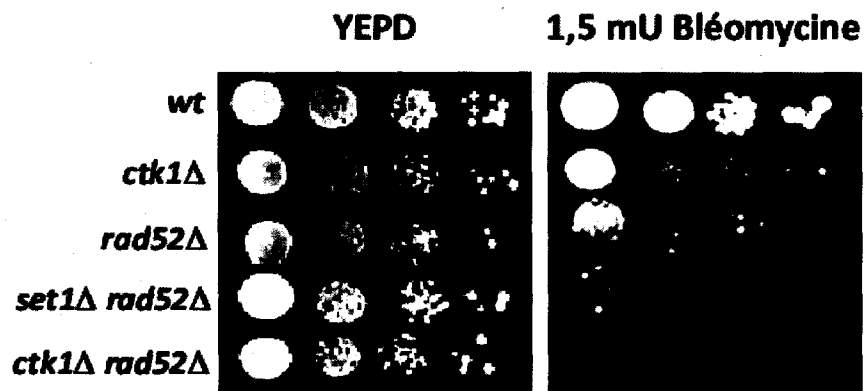


**Figure 4-1. Sensibilité des cellules n'ayant pas l'histone H2AZ ou le complexe SWR1 servant à l'incorporation de cette variante d'histone dans les nucléosomes en absence de *RAD50*.** Les cellules des divers mutants et contrôles ont été diluées en séries sur un milieu riche ou sur un milieu contenant 1,5 mU de bléomycine incubé à 30°C. Les cellules utilisées sont des spores de DFY063, DFY068 et DFY069. Les cellules MTO-73 servent de contrôle négatif.

Nous nous sommes alors questionnés à savoir si la présence de l'ARN polymérase 2 (RNAPII) ne serait pas importante d'une quelconque manière pour le processus de réparation des dommages à l'ADN. La transcription d'un gène par la RNAPII peut être grossièrement divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Nous avons voulu vérifier si une ou plusieurs de ces étapes de la transcription étaient importantes pour la réponse des cellules aux agents endommageant l'ADN et ce en absence de la voie de réparation de la recombinaison homologe. L'étape d'initiation est habituellement caractérisée par le recrutement et l'assemblage des sous-unités de la RNAPII au promoteur des gènes soit via l'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 ou via la

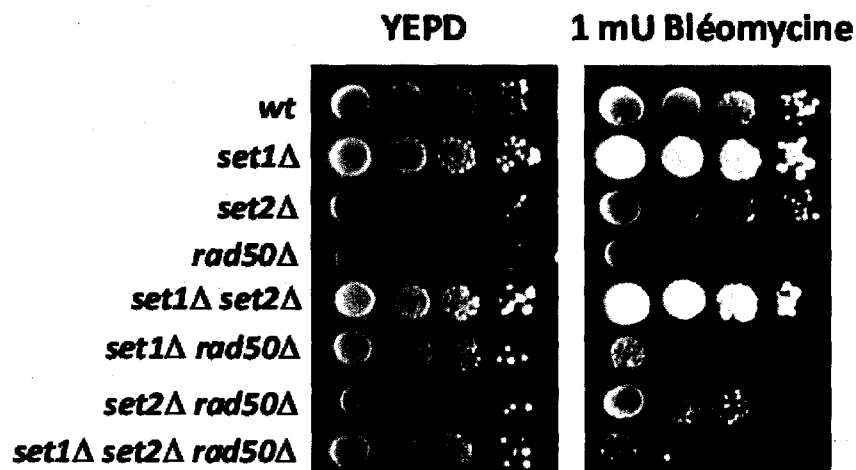
variante d'histone H2AZ (ADAM *et al.*, 2001; BERNSTEIN *et al.*, 2002; SANTOS-ROSA *et al.*, 2002). Par la suite, toujours dans l'étape d'initiation de la transcription, survient une première phosphorylation du CTD (Domaine C-terminal d'une sous-unité de la RNAPII), soit la phosphorylation de la sérine 5 par la kinase Ctk1p (STERNER *et al.*, 1995; WOOD *et al.*, 2003a; XIAO *et al.*, 2003). Le double mutant *ctk1Δ rad52Δ* démontre encore une fois la même sensibilité observée dans les cellules *set1Δ rad50Δ* et *htz1Δ rad50Δ* (Figures 4-2 et 4-3).



**Figure 4-2.** Les cellules n'ayant pas *CTK1* en absence de la recombinaison homologue démontre une sensibilité aux dommages à l'ADN. Les cellules des divers mutants et contrôles ont été diluées en séries sur un milieu riche ou sur un milieu contenant 1,5 mU de bléomycine incubé à 30°C. Les cellules utilisées sont des spores de DFY065.

L'étape suivante de la transcription est l'élongation. Lorsque le CTD de la RNAPII a été phosphorylé sur sa sérine 5, survient une phosphorylation subséquente de la sérine 2 via la kinase Kin28p, protéine essentielle pour l'étape d'élongation et pour la viabilité des cellules (HENGARTNER *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Nous n'avons pas été en mesure de vérifier l'importance de Kin28p dans ce processus puisque nous n'avons pas l'allèle mutant au moment des expériences. Toutefois, l'étape suivant la phosphorylation de la sérine 2 est le recrutement de la méthyltransférase Set2p, qui, en suivant l'action

de la RNAPII, vient méthyler son substrat H3K36 (KROGAN *et al.*, 2003). La délétion de *SET2* en absence de la recombinaison homologue ne rend pas les cellules double mutantes aussi sensibles que pour les cellules *set1Δ rad50Δ*, nous donnant une indication que possiblement l'étape d'élongation n'est pas cruciale pour le processus de traitement des dommages à l'ADN en absence de la recombinaison homologue (Figure 4-3). Nous n'avons pas pu compléter de plus amples analyses qui s'avèrent essentielles pour la confirmation de notre hypothèse. La vérification de la sensibilité des cellules ayant l'allèle thermosensible *kin28* en absence de *RAD50*, ainsi qu'une reproduction des phénotypes de sensibilité observés avec d'autres membres de ces étapes de la transcription nous éclaireront sur le modèle exact à considérer.



**Figure 4-3.** L'absence de *SET2*, gène impliqué dans l'étape d'élongation du transcrit d'ARN par la RNAPII, n'augmente pas de sensibilité des cellules *rad50Δ*. Des dilutions en série (de facteur de 10) de cultures liquides des divers mutants ont été apposées sur un milieu riche ou sur un milieu contenant 1 mU de bléomycine incubé à 30°C. Les cellules utilisées sont des spores de DFY067.



## DISCUSSION

### Fonctions de Tel1p dans le maintien de l'intégrité du génome.

Au cœur du processus de traitement des dommages à l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, se retrouvent les protéines kinase Mec1p et Tel1p. Il est estimé que ces protéines pourraient phosphoryler, donc activer ou réprimer de nombreuses protéines effectrices. Le rôle de Mec1p étant prépondérant dans cette voie de traitement des dommages à l'ADN, il a toujours été plus difficile de comprendre l'étendue des rôles joués par son orthologue Tel1p dans ce processus. La principale raison expliquant ce manque de connaissance sur cette immense protéine de plus de 2700 acides aminés est expliqué par la redondance de fonction et de structure entre ces deux importantes kinases. Usui fut un des premiers à clairement démontrer le rôle joué par Tel1p dans le traitement des dommages à l'ADN (USUI *et al.*, 2001). Il a d'ailleurs nommé cette voie génétique le point de contrôle TM. Afin de pouvoir étudier la véritable fonction de Tel1p sans que sa protéine sœur Mec1p ne fasse ombre, il a dû établir un élégant système génétique. Par la délétion de *MEC1* et *SAE2*, son groupe a pu démontrer que la protéine Tel1p était activée suite à la reconnaissance de dommages de type cassures doubles brins ayant subi un minimum de préparation par les exonucléases (USUI *et al.*, 2001). Toutefois, ni cette étude ni de nombreuses suivantes n'ont permis de saisir précisément de quelle manière ou via quelle interaction physique ou génétique Tel1p pouvait accomplir ce rôle. Avec l'aide de Mikhail Chakhparonian de mon

laboratoire d'accueil, nous avons établi et exécuté un criblage génétique dans un but initial totalement différent que de celui de mieux comprendre les fonctions jouées par Tel1p. Le but de ce criblage était plutôt d'identifier de nouveaux membres de la voie génétique du point de contrôle TM, donc des gènes épistatiques à Tel1p. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur l'observation que les cellules *mec1Δ* sans la voie du point de contrôle TM ne pouvaient pas survivre; probablement dû au fait que la maintenance des télomères était affectée (cette hypothèse sera abordée dans la prochaine section). En utilisant un mutant conditionnel de *MEC1* nous avons pu identifier certaines cellules possédant des mutations potentiellement intéressantes. Toutefois, l'analyse des mutations ne nous a pas permis de découvrir de nouveaux gènes dans la voie du point de contrôle TM, mais plutôt de comprendre un peu mieux l'acteur principal de cette voie soit la protéine Tel1p. La caractérisation de ce mutant a révélé qu'il s'agissait en fait d'un des premiers allèles de séparation de fonction de *TEL1*. Tel que décrit dans le chapitre 1 de cette thèse, l'allèle *tel1-11* possédait une fonction de maintenance des télomères quasi normale, tandis que sa fonction de point de contrôle en présence de dommages à l'ADN était affectée (Chapitre 1 - Figures 1 et 3). Malgré que le changement d'acide aminé causant ces phénotypes différentiels ait été identifié, nous ne connaissons toutefois pas la raison de cette perte de fonction spécifique du point de contrôle. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces phénotypes.

