

Université de Montréal

# **Imagerie moléculaire de l'ARN de la télomérase dans des cellules cancéreuses humaines**

*Par*

Hadrien Laprade

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Biochimie et Médecine moléculaire

Juillet 2020

© Hadrien Laprade, 2020

Université de Montréal

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

*Cette thèse intitulée*

**Imagerie moléculaire de l'ARN de la télomérase dans des cellules cancéreuses  
humaines**

*Présenté par*

**Hadrien Laprade**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Daniel Zenklusen**

Président-rapporteur

**Pascal Chartrand**

Directeur de recherche

**Lea Harrington**

Membre du jury

**Arturo Londoño-Vallejo**

Examineur externe

**Alain Verreault**

Représentant du doyen

# Résumé

Les télomères sont raccourcis à chaque cycle de réplication de l'ADN à cause du problème de réplication des extrémités. Leur longueur dicte la capacité proliférative des cellules eucaryotes. Des télomères trop courts, aillant atteints la limite de Hayflick, feront entrer les cellules en sénescence réplivative. Pourtant dans les cellules progénitrices ainsi que 90% des cellules cancéreuses la longueur des télomères est maintenue par un complexe ribonucléoprotéique, la télomérase. L'assemblage de ce complexe ainsi que son recrutement aux télomères son des processus dynamiques sous le contrôle d'une régulation fine. Toutefois, comment cette régulation à un impact sur la dynamique de la télomérase dans le noyau n'est toujours pas complètement compris. Dans ce projet nous avons développé une nouvelle méthode se basant sur le système MS2 permettant d'observer pour la première des particules uniques d'ARN de télomérase (hTR) par microscopie à fluorescence sur cellules cancéreuse humaines vivantes. Le suivi en temps réel de ces particules aux télomères a permis de révéler que la télomérase scanne activement les télomères via des interactions courtes avec la protéine télomérique TPP1. Des interactions plus stables nécessaires à l'allongement des télomères peuvent être formées grâce à l'appariement entre hTR et l'ADN simple brin du télomère sous contrôle du domaine OB-fold de la protéine télomérique POT1. Le suivi de ces particules au cours du cycle cellulaire a révélé que ces interactions ne sont pas restreintes à la phase S, la phase d'élongation des télomères. La mesure de la dynamique de hTR dans les corps de Cajal (CBs) couplé à des expériences de photo-activation ont pu montrer que hTERT joue un rôle dans la sortie de hTR des CBs. Enfin des mesures d'intensités de fluorescence de hTR aux télomères montrent qu'une seule particule est recruté sur un télomère en phase S.

**Mots-clés** : Télomérase, Télomère, hTR, hTERT, imagerie de molécule unique, Corps de Cajal, dynamique des ARNs *in vivo*, cancer.

# Abstract

Telomeres are shortened at each DNA replication cycle, due to the end replication problem. Their length dictates the proliferative capacity of eukaryotic cells. Too short telomeres, reaching the Hayflick limit, will lead the cells to replicative senescence. However, in stem cells and 90% of cancer cells telomere length is maintained by a ribonucleoproteic complex named telomerase. The assembly of this complex and its recruitment to telomeres are process under a fine regulation. Yet, how this regulation impacts the nuclear dynamics of telomerase is not fully understood. In this project, we developed a new method based on the MS2 system to image for the first time telomerase RNA (hTR) particles in living human cancer cells by fluorescence microscopy. The real time tracking of these particles at telomeres revealed that telomerase actively scan all telomeres by short interactions with the TPP1 shelterin protein. Long stable interaction needed for telomere elongation can be made by the pairing of hTR template and single stranded telomeric DNA under the control of the OB-fold domains of the shelterin protein POT1. By tracking telomerase particle during the cell cycle, we revealed that telomerase recruitment to telomeres is not restricted to S phase, when telomeres are elongated. By measuring the dynamics of hTR in Cajal bodies (CBs) with photo-activation and photo-bleaching technics we showed that hTERT play a role in the hTR exit from CBS. Finally, fluorescence intensity measures of hTR at telomeres showed the recruitment of only one particle on a telomere.

**Keywords** : Telomerase, hTR,hTERT single-molecule imaging, Cajal body, *in vivo* RNA dynamics, cancer



# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Chapitre I – Introduction</b> .....	<b>1</b>
I.1 – Les télomères .....	1
I.1.1 - Le problème de fin de réplication de l'ADN.....	1
I.1.2 - Les conséquences du problème de fin de réplication - La limite de Hayflick.....	4
I.1.3 – La structure du télomère humain.....	5
I.1.4 – La shelterine humaine .....	6
I.1.4.1 – TRF1 et TRF2:.....	7
I.1.4.2 – RAP1 .....	9
I.1.4.3 – TIN2.....	10
I.1.4.4 – TPP1 et POT1 .....	10
I.1.2.5 – Conséquence d'un télomère non fonctionnel .....	12
I.2 – La Télomerase humaine.....	13
I.2.1 – L'ARN hTR.....	14
I.2.2 – Les protéines du complexe télomérase .....	16
I.2.2.1 – TCAB1 .....	16
I.2.2.2 – La protéine hTERT .....	17
I.2.2.3 – Le complexe H/ACA.....	20
I.2.3 – Biogénèse de hTR et sa localisation aux corps de Cajal.....	21
I.2.3.1 – La synthèse et maturation de hTR .....	21
I.2.3.2 - La localisation de hTR aux corps de Cajal .....	22

I.2.4 – Recrutement de la télomérase aux télomères et régulation de son activité.....	23
I.2.4.1 – Promotion du recrutement la télomérase et de son activité .....	23
I.2.4.2 – Répression du recrutement de la télomérase et de son activité .....	25
I.2.5 - Stœchiométrie de la télomérase .....	30
I.2.6 – Télomérase et cancer .....	30
I.3 - Approches d'imagerie de l'ARN en cellules vivantes .....	32
I.3.1 - Le système MS2 comme méthode de marquage de l'ARN <i>in vivo</i> .....	32
I.3.2 - L'imagerie de molécules fluorescentes uniques et le suivi de particules uniques dans des cellules vivantes .....	35
I.4 – La dynamique de la télomérase en cellules vivantes .....	40
I.5 – Problématique .....	42
I.6 – Hypothèses et Objectifs .....	43
<b>Chapitre II - Single-molecule imaging of telomerase RNA reveals a Recruitment – Retention model for telomere elongation .....</b>	<b>46</b>
II.1 - Mise en contexte .....	46
II.2 – Contribution des auteurs .....	47
II.2 - Summary .....	49
II.3 - Keywords.....	49
II.4 - Introduction.....	50
II.5 - RESULTS .....	52
II.5.1 - MS2-tagging reveals hTR dynamics in live cells .....	52
II.5.2 - Single particle tracking identifies two populations of hTR with distinct dynamic properties .....	53
II.5.3 - Telomeres are not exclusively extended in CBs.....	53
II.5.4 - Dynamic exchange of hTR between Cajal bodies and the nucleoplasm .....	54
II.5.5 - hTERT facilitates hTR exit from Cajal bodies .....	56
II.5.6 - Multiple dynamic interactions govern telomerase-telomere association.....	56
II.5.7 - Telomerase oscillates between scanning and engaged states at telomeres.....	57
II.5.8 - Telomerase retention is dependent on RNA-DNA base pairing.....	58
II.5.9 - ATM and ATR act upstream of TPP1 to facilitate telomeres access to telomerase ..	59
II.5.10 - POT1 negatively regulates telomere length by preventing telomerase retention at chromosome ends .....	59
II.6 - DISCUSSION .....	60
II.6.1 - A “Recruitment – Retention” model for telomere extension .....	60

II.6.2 - Cajal bodies as assembly sites for telomerase RNP .....	61
II.6.3 - Unique properties of hTR relative to hTERT and yeast <i>TLC1</i> .....	62
II.6.4 - POT1 regulates telomerase retention at telomeres.....	63
II.7 - STAR Methods:.....	64
II.7.1 - Key resource Table .....	64
II.7.2 - RESOURCE AVAILABILITY .....	67
II.7.3 - Experimental Model and Subject Details .....	67
II.7.4 - Methods Details.....	68
II.7.4.1 - CRISPR/Cas9 gene editing .....	68
II.7.4.2 - Western Blot analysis .....	70
II.7.4.3 - Telomere length analysis .....	70
II.7.4.4 - Northern Blot analysis.....	70
II.7.4.5 - TRAP assay.....	71
II.7.4.6 - Imaging.....	71
II.7.4.7 - Photoactivation .....	72
II.7.4.8 - Telomere Dysfunction Induced Foci (TIF) Analysis.....	73
II.7.4.9 - Photobleaching.....	74
II.7.4.10 - smiFISH and Super-resolution microscopy .....	74
II.7.4.11 - Quantification and Statistical Analysis.....	75
II.7.4.12 - Single particle tracking.....	76
II.8 - Acknowledgements .....	78
II.9 - Authors Contribution .....	78
II.10 - Declaration of Interests .....	78
II.11 - Authors information .....	78
II.12 – Figures.....	79
II.13 - Supplementary figures: .....	91
II.14 - Movie legends .....	104
II.15 - References .....	106
<b>Chapitre III - Article 2 - A single-particle view of telomerase recruitment at telomere in living cells .....</b>	<b>113</b>

III.1 – Mise en contexte .....	113
III.2 - Contribution des auteurs .....	114
III.3 - Abstract .....	115
III.4 - Introduction.....	116
III.5 - Results.....	118
III.5.1 - Telomerase recruitment at telomeres during the cell cycle .....	118
III.5.2 - Telomerase recruitment at telomeres does not depend on its catalytic activity.....	119
III.5.3 - Assessing telomerase stoichiometry at telomeres .....	120
III.6 - Discussion .....	122
III.7 - Materials and Methods.....	124
III.8 - Figures.....	128
III.9 - References .....	134
<b>Chapitre IV – Discussion .....</b>	<b>137</b>
IV.1 – La dynamique de hTR.....	137
IV.1.1 – hTR <sup>5MS2</sup> comme système efficace de suivi du trafic de la télomérase .....	137
IV.1.2 – La dynamique de hTR dans le noyau .....	138
IV.2 – Les Corps de Cajal comme lieu d’assemblage de la télomérase .....	139
IV.2.1 – Localisation de hTR aux corps de Cajal .....	139
IV.2.2 – Le chargement de hTERT sur hTR dans les corps de Cajal.....	140
IV.3 – La recherche des télomères par la télomérase .....	141
IV.3.1 – Le recrutement de hTR aux télomères au cours du cycle cellulaire .....	141
IV.3.2 – La télomérase scanne les télomères via l’interaction TPP1-hTERT.....	143
IV.3.3 – ATM et ATR sont des activateurs du recrutement de la télomérase aux télomères .....	144
IV.3.4 – POT1 contrôle l’accès de la télomérase à l’extrémité simple brin du télomère .....	145
IV.3.5 – Le recrutement et la rétention de hTR aux télomères ne dépendent pas de l’activité catalytique de hTERT .....	146
IV.4 – La nature monomérique de la télomérase.....	147
Conclusion .....	150
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>152</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>175</b>
Annexe I – Methods – Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA.....	175

## Liste des tableaux

TABLE S1: Related to STAR Methods. Oligonucleotides. ....	103
---	-----

## Liste des figures

Figure I.1 : Schéma du problème de réplication des extrémités de l'ADN .....	3
Figure I.2 : Représentation de l'organisation et de la structure d'un télomère humain .....	6
Figure I.3 : Les domaines fonctionnels de TRF1 et TRF2.....	8
Figure I.4 : La structure Ribonucléoprotéique du complexe télomérase. ....	14
Figure I.5: La structure secondaire de hTR .....	16
Figure I.6 : Les sous-domaines de hTERT. ....	18
Figure I.7 : Le domaine TEN de TERT est important pour la localisation de la télomérase aux télomères.....	19
Figure I.8 : Le recrutement de la télomérase au télomère .....	29
Figure I.9 : Le marquage d'un ARN par le système MS2.....	34
Figure I.10 : Courbe MSD de différents mouvements de particules caractérisées .....	38
Figure I.11 : Illustration du Rayon de giration de la trajectoire d'une particule .....	39
Figure I.12 : Visualisation de la dynamique de l'ARN <i>TLC1</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	41
Figure II.1: Tagging endogenous hTR with MS2 stem loops.....	80
Figure II.2: Single particle tracking of endogenous MS2-tagged hTR displays two dynamic populations.....	82
Figure II.3: Dynamics of hTR association with Cajal bodies. ....	84
Figure II.4: hTERT promotes the exit of hTR from Cajal bodies.....	85
Figure II.5: Deciphering the dynamic properties of hTR interaction with telomeres.....	87
Figure II.6: ATM and POT1 regulate different steps of hTR interaction with telomeres. .	89
Figure II.7: Model for hTR dynamics between CBs, nucleoplasm, and telomeres.....	90
Figure SII.1: Validation of MS2-tagged hTR, related to Figure 1.....	92
Figure SII.2: Particle tracking of MS2-hTR, related to Figure 2.....	94
Figure SII.3: Validation of smiFISH and TCAB1 knockout cell lines for photoactivation experiments, related to Figure 3. ....	96
Figure SII.4: Validation of hTERT knockout clones, related to Figure 4. ....	98
Figure SII.5: Dual-camera imaging of MS2-hTR and telomeres, Related to Figure 5...	100

Figure SII.6: ATM and POT1 regulate telomerase access and residence time at telomeres,  
Related to Figure 6.....102

Figure III.1: hTR is present at telomeres along the cell cycle.....129

Figure III.2: Impact of telomerase catalytic activity on its interaction with telomeres ....130

Figure III.3: Assessing telomerase stoichiometry at telomeres .....131

Figure III.4: Quantification of Telomerase RNA stoichiometry from smiFISH images...133

## Liste des sigles et abréviations

µm: micromètre

A: Adénine

ADN: Acide Desoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

C: Cytosine

CB: Cajal Body

Cryo-EM: Cryo microscopie électronique

D: Coefficient de diffusion

DC: Dyskeratose congénitale

DDR: Réponse au Dommages à l'ADN

DKC1: Dyskerine

DN: Dominant négatif

FISH: Fluorescent *in situ* hybridization

FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching

FUCCI: fluorescence ubiquitination cell cycle indicator

G: Guanine

GFP: Green fluorescent protein

HR: Recombinaison Homologue



hTR: Human Telomerase RNA

hTERT: human Telomerase Reverse transcriptase

IF: Immuno-Fluorescence

Kb: Kilobase

KO: Knock Out

MCP: MS2 Coat protein

MSD: Mean Square Displacement

nm: nanomètre

NOP10: Nucleolar protein 10

OB: Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding

pb: paire de bases

PARN: Poly(A)-specific ribonuclease

PCR: Polymerase chain reaction

POT1: Protection of telomere 1

RAP1: Repressor / Activator Protein 1

RNP: ribonucléoprotéine

RoG: Radius of gyration

RPA: Replication protein A

s: seconde

SIM: Structural illumination microscopy

T: Thymine

TCAB1: Telomerase and Cajal body protein 1

TERC: Telomerase RNA component

TIN2: TRF1-interacting nuclear protein 2

TPP1: TIN2 and POT1 interacting protein 1

TRAP: Telomerase repeated amplification protocol

TRF1: Telomere repeat binding Factor 1

TRF2: Telomere repeat binding Factor 2

WT: Wild type

# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Pascal Chartrand pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son aide et ses conseils ont toujours été utiles tout au long de mon doctorat. Merci d'avoir été disponible pour discuter de science et de m'avoir guidé pendant ces sept dernières années que ce soit dans les moments de réussite, ou plus difficiles de ce parcours.

Le labo de Pascal est un endroit où règne une bonne ambiance et ceci grâce aux membres présents et passés que j'y ai côtoyé quotidiennement. Merci à David, Émilie, Karen, Emilio, Marc et aux autres membres pour leur aide précieuse, tous les bons moments que nous avons passé, et pour tous les morceaux de musique de "qualité" que nous avons écouté.

Je voudrais plus particulièrement remercier Emmanuelle Querido pour son aide et toutes les discussions sur la microscopie à fluorescence et le particle tracking qui ont été essentielles à la réalisation des différents projets. Sa passion pour ces sujets et visible et communicative.

Je remercie mes collaborateurs, Agnel Sfeir et les membres de son laboratoire pour ce partenariat fructueux qui à grandement contribué à l'avancée de cette thèse.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse, les Dr Lea Harrington et Luc DesGroseillers pour avoir suivi mon parcours pendant ces sept années, ainsi que pour leur conseils et critiques avisés. Merci également aux membres du jury qui ont accepté de juger cette thèse.