Premièrement, quoique la stabilité de la protéine semble être conservée, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la mutation retrouvée dans le mutant *tel1-11* rende la protéine Tel1p produite plus instable (Chapitre 1 – Figure Supplémentaire 1). De

plus, un récent article par le laboratoire Longhese a permis de démontrer qu'en présence de deux cassures d'ADN, les principaux points de contrôle n'étaient pas activés uniquement via la voie du point de contrôle TM (Via *TEL1* seulement) (MANTIERO *et al.*, 2007). Pour palier à cette lacune, les auteurs ont dû surexprimer la kinase Tel1p à de très hauts niveaux, sans toutefois réussir à activer les substrats de Tel1p avec autant d'efficacité qu'en présence de la kinase Mec1p. La quantité de protéines présente ne serait donc pas le facteur limitant pour une activation efficace des points de contrôle, diminuant la probabilité que cette hypothèse puisse expliquer les phénotypes de l'allèle *tel1-11*.

Dans un deuxième temps, la mutation retrouvée dans *tel1-11* pourrait modifier un site de liaison potentiel pour une protéine impliquée dans le traitement des dommages à l'ADN, affectant l'efficacité de l'activation des points de contrôle via la voie du point de contrôle TM. De plus, dans une telle situation la fonction de maintien des télomères serait alors conservée. Dans le but d'éclaircir la nature des partenaires protéiques de Tel1p des expériences de double hybride ou encore d'immunoprécipitations en utilisant ce domaine précis pourraient être envisagées. Toujours en lien avec cette idée, la liaison de cette protéine inconnue pourrait être nécessaire pour obtenir une activation maximale de Tel1p, donc la capacité à phosphoryler tous ses substrats. Un mécanisme semblable est bien connu avec l'amplification de la phosphorylation de la kinase Rad53p lorsque son partenaire Rad9p, également phosphorylé, se retrouve à proximité (PELLICIOLI et FOIANI, 2005; SWEENEY

*et al.*, 2005). Dans la même ligne de pensée, le groupe de Longhese a également réussi à identifier des allèles dominants de *TEL1*, nommés « Hyper », permettant de supprimer l'hypersensibilité des cellules *mec1Δ* exposées aux agents endommageant l'ADN (BALDO *et al.*, 2008). Dans cette étude, un des allèles identifiés, *tel1-hy544*, démontre également une séparation de fonction, mais inverse à celle que nous avons retrouvée avec *tel1-11*, c'est-à-dire avec le maintien de la taille des télomères affecté, tandis que l'activation des points de contrôle en présence de dommages à l'ADN se fait plus efficacement que pour les cellules de type sauvage. Les auteurs proposent que la diminution de la fonction kinase de cet allèle expliquerait le raccourcissement des télomères, mais que l'augmentation de la fonction de point de contrôle pourrait être provoquée par une meilleure liaison d'une protéine impliquée dans la voie de traitement des dommages à l'ADN au site de la mutation (BALDO *et al.*, 2008). L'isolation de cet allèle supporte notre hypothèse que différents domaines de la kinase Tel1p permettraient à la protéine d'exercer ses différentes fonctions dans la cellule. Finalement, malgré que peu d'information sur les partenaires de liaisons de Tel1p ne soit disponible, il est logique de supposer que bon nombre de protéines accessoires ou substrats de la kinase pourraient venir se lier à cette dernière. En effet, chez l'humain, plusieurs protéines sont connues pour lier ATM, telles BLM, BRCA1, p53 et Tel2 (KHANNA *et al.*, 1998; GATEI *et al.*, 2000; BEAMISH *et al.*, 2002; TAKAI *et al.*, 2007). Chez la levure, il a été démontré que le domaine C-terminal de Xrs2p se lierait à Tel1p au site d'un dommage à l'ADN (NAKADA *et al.*, 2003). Il serait envisageable que l'allèle *tel1-11*, à cause de sa mutation, puisse difficilement lier la protéine Xrs2p au site d'une cassure d'ADN expliquant le défaut de

cet allèle dans l'activation des points de contrôle. De plus, il serait possible que ce mutant ait conservé un minimum de sa capacité à maintenir la taille des télomères, fonction minimale qui pourrait être possiblement Xrs2p indépendante (Voir la fin de la prochaine section). De plus, une récente étude du laboratoire Blackburn a permis de déterminer qu'une séquence conservée entre les orthologues *TEL1/ATM* aurait une fonction cruciale autant pour la fonction d'activation des points de contrôle que pour la régulation de la taille des télomères (SEIDEL *et al.*, 2008). La mutation de ce motif, nommé TAN (*TEL1/ATM N-Terminal motif*), produit un mutant ayant des phénotypes identiques à ceux d'une cellule *tel1Δ*. Malgré que les protéines liant cette région précise ainsi que le reste de la protéine soient toujours inconnues, il est clair qu'au cours des prochaines années de plus en plus de ces partenaires protéiques seront découverts permettant une meilleure compréhension des fonctions de Tel1p.

### **Rôles des kinases de la famille PI3 dans l'homéostasie des télomères.**

Contrairement aux cellules végétatives humaines, l'organisme unicellulaire *S. cerevisiae* doit permettre en tout temps l'activité de la télomérase sur ses télomères les plus courts dans le but d'éviter la sénescence. Parmi les gènes essentiels au maintien de la taille des télomères se retrouvent évidemment les constituants de la télomérase, soit *EST1*, *EST2* et *EST3* en plus de *TLC1* encodant pour l'ARN matrice de cet enzyme. Leur fonction exacte dans le maintien de la taille des télomères devient de plus en plus claire, mis à part pour *EST3* qui possède un rôle un peu plus nébuleux pour l'instant. Le phénotype de sénescence cellulaire lié à une difficulté du maintien de la longueur des

télomères peut être également retrouvé en absence des deux kinases Mec1p et Tel1p. Leur rôle dans le traitement des dommages à l'ADN est bien documenté, mais le mécanisme moléculaire est incertain au niveau de la régulation télomérique. Les phénotypes télomériques associés aux cellules *tel1Δ* ont été caractérisés de long en large, soit des télomères très courts et une diminution du recrutement de la télomérase aux télomères les plus courts mais le mécanisme en jeu demeure obscur (GOUDSOUZIAN *et al.*, 2006; HECTOR *et al.*, 2007; SABOURIN *et al.*, 2007). Une des principales difficultés dans l'étude des kinases Tel1p et Mec1p est la très grande redondance de fonctions entre ces protéines, expliquant pourquoi des cellules uniquement sans *TEL1* ou *MEC1* n'entrent pas en sénescence.

Les analyses ayant mené à la parution de notre article dans la revue « Current Genetics » (Voir chapitre 1 de la présente thèse), où nous décrivons qu'en absence de *MEC1*, l'allèle *tel1-11* permet à la cellule de conserver sa fonction télomérique basale, nous ont apporté de nouveaux questionnements sur cette fonction basale. Par des analyses génétiques, nous avons été en mesure de déterminer que le domaine kinase de Tel1p était essentiel pour assurer cette fonction basale en absence de *MEC1* puisque les cellules entraient alors en sénescence (NAKADA *et al.*, 2003). Toutefois, la surprise fut de découvrir que les cellules ne semblaient pas utiliser la voie de la recombinaison homologue pour se sortir de cette crise, mais semblaient plutôt utiliser la télomérase à un niveau minimal (Chapitre 2 - Figure 2-2). Nous pouvons observer sur cette figure que les télomères de ces cellules sont critiqueusement courts, mais que le patron télomérique

est normal et homogène suggérant une activité coordonnée de la télomérase. Fait appuyant cette interprétation est l'absence dans les souches de levure utilisées du facteur clef de la recombinaison homologe soit la protéine Rad52p. Toutefois, nous ne pouvons pas écarter qu'une voie mineure de survivants utilisant ou non la recombinaison homologe puisse être utilisée par ces cellules.

Lors de l'analyse suivante, nous avons voulu démontrer que la présence de l'allèle *tel1kd* avantageait les cellules (Chapitre 2 - Figure 2-3). En effet, lors de la réintroduction des plasmides *tel1kd* provenant des clones initiaux dans des cellules *mec1Δ tel1Δ* nous avons constaté qu'effectivement l'allèle *tel1kd* procurait un avantage de croissance notable dans certaines cellules le possédant puisque la sénescence était alors évitée. Comme cette situation n'a été retrouvée que dans la moitié des clones environ nous pouvons entrevoir au moins deux explications : premièrement, une ou des mutations sur le plasmide *tel1kd* permettent un rallongement minimal des télomères, empêchant la sénescence lors de la réintroduction du plasmide; ou, deuxièmement, des mutations dans le génome étaient compensatoires à l'utilisation de l'allèle *tel1kd* par les cellules, donc la réintroduction du plasmide *tel1kd* dans de nouvelles cellules *mec1Δ tel1Δ* n'apportait aucun avantage aux cellules. Puisque le séquençage de ces plasmides *tel1kd* réintroduits nous a permis de nous assurer que le domaine kinase comportait toujours sa mutation initiale, nous pouvons supposer que ces mutations créent ou intensifient les liaisons avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de la taille des télomères. Au cours de ces analyses, le laboratoire du Dr Greider a publié un article exposant des conclusions très similaires à l'hypothèse que nous avançons (MA et GREIDER, 2009). En

effet, en utilisant la souche développée par le laboratoire Gottschling permettant de vérifier l'ajout de séquences télomériques suivant la création d'un télomère court, ces auteurs ont pu déterminer que l'allèle *tel1kd* pouvait permettre l'addition de quelques séquences télomériques contrairement à un allèle nul (DIEDE et GOTTSCHLING, 1999; MA et GREIDER, 2009). La conclusion de cette expérience fut que la protéine Tel1p posséderait un domaine important pour le maintien de la taille des télomères en plus de son domaine kinase. Un autre parallélisme avec ce que nous décrivons dans cette thèse est que les cellules *mec1Δ tel1Δ* isolées par ce groupe ne démontreraient pas de patron de survivants de « type 1 » ou de « type 2 » mais plutôt des télomères critiquelement courts (MA et GREIDER, 2009). Ce point sera traité dans les prochains paragraphes.

Dans une deuxième partie de cette étude, nous avons voulu comprendre par quel mécanisme les cellules sans aucune kinase de type PI3K pouvaient survivre à cette sénescence cellulaire et stabiliser leurs télomères. Le premier constat a été que ces cellules ont encore une fois des télomères critiquelement courts et homogènes, donc sans patrons de recombinaison, mais également elles semblent perdre certaines de leurs séquences Y' (en occurrence le Y' court situé à 5,2kb) (Chapitre 2 - Figure 2-4). Dans les cellules *mec1Δ tel1Δ*, l'absence de recombinaison entre les différents télomères peut être explicable par le fait que la plupart des expériences ont été effectuées en absence du gène *RAD52*, acteur essentiel pour que la recombinaison homologue ait lieu (Figure 2-1 à 2-4). Puisque les survivants « classiques » nécessitent l'action de la recombinaison homologue, l'autre option possible serait la formation de survivants indépendants de



*RAD52*. De tels survivants ont été récemment isolés dans des cellules *est1Δ rad52Δ* de levures du type S288C soit le même type de levures utilisé dans nos expériences. Toutefois, il semble que cette voie de survivants *RAD52*-indépendante ne produise seulement que des levures amplifiant leur répétitions télomériques ressemblant aux survivants de « type 2 ». Le patron de fragments de restrictions télomériques que nous obtenons en figures 2-2 et 2-4 est fort différent de celui représenté dans l'article de Lebel *et al.*, malgré la différente sonde utilisée (LEBEL *et al.*, 2009).

Basé sur ces faits, il semble donc que les cellules *mec1Δ tel1Δ* ne soient pas des survivants classiques, mais plutôt que ces cellules mutantes aient trouvé un moyen de maintenir leurs télomères via la télomérase. Cet aspect qui a été analysé dans nos expériences subséquentes sera traité dans le prochain paragraphe.

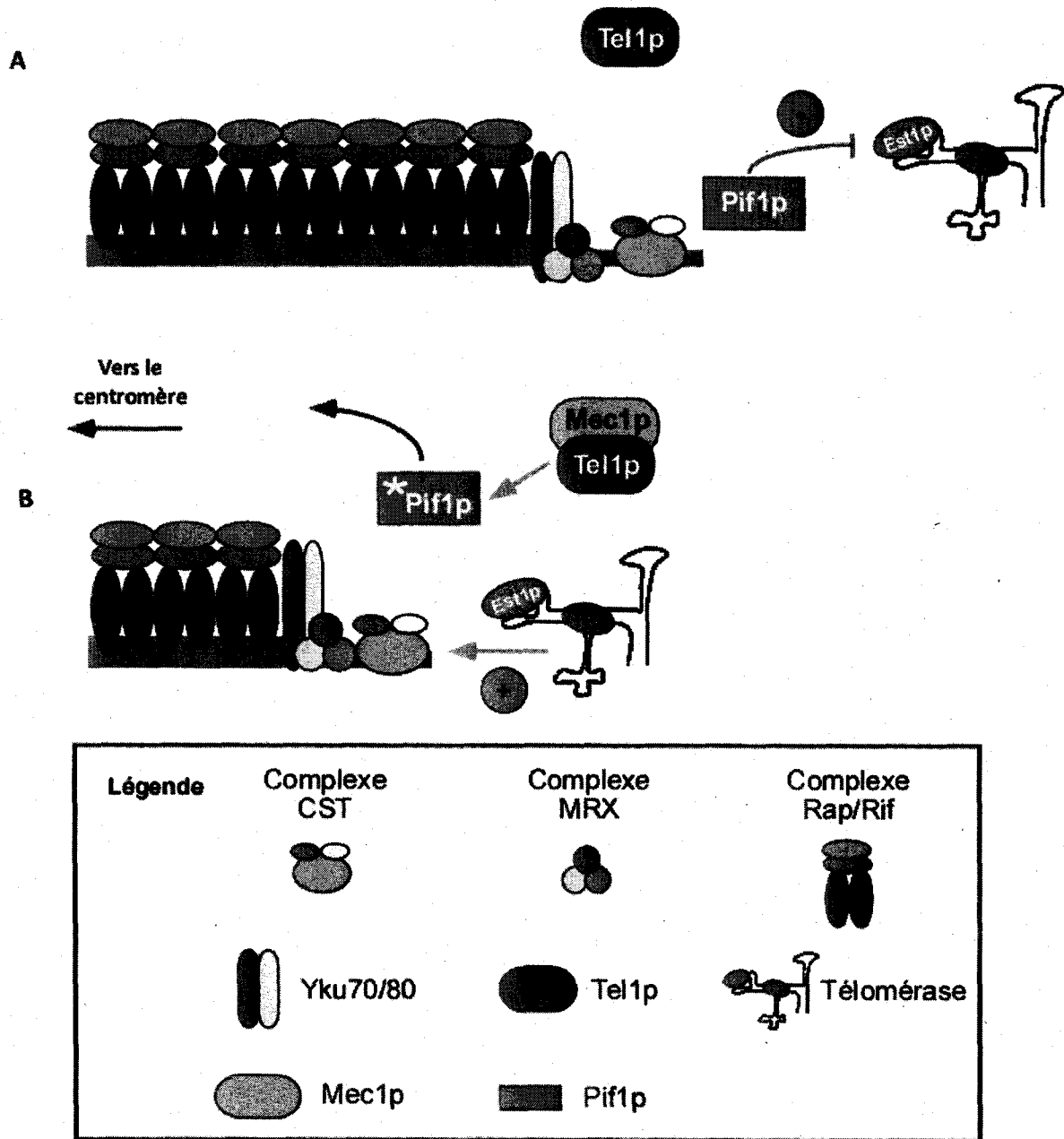
Pour ce qui est de la perte des séquences Y', dans un premier temps nous pouvons poser l'hypothèse que puisque ces séquences sont situées dans les régions sous télomériques, les répétitions télomériques attenantes doivent également avoir été supprimées probablement via un mécanisme similaire à celui de la « Suppression rapide des télomères » (TRD – Telomere Rapid Deletion) (LI et LUSTIG, 1996). Les raisons exactes de ces pertes rapides de séquences télomériques demeurent toujours nébuleuses, mais de plus en plus d'observations semblent pointer vers une difficulté à répliquer ces séquences répétées terminales. En effet, il a été démontré dans le passé que les séquences télomériques sont de véritables barrières au passage de la machinerie de réplication (GILSON et GELI, 2007). Afin de compléter la réplication de ces régions, la cellule s'est dotée de gènes spécialisés dans cette tâche. Les gènes *RRM3* et *TOP3*,

encodant respectivement une hélicase et une topoisomérase, aideraient à la réplication des régions où des complexes stables ADN-chromatine se formeraient ainsi que dans les régions comportant de nombreuses répétitions d'ADN telles les régions télomériques et ribosomales (IVESSA *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2004; AZVOLINSKY *et al.*, 2006); communication personnelle de Camilla Sjögren). Fait intéressant, un raccourcissement de la taille des télomères ainsi qu'une perte de séquences sous-télomériques Y' ont déjà été observés dans les mutants *top3Δ* (KIM *et al.*, 1995) appuyant notre hypothèse. Il serait donc possible que les kinases Tel1p et Mec1p régulent les protéines assurant la réplication normale des télomères.

Un autre mécanisme pouvant expliquer la perte de ces séquences provient des nombreux rapports faisant état de la très grande quantité de réarrangements chromosomiques des cellules *mec1Δ tel1Δ* (MYUNG *et al.*, 2001; CRAVEN *et al.*, 2002; VERNON *et al.*, 2008). Suite à de tels bouleversements moléculaires, il est possible d'entrevoir la perte de séquences télomériques. Toutefois, nous nous serions attendu à une hétérozygocité des séquences télomériques ainsi qu'à une amplification des séquences sous télomériques Y'. Cependant, nous pouvons observer que dans nos cellules *mec1Δ tel1Δ*, les fragments de restrictions terminaux sont courts mais homogènes rendant cette explication improbable. De plus, il ne faut pas oublier que la recombinaison homologue est le moteur de ces réarrangements chromosomiques et que ce mécanisme n'est pas fonctionnel dans nos cellules *mec1Δ tel1Δ* (qui ont également le gène *RAD52* de supprimé) (Chapitre 2 - Figure 2-4).