Je remercie le personnel administratif, de la laverie et des livraisons pour leur efficacité et contribution dans la vie du département.

Ces années passées au Québec m'ont permis de faire de belles rencontres amicales. Merci à Emma & Seb, Flore & Pierre, Mathieu & Carine, Florence, Fabrice, Julie & Zac, David, Émilie, Fadi, Lian & David, Seb & Alix, pour tous les bons moments passés ensemble qui ont ponctué cette aventure avec des rires, des apéros et de bons repas partagés.

Dans ce voyage certaines personnes ont particulièrement compté pour moi et ma famille. Merci à Maxime pour toutes les fois où nous avons refait le monde pendant des heures, lors de discussions que nous seuls comprenions. Merci d'avoir été mon compagnon de galère durant ce doctorat. Un énorme merci à Charline et Aurélien pour avoir toujours répondu présents dans les bons moments et dans les périodes plus difficiles. Rendez-vous en France pour la suite de nos aventures!

Merci à mes parents Brigitte et Michel, à mon frère Simon et toute ma famille. Votre support depuis le début de mes études a été essentiel et a toujours beaucoup compté. Merci aussi à ma belle-famille pour leur soutien ces 10 dernières années.

Enfin merci à ma fille Sarah qui arrive à me redonner le sourire dans n'importe quelle circonstance.

Finalement, merci à Camille d'être à mes côtés depuis onze ans maintenant, d'être arrivée à me supporter durant toutes ces années et de m'avoir toujours encouragé à poursuivre. Ta patience, ton humour, ta tendresse et ton amour me permettent de passer à travers toutes les épreuves (et tes gâteaux aussi). Je n'aurais jamais pu arriver à la fin de cette aventure sans toi. Merci

# Chapitre I – Introduction

## I.1 – Les télomères

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes linéaires chez les eucaryotes. Ce sont des structures nucléoprotéiques composées de répétitions d'ADN non-codant et sont recouvertes de plusieurs protéines. Le rôle principal des télomères est de protéger l'extrémité des chromosomes. Les télomères font face à deux problèmes :

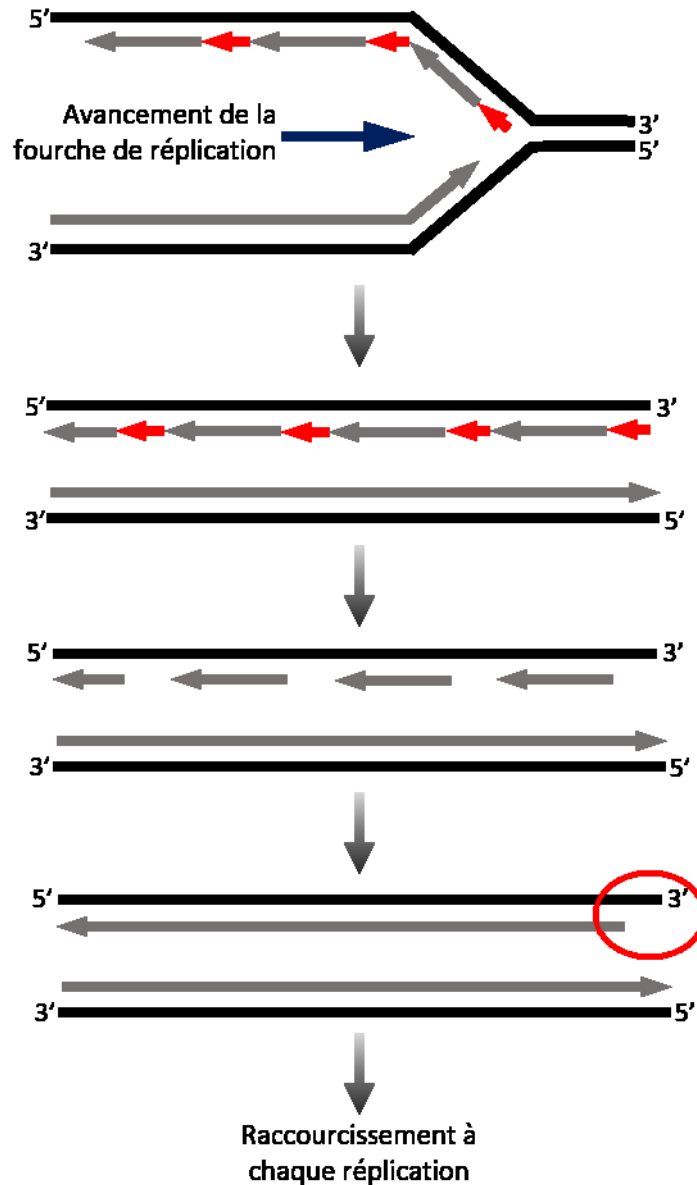
- Le problème de protection des extrémités, qui pose la question de savoir comment ces extrémités d'ADN évitent d'être reconnues par la machinerie de réparation de l'ADN, ce qui mènerait à des aberrations chromosomiques hautement délétères pour les cellules.
- Le problème de réplication des extrémités, qui est induit par un défaut de réplication de la fin du brin tardif et résulte en un raccourcissement progressif des chromosomes à chaque division cellulaire. Ceci limite le nombre de divisions cellulaires possibles. Cependant, certaines cellules peuvent se répliquer indéfiniment.

Dans cette introduction, nous verrons tout d'abord le problème de réplication des extrémités de l'ADN et ses conséquences sur la longévité. Nous passerons ensuite aux télomères et comment ils règlent le problème de protection des extrémités. Nous verrons enfin comment la télomérase est assemblée et recrutée aux télomères pour palier au problème de réplication des extrémités.

### I.1.1 - Le problème de fin de réplication de l'ADN

Lors de chaque réplication du génome des cellules eucaryotes, après que l'ADN polymérase ait répliqué l'extrémité d'un chromosome, quelques nucléotides sont manquants à l'extrémité de ce chromosome. Cette petite perte de matériel génétique est appelée problème de fin de réplication de l'ADN. Ceci est due au fait que l'ADN polymérase est capable de synthétiser l'ADN seulement dans le sens 5'→3'. Ainsi la

réplication du brin tardif nécessite la synthèse d'amorce d'ARN par l'ARN primase associée au réplisome. Ces amorces permettent la synthèse des fragments d'Okazaki dans le sens 5'→3'. Si la dernière amorce est synthétisée à la toute fin du brin tardif, après dégradation de cette amorce l'espace laissé ne pourra pas être comblé par l'ADN polymérase car aucune amorce d'ARN ne sera disponible. Le résultat de ce problème va être une extrémité avec un brin 3' sortant et un brin 5' plus court (figure I.1). Ce processus se répercutera sur les réplifications suivantes, aboutissant ainsi à un chromosome de plus en plus court avec les divisions cellulaires successives. Des télomères ayant atteint une taille critique vont limiter la capacité de la cellule à se diviser, ils ont atteint la limite de Hayflick.



**Figure I.1 : Schéma du problème de réplication des extrémités de l'ADN**

Cette représentation montre qu'après passage de la boucle de réplication et dégradation de la dernière amorce d'ARN (flèche rouge) de l'extrémité du brin tardif, un espace impossible à combler est laissé en 5' (cercle rouge). À la fin de la réplication, le brin précocesse sera mûré par les exonucléases Appolo et Exo1 pour générer une extrémité 3' simple brin. Ce raccourcissement s'amplifiera avec des réplications successives. Le brin matrice est en noir, le brin néo-synthétisé est en gris, les amorces d'ARN sont en rouge.

## **I.1.2 - Les conséquences du problème de fin de réplication - La limite de Hayflick**

Dans les débuts de la culture de tissus (première moitié du vingtième siècle), une idée répandue était que toutes les cellules saines en culture étaient immortelles. Mais au début des années 1960s, Leonard Hayflick et Paul S. Moorhead remarquèrent que des fibroblastes humains sains en culture ne pouvaient se diviser qu'un nombre finit de fois, après une cinquantaine de divisions les cellules arrêtaient de se multiplier. En mélangeant des cellules mâles ayant arrêtés de se diviser avec des cellules femelles jeunes, Hayflick remarqua qu'après quelques passages il ne restait seulement que des cellules femelles, concluant ainsi que quelque chose devait empêcher les cellules ayant atteint leur nombre maximal de division de se diviser à nouveau (Hayflick and Moorhead, 1961). Cette limite de division est appelée la limite de Hayflick. Ceci permit de commencer à parler de la présence d'un mécanisme capable de compter le nombre de réplication ainsi que de vieillissement cellulaire et d'entrée en sénescence après un certain nombre de divisions. Aussi, en comparant les cellules primaires aux cellules cancéreuses pouvant se diviser de façon illimitée, on a pu imaginer qu'il y a un mécanisme d'immortalisation cellulaire. Ce n'est qu'à partir des années 1970 que la raison de cette limite au nombre de division a pu être rationalisé, avec la théorie du problème de fin de réplication.

Avec la découverte de la séquence des télomères d'abord chez *Tetrahymena thermophila* puis chez l'humain, la longueur de ceux-ci a pu être mesurée par buvardage de type Southern. Il a été montré que leur raccourcissement corrèle avec le nombre de division cellulaire (Harley et al., 1990), menant au concept que l'érosion des télomères est un indicateur de l'âge de la cellule, des télomères trop courts limiteront la prolifération cellulaire en faisant entrer la cellule en sénescence répliative. Le fait que certaines cellules sont immortelles (comme des cellules souches ou cancéreuses) a pu être expliqué lors de la découverte de la télomérase en 1985 (Greider and Blackburn, 1985), l'enzyme qui synthétise des répétitions télomériques et ainsi permet de maintenir leur longueur. L'expression de cette enzyme dans des cellules saines suffit à maintenir leurs télomères et leur permettre de continuer de se diviser, montrant que le maintien des télomères est requis pour la prolifération cellulaire (Bodnar et al., 1998). En prenant en compte que plus de 80% des cellules cancéreuses maintiennent leurs télomères en



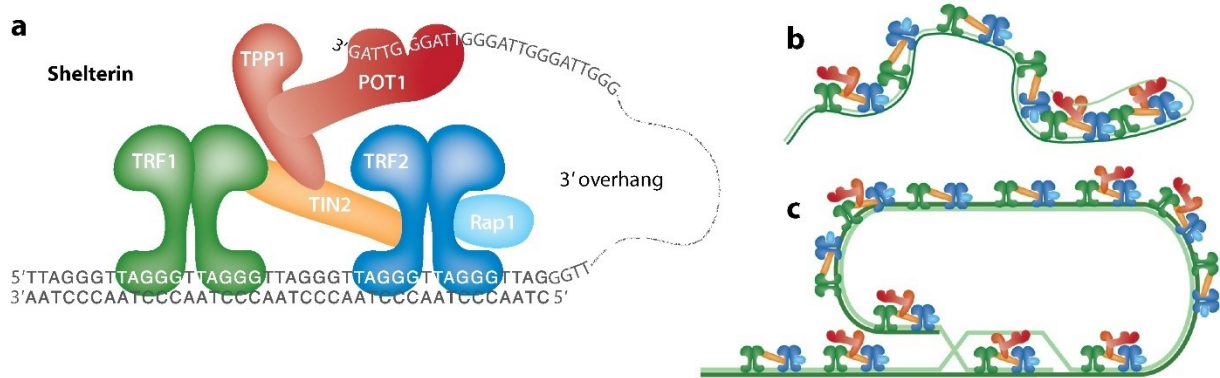
exprimant la télomérase, la sénescence répliquative pourrait servir à limiter le processus de transformation cellulaire.

La télomérase permet ainsi de contourner le problème de réplication des extrémités. Mais les télomères qui sont des extrémités d'ADN peuvent être reconnues comme des cassures de l'ADN. Pour éviter ceci, les télomères ont une structure particulière et sont recouverts par le complexe Shelterine.

### **I.1.3 – La structure du télomère humain**

Chez l'humain, la séquence de répétition télomérique est TTAGGG et sera répétée sur 5 à 15 kb environ (Samassekou et al., 2010). Leur brin 3' riche en guanine est plus long que le brin 5' de plusieurs centaines de nucléotides (Samassekou et al., 2010). Ces répétitions sont recouvertes d'un complexe protéique nommé Shelterine, jouant un rôle dans la protection des télomères, mais aussi dans le recrutement de la télomérase. Ce complexe est constitué de six protéines se liant à la partie double brin ou simple brin : TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 et POT1. Ces protéines jouent un rôle dans l'inhibition des voies de signalisation de dommage à l'ADN afin que le télomère ne soit pas reconnu comme une cassure dans l'ADN et ainsi éviter des fusions entre chromosomes (Figure I.2a et b). En plus de cette protection par la shelterine, l'extrémité du télomère va venir former une boucle-T, qui est une structure dite en lasso découlant de l'invasion de l'ADN double brin du télomère par sa protrusion en 3' (Griffith et al., 1999). Il est convenu que l'extrémité 3' simple brin riche en G va venir s'hybrider par complémentarité avec le brin riche en C de l'ADN double brin déplaçant ainsi le brin riche en G et formant une boucle-D (figure I.2c). Cette boucle-T vient résoudre le problème de protection des extrémités en masquant l'extrémité 3' simple brin du télomère.

Nous verrons dans les sections suivantes les différents composants de la Shelterine ainsi que leur fonction pour éviter que le télomère soit reconnu comme une cassure double brin de l'ADN.



## **Figure I.2 : Représentation de l'organisation et de la structure d'un télomère humain**

**a)** Schéma de l'organisation des six protéines du complexe shelterine sur l'extrémité d'un télomère. TRF1 et TRF2 forment des dimères et lient la partie double brin du télomère (en vert et bleu). RAP1 lie TRF2 (en bleu clair). TIN2 (en jaune) interagit avec TRF1, TRF2 et TPP1. TPP1 (en rose) lie à son tour POT1 (en rouge) qui interagit avec l'extrémité simple brin. Représentation de la structure nucléoprotéique d'un télomère linéaire **(b)** et formant une boucle-T **(c)**. Figure adaptée de (de Lange, 2018).

### **I.1.4 – La shelterine humaine**

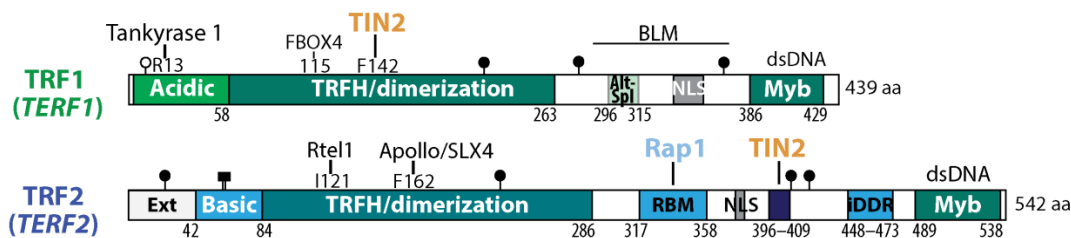
La shelterine est un complexe multi-protéique recouvrant les répétitions télomériques et assurant le rôle essentiel d'éviter que les télomères soit reconnus comme des cassure double brin de l'ADN. Ce complexe est constitué de six protéines : TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 et POT1. Les protéines TRF1/2 (Telomeric Repeat-binding Factor 1/2) forment des homodimères, lient directement l'ADN double brin contenant les répétitions TTAGGG et vont recruter les autres composants de la shelterine. RAP1 (Repressor/Activator binding Protein 1) est lié à TRF2, alors que TIN2 (TRF1 Interaction Nuclear factor 2) lie TRF1 et TRF2 ainsi que TPP1 (POT1 and TIN2 interacting protein), qui à son tour lie POT1 (Protection Of Telomere 1). POT1 lie l'ADN télomérique simple brin (de Lange, 2018). Le complexe shelterine empêche que les télomères soient reconnus par les différentes voies de réparation des cassures de l'ADN et ainsi éviter des aberrations chromosomiques et instabilités génétiques (Sfeir and de Lange, 2012). Ce

complexe joue aussi un rôle dans la régulation du recrutement de la télomérase aux télomères.

#### **I.1.4.1 — TRF1 et TRF2:**

TRF1 est une protéine de 439 acides aminés (aa) qui possède un domaine N-terminal acide, suivi d'un domaine TRFH (TRF Homology) et un domaine Myb en C-terminal (figure I.3). Le domaine N-terminal acide permet la liaison de la tankyrase qui régule la rétention de TRF1 au télomère (Hatsugai et al., 2010). Le domaine TRFH a pour fonction de créer des homodimères de TRF1, ainsi que de lier TIN2 (Chen et al., 2008; Fairall et al., 2001). En C-terminal, un domaine Myb permet l'interaction de TRF1 spécifiquement avec les répétitions TTAGGG des télomères. TRF1 possède aussi un domaine de liaison à l'hélicase BLM entre les domaines Myb et TRFH (Zimmermann et al., 2014).