Tel que mentionné précédemment, dans tous les clones *mec1Δ tel1Δ* analysés, il nous a été impossible d'isoler des cellules qui maintenaient leur télomères via la recombinaison homologe. En effet, la figure 2-4 est un exemple que dans tous les cas les télomères des cellules *mec1Δ tel1Δ* étaient de petite taille, mais ne présentaient pas un patron de digestion semblable aux survivants de «type 1» ou de «type 2». Nous avons donc posé l'hypothèse qu'initialement les cellules *mec1Δ tel1Δ* entraient en sénescence principalement à cause de problèmes de régulation de l'accessibilité ou de recrutement de la télomérase (SHORE et BIANCHI, 2009). En effet, des analyses ont permis de constater que la télomérase des cellules *mec1Δ tel1Δ* est toujours fonctionnelle *in vitro* donc il doit y avoir une autre raison de la sénescence de ces cellules (CHAN *et al.*, 2001). Basé sur les phénotypes télomériques des cellules *tel1Δ mec1Δ*, nous avons posé l'hypothèse que les kinases Tel1p et Mec1p pourraient activer des activateurs de la télomérase ou inhiber des inhibiteurs de la télomérase (Voir chapitre 2 de la présente thèse). Suite à des analyses génétiques, nous avons pu découvrir qu'en absence de Pif1p, un inhibiteur de la télomérase, les cellules *mec1Δ tel1Δ* pouvaient pousser normalement sans démontrer un phénotype de sénescence. Toutefois cette délétion ne parvenait pas à rétablir la taille des télomères à un niveau normal (Chapitre 2 - Figure 2-6). Le laboratoire Zakian a caractérisé Pif1p comme étant une hélicase impliquée dans la séparation de duplexes ADN/ARN et plus précisément au cœur du déplacement de l'ARN de la télomérase Tlc1 avec les séquences télomériques (SCHULZ et ZAKIAN, 1994; ZHOU *et al.*, 2000; BOULE *et al.*, 2005). En fait, Pif1p serait un régulateur de la télomérase en empêchant l'enzyme télomérase de correctement se lier à son substrat, les télomères.

Basé sur nos études génétiques, nous pensons que Tel1p et dans un deuxième temps Mec1p pourraient inactiver l'action d'inhibition de Pif1p. Vraisemblablement, dans une situation où les télomères sont trop courts, les kinases PI3 pourraient phosphoryler Pif1p sur un de ses quatre résidus SQ/TQ permettant alors la liaison de la télomérase avec les télomères et le rallongement de ces derniers sans l'interposition de Pif1p. En absence de *TEL1* et *MEC1*, Pif1p n'étant pas régulée, elle ne permettrait pas l'action de la télomérase sur les télomères induisant alors un phénotype de sénescence (Voir figure 9 pour le modèle).



**Figure 9. Modèle de régulation de l'accessibilité de la télomérase versus l'hélicase Pif1p et les kinases Tel1p et Mec1p.** (A) En présence de télomères longs, la télomérase ne pourrait effectuer l'élongation de ces derniers à cause de l'inhibition induite par l'hélicase Pif1p qui pourrait alors désapparier la télomérase avec les télomères. (B) Lorsque les télomères deviendraient courts, les kinases Tel1p et Mec1p pourraient alors phosphoryler la protéine Pif1p afin d'enlever son inhibition et de permettre l'élongation des télomères par la télomérase.

Afin de confirmer ce modèle, il nous faudrait effectuer des analyses génétiques supplémentaires en interchangeant les sérines ou thréonines potentiellement phosphorylées par soit des alanines ne possédant aucune charge ou soit des acides

glutamiques mimant un résidu phosphorylé. Dans le premier cas, nous devrions alors voir une sénescence de ces cellules mutantes produisant la protéine Pif1p ne pouvant être phosphorylée (sénescence identique à celle retrouvée dans les cellules *tel1Δ mec1Δ*). Dans le deuxième cas, ces mutations phosphomimétiques devraient permettre d'éviter la sénescence des cellules *mec1Δ tel1Δ*. De plus, des analyses biochimiques de buvardage de type Western ou de spectrométrie de masse pourraient permettre d'identifier la présence de ces sites de phosphorylation sur Pif1p, s'il y a lieu. Comme le démontre un récent article du laboratoire Blackburn, la protéine Pif1p serait phosphorylée via les kinases Mec1p-Dun1p et Rad53p (MAKOVETS et BLACKBURN, 2009). Toutefois, contrairement au modèle que nous avançons, il semblerait que cette phosphorylation de Pif1p par ces kinases serve plutôt à inhiber la télomérase et donc à empêcher l'ajout de séquences télomériques aux sites de cassures à l'ADN sans avoir d'impact au niveau des télomères (MAKOVETS et BLACKBURN, 2009). Il y a donc toujours de l'espoir pour que notre modèle soit prouvé.

Toutefois, il semble clair que la kinase Tel1p agirait sur la régulation de la taille des télomères à de nombreux niveaux et nous ne pouvons concevoir que les cellules *mec1Δ tel1Δ* entreraient en sénescence seulement par une mauvaise régulation de Pif1p. En effet, la délétion de *PIF1* dans les cellules *mec1Δ tel1Δ* parvient à éviter la sénescence mais ne peut rallonger les télomères à un niveau normal et encore moins au niveau des cellules *pif1Δ*. Ce résultat nous oblige à considérer qu'il existe d'autres voies de recrutement et d'activation de la télomérase dépendantes de la kinase Tel1p .

Un autre mode de recrutement de la télomérase par Tel1p a été proposé à la suite de travaux du laboratoire Lundblad qui a clairement démontré que la protéine Cdc13p serait cruciale pour le recrutement de la télomérase via la sous-unité de la télomérase Est1p (EVANS et LUNDBLAD, 1999). Grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion Cdc13p-Est1p dans les cellules *mec1Δ tel1Δ*, un autre groupe de recherche est parvenu à rallonger les télomères de ces cellules à un niveau supérieur à ce qui est retrouvé chez les cellules de type sauvage (TSUKAMOTO *et al.*, 2001). Finalement, des études supplémentaires ont permis d'identifier des sites SQ/TQ sur Cdc13p qui seraient phosphorylés via les protéines Tel1p et Mec1p dans le but de recruter la télomérase (TSENG *et al.*, 2006). En absence de ces phosphorylations par le changement des sérines 249 et 255 par des alanines, les auteurs ont démontré que ces cellules avaient de la difficulté à maintenir la taille de leurs télomères et entraient en sénescence. Pour renforcer leur hypothèse, ils ont également démontré que le changement de ces sérines pour des acides glutamiques chargés négativement, donc mimant la phosphorylation de ces sites, produisait des cellules avec des phénotypes normaux. De plus, en reproduisant l'expérience utilisant la protéine chimérique Cdc13p-Est1p, mais en présence de l'allèle non phosphorylable de Cdc13p, les auteurs réussissaient également à surpasser la sénescence observée auparavant (TSENG *et al.*, 2006). Toutes ces expériences viennent donc démontrer que la phosphorylation de Cdc13p par Tel1p serait importante pour le recrutement de la télomérase spécifiquement aux télomères les plus courts. À la lumière de ces observations, il serait donc possible que les cellules *mec1Δ tel1Δ* réussissent à

survivre à la sénescence par certaines mutations sur Cdc13p induisant une charge négative sur ces sérines normalement phosphorylées.

Un troisième mode de recrutement de la télomérase présentement considéré par les laboratoires est via la phosphorylation de la protéine Rif2p, protéine au cœur du modèle « du décompte protéique » (MARCAND *et al.*, 1997; RAY et RUNGE, 1999b; LEVY et BLACKBURN, 2004; HIRANO *et al.*, 2009). Ces groupes ont tous proposé (avec certaines variations) que la cellule en « comptant » le nombre de protéines Rap1p, Rif1p ou Rif2p permettait ou non le recrutement de la télomérase aux télomères les plus courts ainsi que le rallongement de ces derniers. En effet, la liaison artificielle des protéines Rap1p, Rif1p ou Rif2p sur les télomères produisait un raccourcissement de ces derniers proportionnel au nombre de molécules respectivement liées (MARCAND *et al.*, 1997; LEVY et BLACKBURN, 2004). La présence de ces protéines impliquées dans l'établissement de la chromatine télomérique répressive pourrait provoquer un repliement des longs télomères (donc lorsque les protéines Rif1p et Rif2p sont présentes en grande quantité), empêchant alors l'action efficace de la télomérase (RAY et RUNGE, 1999b; LEVY et BLACKBURN, 2004). Récemment, le groupe de Sugimoto a permis une meilleure compréhension de ce modèle. Par immunoprécipitation de la chromatine ils ont pu déterminer que la présence des protéines Rap1p, Rif1p et Rif2p à une cassure doubles brins ou à des répétitions télomériques empêchait le recrutement de Tel1p par deux moyens différents (HIRANO *et al.*, 2009). Premièrement, la protéine Rif2p empêcherait la liaison entre le complexe MRX et Tel1p démontrée précédemment



(NAKADA *et al.*, 2003; SABOURIN *et al.*, 2007). En effet, les protéines Rif2p et Tel1p seraient en compétition pour lier le domaine C-terminal de la protéine Xrs2p, une des protéines responsables du recrutement de Tel1p à l'ADN. Dans le deuxième cas, dans une situation où l'ADN serait recouvert de protéines Rap1p, ces dernières empêcheraient la liaison de MRX et donc le recrutement subséquent de Tel1p (HIRANO *et al.*, 2009). Une mauvaise régulation de ce système de « décompte des protéines » semble être une des raisons pour lesquelles les cellules *mec1Δ tel1Δ* entrent en sénescence. En effet, la double délétion des protéines Rif1p et Rif2p permet aux cellules d'éviter la sénescence cellulaire (CHAN *et al.*, 2001). Afin de supprimer cette sénescence, la simple délétion de la protéine Rif1p n'est pas suffisante et donc soit l'absence de Rif2p ou soit l'absence des deux protéines permet d'éviter cette sénescence (D. Faucher, résultats non publiés). L'absence des gènes *RIF1* et *RIF2* dans les cellules *mec1Δ tel1Δ* permet de rallonger les télomères à un niveau supérieur à celui des cellules de type sauvage mais à un niveau inférieur à celui du double mutant *rif1Δ rif2Δ* (CHAN *et al.*, 2001). Ce résultat indique encore une fois que la protéine kinase Tel1p serait impliquée dans d'autres voies de maintien de la taille des télomères en plus de la voie de *RIF1* et *RIF2*. Il ne faut également pas écarter la possibilité que les protéines Rif1p et Rif2p soient phosphorylées par Tel1p. En effet, malgré qu'aucun site de phosphorylation impliqué dans la régulation des télomères et dépendant de la protéine Tel1p n'ait été identifié jusqu'à maintenant sur ces protéines, une phosphorylation est possible sur Rif1p en réponse à des agents qui endommagent l'ADN (SMOLKA *et al.*, 2007).