TRF2 est une protéine de 542 aa. À la différence de TRF1, TRF2 possède un domaine N-terminal basique dont la fonction est de modifier la topologie de l'ADN et de faciliter son invasion pour la formation de la t-loop (Poulet et al., 2012). Comme TRF1, TRF2 possède un domaine TRFH permettant son homodimérisation. De même un domaine Myb permettant une interaction spécifique avec l'ADN télomérique double brin (Erdel et al., 2017). Entre son domaine TRFH et Myb, TRF2 a un domaine RBM (RAP1 Binding Motif) liant RAP1 et un autre liant TIN2. TRF2 a aussi un domaine iDDR (inhibitor of DNA Damage Response) permettant de prévenir la localisation de 53BP1 aux télomères (Okamoto et al., 2013). (Voir figure I.3)



**Figure I.3 : Les domaines fonctionnels de TRF1 et TRF2**

TRF1 possède un domaine acide en position N-terminale, un domaine TRFH, un NLS (en gris), ainsi qu'un domaine Myb de liaison à l'ADN du côté C-terminal. TRF2 possède un domaine N-terminal basique, un domaine TRFH, un domaine RBM, un domaine de liaison à TIN2 (en violet), un domaine iDDR et un domaine Myb en C-terminal. Adapté de de Lange (2018).

TRF1 et TRF2 sont les deux protéines interagissant directement avec l'ADN double brin des télomères. Leur domaine Myb va permettre la reconnaissance des répétitions 5'-TTAGGG-3' du télomère avec une forte affinité (Broccoli et al., 1997; Erdel et al., 2017). Ces deux protéines forment des homodimères sur le télomère par interaction de leurs domaines TRFH (TRF Homology). Bien que ce domaine partage une structure très similaire entre TRF1 et TRF2, il est suffisamment différent entre les deux protéines pour empêcher une hétérodimérisation (Fairall et al., 2001). Cette homodimérisation est importante pour permettre une liaison avec une forte affinité des répétitions télomériques. En effet, des expériences de retard sur gel ont montré que deux domaines Myb de TRF1 étaient nécessaires pour lier le télomère (Bianchi et al., 1997).

Des expériences de FISH sur des télomères de souris dans des conditions où TRF1 est absent montrent que les télomères forment des sites fragiles, dus à un blocage de la fourche de réplication (Sfeir et al., 2009). Ces résultats montrent que TRF1 joue un rôle dans le bon déroulement de la réplication du télomère chez les mammifères. Lors de la réplication, le brin tardif va être synthétisé à partir du brin riche en G du télomère, ce brin pouvant former des quadruplex de guanine délétères au passage de la fourche de réplication. Il a été proposé que TRF1 interagisse avec la protéine BLM chez la souris, une hélicase capable de défaire les quadruplex de guanine et ainsi promouvoir la réplication des télomères (Zimmermann et al., 2014). TRF1 semble aussi avoir un rôle dans la

répression de l'activation de la kinase Ataxia Telangiectasia Rad3-related (ATR) (Zimmermann et al., 2014), impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN.

La délétion de TRF2 dans des cellules de souris augmente la réponse aux dommages à l'ADN au télomère induite spécifiquement par ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) (Denchi and de Lange, 2007). Aussi la surexpression de TRF2 dans des cellules humaines inhibe la réponse aux dommages à l'ADN associé à une réduction de la phosphorylation d'ATM (Karlseder et al., 2004). Ces résultats montrent un rôle clé de TRF2 dans la protection des télomères et sa capacité à inhiber la kinase ATM, un senseur des dommages à l'ADN aux télomères provoquant un arrêt du cycle cellulaire. TRF2 permet la formation de la boucle-T, sa nécessité dans ce processus a été montré par microscopie en super-résolution (Doksani et al., 2013). Cette formation de boucle-T pourrait expliquer comment les télomères évitent l'activation d'ATM, en limitant l'accès de son extrémité 3' simple brin au complexe MRN. La répression d'ATM par ce mécanisme va protéger le télomère de la machinerie de jonction des extrémités non homologues (NHEJ). En plus de leur rôle dans la réplication et l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN, TRF1 et TRF2 servent de plateforme de recrutement pour les autres composants du complexe shelterine.

#### **I.1.4.2 – RAP1**

La protéine Rap1 (ou hRap1) liée à TRF2 a été identifiée chez l'humain par des expériences de double hybride chez la levure comme étant l'orthologue de la protéine Rap1p chez *Saccharomyces cerevisiae* (Li et al., 2000). A la différence de la levure, Rap1 humain ne lie pas directement l'ADN, même si elle possède un domaine Myb puisque sa charge ne lui permet pas de lier l'ADN. En effet les domaines Myb possèdent des surfaces chargées positivement qui leur donnent leur capacité à lier l'ADN, comme dans le cas de TRF1 ou c-Myb, RAP1 l'humain ne possède pas ces surfaces positives ce qui peut expliquer son inhabilité à lier l'ADN (Hanaoka et al., 2001). Son interaction avec TRF2 se fait entre son domaine RCT et le domaine RBM de TRF2 et augmente la spécificité de TRF2 pour les répétitions TTAGGG (Janouskova et al., 2015).

Un rôle pour Rap1 dans l'inhibition de la jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) a été proposé. Bien qu'il ne semble pas avoir un rôle direct dans ce processus chez la souris (Sfeir et al., 2010), des évidences *in vitro* montrent que le couple TRF2/Rap1 pourrait être nécessaire pour la protection contre la NHEJ (Bae and Baumann, 2007). Rap1 semble aussi posséder un rôle dans la protection des télomères contre la recombinaison homologue puisque sa délétion induit la recombinaison des télomères (Kabir et al., 2014; Martínez et al., 2016; Sfeir et al., 2010).

#### **I.1.4.3 – TIN2**

Comme TRF1/2 TIN2 possède aussi un domaine TRFH. TIN2 interagit avec TRF1 via un site F/YxLxP et le domaine TRFH de TRF1 (Chen et al., 2008). Elle interagit aussi avec TRF2 via son domaine TRFH et le domaine de liaison a TIN2 sur TRF2. Elle permet le recrutement de TPP1 (et ainsi POT1) au sein de la shelterine aussi via son domaine TRFH. Sa principale fonction est de faire un lien entre les protéines liant l'ADN double brin (TRF1 et TRF2) et la partie de la shelterine liant l'ADN simple brin POT1 (voir figure 1A). Des évidences montrent que l'interaction de TIN2 avec TRF1 et TRF2 permet de stabiliser ces protéines sur le télomères, cette stabilisation est importante pour assurer la protection du télomère contre la réponse aux dommages à l'ADN (Kim et al., 2004). En effet la délétion de TIN2 déclenche l'activation d'ATM qui est causé par la déstabilisation de la liaison de TRF2 sur le télomère, et active aussi ATR qui est la conséquence de la perte de TPP1 et POT1 sur les télomères (Frescas and de Lange, 2014; Takai et al., 2011). TIN2 possède un rôle dans l'inhibition de PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1) au télomère, évitant la PARsylation des protéines du télomère qui pourrait réduire leur capacité à lier l'ADN et ainsi éviter la réponse aux dommages (Schmutz et al., 2017). Ainsi TIN2 joue un rôle central dans l'assemblage d'une shelterine complète sur le télomère, assurant ainsi sa protection.

#### **I.1.4.4 – TPP1 et POT1**

TPP1 et POT1 sont les protéines qui vont permettre la liaison de la shelterine à l'extrémité 3' simple brin du télomère. TPP1 (aussi appelé ACD, AdrenoCortical Dysplasia

proteïn homolog) est recrutée sur le télomère en interagissant avec TIN2 via son domaine de liaison à TIN2 (TBD) et permet de recruter la protéïne POT1 via son domaine de liaison à POT1 (PDB). Elle possède aussi un domaine OB-fold nommé « TEL patch » (TPP1 glutamate (E) and leucine (L)-rich patch) capable de lier la sous-unité hTERT, responsable de l'activité catalytique de la télomérase, via son domaine TEN. Ce domaine est un des acteurs clé pour le recrutement de la télomérase et le maintien de la longueur des télomères. En effet, il a été montré que quelques acides aminés dans le TEL patch (E169, E171 et L212) jouent un rôle critique dans le recrutement de la télomérase (Nandakumar et al., 2012). Des expériences de FISH sur l'ARN de la télomérase ont montré l'implication de ce domaine dans la localisation de la télomérase aux télomères (Nandakumar et al., 2012), et des essais directs d'activité de la télomérase montrent une interaction de la « TEL patch » avec le domaine TEN de la protéïne hTERT (Schmidt et al., 2014).

POT1 lie TPP1 via un domaine OB-fold situé sur sa moitié C-terminale. POT1 lie aussi l'ADN simple brin de l'extrémité du télomère via deux autres domaines OB-fold situés sur sa moitié N-terminale. Cette liaison semble être impliquée dans la répression de l'activation de la kinase ATR au télomère, comme le montre l'utilisation de shARN contre POT1a induisant une augmentation de la réponse aux dommages à l'ADN en phase S et G2 chez la souris (Denchi and de Lange, 2007). Le modèle actuel de protection du télomère par POT1 prédit que sa liaison à l'ADN simple brin est en compétition avec la liaison de la protéïne RPA (Replication Protein A) à l'extrémité simple brin du télomère (Gong and de Lange, 2010), et ainsi réprime l'activation d'ATR, évitant la réparation de l'extrémité par recombinaison homologue. Ce camouflage de l'extrémité 3' simple brin par POT1 est aussi suspecté de participer au contrôle du recrutement de la télomérase. Des expériences d'expression d'un mutant de POT1 tronqué de 127 acides aminés en N-terminal (sans les deux domaines OB-fold en N-terminal) montre un allongement soutenu des télomères dans des cellules cancéreuses humaines (Loayza and De Lange, 2003). Ces résultats pointent vers une compétition entre POT1 et l'interaction de l'ARN hTR avec l'ADN simple brin du télomère, réduisant ainsi l'accès de la télomérase à son substrat. Toutefois les télomères dans les cellules en continuelle division sont maintenus par la télomérase. Donc si POT1 inhibe le recrutement de la télomérase en masquant les

extrémités simple brin des télomères il doit aussi exister un mécanisme pour lever cette interaction et permettre l'accès de la télomérase à son site d'activité. Il est à noter que plusieurs mutations de POT1 sont associées à divers types de cancers (Calvete et al., 2017). Ces mutations surviennent fréquemment dans les domaines OB-fold de POT1. Les patients possédant des mutations dans ces domaines montrent des télomères plus longs, bien que POT1 soit toujours présent aux télomères (donc interagit encore avec TPP1) (Gong et al., 2020).

Bien que TPP1 et POT1 semblent avoir un rôle antagoniste dans le recrutement de la télomérase; TPP1 aide au recrutement et POT1 le réprime, ces deux protéines complexes semblent avoir un rôle important dans la stimulation de la processivité de la télomérase. Des essais directs de l'activité télomérase (*in vitro*) ont montré que la présence de TPP1 et POT1 augmentait l'extension d'amorce par la télomérase (Latrack and Cech, 2010; Wang et al., 2007).

#### **I.1.2.5 – Conséquence d'un télomère non fonctionnel**

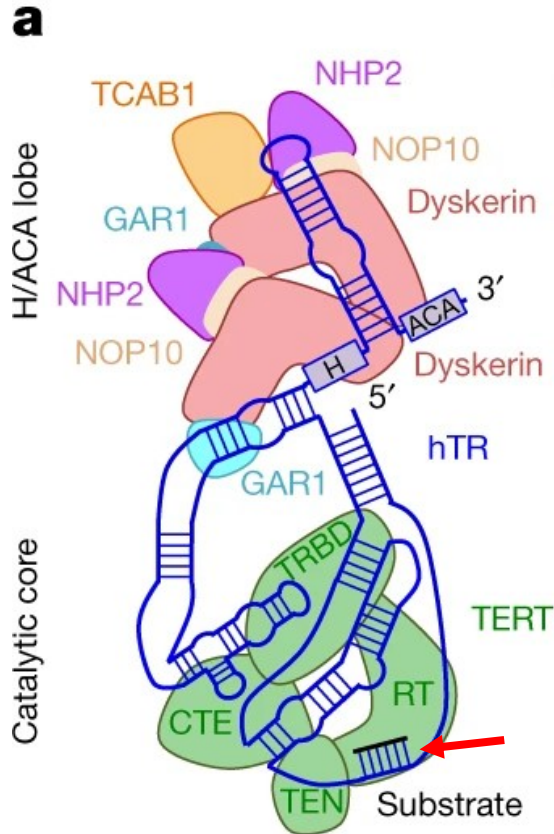
Le complexe shelterine ainsi que la formation de la t-loop sont des éléments essentiels pour protéger les extrémités des chromosomes des réponses aux dommages à l'ADN. Lors d'un dysfonctionnement de la shelterine, plusieurs voies de réparation de l'ADN peuvent intervenir et causer des aberrations chromosomiques. La NHEJ classique (c-NHEJ) est la voie prédominante de réparation chez l'humain, son action au télomère étant inhibée principalement par TRF2, ce qui prévient des fusions entre extrémités de différents chromosomes (Celli and de Lange, 2005; Smogorzewska et al., 2002). La nature répétitive des télomères les rends aussi plus prompts à être réparés par la NHEJ alternative (a-NHEJ) et la recombinaison homologue (HR), pouvant aussi mener à des fusions entre télomères (revue dans Muraki and Murnane (2018) et Doksani (2019)). Ces fusions mènent la plupart du temps à un arrêt du cycle cellulaire ou à la mort de la cellule. Mais l'activation de l'HR au télomère peut avoir un effet bien plus pernicieux en outrepassant le problème de fin de réplication de l'ADN (dans la partie suivante) et en maintenant la longueur des télomères dans 10 à 15 % des cellules cancéreuses, contournant ainsi la sénescence répllicative.



## I.2 – La Télomérase humaine

La télomérase est l'enzyme responsable de l'élongation des télomères chez la majorité des eucaryotes. Sa découverte fut faite chez le cilié *Tetrahymena thermophila* en 1985 par Carol W. Greider et Elizabeth H. Blackburn, et a été récompensé du prix Nobel en physiologie et médecine en 2009. Il avait été observé qu'au fil des générations lors d'une croissance exponentielle prolongées chez les organismes unicellulaires pouvant se diviser indéfiniment, comme des trypanosomes, les télomères pouvaient gagner en taille (Bernards et al., 1983). Il était peu probable que cette augmentation de taille des télomères soit due à une répllication classique de l'ADN à cause du problème de répllication des extrémités. En utilisant des extraits cellulaires de *Tetrahymena thermophila* sur des amorces [TTGGGG]<sub>n</sub> (séquence télomérique chez *Tetrahymena thermophila*), Greider et Blackburn ont pu observer une élongation de ces amorces par incorporation d'hexamères TTGGGG due à une activité enzymatique. Elles en ont conclu la présence d'une enzyme possédant une activité terminal transférase capable d'allonger les télomères chez *Tetrahymena*, qui fut nommé télomérase (Greider and Blackburn, 1985). Plus tard, des expériences de gel filtration ont permis de purifier la télomérase et de se rendre compte qu'il s'agit en fait d'une ribonucléoprotéine (Greider and Blackburn, 1989).

Ce complexe ribonucléoprotéique est composé d'un ARN, hTR chez l'humain, qui forme le squelette du complexe et inclut la séquence matrice pour la synthèse des télomères. Cet ARN fait partie de la famille des ARN H/ACA, possédant un domaine H/ACA constitué d'une tige-boucle 5' séparée d'une seconde tige-boucle en 3' par la boîte H (consensus ANANNA) et la boîte ACA (Chen et al., 2000; Jady et al., 2004; Mitchell et al., 1999). Ce domaine H/ACA est lié par les protéines dyskerine, NOP10, NHP2, GAR1 et TCAB1, qui sont impliquées dans la stabilité et la maturation du complexe. Enfin, la protéine hTERT possède l'activité de rétrotranscription nécessaire à l'addition de répétitions TTAGGG à l'aide de la matrice de hTR (figure I.4).



**Figure I.4 : La structure Ribonucléoprotéique du complexe télomérase.**

Ce schéma représente la structure du complexe de la télomérase humaine d'après sa résolution par électro-microscopie cryogénique. L'ARN hTR (en bleu) est le squelette du complexe, il possède la matrice d'addition de répétitions (flèche rouge). La protéine TERT n'est pas représentée en intégralité mais seulement quatre de ses domaines (en vert). Adapté de (Nguyen et al., 2018).