Finally, some observations have allowed to identify an alternative pathway of telomere elongation parallel to that of *TEL1* (CRAVEN et PETES, 1999; ARNERIC et LINGNER, 2007). According to these authors, this new pathway of telomerase recruitment would concern telomeres with X repeats only, while the pathway regulated by Tel1p would concern telomeres containing Y' sequences. In fact, epistasis analyses with *TEL1* vis-à-vis the gene *RIF1* have been performed in the past and it was observed that *TEL1* was epistatic with *RIF1* for Y' telomeres but not for X' telomeres (CRAVEN et PETES, 1999). It was the Lingner laboratory that allowed to elucidate the difference between these two types of recruitment. Telomeres carrying X subtelomeric sequences would be potentially linked by the protein Tbf1p and by forcing the recruitment of this protein to telomeres, *tel1Δ* cells would then recruit telomerase more efficiently. (ARNERIC et LINGNER, 2007).

An interesting fact to note is that in *mec1Δ tel1Δ* cells where telomeres are extremely short and telomerase recruitment is very deficient, it would be easy to conceive that alternative telomere elongation pathways via homologous recombination are used. However, in all our analyses and in those reported by another group, it seems that telomerase can protect telomeres against the homologous recombination machinery responsible for the establishment of classical survivors (MA et GREIDER, 2009). This protection could be direct via the presence of certain subunits of telomerase such as Est2p

ou indirecte via la présence de télomères de taille suffisante et comportant assez de protéines du capuchon télomérique soit par exemple Cdc13p et l'hétérodimère  $\gamma$ Ku (TAGGART *et al.*, 2002). Une observation appuyant la première partie de cette hypothèse est que les cellules *mec1 $\Delta$  tel1 $\Delta$  pif1 $\Delta$*  ont besoin d'une télomérase active afin de maintenir leur viabilité. En effet, ces cellules sans la télomérase (via la suppression de *EST1*) entrent en sénescence, démontrant clairement l'importance de cette enzyme dans la survie de ces cellules. Nous pouvons donc constater à quel point les rôles de la kinase Tel1p (et de Mec1p en son absence) sont variés au niveau du maintien de la taille des télomères. Les cellules *mec1 $\Delta$  tel1 $\Delta$*  entrent probablement en sénescence à cause d'un défaut de recrutement de la télomérase, mais réussissent à en sortir via la réactivation d'une de ces voies ou d'une autre voie inconnue à ce jour.

### **Caractérisation de l'implication de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans le processus de traitement des dommages à l'ADN.**

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes éloignés de l'étude du télosome pour étudier plutôt la chromatine dans son ensemble. En effet, ce projet a débuté suite à la réalisation d'un criblage ayant pour but de déterminer des voies génétiques parallèles à celle du complexe *MRE11-RAD50-XRS2* et de *TEL1*. Notre objectif était de trouver de nouveaux acteurs dans le maintien de la longueur des télomères, mais le seul candidat qui fut repêché ne jouait pas de rôle important dans ce mécanisme. Il s'agissait plutôt de la protéine Lge1p, un membre du complexe de monoubiquitination

de l'histone H2B sur la lysine 123, agissant de concert avec les protéines Bre1p et Rad6p (WEAKE et WORKMAN, 2008). Nous avons alors recherché dans la littérature quel était le rôle joué par ce complexe. Les nombreux articles traitant de H2BK123ub traçaient un lien très clair entre cette modification de l'histone H2B et la méthylation subséquente de l'histone H3 sur ses lysines 4 et 79. De plus, de nombreuses observations faisaient état de l'implication de cette cascade de modifications dans la transcription (RUTHENBURG *et al.*, 2007). Toutefois, nous avons découvert qu'une partie de cette voie génétique, soit la triméthylation de H3K4 était également essentielle pour la réponse des cellules aux agents endommageant l'ADN tel que démontré dans les figures 1D et 1E (Chapitre 3). La suite de ce projet fut de déterminer les raisons pour lesquelles les cellules dans le complexe Lge1-Bre1-Rad6 démontraient une grande sensibilité aux agents endommageant l'ADN en absence de la voie principale de réparation, la recombinaison homologue. Pendant que nous caractérisions les fonctions de H3K4me3, deux articles démontrant que les homologues humains et de *S.Pombe* de *S.c.Rad9p* pouvaient directement interagir avec des histones modifiées au site de cassure double brin, soit avec H3K79me3 et H4K20me respectivement, dans le but d'activer les points de contrôle des dommages à l'ADN (HUYEN *et al.*, 2004; SANDERS *et al.*, 2004). Nous avons donc testé cette première approche en vérifiant si la protéine kinase Rad53p et l'histone H2AS129 étaient phosphorylées dans les cellules *bre1Δ* et les résultats obtenus démontraient que tout était normal à ce niveau (D. Faucher, résultats non publiés). Toutefois, un autre groupe ayant travaillé sur *BRE1* et H3K79me3 est arrivé à un résultat inverse dans des conditions expérimentales différentes (GIANNATTASIO *et al.*, 2005). Ce

groupe a démontré dans son article que les cellules *bre1Δ* étaient déficientes dans l'activation de la kinase Rad53p suivant un traitement avec du MMS, de la zéocine ou des radiations UV. La différence obtenue pourrait être explicable par la souche utilisée ou par le fait que nous ayons traité les cellules avec un agent chimique différent soit la bléomycine. Toutefois, ce groupe a démontré que les cellules *set1Δ* activaient normalement les points de contrôle suite à un traitement avec des agents endommageant l'ADN (GIANNATTASIO *et al.*, 2005).

Notre deuxième hypothèse fut donc que la cascade de modification des histones H2BK123ub et H3K4me3 devait être importante pour la réparation des dommages. Par des essais génétiques, nous avons été en mesure de déterminer que les cellules *set1Δ* démontraient une diminution d'environ de 70% de leur capacité à effectuer la réparation de dommages par le mécanisme de ligation de bouts non homologues (NHEJ) (Chapitre 3 - Figure 2). Toutefois, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le NHEJ est une voie de réparation mineure et masquée par la voie de réparation de la recombinaison homologue. Cette diminution de 70% semble importante mais est biologiquement modérée pour la cellule.

De plus, des analyses subséquentes nous ont permis de constater que la méthyltransférase Set1p et son substrat H3K4me3 étaient importants pour la stabilité des fourches de réplication en présence de stress réplcatif (Chapitre 3 - Figure 5). Des analyses génétiques supplémentaires nous ont également permis d'observer de

l'épistasie entre *SET1* et *MRC1*, un gène encodant pour une protéine impliquée dans la stabilisation des fourches de réplication et dans l'activation du point de contrôle intra-S (ALCASABAS *et al.*, 2001; SZYJKA *et al.*, 2005; TOURRIERE *et al.*, 2005). Le rôle joué par la triméthylation de l'histone H3 dans la stabilité des fourches demeure nébuleuse. Cette modification pourrait permettre le recrutement de protéines stabilisant les fourches via leur domaine de type « chromodomaine » ou « PHD » connus pour permettre la liaison avec les lysines méthylées (KIM *et al.*, 2006). Chez les mammifères, un lien entre H3K4me et la réplication a été caractérisé. En effet, les travaux du laboratoire Côté ont permis de démontrer que l'acétyltransférase HB01 aurait comme partenaires de liaison les protéines Ing4 et Ing5 (DOYON *et al.*, 2006; SAKSOUK *et al.*, 2009). Ce complexe serait recruté aux sites de réplication via la liaison d'Ing5p avec l'histone H3K4 triméthylée et permettrait d'augmenter l'assemblage du complexe de pré-réplication et le recrutement des protéines MCMs (IIZUKA *et al.*, 2006; SAKSOUK *et al.*, 2009). La déplétion de la protéine Ing5 ou du complexe HB01 provoquerait une diminution de la réplication de l'ADN et retarderait la progression des cellules au travers de la phase S (DOYON *et al.*, 2006).

Finalement, nous avons pu déterminer qu'au site d'une cassure double brin fraîchement crée, il y a recrutement de la méthyltransférase Set1p ainsi que son substrat H3K4me3 (Chapitre 3 - Figure 3). Encore une fois, la fonction exacte de l'établissement de cette modification au site du dommage à l'ADN n'est pas très claire, mais une des hypothèses les plus plausibles est qu'une protéine impliquée dans les machineries de

réparation soit recrutée au dommage via H3K4me3. Toutefois, une telle protéine reste à être identifiée.

Une autre observation intéressante de ce projet fut l'interrelation entre le complexe de remodelage de la chromatine RSC et H3K4me3. En effet, lors de nos analyses ainsi que celle du groupe de Lee, nous avons pu observer que les cellules sans une sous-unité non essentielle du complexe RSC, soit *rsc30Δ*, démontraient des phénotypes similaires à ceux des cellules *set1Δ* (Chapitre 3 - Figures 5 et 6) (SHIM *et al.*, 2005). De plus, des analyses d'épistasie nous ont informés que *SET1* et *RSC30* agiraient dans la même voie génétique. Finalement, dans les cellules *rsc30Δ* le recrutement de la méthyltransférase (et probablement de H3K4me3) était perdu, démontrant leur relation étroite (Chapitre 3 - Figure 6B). Un modèle intéressant pour tenter d'expliquer ces résultats serait que suite au recrutement du complexe RSC immédiatement suivant la détection du dommage, la méthyltransférase Set1p serait recrutée suivant le repositionnement et l'enlèvement des nucléosomes par RSC. Des expériences comparatives d'immunoprécipitation de la chromatine du complexe RSC et de H3K4me3 effectuées à divers intervalles de temps pourraient nous donner un portrait plus général sur la relation entre ces deux éléments dans la réparation des dommages à l'ADN.