### I.2.1 – L'ARN hTR

hTR (human Telomérase RNA), aussi appelé TERC (Telomerase RNA Component), est un long ARN non codant de 451 nucléotides formant le cœur du complexe télomérase et dont le rôle est de maintenir la longueur des télomères. hTR est transcrit par l'ARN polymérase II. L'extrémité 3' de hTR est d'abord plus longue que la forme mature, elle peut être étendue ou polyadénylée, bien que le rôle de ces deux espèces non matures n'est pas encore connu (Goldfarb and Cech, 2013). Cette extrémité

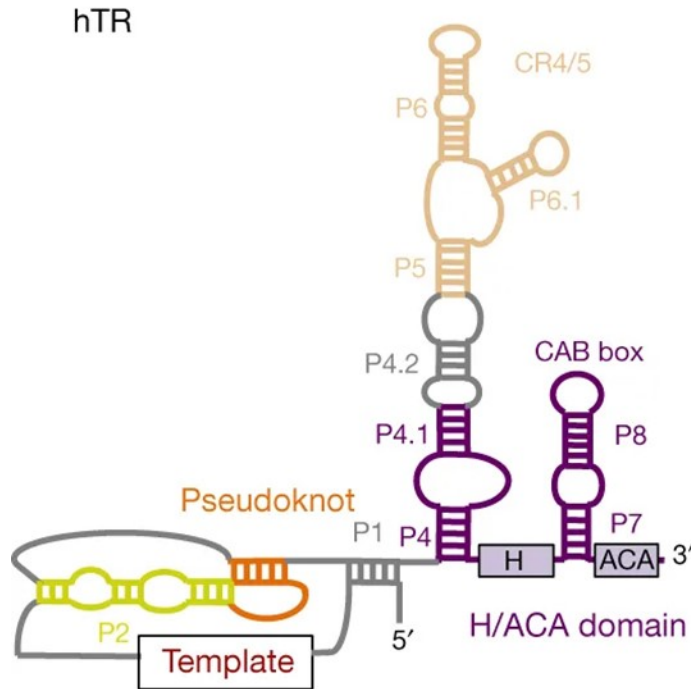
3' nécessite d'être traitée de façon post-transcriptionnelle pour que hTR soit mature et continue son trafic dans le noyau (Theimer et al., 2007). De plus, lors de sa transcription, l'extrémité 5' de hTR reçoit une coiffe m<sup>7</sup>G methylguanosine, qui deviendra plus tard hyperméthylée sous l'action de TGS1 (Trimethylguanosine synthase)(Chen et al., 2020). hTR possède des structures secondaires typiques : la matrice pour l'ajout de répétitions télomériques, un domaine pseudo-nœud et une tige boucle CR4/5 importants pour la liaison de hTERT et son activité, une tige-boucle avec une boîte CAB ainsi qu'un motif H/ACA. Ces éléments structuraux sont conservés chez les vertébrés (figure I.5)(Chen et al., 2000).

La matrice de hTR, dont la séquence est CAAUCCCAAUC, se lie à l'extrémité 3' d'un télomère et fournit l'information nécessaire pour la synthèse de séquences GGTTAG de façon répétée par la protéine hTERT.

Le domaine pseudo-nœud forme une triple hélice d'ARN et est liée par hTERT. Cette structure est requise pour l'activité de l'enzyme. En effet, une partie du pseudo-nœud forme une triple hélice jouant un rôle dans la catalyse (figure I.4) (Qiao and Cech, 2008).

Le domaine CR4/5 est une structure en tige boucle possédant une jonction de deux tiges boucles à son extrémité, les boucles P6 et P6.1. Ce domaine est nécessaire pour l'addition de répétitions télomériques, en particulier la tige boucle P6.1 essentielle pour l'activité de l'holoenzyme (Wu et al., 2017). Ce domaine interagit avec la protéine hTERT, responsable de l'activité de rétrotranscription (Nguyen et al., 2018), et l'interaction de la tige boucle P6.1 et hTERT est critique pour l'activité de l'enzyme (Chen et al., 2002).

Comme les petits ARN nucléolaires (sno-ARN) et les petits ARN spécifiques aux corps de Cajal (sca-ARN), hTR possède un domaine H/ACA à son extrémité 3'. Ce domaine permet le recrutement co-transcriptionnel de la dyskerin, NOP10, NHP2, et NAF1 (Darzacq et al., 2006). NAF1 sera remplacé par GAR1 pour former un complexe mature (Leulliot et al., 2007). La boîte CAB est liée par la protéine TCAB1 et permet son adressage au corps de Cajal (voir sections ci-dessous).



**Figure I.5: La structure secondaire de hTR**

Représentation schématique de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase humaine hTR. La structure en pseudo-nœud est en orange. Le domaine H/ACA en violet comprend la boîte CAB liant TCAB1. La protéine hTERT lie le pseudo-nœud et la tige boucle CR4/5. Adapté de (Nguyen et al., 2018).

## I.2.2 – Les protéines du complexe télomérase

### I.2.2.1 – TCAB1

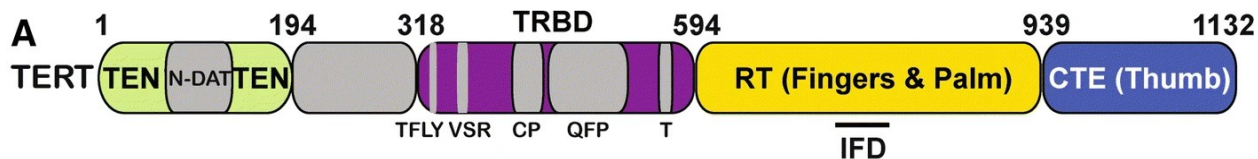
TCAB1 (pour Telomerase Cajal Body protein 1, aussi appelé WDR79 pour WD repeat-containing protein 79) est une protéine de 543 acides aminés faisant partie du complexe mature de la télomérase. Elle a été identifiée par spectrométrie de masse après purification de la dyskerine (Venteicher et al., 2009). TCAB1 est recruté sur la télomérase en interagissant avec la boîte CAB de hTR (figure I.5)(Chen et al., 2018b; Tycowski et al., 2009; Venteicher et al., 2009). Le recrutement de TCAB1 sur hTR joue un rôle dans la localisation de la télomérase aux corps de Cajal (section I.2.3). En effet, des mutations

de la boîte CAB de hTR pouvant abroger la liaison de TCAB1 sur la télomérase montrent une relocalisation de hTR des corps de Cajal vers le nucléole, hTR se comportant ainsi comme un petit ARN nucléolaire classique (Jady et al., 2004). Des mutations de TCAB1 sont retrouvées chez des patients atteints de dyskératose congénitale (DC). Cette maladie héréditaire associée à des mutations de protéine impliquée dans la fonction des télomères cause une insuffisance de la moelle osseuse résultant en un défaut de production des cellules sanguines (Savage and Alter, 2009). Ces mutations de TCAB1 conduisent à une mauvaise localisation de la télomérase aux nucléoles (Zhong et al., 2011).

Des cellules délétées ou déplétées de TCAB1 ont montré un défaut de maintenance des télomères ainsi qu'une baisse de l'activité de la télomérase (Chen et al., 2018b; Venteicher et al., 2009), liant ainsi TCAB1 et la localisation de hTR au corps de Cajal à l'activité de la télomérase. La localisation de TCAB1 sur hTR semble importante pour le repliement de la tige boucle P6.1 du domaine CR4/5 de hTR, une structure essentielle pour l'activité de l'enzyme (Chen et al., 2018b). Des expériences d'immunoprécipitations ont aussi montré que l'absence de TCAB1 réduisait l'association de TERT avec le domaine CR4/5 de hTR (Chen et al., 2018b). Ces résultats suggèrent que TCAB1 aide au bon repliement de la tige boucle CR4/5 de hTR pour assurer un bon assemblage de TERT dans le complexe télomérase et ainsi permettre son activité catalytique. Bien que la localisation de la télomérase aux corps de Cajal soit due à TCAB1, il n'est toujours pas clair si cette localisation a un rôle dans la maturation de l'holoenzyme.

### **I.2.2.2 – La protéine hTERT**

hTERT est une protéine composée de 1132 acides aminés et fournit l'activité rétrotranscriptase à la télomérase. Elle forme avec hTR les deux parties minimales à l'ajout de répétitions télomériques *in vitro* (Bachand and Autexier, 1999; Beattie et al., 1998). Elle est aussi le facteur limitant pour l'assemblage du complexe télomérase fonctionnel car elle en est le composant dont l'expression est la moins élevée et réprimée dans la plupart des cellules somatiques. Cette protéine possède quatre domaines importants pour son activité (figure I.6).



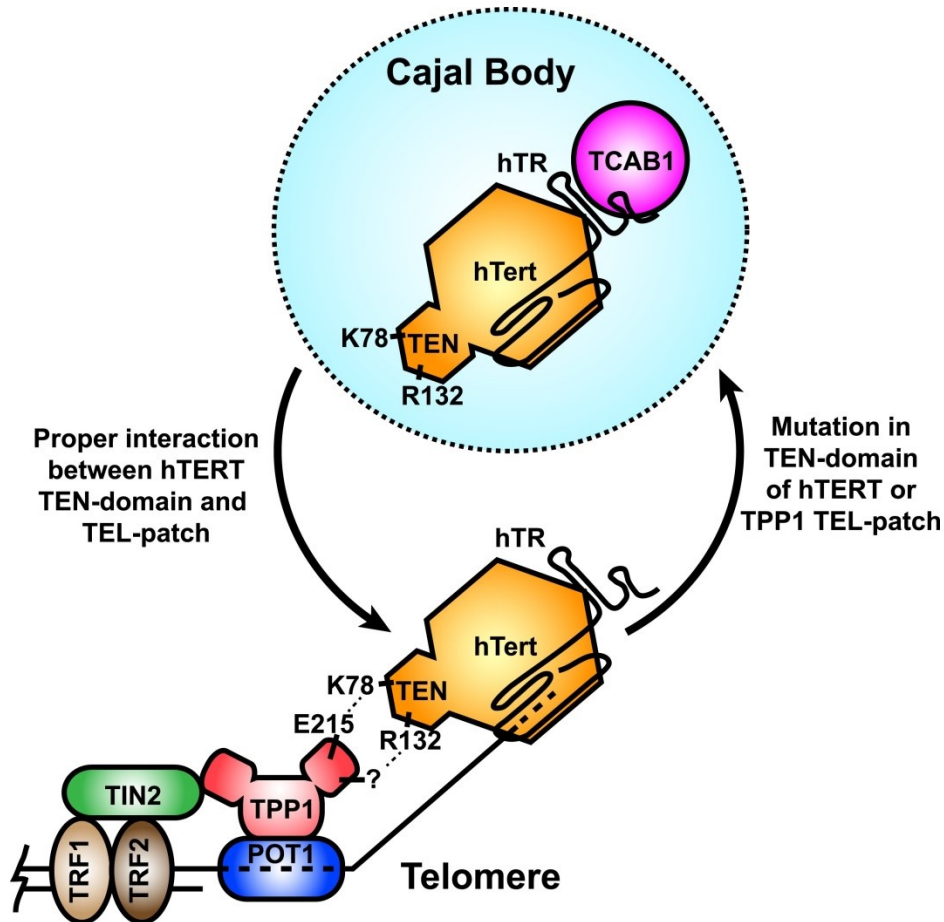
**Figure I.6 : Les sous-domaines de hTERT.**

hTERT est composé de 4 domaines fonctionnels. Le domaine TEN (Telomerase Essential N-terminal domain) en vert. Le domaine TRBD (Telomerase RNA Binding Domain) en violet, le domaine RT (RétroTranscriptase) en jaune. Le domaine CTE (C-Terminal Extension) en bleu. Adapté de (Smith et al., 2020).

Le domaine TRBD (Telomerase RNA Binding Domain) est le domaine responsable de la majorité de l'interaction entre hTERT et l'ARN hTR. Cette liaison est faite avec le domaine CR4/5, ainsi qu'avec le domaine pseudo-nœud de hTR. Le domaine RT (Reverse Transcriptase) est le domaine responsable de l'activité de synthèse de répétitions complémentaires de la matrice de hTR. Avec le domaine CTE (C-terminal Extension), ils vont former une structure en 'doigt, paume et pouce' venant entourer le domaine pseudo-nœud et la matrice de hTR assurant ainsi la bonne orientation de la matrice sur l'ADN télomérique pour l'addition de TTAGGG (Smith et al., 2020).

Le domaine TEN est essentiel pour le recrutement de la télomérase aux télomères. Plusieurs mutations ponctuelles dans ce domaine (dont K78E, R112D, G100V) réduisant la stimulation de la télomérase par TPP1-POT1, mais qui conservent l'activité enzymatique de TERT, ont été identifiées. Ces mutations montrent une grande réduction dans le recrutement de la télomérase aux télomères et indiquent la présence d'une interaction essentielle entre hTERT et TPP1 pour le maintien des télomères. De plus ces mutations causent l'accumulation de hTR aux CBs (Schmidt et al., 2014; Stern et al., 2012; Zhong et al., 2012). Des expériences ont montré que le défaut de liaison à TPP1 dans le mutant K78E de hTERT pouvait être compensé par l'expression du mutant E215K du domaine TEL de TPP1. Cette inversion de charge entre ces deux mutations permet à la fois de récupérer la colocalisation entre hTERT et TPP1 mais aussi l'allongement des

télomères et suggère fortement que l'interaction entre les deux protéines soit directe (Schmidt et al., 2014)(figure I.7).



**Figure I.7 : Le domaine TEN de TERT est important pour la localisation de la télomérase aux télomères.**

Schéma représentant l'importance du domaine TEN de hTERT et du TEL patch de TPP1 dans la localisation de la télomérase aux télomères. La mutation de ces domaine nuit à son recrutement et cause l'accumulation de hTR aux CBs. Nous pouvons voir l'interaction directe entre les acides aminés K78 de TERT et E215 de TPP1. Adapté de (Schmidt et al., 2014).

### **I.2.2.3 – Le complexe H/ACA**

La dyskérine (aussi appelé DKC1 pour Dyskeratosis Congenita 1) forme un complexe avec les protéines NOP10 (H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3) et NHP2 (H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2). Ce complexe lie les séquences H/ACA sur les snoARN et scaARN. Ces ARN vont servir de guides pour la pseudouridylation d'ARNm, ARNr, et autres petit ARNs nucléaires. Cette pseudouridylation est catalysée par la dyskérine dans le complexe. La pseudouridylation est la modification des ARNs la plus abondante, et a notamment des fonctions dans l'expression des gènes, l'épissage et la traduction (Penzo and Montanaro, 2018; Zhao et al., 2018). hTR possède des sites potentiels de pseudouridylation sur la tige-boucle P6.1 du domaine CR4/5. Cette pseudouridylation pourrait jouer un rôle dans la stabilité de cette tige-boucle, mais son rôle dans l'activité de la télomérase reste à clarifier (Kim et al., 2010).

L'ARN hTR contient lui aussi en 3' un domaine H/ACA de part et d'autre de la boîte CAB. Ce domaine recrute de façon co-transcriptionnelle le complexe H/ACA sur la télomérase (Darzacq et al., 2006). La protéine GAR1 sera recrutée plus tard par ce complexe (Leulliot et al., 2007). Ce groupe de protéine, bien que ne faisant pas partie du cœur de la télomérase responsable de l'activité enzymatique, est associé de façon stable à hTR et fait partie de l'holoenzyme mature (Nguyen et al., 2018).

Le recrutement de la dyskérine sur hTR joue un rôle crucial dans la maturation et la stabilité de la télomérase. En effet, des mutations dans la dyskérine ou de la boîte H/ACA de hTR vont augmenter la dégradation de hTR par l'exosome (Shukla et al., 2016). Cette dégradation entraîne une réduction des niveaux de hTR, qui résultera en un raccourcissement des télomères et est une des causes de la dyskératose congénitale.



## **I.2.3 – Biogénèse de hTR et sa localisation aux corps de Cajal**

### **I.2.3.1 – La synthèse et maturation de hTR**

hTR est transcrit à partir de son propre promoteur par l'ARN polymérase II. Lors de sa transcription, hTR reçoit une coiffe m<sup>7</sup>G qui sera hyperméthylée par TGS1 (voir I.2.1). Cette coiffe est importante dans la stabilité et la régulation du niveau de hTR. En effet des cellules déficientes pour TGS1 montrent une accumulation de hTR ainsi qu'une augmentation de la taille de leurs télomères (Chen et al., 2020). hTR peut être décoiffé par DCP2 (mRNA-decapping enzyme 2) dans le cytoplasme ce qui mène à sa dégradation par XRN1 (Exoribonuclease 1) (Shukla et al., 2016). Le précurseur de hTR possède une extension en 3' codé par son gène et la majorité de ces transcrits possèdent une queue poly(A) (Goldfarb and Cech, 2013). Ces précurseurs de hTR vont subir une réduction de leur extrémité 3' pour former la forme mature de hTR (Goldfarb and Cech, 2013; Roake et al., 2019). La polyadénylation du précurseur de hTR est faite par la poly(A) polymérase PAPD5 (Roake et al., 2019). Ces formes polyadénylées de hTR sont déadénylées par PARN (poly(A)-specific ribonuclease) (Moon et al., 2015). La délétion de PARN provoque une diminution de l'activité de la télomérase, un raccourcissement des télomères, une accumulation d'hTR polyadénylé, ainsi que des niveaux réduits de hTR. (Moon et al., 2015; Roake et al., 2019; Tseng et al., 2015). Ces effets montrent l'implication de PARN dans la maturation de hTR. A l'inverse la délétion de PAPD5 mène à la diminution de la forme non-polyadénylé de hTR, un plus haut niveau de hTR ainsi qu'une augmentation de l'activité télomérase (Roake et al., 2019). Ainsi ces résultats suggèrent que le niveau de hTR mature est régulé par un équilibre entre les activités de PAPD5 et PARN. Toutefois, en absence de ces deux protéines la maturation de hTR reste normale, ceci suggère l'implication d'au moins une autre exonucléase impliquée dans la dégradation de l'extension 3' encodé par le génome de hTR. Il a été proposé que cette exonucléase pourrait être TOE1, qui participe à la maturation de petit ARN nucléaires et est localisé au corps de Cajal à l'instar de hTR (Roake and Artandi (2020)).

De façon co-transcriptionnelle, hTR va être lié par le complexe H/ACA via son domaine du même nom. Ce complexe sera composé dans un premier temps de DKC1, NOP10, NHP2 et NAF1. Il a été proposé que la formation de ce complexe puisse se faire

dans le nucléole (revue dans MacNeil et al. (2016)). NAF1 sera remplacé plus tard par GAR1 pour former une RNP active potentiellement dans les corps de Cajal (Darzacq et al., 2006).

### **I.2.3.2 - La localisation de hTR aux corps de Cajal**

Les corps de Cajal (CBs) sont des compartiments subnucléaires dont le rôle principal est la modification des petits ARN nucléaires et nucléolaires impliqués dans l'épissage et la modification des ARNr, ainsi que leur assemblage en snRNP ou snoRNP (Machyna et al., 2015; Meier, 2017). La coiline est une protéine structurant les CBs, elle interagit avec de nombreux composants des CBs (comme TCAB1) et permettrait de les réunir pour former le CB (Machyna et al., 2015). La délétion de la coiline est suffisante pour perturber la formation des CBs. Les scaRNAs possèdent un domaine H/ACA comme les snoRNAs, mais ont en plus une boîte CAB qui est reconnue par TCAB1 pour leur adressage au CBs (Meier, 2017). Comme les scaRNAs, hTR possède un domaine H/ACA ainsi qu'une boîte CAB responsable de son interaction avec TCAB1 et sa localisation au CBs.

L'accumulation de hTR au CBs chez l'humain a été pour la première fois détectée au début des années 2000 par des expériences de FISH sur hTR et les CBs ont été proposés comme site de maturation et d'assemblage de la télomérase (Jady et al., 2004; Zhu et al., 2004). Cette localisation est prépondérante en phase G1 et G2, et baisse en phase S lorsque les télomères sont répliqués (Tomlinson et al., 2006). En phase S, hTR, les CBs et télomères peuvent colocaliser, menant à un modèle dans lequel la localisation au CBs de hTR favorise l'accumulation de la télomérase et son recrutement aux télomères (Jady et al., 2006). La mutation de la boîte CAB de hTR suffit pour que hTR ne soit pas localisé aux CBs (Cristofari et al., 2007). La délétion de TCAB1 cause un défaut à la fois de localisation de hTR aux CBs mais aussi réduit le recrutement de la télomérase aux télomères, induisant un raccourcissement des télomères (Stern et al., 2012; Venteicher et al., 2009; Yuan et al., 2014). Cependant l'absence de CB par la déplétion de la coiline n'a pas d'impact sur la présence de la télomérase aux télomères et permet la formation de complexes de télomérase actifs (Chen et al., 2015; Stern et al., 2012). Ces résultats

suggèrent que la formation d'une télomérase active peut être faite hors des CBs, mais requiert la liaison entre TCAB1 et hTR.

Toutefois le rôle de la localisation de hTR aux CBs reste très peu compris. L'étude de cette localisation se base principalement sur des techniques de FISH qui ne permettent pas de distinguer des molécules uniques de hTR et ainsi potentiellement donner l'impression que hTR s'accumule aux CBs. Plus récemment, le suivi en direct de hTERT dans des cellules cancéreuses vivantes a montré une localisation transitoire de cette sous-unité de la télomérase aux CBs (<1s), montrant que la localisation de la télomérase aux CBs est un processus dynamique et en opposition avec les modèles d'accumulation de hTR (Schmidt et al., 2016).

Néanmoins cette localisation aux CBs ainsi que la liaison entre hTR et TCAB1 restent importantes pour le recrutement de la télomérase aux télomères, un processus clé dans leur élongation.

## **I.2.4 – Recrutement de la télomérase aux télomères et régulation de son activité**

En plus de la régulation de l'expression des composants de la télomérase, son association aux télomères ainsi que son activité sont régulées finement par différents facteurs. Cette enzyme allonge préférentiellement les télomères courts et son recrutement aux télomères est restreint à la phase S du cycle cellulaire (Britt-Compton et al., 2009; Jady et al., 2006; Tomlinson et al., 2006).

### **I.2.4.1 – Promotion du recrutement la télomérase et de son activité**

Le recrutement de la télomérase sur son substrat, les télomères, se fait principalement par l'intermédiaire de la liaison entre le domaine TEN de hTERT et le domaine TEL de TPP1 (figure I.8a). Cette interaction demande l'assemblage d'un complexe shelterine complet, ce qui indique l'importance de ce complexe dans le maintien de la longueur des télomères. La déplétion de TPP1 par shARN montre une réduction du

recrutement de la télomérase aux télomères (Abreu et al., 2010). En plus de son rôle dans l'association de TPP1 et POT1 aux télomères, TIN2 pourrait avoir un impact sur l'activité de la télomérase. Effectivement, des cellules exprimant des mutants de TIN2 associés à la DC gardent leur capacité à recruter TPP1 aux télomères mais présentent un raccourcissement des télomères dépendant de la télomérase (Frank et al., 2015; Yang et al., 2011). De plus, la surexpression de TIN2 semble augmenter la processivité de la télomérase (Pike et al., 2019).

En plus de son rôle dans le recrutement de la télomérase, TPP1 stimule l'activité de cet enzyme via son domaine TEL (Nandakumar et al., 2012). Le couple TPP1-POT1 augmenterait la processivité de la télomérase, probablement en participant à sa rétention au télomère ou à sa translocation pour l'ajout de plusieurs répétitions successives (figure I.8b) (Latrick and Cech, 2010; Wang et al., 2007). Il reste difficile de comprendre comment TPP1 et POT1 influent sur la processivité de la télomérase car il n'existe pas de méthode de visualisation de cette processivité *in vivo*.

La kinase ATM est aussi un régulateur positif de la télomérase, comme le montre l'utilisation de siARN ciblant ATM et d'inhibiteur d'ATM qui provoquent un défaut dans la maintenance de la longueur des télomères et dans le recrutement de la télomérase (Lee et al., 2015; Tong et al., 2015). Le processus par lequel ATM promeut le recrutement de la télomérase et l'élongation des télomères est encore flou. Il a été proposé qu'ATM phosphoryle TRF1 et que cette modification provoque la dissociation de TRF1 et sa dégradation par le protéasome (McKerlie et al., 2012; Tong et al., 2015). Ainsi, la dissociation de TRF1 peut induire un blocage de la fourche de réplication lors de la réplication du télomère (Sfeir et al., 2009) et le blocage de la fourche de réplication induit par un traitement à l'aphidicoline facilite le recrutement de la télomérase (Tong et al., 2015). Bien que le recrutement induit dans cette expérience semble principalement dû à ATR, ATR est connu pour phosphoryler ATM en réponse à un blocage de la fourche de réplication (Stiff et al., 2006). Toutefois bien qu'ATR ait un rôle dans l'activation de la télomérase, l'impact de cette kinase semble être minime par rapport aux effets observés avec ATM. Ces résultats suggèrent qu'ATM régule positivement la télomérase par des voies encore inconnues.

L'hélicase RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1) est aussi impliquée dans la promotion de la réplication des télomères. RTEL1 est recrutée aux télomères par TRF2 et participe au dépliement de la boucle-T par perturbation de la boucle D via son activité hélicase (Barber et al., 2008; Sarek et al., 2016). Ceci permettrait de libérer l'extrémité 3' simple brin du télomère et ainsi faciliterait le recrutement de la télomérase. La déplétion de RTEL1 par siARN mène à un raccourcissement des télomères dépendant de la télomérase dans des cellules possédant des télomères longs, suggérant que cette enzyme est un régulateur positif de la télomérase (Porreca et al., 2018). Cette déplétion de RTEL1 a aussi pour conséquence la réduction de taille de l'extrémité simple brin riche en G des télomères, pointant vers un rôle de cette hélicase dans leur stabilité. Ainsi en évitant la formation de quadruplex de guanines à l'extrémité des télomères, RTEL1 favoriserait l'accès de la télomérase (Porreca et al., 2018).

#### **1.2.4.2 – Répression du recrutement de la télomérase et de son activité**

Bien que des protéines de la shelterine puissent jouer un rôle dans le recrutement et l'activation de la télomérase, comme TPP1 et POT1, ce complexe participe aussi dans la répression de ces processus. Les protéines TRF1 et TRF2 ont été identifiées comme régulateur négatifs de la télomérase. La surexpression de ces deux protéines dans des cellules cancéreuses engendre un raccourcissement des télomères et un levée de cette surexpression montre un rallongement des télomères (Smogorzewska et al., 2000). Le nombre de copies de ces protéines au sein d'un télomère est corrélé avec la longueur de celui-ci, cette corrélation pointe vers l'hypothèse que TRF1 et TRF2 sont des indicateurs de la longueur des télomères, ainsi un télomère court présentera un plus faible nombre de TRF1 et 2 levant ainsi l'inhibition du recrutement de la télomérase pour son élongation (Erdel et al., 2017; Smogorzewska et al., 2000). Cette répression est possiblement due au fait que TRF2 participe à la mise en place de la boucle-T (Doksani et al., 2013). La formation de cette structure empêche l'accès de la télomérase à l'extrémité 3' simple brin du télomère. POT1 est connu pour pouvoir activer la processivité de la télomérase, mais elle a d'abord été identifiée comme participant à la répression du recrutement de la télomérase (Latrack and Cech, 2010; Loayza and De Lange, 2003). La mutation des

domaine OB-fold à l'extrémité N-terminal de POT1 résulte en une augmentation de la taille des télomères, probablement en limitant l'hybridation de la matrice de hTR sur cette extrémité (Kelleher et al., 2005; Loayza and De Lange, 2003). Cependant, des expériences de FISH sur hTR dans des cellules exprimant des mutants de POT1 ou des shARN contre POT1 n'ont pas montré de différence dans le recrutement de la télomérase aux télomères en comparaison de cellules exprimant POT1 sauvage (Abreu et al., 2010; Gu et al., 2017). Ce dernier point illustre l'absence de validation expérimentale pour la fonction de POT1 dans l'inhibition du recrutement de la télomérase aux télomères *in vivo*.

La protéine RAP1, recrutée par TRF2, a aussi été identifiée comme régulateur négatif de la longueur des télomères, mais son mode d'action est peu clair. La surexpression de mutants de RAP1 n'affectant pas son association avec TRF2 induit un allongement des télomères. Ce résultat pointe vers un mécanisme agissant en *cis* pour le contrôle de la longueur des télomères, il est possible que RAP1 lie un régulateur positif de la longueur des télomères et limite son effet (Li and de Lange, 2003). Il existe aussi des hélicases pouvant inhiber l'activité de la télomérase. Notamment l'hélicase Pif1p chez *Saccharomyces cerevisiae* participe à la dissociation des hybrides ADN/ARN et favorise la dissociation de la télomérase de l'extrémité du télomère, limitant ainsi l'action de la télomérase, et l'addition *de novo* de répétitions télomériques sur le site d'une cassure double brin de l'ADN (Boule et al., 2005; Boule and Zakian, 2007). L'homologue PIF1 humain semble avoir la même fonction puisque sa surexpression dans des cellules cancéreuses a pour effet de réduire la taille des télomères, cette protéine réduisant aussi l'activité de la télomérase *in vitro* (Zhang et al., 2006). D'autres travaux ont aussi montré que cette hélicase co-immunoprecipite avec TERT (Mateyak and Zakian, 2006). De plus son pic d'expression est en fin de phase S/début G2, comme chez la levure renforçant l'idée d'un mécanisme conservé durant l'évolution (Mateyak and Zakian, 2006). Cependant ce rôle ne paraît pas conservé chez toutes les espèces, en effet chez la souris bien que mPif1 puisse interagir avec hTERT, sa délétion n'a pas d'impact sur la taille des télomères (Snow et al., 2007).

L'ARN TERRA (Telomeric Repeats-containing RNA), un ARN non-codant transcrit à partir des télomères et contenant des répétitions télomériques, a été identifié comme

régulateur de la télomérase. Il a d'abord été observé qu'un oligonucléotide analogue à TERRA peut inhiber la télomérase humaine *in vitro* (Redon et al., 2010), cette inhibition pouvant se faire par la liaison de TERRA sur hTR (Azhibek et al., 2016). Toutefois, le rôle dans la régulation négative de la longueur des télomères par TERRA est discuté. En effet TERRA peut aussi lier la ribonucléoprotéine hnRNPA1 présente au télomère, et cette dernière est capable d'inhiber la télomérase en liant l'extrémité des télomères (Redon et al., 2013). Ainsi il a été proposé qu'un équilibre entre TERRA et hnRNPA1 pourrait exister pour réguler l'accès de la télomérase aux télomères. Si le nombre de molécules de TERRA comparativement à hnRNPA1 est faible, peu de hnRNPA1 seraient liés par TERRA, laissant une partie de hnRNPA1 accéder aux télomères et inhiber la télomérase. Inversement, si TERRA est en grand nombre comparativement à hnRNPA1, cela laisserait des molécules de TERRA liant la télomérase et inhibant son recrutement. Dans le cas où les deux molécules seraient en équilibre, elles interagiraient ensemble libérant l'accès de la télomérase aux télomères (Redon et al., 2013). Il est à noter qu'un rôle d'activateur de la télomérase est proposé chez la levure où TERRA est produit à partir d'un télomère court et guide la télomérase vers celui-ci pour son élongation (Cusanelli et al., 2013; Moravec et al., 2016).

Un autre régulateur négatif de la télomérase est le complexe CST, qui est composé des protéines Ctc1, hStn1 et hTen1. Ce complexe est connu pour interagir avec les séquences riches en guanine du télomère (Hom and Wuttke, 2017). Des expériences de shARN ciblant les trois composantes de ce complexe ont montré une augmentation de la taille des télomères, associée à la télomérase et constante au fil des générations de cellules épithéliales cancéreuses (Chen et al., 2012). Ces résultats ont identifié le complexe CST comme un régulateur négatif de la télomérase. Cette régulation passe par une réduction de l'activité de la télomérase, comme suggéré par des expériences d'essais directs de télomérase en présence du complexe CST *in vitro* (Chen et al., 2012). Ce complexe interagit avec l'ADN polymérase  $\alpha$ -primase, nécessaire pour la synthèse d'une amorce pour débiter la synthèse du brin riche en C du télomère. Il a donc été proposé que le complexe CST participe à l'arrêt de l'activité de la télomérase dans le but de terminer la réplication du télomère (figure 1.8c). Ce complexe est conservé durant l'évolution, chez la levure *S.cerevisiae*, le complexe CST est composé de Cdc13, Stn1 et

Ten1 et a une fonction similaire à la fois à TPP1 et au complexe CST chez l'humain. Cdc13 est recruté aux télomères en phase S et permet le recrutement de la télomérase, en phase G2 Stn1 et Ten1 seront recruté pour former le complexe CST, ceci inhibe la liaison de la télomérase à Cdc13 et permet la synthèse du brin riche en C (Vasianovich et al., 2019).