Finalement, au cours de l'analyse de la fonction de H3K4me3, nous nous sommes questionnés si H3K4me3 ne cacherait pas en réalité un rôle plus global joué par la transcription dans le traitement des dommages à l'ADN. Les expériences génétiques

préliminaires effectuées avec les mutants *htz1Δ*, *ctk1Δ* et *set2Δ* nous ont également permis de constater que d'autres gènes impliqués dans la transcription se retrouvaient au cœur du mécanisme de stabilité du génome. Bien entendu, des analyses génétiques plus extensives nous permettront de statuer sur la véracité d'un tel mécanisme.

À ce point, nous voulons quand même proposer un modèle basé sur nos résultats très préliminaires. Il semblerait que l'initiation de la transcription, mais pas son élongation, soit essentielle à cette nouvelle voie impliquée dans le traitement des dommages à l'ADN. Est-ce que le recrutement de la RNAPII au site de cassure permettrait le recrutement de d'autres facteurs de réparation ? Ou encore est-ce que la transcription d'ARNs non codants permettrait l'action d'une voie de réparation semblable à la « réparation couplée à la transcription » telle que vu lors de la réparation de dommages UV ? Nul ne le sait pour l'instant et bien des efforts seront nécessaires pour faire la lumière sur ce possible mécanisme.



## CONCLUSION

Les travaux que j'ai réalisés au cours des dernières années ont permis de préciser le rôle joué par la kinase Tel1p au niveau du maintien de la taille des télomères ainsi que dans le maintien de l'intégrité du génome. Par l'isolation et la caractérisation d'un nouvel allèle de séparation de fonction de *TEL1* ainsi que par l'utilisation d'un allèle kinase inactivée du même gène, nous avons pu déterminer que cette kinase comportait de nouveaux domaines auxquels étaient rattachés des rôles bien spécifiques. À la lumière de nos résultats et de ceux révélés régulièrement dans les articles scientifiques publiés, la protéine Tel1p avec ses 2787 acides aminés est définitivement la cible de liaison de nombreuses protéines impliquées dans la réparation et dans le maintien de l'homéostasie des télomères. De plus, malgré que les cellules sans les kinases de la famille phosphatidyl-3-Inositol (PI3K) démontrent un phénotype de sénescence dû au raccourcissement graduel de leurs télomères, nous avons pu isoler certaines cellules *mec1Δ tel1Δ* qui avaient réussi à s'échapper de cette crise. Une analyse de ces cellules nous a permis de déterminer que leurs télomères ne semblaient pas maintenus par la recombinaison homologe, une voie alternative de rallongement des télomères. En effet, le patron télomérique de ces cellules était composé de fragments de restrictions terminaux critiqueusement courts et il y avait absence d'amplification de séquences sous télomériques Y' ou de répétitions télomériques. Par contre, ces cellules *mec1Δ tel1Δ* semblaient souffrir d'instabilité génomique puisque l'élément sous télomérique Y' était spécifiquement perdu dans bon nombre de ces clones. Une analyse plus poussée de ce

phénotype pourrait donner des indications sur la manière dont ces cellules parviennent à maintenir leurs télomères. Par le biais de croisement génétique, nous avons pu découvrir que la délétion de l'hélicase Pif1p, un inhibiteur de la télomérase, améliorait la viabilité de ces cellules et leur permettait d'éviter la sénescence. Ce résultat pourrait être explicable par un recrutement accru de la télomérase aux télomères les plus courts en absence de la régulation négative de l'hélicase Pif1p.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons identifié la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 comme étant très importante pour le maintien de la stabilité du génome. Cette modification ajoutée sur l'histone H3K4 par l'enzyme Set1p, n'était pas connue pour cette fonction mais plutôt pour son implication dans la transcription des gènes. Retrouvée au promoteur de gènes activement transcrits et importants pour le recrutement de l'ARN polymérase 2, nous pouvons maintenant ajouter que cette modification est présente sur la chromatine bordant un site de cassure doubles brins. De plus, nous avons démontré que ce recrutement de H3K4me3 est dépendant de Rsc30p, une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine RSC, puisqu'en absence de cette dernière H3K4me3 n'était plus retrouvée à la cassure d'ADN. Des expériences supplémentaires nous ont également permis de déterminer qu'en absence de cette modification ou de la méthyltransférase Set1p, les cellules démontraient alors un défaut dans la voie de réparation de ligation de bouts non homologues ainsi qu'une difficulté à stabiliser les fourches de réplifications en présence d'un stress réplcatif. Finalement, nous sommes attardés sur l'implication de la transcription dans le processus de traitement des dommages à l'ADN. Nous avons pu déterminer que l'initiation de la

transcription d'un gène était cruciale pour le traitement des dommages à l'ADN en absence de la recombinaison homologe mais non l'élongation de la transcription.

Tous ces projets auront permis de saisir un peu mieux la diversité des mécanismes existants dans les cellules afin de maintenir la stabilité du génome. Que ce soit en permettant l'homéostasie des télomères ou par le traitement des dommages à l'ADN via la chromatine, les cellules disposent de nombreux moyens pour s'assurer que son information génétique ainsi que celle qu'elle transférera à sa progéniture restent immaculées, sauvegardant ainsi les générations futures de son espèce.



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord dédier cette thèse à ma famille et belle-famille qui ont toujours été là pour m'encourager et me soutenir tout au long de mes études. Vous m'avez donné le courage et la persévérance requises pour la complétion de ces études.

Dans un deuxième temps, j'aimerais remercier Raymund qui a su faire de moi un scientifique à part entière. Ta rigueur scientifique, tes questionnements omniprésents ainsi que ta vision de la science ont permis de parfaire ma formation. De plus, la confiance et la latitude que tu m'as données m'ont permis d'emprunter le chemin que je voulais au travers des dédales de la recherche.

Troisièmement, je veux remercier mes collègues de travail avec qui je pouvais avoir des discussions scientifiques ou plus légères. Un gros merci à ces collègues devenus de grands amis (Simon, Tim, JF, Marie, Serge, Isa, Mikhail) avec qui j'ai pu partager mes joies et nombreux projets. Un merci tout particulier à mes amis et mentors Martin, Mathdur et Momtchil, du début à la fin vous avez toujours été là pour moi afin d'assurer ma santé mentale. Merci également à Carole et Normand que je ne remercierai jamais assez pour leur aide.

Mes remerciements vont également aux Drs Daniel Durocher, Luc Gaudreau et Antonio Conconi pour avoir accepté d'être membre du jury d'évaluation de ma thèse. À un moment ou un autre au cours de mes études vous avez été présents pour m'aider.

Finalement, l'ascension de ce sommet n'aurait pu être possible sans ma douce moitié Stéphanie qui a été d'un soutien inconditionnel tout au long de cette aventure. Tu m'as permis de dépasser mes limites et de faire de moi une meilleure personne.



## RÉFÉRENCES

- Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Geli, V., Gilson, E., and Teixeira, M.T. 2009. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat Cell Biol* **11**(8): 988-993.
- Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**(17): 2177-2196.
- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* **21**(18): 6270-6279.
- Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F., Carr, A.M., and Elledge, S.J. 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nature Cell Biology* **3**(11): 958-965.
- Andrade, M.A. and Bork, P. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**(2): 115-116.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Muller, C.W., and Bork, P. 2001. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* **309**(1): 1-18.
- 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.
- Azvolinsky, A., Dunaway, S., Torres, J.Z., Bessler, J.B., and Zakian, V.A. 2006. The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes. *Genes Dev* **20**(22): 3104-3116.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506.
- Baldo, V., Testoni, V., Lucchini, G., and Longhese, M.P. 2008. Dominant TEL1-hy mutations compensate for Mec1 lack of functions in the DNA damage response. *Mol Cell Biol* **28**(1): 358-375.
- Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. 2002. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* **109**(7): 801-806.
- Barzel, A. and Kupiec, M. 2008. Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* **9**(1): 27-37.
- Beamish, H., Kedar, P., Kaneko, H., Chen, P., Fukao, T., Peng, C., Beresten, S., Gueven, N., Purdie, D., Lees-Miller, S., Ellis, N., Kondo, N., and Lavin, M.F. 2002. Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM. *J Biol Chem* **277**(34): 30515-30523.

- Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., and Schreiber, S.L. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8695-8700.
- Bernstein, K.A. and Rothstein, R. 2009. At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* **137**(5): 807-810.
- Bi, X., Gong, M., Srikanta, D., and Rong, Y.S. 2005. Drosophila ATM and Mre11 are essential for the G2/M checkpoint induced by low-dose irradiation. *Genetics* **171**(2): 845-847.
- Bianchi, A. and Shore, D. 2007. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev* **21**(14): 1726-1730.
- Biswas, D., Takahata, S., Xin, H., Dutta-Biswas, R., Yu, Y., Formosa, T., and Stillman, D.J. 2008. A role for Chd1 and Set2 in negatively regulating DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**(2): 649-659.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Geli, V., and Nicolas, A. 2009. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *Embo J* **28**(2): 99-111.
- 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.
- 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.
- Bradbury, E.M. 2002. Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. *Mol Cell* **10**(1): 13-19.
- Brown, E.J. and Baltimore, D. 2003. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**(5): 615-628.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., and Thelander, L. 2003. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**(3): 391-401.
- Chakhparonian, M., Faucher, D., and Wellinger, R.J. 2005. A mutation in yeast Tel1p that causes differential effects on the DNA damage checkpoint and telomere maintenance. *Current Genetics* **48**(5): 310-322.
- Chan, C.S. and Tye, B.K. 1983. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**(2): 563-573.
- Chan, S.W., Chang, J., Prescott, J., and Blackburn, E.H. 2001. Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* **11**(16): 1240-1250.
- 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.
- Chen, Q., Ijima, A., and Greider, C.W. 2001. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol* **21**(5): 1819-1827.