## I.2.5 - Stœchiométrie de la télomérase

La télomérase humaine est-elle active sous forme monomérique ou dimérique ? Cette question a fait l'objet de quelques travaux aux cours des vingt dernières années. En 2001, des travaux de filtration sur gel sur des complexes minimaux de télomérase reconstitués *in vitro* (hTERT+hTR) ont montré une dimérisation du complexe (Wenz et al., 2001). Plus tard, la purification de télomérase à partir de cellules "super-télomérase" a permis de confirmer cette dimérisation par microscopie électronique sur des télomérases liées à un oligonucléotide 5'-(TTAGGG)<sub>2</sub>-3' mimant son substrat (Sauerwald et al., 2013). Les modèles proposés pour l'élongation des télomères par ces dimères est que soit le complexes allonge deux télomères en parallèle, ou allonge un seul télomère et change de matrice lors de la translocation de l'enzyme (Wenz et al., 2001). Cependant, des travaux plus récents suggèrent que la purification de télomérase minimale tendrait vers la création de dimères de télomérase (Wu et al., 2015). Ces mêmes travaux ont permis la purification d'un mélange de monomères et de dimères liés à de l'ADN complémentaire de la matrice de hTR. La séparation des dimères et monomères a montré que la forme active de la télomérase est monomérique (Wu et al., 2015). La monomérisation du complexe a été confirmée en 2018 par cryo-microscopie électronique révélant la structure d'une télomérase complète lié à des répétitions télomériques (Nguyen et al., 2018).

Le modèle d'une télomérase monomérique est renforcé par le fait que cette caractéristique paraît conservée au cours de l'évolution. En effet la structure monomérique du cœur de la télomérase a pu être caractérisée par cryo-microscopie électronique chez *T. thermophila* (Jiang et al., 2015). Cette monomérisation a aussi été observée chez *S. cerevisiae* par des expériences de FISH utilisant des ARN *TLC1* marqué par PP7 et MS2 simultanément dans le noyau de levures (Bajon et al., 2015). Cependant bien que les dernières évidences suggèrent que la télomérase active est monomérique, la stœchiométrie du complexe aux télomères reste encore à déterminer de façon claire.

## I.2.6 – Télomérase et cancer

La grande majorité (plus de 80%) des cancers maintiennent leurs télomères via l'activation de la télomérase (Chen and Chen, 2011; Shay and Bacchetti, 1997). Le reste des cancers repose sur le mécanisme ALT (Alternative lengthening of telomeres) basé

sur la recombinaison homologue pour maintenir la longueur de leurs télomères. Le recouvrement de l'activité de la télomérase est lié à la réexpression de hTERT dans des cellules somatiques. Ceci est causé par des mutations dans le promoteur proximal du gène *hTERT*, et sont parmi les mutations les plus communes dans différents types de cancers. Ces mutations, en plus d'autres mutations dans des oncogènes, contribuent à la longévité des cellules cancéreuses (Shay, 2016). L'expression de hTERT n'a pas besoin d'être forte ou continue pour augmenter de façon significative l'espérance de vie d'une cellule ou lui permettre de continuer à proliférer (Ouellette et al., 2000; Steinert et al., 2000). Les mutations du promoteur de TERT promeuvent l'expression de cette protéine, ce qui résulte en un allongement des télomères et donc à une augmentation de la capacité de division de la cellule.

Parmi les mutations les plus récurrentes sont les C228T et C250T localisés environ 100 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *TERT* (Weinhold et al., 2014). Ces mutations créent un site de liaison aux facteurs de transcription ETS (E26 transformation specific). Le facteur GABP $\alpha$  lie ce site et promeut la transcription de l'ARNm *hTERT* (Bell et al., 2015). En mesurant l'importance de la télomérase dans l'immortalisation des cellules cancéreuses, il devient évident que la compréhension de son activité est importante pour le développement de traitement anti-cancer. A l'heure actuelle, aucun traitement ciblant la télomérase n'est disponible en clinique, mais certains ont déjà fait l'objet d'études cliniques (Shay, 2016). Cependant certaines drogues sont développées comme agent anti-cancéreux ciblant l'activité de la télomérase. Par exemple, le GRN163L (aussi appelé Imetelstat) a fait l'objet d'essais cliniques (Jafri et al., 2016). Ce composé chimique est un oligonucléotide complémentaire à la matrice de la télomérase fusionné à un groupe lipide. Il agit comme un inhibiteur du recrutement de la télomérase par compétition avec l'hybridation de hTR avec l'ADN télomérique (Schmidt et al., 2018b). Cependant l'utilisation de cette drogue nécessite de nombreuses divisions cellulaires pour montrer un effet et permettre aux télomères d'être suffisamment courts pour déclencher l'entrée en sénescence.

Étant donné l'importance de la télomérase dans la formation de cancers, l'étude de sa régulation est primordiale pour permettre d'identifier de nouvelles cibles potentielles

pour des traitements anticancéreux. Récemment, des travaux ont montré que le recrutement de la télomérase aux télomères est un processus dynamique (Gallardo et al., 2011; Schmidt et al., 2016) et révèle l'importance de pouvoir suivre des particules uniques du complexe télomérase dans des cellules vivantes. Dans cette optique la création d'un système permettant de suivre l'ARN de la télomérase serait d'une utilité majeure pour à la fois mieux comprendre la régulation son recrutement aux télomères mais aussi sa dynamique intranucléaire lors de sa biogénèse.

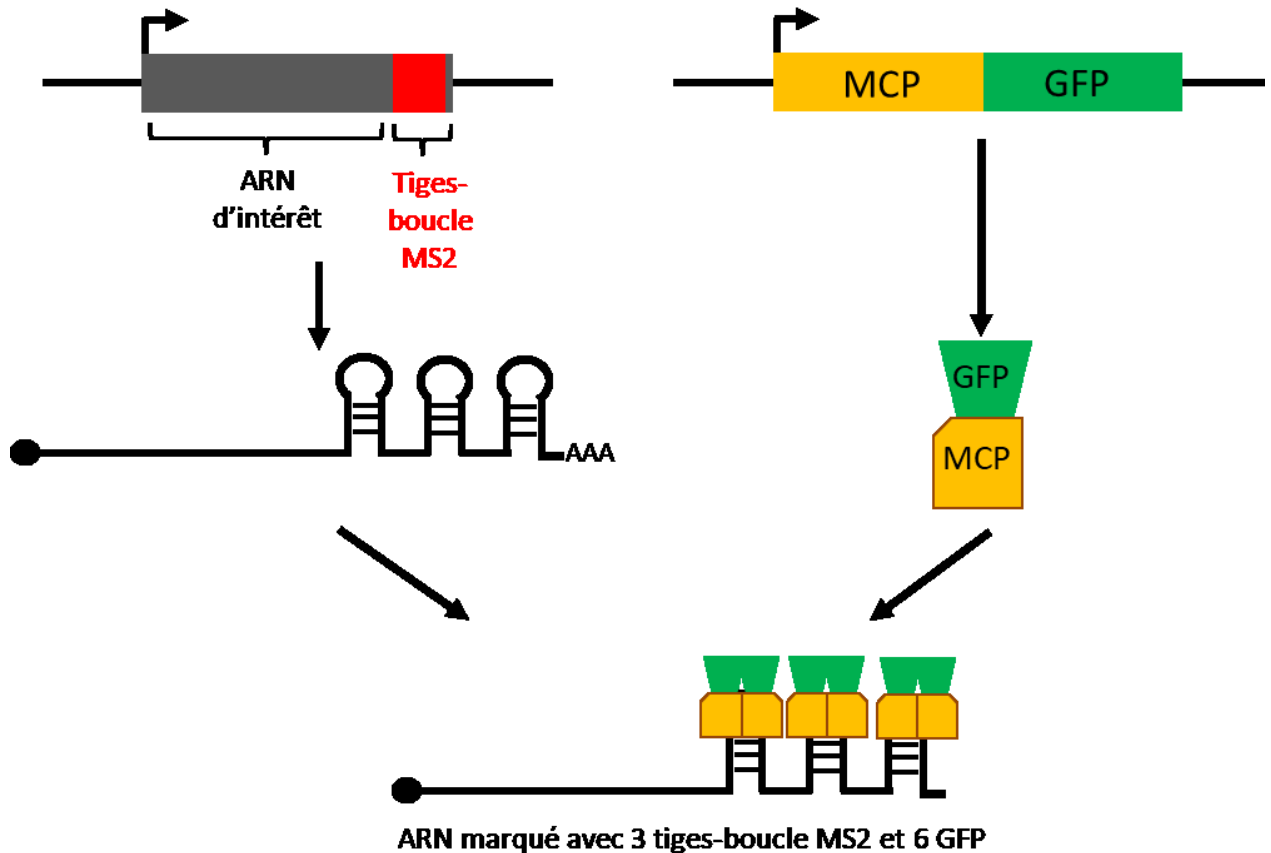
## **I.3 - Approches d'imagerie de l'ARN en cellules vivantes**

### **I.3.1 - Le système MS2 comme méthode de marquage de l'ARN *in vivo***

La visualisation des ARNs par microscopie à fluorescence apporte d'importantes informations sur leurs localisations et leurs fonctions, que ce soit pour l'expression des ARN messagers, ou la fonction d'ARN non codant. Cette visualisation est souvent faite par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui utilise des sondes chimiquement marquées par des fluorophores sur des cellules fixées. Le fait que cette technique requiert une étape de fixation limite grandement la résolution temporelle, rendant difficile l'étude du trafic intracellulaire d'ARN, et impossible d'observer leur mouvement. Pour visualiser des processus rapides, il est nécessaire d'utiliser des techniques de marquage de l'ARN en cellules vivantes.

Pour visualiser des molécules d'ARNs uniques en cellules vivantes, une approche est de les marquer avec une protéine de liaison spécifique à l'ARN d'intérêt fusionnée à un fluorophore (comme par exemple la GFP). Trouver une protéine de liaison spécifique à un seul ARN se révèle compliqué, du fait que les protéines de liaison à l'ARN endogènes à une cellule peuvent interagir avec de nombreux ARN. Une solution est d'insérer sur l'ARN d'intérêt une structure ne pouvant être reconnue que par une protéine exprimée de façon exogène. La méthode la plus utilisée et pratique reposant sur ce principe pour l'étude d'ARN est l'utilisation du système MS2 (figure I.9).

Le système MS2 est issu du bactériophage MS2. L'ARN de ce virus bactérien possède une structure en tige boucle qui est reconnue spécifiquement par la protéine virale MCP (MS2 coat protein). La liaison de cette protéine MCP à une tige boucle MS2 unique sur l'ARN viral participe à l'encapsidation du génome du bactériophage. La protéine MCP possède une très grande affinité pour la tige boucle MS2 ( $K_d=3nM$ ) (Lim and Peabody, 1994). Aussi pour se lier à une tige boucle MS2, MCP forme un dimère. Ce système tige boucle MS2/protéine MCP a été modifié pour l'utilisation en laboratoire. L'insertion de plusieurs tiges boucles MS2 sur un ARN permet la liaison spécifique de MCP sur celui-ci. Ainsi en fusionnant une GFP à MCP, il est possible de visualiser et de suivre en temps réel un ARN contenant des tiges-boucles MS2 par microscopie à fluorescence (figure I.9).



**Figure I.9 : Le marquage d'un ARN par le système MS2**

Deux composants sont nécessaires pour marquer un ARN avec le système MS2 : l'insertion de tige-boucle MS2 sur l'ARN d'intérêt (en rouge) et l'expression de la protéine MCP (ici MS2-BP en jaune) fusionnée à une protéine rapporteuse (ici GFP en vert). La protéine MCP forme des dimères et vient former une interaction stable avec les tige-boucle MS2 sur l'ARN d'intérêt.

La première utilisation du système MS2 pour la visualisation d'ARN en temps réel par microscopie a été faite pour l'étude de l'ARN messager *ASH1* chez *Saccharomyces cerevisiae* dans le laboratoire du Dr. R.H. Singer en 1998 (Bertrand et al., 1998). Ceci a nécessité deux composantes, d'une part l'expression de la protéine de fusion MCP-GFP contenant une séquence de localisation nucléaire (NLS) à partir d'un plasmide. D'autre part, l'expression d'ARN rapporteur contenant six tiges-boucles MS2 (de 19 nucléotides chacune) suivi du 3'UTR de l'ARNm *ASH1*. Ces deux composantes ont permis la localisation de l'ARNm rapporteur *in vivo*. Ainsi, le système MS2 fourni un excellent outil

pour la visualisation d'ARN en temps réel dans des cellules vivantes. De plus en jouant avec le nombre de tiges-boucles ainsi que l'expression de MCP-GFP, il est possible de moduler le signal émis par l'ARN d'intérêt pour une observation optimale en fluorescence. Il est aussi à noter que ce système peut être versatile dans son utilisation; par exemple, il peut aussi être utilisé pour immunoprécipiter un ARN cible (Cusanelli et al., 2013).

D'autres méthodes de marquage de l'ARN existent pour l'imagerie d'ARN uniques en cellules vivantes. Le système PP7 est dérivé du bactériophage PP7 et fonctionne de façon similaire à MS2 et les deux peuvent être utilisés en combinaison. Il requiert l'insertion de tige-boucles PP7 sur l'ARN cible, ces tige-boucles seront reconnues spécifiquement par la protéine PCP (PP7 coat protein) qui peut être fusionnée à une protéine fluorescente (Bensidoun et al., 2016). De même, le système  $\lambda_N$  utilise des structures boxB en série sur l'ARN qui seront liées par le peptide  $\lambda_{N22}$  fusionné à un fluorophore (Daigle and Ellenberg, 2007). L'utilisation d'aptamères comme Spinash ou Mango permettent aussi de localiser des ARNs par fluorescence. Ces séquences d'ARN forment une structure secondaire capable de lier spécifiquement un ligand organique fluorogène. Ce ligand a la particularité de ne pas être fluorescent lorsqu'il est libre, mais sa stabilisation en liant l'aptamère augmente sa fluorescence, permettant de créer un fort ratio signal/bruit (Ouellet, 2016). Enfin, l'utilisation de Cas9 ou Cas13 sans activité nucléase (dCas9 ou dCas13) fusionné à une protéine fluorescente peut aussi marquer un ARN pour son imagerie. Cette fois ci, l'ARN cible sera reconnu par un ARN guide lié à Cas9/13 permettant ainsi son marquage (Nelles et al., 2016).

Un des intérêts de pouvoir suivre des ARN en cellules vivantes est de pouvoir étudier leur dynamique. Ceci nécessite de pouvoir observer des particules uniques d'ARN par microscopie sur cellules vivantes.

### **I.3.2 - L'imagerie de molécules fluorescentes uniques et le suivi de particules uniques dans des cellules vivantes**

L'observation de molécules uniques permet d'étudier des processus avec plus de précision que les méthodes biochimiques classiques, dans lesquelles des étapes de ce

processus ne peuvent pas être mesurées, car masquées par le grand nombre de molécules ou d'évènements observés en même temps, donc regroupés en une moyenne du total des évènements. L'observation de molécules individuelles dans des cellules vivantes permet de mieux comprendre certains mécanismes biologiques comme, par exemple, la régulation de l'expression des gènes par des facteurs de transcription (Chen et al., 2014; Elf et al., 2007), la dynamique des ARN (Gallardo et al., 2011; Shav-Tal et al., 2004), la traduction des ARN messagers (Wu et al., 2016; Yan et al., 2016) ou la dynamique protéique dans des compartiments cellulaires spécifiques (Konig et al., 2020).

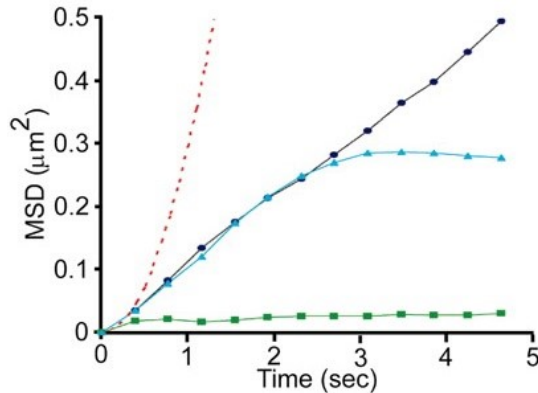
Pour parvenir à étudier des mécanismes dynamiques au niveau de molécules individuelles en cellules vivantes, il est nécessaire d'utiliser l'imagerie par microscopie en fluorescence. Les principaux critères à atteindre pour visualiser des molécules uniques par microscopie à fluorescence est 1) de produire le meilleur ratio signal sur bruit de fond possible et 2) capturer les images suffisamment rapidement pour détecter les particules en mouvement. Pour ceci, un des moyens utilisé est d'éliminer la captation de photons hors focus. Cela peut être atteint avec l'utilisation d'un microscope confocal à disque rotatif qui permet de diminuer la phototoxicité sur les cellules grâce au plus faible nombre de photons illuminant chaque point de l'échantillon. L'appareil doit être équipé de composants optiques et électroniques suffisamment performants pour donner une résolution optique suffisante pour qu'une seule particule fluorescente soit visible de façon ponctuelle. Ainsi, l'utilisation d'un objectif à fort grossissement avec une grande ouverture numérique sera nécessaire pour avoir une bonne résolution optique et recueillir suffisamment de lumière. Aussi l'utilisation d'une camera EM-CCD (Electro multiplying charged coupled device) est recommandée pour sa capacité à détecter de faibles sources lumineuses et sa haute vitesse d'acquisition. De plus l'utilisation de cellules vivantes donne la possibilité d'observer le mouvement de notre molécule marquée, pour permettre la meilleure évaluation possible de son mouvement le matériel doit pouvoir fournir une résolution temporelle suffisante. Le mouvement des molécules observées sera analysé par suivi de particules uniques à partir de films.

Le traçage de particules uniques (Single Particle Tracking ou SPT) est une technique d'analyse d'image permettant de suivre, avec l'aide d'algorithmes, des



molécules individuelles d'intérêts selon leurs trajectoires à partir de films. Les images obtenues par microscopie optique sont analysées par un algorithme informatique qui va dans un premier temps détecter les "spots" individuels, créés par la fluorescence de notre molécule d'intérêt, sur chaque image d'un film. Cette détection est basée sur la prédiction de la fonction d'étalement d'un point pour la localisation du centroïde de chaque spot présent sur une image. Cette approximation est faite la plupart du temps grâce à l'adaptation d'une fonction gaussienne sur la variation de fluorescence d'une particule (Manzo and Garcia-Parajo, 2015; Shen et al., 2017). Le but de cette étape est de pouvoir détecter chaque particule d'une image de façon séparée. Pour ceci le matériel de microscopie utilisé est très important, car une meilleure résolution spatiale permet de mieux séparer les particules (Manzo and Garcia-Parajo, 2015). La seconde étape du suivi est de déterminer la trajectoire d'une particule au cours du temps. L'algorithme doit identifier quels spots sur deux images successives dans le temps appartiennent à la même particule pour pouvoir les lier et ainsi déterminer le déplacement d'une particule entre deux images. Ces liens entre spots peuvent être faits par recherche des voisins les plus proches (Manzo and Garcia-Parajo, 2015). Pour cette étape, une résolution temporelle adaptée au processus étudié est nécessaire pour éviter le plus possible que deux particules différentes soit liées incorrectement entre elles. L'analyse de ce suivi va permettre de déterminer des paramètres cinétiques des particules étudiées, comme leur vitesse, leur coefficient de diffusion, le déplacement carré moyen (MSD) ou leur rayon de giration ( $R_g$ ) (Gal et al., 2013; Manzo and Garcia-Parajo, 2015).

Le MSD est le calcul du déplacement carré moyen au cours du temps. Il va représenter une accumulation de mouvements au cours du temps. Les courbes tracées par le MSD vont permettre de déterminer le type de mouvement d'une particule, qu'elle possède une diffusion libre, un mouvement dirigé ou contraint (figure I.10). Cette mesure a été une des plus utilisées pour l'étude du mouvement des particules. Un MSD augmentant rapidement correspond à une molécule diffusant librement, tandis qu'un MSD atteignant un plateau signifiera une molécule contrainte dans l'espace. Cependant, plus les temps de suivi sont long, plus cette technique perd en précision, et il est conseillé de l'utiliser avec une méthode d'analyse complémentaire, comme le rayon de giration (Gal et al., 2013).



**Figure I.10 : Courbe MSD de différents mouvements de particules caractérisées**

Grphe représentant le MSD en fonction du temps d'ARN messenger suivi dans le nucléoplasme présentant différents types de mouvements mesurer: diffusif (points noirs), restreint (triangles bleus), statique (carrés verts) ou dirigé (théorique, pointillés rouges). Adapté de (Shav-Tal et al., 2004).

Le Coefficient de diffusion permet aussi de déterminer le comportement de molécules au sein d'un environnement. Il est influencé par les interactions que la particule étudiée possède avec son milieu. Il est défini par l'équation de Stokes-Einstein qui prend en compte le rayon de la particule étudiée, et la viscosité du milieu liquide (voir équation sous ce paragraphe). Il peut aussi être calculé à partir de la pente de la courbe du MSD. Un haut coefficient de diffusion reflète un mouvement libre d'une particule, alors qu'un coefficient de diffusion faible signifiera un mouvement très limité.

Équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi r_s \eta}$$

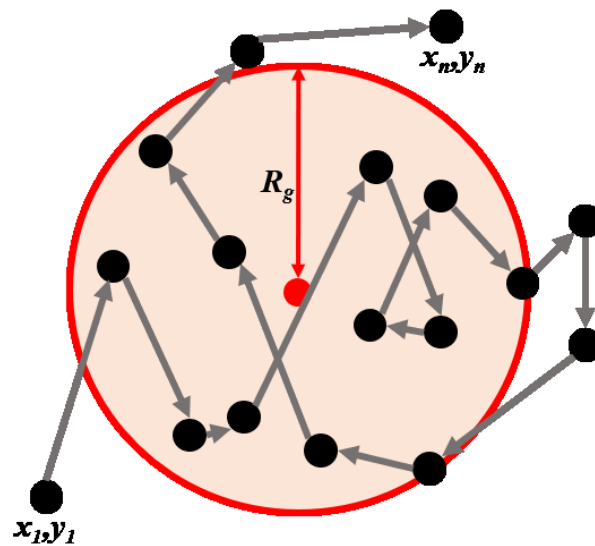
$D$  est le coefficient de diffusion de la particule (en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $k$  est la constante de Boltzmann ( $1.23 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ ),  $r_s$  est le rayon de la particule (en m), et  $\eta$  est la viscosité du solvant (en kg/ms).

Le rayon de giration est l'évaluation de la propagation de la trajectoire d'une particule (figure I.11). Une trajectoire avec un rayon de giration élevé caractérise une

particule qui visite une plus grande aire qu'une particule avec un faible rayon de gyration, dans un le même temps. Il est calculé par la moyenne de la distance entre le centre de masse de la trajectoire et la position de la particule à chaque temps d'observation.

Équation du Rayon de gyration :

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i^n ((x_i - \bar{X})^2 + (y_i - \bar{Y})^2)}$$

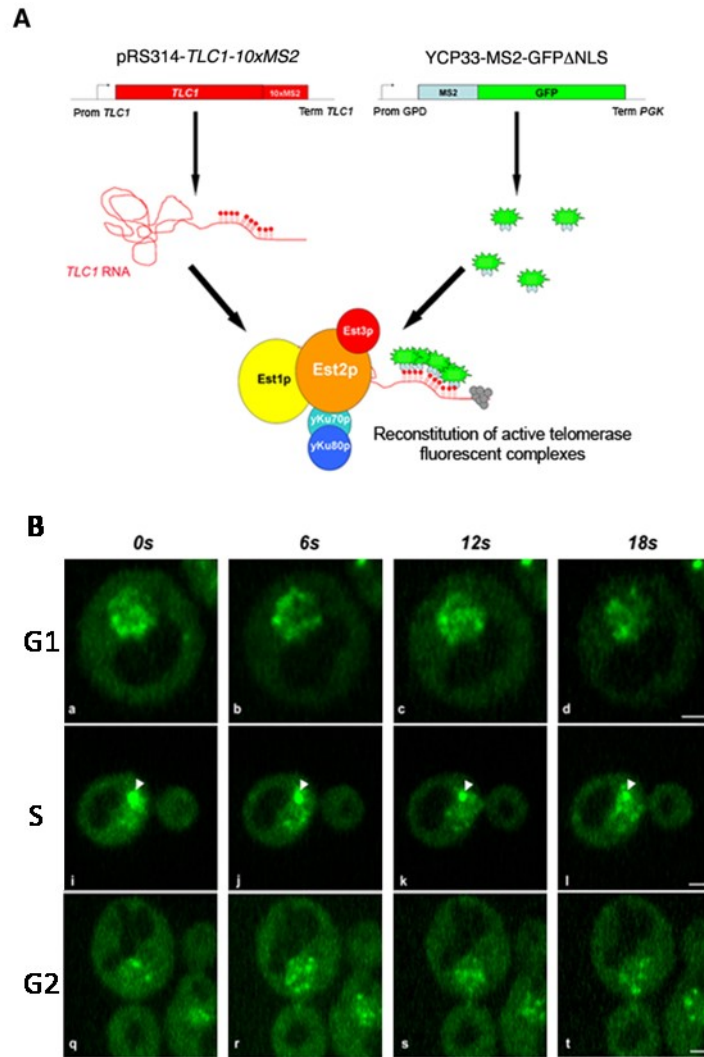


**Figure I.11 : Illustration du Rayon de gyration de la trajectoire d'une particule**

Le rayon de gyration  $R_g$  (flèche rouge) est calculé à partir de chaque point  $(x_1, y_1$  à  $x_n, y_n)$  de la trajectoire (flèches grises) d'une particule (ronds noirs).

## I.4 – La dynamique de la télomérase en cellules vivantes

L'analyse de la télomérase au niveau moléculaire dans des cellules vivantes n'a fait l'objet pour l'instant que de quelques études. La première visualisation de la télomérase en temps réel dans des cellules vivantes a été faite chez la levure *S. cerevisiae* avec l'utilisation du système MS2 pour marquer l'ARN *TLC1* (Figure I.12A) (voir Annexe I) (Gallardo et al., 2011; Laprade et al., 2017). Ceci a pu révéler la dynamique de la télomérase dans le noyau de levure au cours du cycle cellulaire. La télomérase de levure diffuse librement dans le noyau en phase G1 et G2, suggérant que s'il y a interaction avec un télomère celle-ci n'est transitoire. En phase S, phase d'élongation des télomères, plusieurs molécules de télomérase se regroupent et sont localisées au télomères pour former des T-Recs (Telomerase Recruitment clusters) suggérant qu'une interaction stable avec les télomères ne se fait seulement en phase S et que plusieurs molécules de télomérase se trouve sur au niveau de leur substrat lorsque l'élongation est possible (figure 12B)(Gallardo et al., 2011).



**Figure I.12 : Visualisation de la dynamique de l'ARN *TLC1* chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

**A)** Schéma représentant le marquage de l'ARN *TLC1* par le système MS2. Dix tige-boucles MS2 sont présentes en 3' de l'ARN *TLC1* et sont liées par 20 protéines fluorescentes MCP-GFP (ou MS2-GFP dans le schéma). Ces deux éléments permettent la reconstitution complète d'une RNP active. **B)** Visualisation de l'ARN *TLC1*-MS2 dans des noyaux de levure par microscopie à fluorescence dans les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S et G2). L'apparition de clusters d'ARN *TLC1* dans les cellules en phase S est indiquée par des pointes de flèches blanches. Image tirée de Gallardo et al. (2011).

La première observation de particules uniques de télomérase dans des cellules humaines vivantes a été produite avec le marquage de hTERT avec le système HaloTag (Schmidt et al., 2016). HaloTag est un système de marquage de protéine qui consiste à fusionner la protéine HaloTag à une protéine d'intérêt, un ligand synthétique fusionné à un fluorophore chimique (dans le cas d'étude par microscopie à fluorescence) va former un lien covalent avec la protéine HaloTag et permettre la localisation de la protéine d'intérêt. Les auteurs de cette étude ont produit des cellules HeLa exprimant de façon endogène la protéine de fusion hTERT-HaloTag, permettant l'observation en temps réel de molécules uniques de hTERT par microscopie à fluorescence. L'analyse de leur localisation et de leur coefficient de diffusion montre que la télomérase humaine diffuse rapidement dans tout le nucléoplasme, à l'exception du nucléole. En phase S, ces molécules interagissent avec les télomères plusieurs fois de façon transitoire et ces interactions sont dépendantes de TPP1. Quelques rares interactions sont stables aux télomères et peuvent rester de 30 secondes à 8 minutes. Ces résultats suggèrent que la télomérase parcourt l'intégralité du nucléoplasme à la recherche de télomères, peut former le plus souvent des interactions courtes avec eux, et dans des conditions encore inconnues, elle peut former une interaction stable possiblement pour la maintenance du télomère (Schmidt et al., 2016). L'utilisation d'Imetelstat (ou GRN163L), un inhibiteur de la télomérase, montre que ces interactions stables semblent faire intervenir l'appariement entre la matrice de hTR et l'extrémité du télomère, suggérant que ces interactions montrent une télomérase pouvant allonger un télomère (Schmidt et al., 2018b).

## **I.5 – Problématique**

La maturation de la télomérase et son interaction avec les télomères impliquent des relocalisations de cette enzyme à divers endroits du noyau. Ceci montre que ces processus ont une dynamique dans l'espace, de plus il a été montré chez l'humain que cette dynamique peut changer sur des périodes de l'ordre de la seconde (Schmidt et al., 2016). Cependant, jusqu'à présent, les méthodes les plus couramment utilisées dans l'étude des interactions entre télomérase et télomères sont le FISH et l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Bien que ces méthodes aient et

continueront d'apporter bon nombre d'information sur la régulation de l'homéostasie des télomères, elles possèdent des limitations quant à l'étude de processus très dynamiques. Le FISH se fait sur des cellules fixées ce qui limite grandement la résolution temporelle de l'expérience. Aussi la plupart des FISH réalisés sur hTR peinent à détecter des particules uniques de télomérase dans le noyau, menant vers la conclusion que la majorité des molécules de télomérase s'accumulent aux CBs. D'autre part les résultats d'expériences d'immunoprécipitations de la chromatine sont le fruit de l'étude de la population complète de la protéine précipitée dans une population de cellules, et peut ainsi cacher des sous-populations ou des étapes du processus étudié. De plus cette technique peut ne pas être capable de capturer des interactions faibles ou transitoires. Ces limitations montrent l'intérêt de l'étude de la télomérase par des techniques de visualisation de molécules uniques en cellules vivantes pour mieux comprendre sa régulation.

L'imagerie de molécules de télomérase en cellules vivantes qui a été faite par le marquage de hTERT avec HaloTag a montré que la télomérase possède plusieurs dynamiques aux télomères (voir section 1.4). Néanmoins cette méthode possède deux désavantages. Premièrement en visualisant seulement hTERT, il n'est pas possible d'étudier l'ensemble de la maturation et assemblage du complexe télomérase. Deuxièmement, le marquage de hTERT avec HaloTag produit une télomérase avec une activité réduite, ce qui peut affecter l'interprétation des résultats (Chiba et al., 2017; Schmidt et al., 2018).

## **I.6 – Hypothèses et Objectifs**

Le recrutement de la télomérase aux télomères est un processus dynamique qui repose sur l'assemblage de la télomérase en une enzyme active et une recherche des télomères qui est finement régulée. C'est deux processus recèlent encore des zones d'ombre qui empêchent la complète compréhension de la régulation du maintien de la longueur des télomères dans des cellules cancéreuses. Nous proposons d'étudier ces mécanismes grâce au suivi de particules uniques de hTR dans des cellules HeLa. Comme hTR constitue le squelette sur lequel s'assemble les différentes composantes de

la télomérase, son trafic devrait refléter les différentes étapes de la vie de cette enzyme, de sa synthèse et assemblage jusqu'à son action aux télomères. Cette approche a déjà porté ses fruits chez la levure grâce à l'utilisation du système MS2 sur l'ARN *TLC1*. Ainsi notre premier objectif sera d'adapter le système MS2 à l'ARN hTR tout en conservant un complexe télomérase mature et actif. L'édition du génome d'une lignée HeLa avec CRISPR/Cas9 permettra d'insérer des tiges-boucles MS2 au locus *TERC* pour, après expression de MCP-GFP, visualiser les molécules de hTR par microscopie à fluorescence dans des conditions d'expression endogène. Ainsi il sera possible de suivre cet ARN depuis sa transcription jusqu'à son site d'action. Ceci nous permettra de mesurer la dynamique globale de la télomérase dans le noyau ainsi que son recrutement au cours du cycle cellulaire. Cette dynamique pourra être quantifiée via plusieurs caractéristiques comme le coefficient de diffusion, le temps de résidence et le nombre de colocalisation avec les télomères, donnant un aperçu des types d'interactions que la télomérase effectue aux télomères.