- Clapier, C.R. and Cairns, B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304.
- Cohen, H. and Sinclair, D.A. 2001. Recombination-mediated lengthening of terminal telomeric repeats requires the Sgs1 DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3174-3179.
- 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.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**(5547): 1713-1716.
- Craven, R.J., Greenwell, P.W., Dominska, M., and Petes, T.D. 2002. Regulation of genome stability by TEL1 and MEC1, yeast homologs of the mammalian ATM and ATR genes. *Genetics* **161**(2): 493-507.
- Craven, R.J. and Petes, T.D. 1999. Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**(4): 1531-1541.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D., and Wilson, T.E. 2005. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431-451.
- Davie, J.R. and Spencer, V.A. 1999. Control of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**: 141-148.
- Delgoshai, N., Wurtele, H., and Verreault, A. 2009. Histone acetylation floods the human cell cycle and DNA damage response. *Cell Cycle* **8**(12): 1820.
- 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.
- Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Yang, X.J., and Cote, J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**(1): 51-64.
- Evans, S.K. and Lundblad, V. 1999. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**(5437): 117-120.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**(7033): 605-611.
- Featherstone, C. and Jackson, S.P. 1999. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* **434**(1): 3-15.
- Fisher, A.E., Hohegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* **27**(15): 5597-5605.
- 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.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., and Schubert, I. 2006. Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* **11**(4): 199-208.

- Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J.C. 2009. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* **1789**(6-8): 451-459.
- 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.
- Gatei, M., Scott, S.P., Filippovitch, I., Soronika, N., Lavin, M.F., Weber, B., and Khanna, K.K. 2000. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* **60**(12): 3299-3304.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. 2005. The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *Journal of Biological Chemistry* **280**(11): 9879-9886.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**(4): 355-360.
- Gilson, E. and Geli, V. 2007. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 825-838.
- Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D., and Gasser, S.M. 1993. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol* **231**(2): 293-310.
- Glozak, M.A. and Seto, E. 2009. Acetylation/deacetylation modulates the stability of DNA replication licensing factor Cdt1. *J Biol Chem* **284**(17): 11446-11453.
- Goudsouzian, L.K., Tuzon, C.T., and Zakian, V.A. 2006. *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association. *Mol Cell* **24**(4): 603-610.
- Grandin, N. and Charbonneau, M. 2009. Telomerase- and Rad52-independent immortalization of budding yeast by an inherited-long-telomere pathway of telomeric repeat amplification. *Mol Cell Biol* **29**(4): 965-985.
- 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.
- Greenwell, P.W., Kronmal, S.L., Porter, S.E., Gassenhuber, J., Obermaier, B., and Petes, T.D. 1995. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* **82**(5): 823-829.
- 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.

- 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.
- Grunstein, M. 1997. Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Current Opinion in Cell Biology* **9**(3): 383-387.
- Grunstein, M. 1998. Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* **93**(3): 325-328.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**(12): e384.
- Guo, X.W. and Cole, R.D. 1989a. Chromatin aggregation changes substantially as pH varies within the physiological range. *J Biol Chem* **264**(20): 11653-11657.
- Guo, X.W. and Cole, R.D. 1989b. Chromatin aggregation depends on the anion species of the salts. *J Biol Chem* **264**(28): 16873-16879.
- Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Richardson, H.E., de Barros Lopes, M., and Reed, S.I. 1989. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16): 6255-6259.
- Hande, M.P., Balajee, A.S., Tchirkov, A., Wynshaw-Boris, A., and Lansdorp, P.M. 2001. Extrachromosomal telomeric DNA in cells from *Atm(-/-)* mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* **10**(5): 519-528.
- Hansen, J.C. 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 361-392.
- 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.
- Hector, R.E., Shtofman, R.L., Ray, A., Chen, B.R., Nyun, T., Berkner, K.L., and Runge, K.W. 2007. Tel1p 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), pp. 11-34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S., and Young, R.A. 1998. Temporal regulation of RNA polymerase II by *Srb10* and *Kin28* cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* **2**(1): 43-53.
- Hereford, L.M., Osley, M.A., Ludwig, T.R., 2nd, and McLaughlin, C.S. 1981. Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* **24**(2): 367-375.
- Hirano, Y., Fukunaga, K., and Sugimoto, K. 2009. Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol Cell* **33**(3): 312-322.
- Huang, P., Pryde, F.E., Lester, D., Maddison, R.L., Borts, R.H., Hickson, I.D., and Louis, E.J. 2001. SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr Biol* **11**(2): 125-129.

- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. 2004. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**(7015): 406-411.
- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C., and Madhani, H.D. 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular Cell* **11**(1): 261-266.
- Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H., and Smith, M.M. 2006. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol* **26**(3): 1098-1108.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., and Haber, J.E. 2003. Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**(4): 401-411.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., Haber, J.E., and Foiani, M. 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**(7011): 1011-1017.
- Ivessa, A.S., Zhou, J.Q., Schulz, V.P., Monson, E.K., and Zakian, V.A. 2002. Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev* **16**(11): 1383-1396.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**(1): 37-45.
- Jenuwein, T. 2001. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* **11**(6): 266-273.
- Khadaroo, B., Teixeira, M.T., Luciano, P., Eckert-Boulet, N., Germann, S.M., Simon, M.N., Gallina, I., Abdallah, P., Gilson, E., Geli, V., and Lisby, M. 2009. The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol* **11**(8): 980-987.
- Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., and Lavin, M.F. 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* **20**(4): 398-400.
- Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M.T. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Reports* **7**(4): 397-403.
- Kim, R.A., Caron, P.R., and Wang, J.C. 1995. Effects of yeast DNA topoisomerase III on telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2667-2671.
- 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.
- Koc, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. 2004. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* **279**(1): 223-230.
- Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 198-209.

- Krogan, N.J., Dover, J., Khorrami, S., Greenblatt, J.F., Schneider, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. 2002. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J Biol Chem* **277**(13): 10753-10755.
- Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D.P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T.R., Buratowski, S., and Greenblatt, J.F. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular Cell* **12**(6): 1565-1576.
- Larrivee, M. and Wellinger, R.J. 2006. Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. *Nat Cell Biol* **8**(7): 741-747.
- 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.
- Lebel, C., Rosonina, E., Sealey, D.C., Pryde, F., Lydall, D., Maringele, L., and Harrington, L.A. 2009. Telomere maintenance and survival in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of telomerase and RAD52. *Genetics* **182**(3): 671-684.
- Lee, J., Mandell, E.K., Tucey, T.M., Morris, D.K., and Lundblad, V. 2008. The Est3 protein associates with yeast telomerase through an OB-fold domain. *Nat Struct Mol Biol* **15**(9): 990-997.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**(5721): 551-554.
- Lee, J.S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS.[see comment]. *Cell* **131**(6): 1084-1096.
- Lempiainen, H. and Halazonetis, T.D. 2009. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *Embo J* **28**(20): 3067-3073.
- 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.
- 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. and Lustig, A.J. 1996. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**(11): 1310-1326.
- Liang, B., Qiu, J., Ratnakumar, K., and Laurent, B.C. 2007. RSC functions as an early double-strand-break sensor in the cell's response to DNA damage. *Current Biology* **17**(16): 1432-1437.
- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., and Lundblad, V. 1997. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11190-11195.
- Lisby, M. and Geli, V. 2009. DNA damage response to eroded telomeres. *Cell Cycle* **8**(22): 3617-3618.

- Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskaya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R., and Berger, S.L. 2001. Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**(5532): 1142-1146.
- Longhese, M.P., Mantiero, D., and Clerici, M. 2006. The cellular response to chromosome breakage. *Mol Microbiol* **60**(5): 1099-1108.
- Longhese, M.P., Paciotti, V., Neecke, H., and Lucchini, G. 2000. Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. *Genetics* **155**(4): 1577-1591.
- Louis, E.J. and Haber, J.E. 1990. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* **124**(3): 533-545.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Luger, K. and Richmond, T.J. 1998. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* **8**(1): 33-40.
- 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.
- 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.
- Ma, Y. and Greider, C.W. 2009. Kinase-independent functions of TEL1 in telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **29**(18): 5193-5202.
- Makovets, S. and Blackburn, E.H. 2009. DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol* **11**(11): 1383-1386.
- Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. 2007. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep* **8**(4): 380-387.
- 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.
- Marino-Ramirez, L., Jordan, I.K., and Landsman, D. 2006. Multiple independent evolutionary solutions to core histone gene regulation. *Genome Biol* **7**(12): R122.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**(5828): 1160-1166.

- McClintock, B. 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**: 405-416.
- McEachern, M.J., Krauskopf, A., and Blackburn, E.H. 2000. Telomeres and Their Control. *Annu Rev Genet* **34**: 331-358.
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., and Shilatifard, A. 2001. COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 12902-12907.
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. 2009. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* **8**(9): 983-995.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex.[see comment]. *Science* **303**(5656): 343-348.
- Mohrmann, L. and Verrijzer, C.P. 2005. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* **1681**(2-3): 59-73.
- Mordes, D.A., Glick, G.G., Zhao, R., and Cortez, D. 2008. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev* **22**(11): 1478-1489.
- 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.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair.[see comment]. *Cell* **119**(6): 767-775.
- Morrow, D.M., Tagle, D.A., Shiloh, Y., Collins, F.S., and Hieter, P. 1995. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* **82**(5): 831-840.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**: 181-195, 198.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. 2001. Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**(3): 397-408.
- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D., and Cleary, M.L. 2002. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 90-94.
- Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. 2003. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**(16): 1957-1962.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**(4): 475-487.
- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H., and Kouzarides, T. 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**(5): 905-916.

- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**(3): 709-719.
- Ng, H.H., Xu, R.M., Zhang, Y., and Struhl, K. 2002. Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem* **277**(38): 34655-34657.
- Nugent, C.I. and Lundblad, V. 1998. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* **12**(8): 1073-1085.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**: 617-656.
- Oikemus, S.R., McGinnis, N., Queiroz-Machado, J., Tukachinsky, H., Takada, S., Sunkel, C.E., and Brodsky, M.H. 2004. Drosophila atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes Dev* **18**(15): 1850-1861.
- Olave, I.A., Reck-Peterson, S.L., and Crabtree, G.R. 2002. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**: 755-781.
- Pandita, T.K. 2002. ATM function and telomere stability. *Oncogene* **21**(4): 611-618.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E., and Peterson, C.L. 2006. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes & Development* **20**(17): 2437-2449.
- Paques, F. and Haber, J.E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 349-404.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**(15): 886-895.
- Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. 2006. Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* **443**(7108): 222-225.
- Pelliccioli, A. and Foiani, M. 2005. Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol* **15**(18): R769-771.
- 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.
- Peterson, C.L. and Cote, J. 2004. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* **18**(6): 602-616.
- 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.
- Pham, A.D. and Sauer, F. 2000. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* **289**(5488): 2357-2360.
- Pryde, F.E. and Louis, E.J. 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO Journal* **18**(9): 2538-2550.



- Ray, A. and Runge, K.W. 1999a. Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in tel1Delta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15044-15049.
- Ray, A. and Runge, K.W. 1999b. The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Mol Cell Biol* **19**(1): 31-45.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 162-169.
- Rice, J.C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., and Allis, C.D. 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev* **16**(17): 2225-2230.
- Ritchie, K.B., Mallory, J.C., and Petes, T.D. 1999. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6065-6075.
- Ritchie, K.B. and Petes, T.D. 2000. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**(1): 475-479.
- Rockmill, B., Lambie, E.J., and Roeder, G.S. 1991. Spore enrichment. *Methods Enzymol* **194**: 146-149.
- Rodriguez, C.R., Cho, E.J., Keogh, M.C., Moore, C.L., Greenleaf, A.L., and Buratowski, S. 2000. Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**(1): 104-112.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**(5): 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Rose MD, W.F., Hieter P. 1990. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular Cell* **25**(1): 15-30.
- Sabourin, M., Tuzon, C.T., and Zakian, V.A. 2007. Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **27**(4): 550-561.
- Saksouk, N., Avvakumov, N., Champagne, K.S., Hung, T., Doyon, Y., Cayrou, C., Paquet, E., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., Yang, X.J., Gozani, O., Kutateladze, T.G., and Cote, J. 2009. HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Molecular Cell* **33**(2): 257-265.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**(5): 603-614.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**(6905): 407-411.
- Sarma, K. and Reinberg, D. 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 139-149.
- 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.
- Seidel, J.J., Anderson, C.M., and Blackburn, E.H. 2008. A novel Tel1/ATM N-terminal motif, TAN, is essential for telomere length maintenance and a DNA damage response. *Mol Cell Biol* **28**(18): 5736-5746.
- 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 [published erratum appears in *Nature* 1999 Dec 23-30;402(6764):898]. *Nature* **401**(6749): 177-180.
- Shahbazian, M.D., Zhang, K., and Grunstein, M. 2005. Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Mol Cell* **19**(2): 271-277.
- Shampay, J., Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**(5973): 154-157.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**(6795): 541-544.
- Shim, E.Y., Hong, S.J., Oum, J.H., Yanez, Y., Zhang, Y., and Lee, S.E. 2007. RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Molecular & Cellular Biology* **27**(5): 1602-1613.
- Shim, E.Y., Ma, J.L., Oum, J.H., Yanez, Y., and Lee, S.E. 2005. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **25**(10): 3934-3944.
- Shore, D. 1994. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet* **10**(11): 408-412.
- Shore, D. 1997. Telomerase and telomere-binding proteins: controlling the endgame. *Trends Biochem Sci* **22**(7): 233-235.
- Shore, D. and Bianchi, A. 2009. Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase. *Embo J* **28**(16): 2309-2322.
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. 2004. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol* **14**(19): 1703-1711.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. 2003. Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *Embo J* **22**(8): 1846-1856.

- Singer, M.S. and Gottschling, D.E. 1994. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**(5184): 404-409.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. 2007. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(25): 10364-10369.
- Snyder, M., Sapolsky, R.J., and Davis, R.W. 1988. Transcription interferes with elements important for chromosome maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**(5): 2184-2194.
- Spencer, V.A. and Davie, J.R. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**(1): 1-12.
- Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. 2001. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J* **20**(19): 5532-5540.
- Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* **17**(19): 2384-2395.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Sterner, D.E., Lee, J.M., Hardin, S.E., and Greenleaf, A.L. 1995. The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol* **15**(10): 5716-5724.
- 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.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893): 104-108.
- Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Fitcher, A.B., and Nasmyth, K. 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **65**(1): 145-161.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Durocher, D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Current Biology* **15**(15): 1364-1375.
- Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**(1): 245-255.
- Szyjka, S.J., Viggiani, C.J., and Aparicio, O.M. 2005. Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell* **19**(5): 691-697.
- 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.
- Takai, H., Wang, R.C., Takai, K.K., Yang, H., and de Lange, T. 2007. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell* **131**(7): 1248-1259.

- Teng, S.C., Chang, J., McCowan, B., and Zakian, V.A. 2000. Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell* **6**(4): 947-952.
- Teng, S.C. and Zakian, V.A. 1999. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8083-8093.
- Torres, J.Z., Bessler, J.B., and Zakian, V.A. 2004. Local chromatin structure at the ribosomal DNA causes replication fork pausing and genome instability in the absence of the *S. cerevisiae* DNA helicase Rrm3p. *Genes Dev* **18**(5): 498-503.
- Tourriere, H., Versini, G., Cordon-Preciado, V., Alabert, C., and Pasero, P. 2005. Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53. *Mol Cell* **19**(5): 699-706.
- Toussaint, M., Levasseur, G., Gervais-Bird, J., Wellinger, R.J., Elela, S.A., and Conconi, A. 2006. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutation Research* **606**(1-2): 92-105.
- Tseng, S.F., Lin, J.J., and Teng, S.C. 2006. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6327-6336.
- Tsukamoto, Y., Taggart, A.K., and Zakian, V.A. 2001. The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* **11**(17): 1328-1335.
- Tsukiyama, T. 2002. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 422-429.
- Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J.H. 2001. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* **7**(6): 1255-1266.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. 2004. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair.[see comment]. *Cell* **119**(6): 777-788.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R., and Gottschling, D.E. 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**(6): 745-756.
- Vaze, M.B., Pellicoli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M., and Haber, J.E. 2002. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* **10**(2): 373-385.
- Venkatasubrahmanyam, S., Hwang, W.W., Meneghini, M.D., Tong, A.H., and Madhani, H.D. 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16609-16614.
- Vernon, M., Lobachev, K., and Petes, T.D. 2008. High rates of "unselected" aneuploidy and chromosome rearrangements in tel1 mec1 haploid yeast strains. *Genetics* **179**(1): 237-247.

- Vespa, L., Warrington, R.T., Mokros, P., Siroky, J., and Shippen, D.E. 2007. ATM regulates the length of individual telomere tracts in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18145-18150.
- 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. *Molecular Cell* **24**(1): 127-137.
- Vodenicharov, M.D. and Wellinger, R.J. 2007. The cell division cycle puts up with unprotected telomeres: cell cycle regulated telomere uncapping as a means to achieve telomere homeostasis. *Cell Cycle* **6**(10): 1161-1167.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**: 607-614.
- Walmsley, R.W., Chan, C.S., Tye, B.K., and Petes, T.D. 1984. Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**(5973): 157-160.
- Weake, V.M. and Workman, J.L. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**(6): 653-663.
- 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.
- Wolffe, A.P. and Pruss, D. 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**(6): 817-819.
- Wood, A., Krogan, N.J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J.F., Johnston, M., and Shilatifard, A. 2003a. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Molecular Cell* **11**(1): 267-274.
- Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. 2003b. The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *Journal of Biological Chemistry* **278**(37): 34739-34742.
- 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.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Cote, J., and Kron, S.J. 2005. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Molecular & Cellular Biology* **25**(19): 8430-8443.
- Xiao, T., Hall, H., Kizer, K.O., Shibata, Y., Hall, M.C., Borchers, C.H., and Strahl, B.D. 2003. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev* **17**(5): 654-663.
- Zakian, V.A. and Scott, J.F. 1982. Construction, replication, and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from Saccharomyces cerevisiae chromosomal DNA. *Mol Cell Biol* **2**(3): 221-232.

- Zhang, Y. and Reinberg, D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**(18): 2343-2360.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**(6811): 433-439.
- Zhou, J., Monson, E.K., Teng, S., Schulz, V.P., and Zakian, V.A. 2000. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* **289**(5480): 771-774.
- Zou, L. and Elledge, S.J. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**(5625): 1542-1548.