Le passage de la télomérase par les CBs semble être important dans son assemblage, et favorise le recrutement de la télomérase aux télomères. Quelles étapes de la maturation de la télomérase sont faites dans ce compartiment n'est pas encore connu. Toutefois il a été montré que hTERT ne fait qu'un passage transitoire dans les CBs (moins d'une seconde). Nous proposons donc d'étudier la dynamique de hTR dans les corps de Cajal. Nous utiliserons des KO de hTERT et de TCAB1 dans des expériences de photo-activation et photoblanchiment dans le but de mieux comprendre le rôle de ces facteurs dans la dynamique de hTR aux CBs.

Un mécanisme crucial pour l'élongation des télomères est le recrutement de la télomérase sur son substrat. Ce processus est dynamique, implique des interactions transitoires et stables entre télomérase et télomères. Comment sont régulés ces changements de dynamique n'est toujours pas connu. Ainsi, notre hypothèse est que les régulateurs du recrutement de la télomérase (comme ATM, ATR, TPP1 ou POT1) pourraient avoir un impact sur la formation d'une liaison stable de la télomérase aux télomères. Nous proposons donc d'utiliser notre nouvelle méthode en association avec



des inhibiteurs et mutants de régulateurs de la télomérase pour mieux comprendre comment la télomérase est dirigée aux télomères.

Finalement, de récentes évidences supportent le modèle selon lequel la télomérase est majoritairement sous la forme d'un monomère chez l'humain. Cependant, sous quelle forme la télomérase est active aux télomères reste inconnu. Chez la levure, bien que la télomérase est aussi un monomère, plusieurs molécules se regroupent lors de l'élongation de télomères en phase S. Notre hypothèse est que la télomérase humaine agirait comme monomère aux télomères, et elle ne devrait pas se regrouper en plusieurs molécules pour l'élongation d'un télomère. Notre système donne à chaque particule le même nombre de molécules fluorescentes, donc en théorie la même intensité de fluorescence. Notre objectif sera de quantifier le nombre de molécules de télomérase recrutées sur un même télomère en phase S.

# **Chapitre II - Single-molecule imaging of telomerase RNA reveals a Recruitment – Retention model for telomere elongation**

## **II.1 - Mise en contexte**

Il y a maintenant une dizaine d'années, notre laboratoire a mis au point une méthode de marquage de l'ARN de la télomérase utilisant le système MS2 chez *S.cerevisiae*. Ceci a pu révéler la dynamique de la télomérase de levure lors de l'élongation des télomères. L'étape suivante naturelle était d'adapter ce système aux cellules humaines pour permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires en place derrière la régulation du recrutement de la télomérase. Nous avons ainsi adapté ce système avec succès dans des cellules HeLa. Le suivi en temps réel de hTR a ainsi pu révéler sa dynamique dans le noyau, aux Cajal Bodies, et aux télomères. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs et mutants de régulateurs de la télomérase, nous avons pu construire un nouveau modèle montrant une étape de scan des télomères par la télomérase suivi d'une possible rétention de hTR sur les télomères nécessaire à leur élongation.

## II.2 – Contribution des auteurs

J'ai effectué la majorité des expériences de microscopie sur hTR ainsi que leurs analyses menant aux résultats de dynamique de la télomérase dans le noyau et aux télomères. Emmanuelle Querido m'a apporté son aide pour certaines expériences. Emmanuelle Querido, David Guérit, Emilie Pourret, et moi avons mis au point ces expériences d'imagerie.

Emmanuelle Querido et Michael Joseph Smith ont fait l'imagerie de hTR aux corps de Cajal, ainsi que l'analyse révélant la dynamique de hTR dans ce compartiment (photoactivation et photoblanchiment)

David Guérit a adapté le système MS2 à hTR et fait les validations du système.

Dimitri Conomos a produit les images fixes montrant la localisation de hTR dans le noyau.

Hannah Crimmins a effectué les expériences d'édition du génome des cellules HeLa pour générer les clones exprimant hTR-MS2.

# Single-molecule imaging of telomerase RNA reveals a Recruitment – Retention model for telomere elongation

Hadrien Laprade<sup>1</sup>, Emmanuelle Querido<sup>1\*</sup>, Michael Joseph Smith<sup>2\*</sup>, David Guérit<sup>1</sup>, Hannah Crimmins<sup>2</sup>, Dimitri Conomos<sup>2</sup>, Emilie Pourret<sup>1</sup>, Pascal Chartrand<sup>1\*\*</sup>, and Agnel Sfeir<sup>2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup> Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Cell Biology Department, NYU School of Medicine, New York, NY 10016, USA

(<sup>3</sup>) Lead contact: Agnel Sfeir

(\*) (\*\*) Equal Contribution

Correspondence to Agnel Sfeir and Pascal Chartrand

Agnel Sfeir  
Skirball Institute/NYU Langone Medical center  
540 First Avenue  
4 floor/ Lab3  
New York, NY 10016  
Phone: (646) 501 6742  
[agnel.sfeir@med.nyu.edu](mailto:agnel.sfeir@med.nyu.edu)

Pascal Chartrand:  
Department of Biochemistry and Molecular Medicine  
Université de Montréal  
2900 Edouard-Montpetit  
Montréal, Qc, H3C 3J7  
Canada  
Phone: (514) 343-5684  
[p.chartrand@umontreal.ca](mailto:p.chartrand@umontreal.ca)

**Molecular Cell**; 79(1):115-126.e6.

Published : 2 July 2020

doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.005

[https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(20\)30306-3](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(20)30306-3)

## **II.2 - Summary**

Extension of telomeres is a critical step in the immortalization of cancer cells. This complex reaction requires proper spatio-temporal coordination of telomerase and telomeres, and remains poorly understood at the cellular level. To understand how cancer cells execute this process, we combine CRISPR genome editing and MS2 RNA-tagging to image single-molecules of telomerase RNA (hTR). Real-time dynamics and photoactivation experiments of hTR in Cajal bodies (CBs) reveal that hTERT controls the exit of hTR from CBs. Single-molecule tracking of hTR at telomeres shows that TPP1-mediated recruitment results in short telomere-telomerase scanning interactions, then base-pairing between hTR and telomere ssDNA promotes long interactions required for stable telomerase retention. Interestingly, POT1 OB-fold mutations that result in abnormally long telomeres in cancers act by enhancing this retention step. In summary, single-molecule imaging unveils the life-cycle of telomerase RNA and provides a framework to reveal how cancer-associated mutations mechanistically drive defects in telomere homeostasis.

## **II.3 - Keywords**

ATM; ATR; POT1; cancer cells; fluorescent in situ hybridization; hTR RNA; single-molecule imaging; telomerase; telomeres.

## II.4 - Introduction

Mammalian telomeres consist of tracts of duplex TTAGGG repeats bound by a six-subunit protein complex – termed shelterin – that prevents the activation of the DNA damage response (de Lange, 2005; Sfeir and de Lange, 2012). Telomere repeats are synthesized by telomerase, a specialized ribonucleoprotein (RNP) that is minimally composed of a reverse transcriptase (hTERT) and an RNA subunit (hTR) (Greider and Blackburn, 1985). Most somatic cells lack telomerase activity and as a result, telomeres get progressively shorter until the cells become senescent or die. Reactivation of telomerase is a key event during tumorigenesis and enables cancer cells to proliferate indefinitely (Kim et al., 1994). Generating an active telomerase RNP is a multistep process that requires hTERT, hTR, and additional co-factors including dyskerin, TCAB1, and H/ACA proteins (Schmidt and Cech, 2015). Telomerase folding and assembly involves transit through Cajal bodies (CBs) (Jady et al., 2004; Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004) where processing and maturation of small nuclear RNAs (snRNAs) and snoRNPs take place (Gall, 2000) and relies on its interaction with the WD40 repeat-containing protein TCAB1 (Venteicher et al., 2009) (Cristofari et al., 2007) (Stern et al., 2012). Paradoxically, elimination of human coilin did not alter telomere length (Chen et al., 2015; Vogan et al., 2016), potentially implicating a backup pathway during telomerase assembly. Though, it is possible that other components of CBs compensate for coilin loss to allow the maturation and trafficking of hTR.

Following exit from CBs, telomerase is targeted to chromosome ends to promote telomere elongation. It has been estimated that cancer cells have ~250 active telomerase RNPs (Cohen et al., 2007) that add ~50 nucleotides to most chromosome ends each cell cycle (Zhao et al., 2009). It is not fully understood how telomerase molecules are targeted to telomeres in a crowded nucleus. Emerging evidence indicates that telomerase recruitment is dependent on a specific interaction between hTERT and the shelterin subunit, TPP1. Disruption of TPP1-hTERT interaction leads to progressive telomere shortening and results in cell death (Nandakumar et al., 2012; Schmidt et al., 2014; Sexton et al., 2014; Zhong et al., 2012), and single-particle tracking of hTERT-K78E, that is unable to interact with TPP1, confirmed that telomerase association with telomeres is diminished when hTERT-TPP1 interaction is blocked (Schmidt et al., 2016).

Telomere length is maintained around a set point that is essential for survival. Short telomeres trigger a DNA damage response that can lead to age-related diseases and short-telomere syndromes (also known as telomeropathies) (Martinez and Blasco, 2017). On the other hand, abnormally long telomeres can foster tumorigenesis. Telomere length regulation is not fully understood, but genetic evidences point to a role for DNA damage factors and telomere binding proteins in this process. For example, the ATM-like kinase, Tel1 and the ATR-like kinase, Mec1/Rad3 play partially redundant roles in maintaining telomere length in budding and fission yeasts (Moser et al., 2011; Ritchie et al., 1999). Inhibition of the ATM kinase in human and mouse cells compromises telomere repeat addition (Lee et al., 2015), and both ATM and ATR were reported to regulate telomerase localization at chromosome ends (Tong et al., 2015). Subunits of the shelterin complex have also been implicated in telomere length regulation (Loayza and De Lange, 2003; van Steensel and de Lange, 1997). Expression of POT1- $\Delta$ OB that is incapable of binding to single-stranded telomere DNA results in rapid telomere elongation (Loayza and De Lange, 2003). Notably, POT1 mutations have been reported in familial and sporadic cancers, and manifests abnormally long telomeres (Sfeir and Denchi, 2016). The mechanism by which POT1 mutations, which predominantly cluster in the DNA binding domain, alter repeat addition remains unknown.

Here, we apply the MS2-tagging approach to visualize single-hTR particles using live-cell imaging and photoconversion experiments. Our results delineate the dynamic process of telomerase trafficking through Cajal bodies. Furthermore, we provide evidence in support of a two-step “Recruitment – Retention” model that governs telomerase association with telomere ends. Telomerase recruitment by TPP1 gives rise to quick and highly diffusive associations. A subsequent retention step stabilizes telomerase at the 3' overhang and promotes longer interactions with constrained diffusion. Interestingly, we show that expression of POT1- $\Delta$ OB enhances telomerase retention, potentially providing insight into the mechanism by which recently identified cancer-associated POT1 mutations impacting its DNA binding, lead to abnormal telomere elongation

## II.5 - RESULTS

### II.5.1 - MS2-tagging reveals hTR dynamics in live cells

To monitor the dynamics of human telomerase at the single molecule level, we employed the MS2-GFP tagging system and visualized its RNA subunit *in vivo*. The two-component MS2 system included a GFP-tagged MS2 coat protein (GFP-MCP) that recognizes the MS2 RNA stem-loop, even when added to a particular RNA (Bertrand et al., 1998; Querido and Chartrand, 2008). This system has been employed to study RNA trafficking and visualize telomerase RNA in living yeast cells (Bertrand et al., 1998; Gallardo et al., 2011). Based on the recently reported Cryo-EM structure of telomerase holoenzyme, we anticipated that the 5'-end and the conserved regions 4 and 5 (CR4/5) domain of hTR could be modified with minimal disruption to the telomerase holoenzyme (Nguyen et al., 2018) (Figures II.1A and SII.1A). To determine the number of MS2 stem-loop repeats that could be tolerated, we employed a mutant hTR – termed hTR-TSQ1 – designed to add GTTGCG variant repeats that are distinguishable from the canonical telomere repeats (Diolaiti et al., 2013). We overexpressed GFP-MCP along with hTR-TSQ1 tagged with MS2 stem-loops at the 5'-end and the CR4/5 region, independently, in 293T cells. Southern blot analysis to detect the incorporation of GTTGCG sequences revealed that amending hTR with  $\geq 4$ MS2 stem loops severely compromised repeat addition, whereas 3MS2 stem-loops did not impair the function of the RNP (Figure SII.1B-C). We confirmed these results by co-expressing MS2-tagged hTR and GFP-MCP in VA13 cells that lack endogenous telomerase RNA, and monitored telomerase activity using Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP) assay. While tagging hTR at the 5' end did not impair the function of the enzyme, the presence of 3 MS2 stem loops at the CR4/5 domain slightly reduced telomerase activity *in vivo* (Figure SII.1D-G).

We performed CRISPR-Cas9 gene editing of the endogenous hTR locus in HeLa 1.3 (Takai et al., 2010) and introduced three MS2 stem-loops at the 5' end and the CR4/5 domain of hTR, independently. Genotyping PCR and Sanger sequencing confirmed proper gene targeting (Figures II.1B-C and SII.1H) and Northern blot analysis indicated that MS2-tagged hTR was expressed at comparable levels as non-targeted cells (Figure



II.1D). Lastly, we assessed telomere length using Southern blot analysis and found that hTR modification did not alter telomere maintenance in *hTR<sup>5MS2</sup>* and *hTR<sup>Cr4/5MS2</sup>* cells (Figures II.1E and SII.1I).

### **II.5.2 - Single particle tracking identifies two populations of hTR with distinct dynamic properties**

We transduced *hTR<sup>5MS2</sup>* and *hTR<sup>WT</sup>* cells with lentiviral particles expressing GFP-MCP. Image acquisition with a spinning disk confocal microscope allowed the detection of single hTR particles in the nucleus of *hTR<sup>5MS2</sup>* cells, but not in control *hTR<sup>WT</sup>* cells (Figure II.2A). Particle tracking with the Trackmate algorithm (Tinevez et al., 2017) showed that the majority of telomerase RNA rapidly diffuse in the nucleoplasm and probe a large nuclear surface (Figure SII.2A and Movies S1-S3). Frequency distribution analysis identified a highly diffusive (mean logD: 0.09  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) fraction as well as a less mobile pool (mean logD: -0.69  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) (Figure II.2B). We also detected MS2-hTR particles in the nucleolus and, interestingly, they displayed a reduced diffusion rate compared to nucleoplasmic particles (Figure SII.2B-C and Movie S4). To better characterize the distinct populations of diffusive hTR molecules in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells, we overexpressed hTERT and hTERT-K78E, a mutant that disrupts telomerase interaction with TPP1 and prevents its recruitment to telomeres (Figure SII.2D)(Schmidt et al., 2014). We analyzed the distribution of diffusion coefficients obtained from MS2-hTR tracks and noted an enrichment in the fraction of slow diffusing particles in the presence of excess wild-type hTERT (Figure 2II.A-B). On the other hand, overexpression of hTERT-K78E reduced the percentage of less mobile hTR particles (Figure II.2A-B). Similar results were obtained when we analyzed the short-traces of hTR particles using Spot-On (Figure SII.2E-F) (Hansen et al., 2018). We therefore conclude that hTR particles with reduced mobility likely include telomere-bound telomerase. In contrast, rapidly diffusing particles potentially reflect telomere-unbound telomerase or free hTR molecules. We next sought to explore the localization and behaviors of these bound states.

### **II.5.3 - Telomeres are not exclusively extended in CBs**

We examined hTR localization at two important compartments for telomere homeostasis, the telomere itself and CBs where telomerase processing, assembly, and

maturation take place. To visualize telomeres, we transduced *hTR<sup>5MS2</sup>* cells expressing GFP-MCP with mCherry-tagged TRF1 and marked CBs with BFP-tagged coilin. In addition, we labelled *hTR<sup>5MS2</sup>* cells with mCherry-CDT1 that is highly expressed in G1 cells but is rapidly degraded in S phase, when telomeres are extended. This was necessary to focus our image acquisition to this particular phase of the cell cycle during which telomerase extends telomeres (Figure II.2C) (Tomlinson et al., 2006). Degradation of pan-nuclear CDT1 in S phase enabled the visualization of punctate mCherry at TRF1-bound telomeres (Figure II.2D). 3 dimensional (3D) timelapse imaging revealed that ~40% of S phase cells display one or more colocalization events between hTR and TRF1. Furthermore, the association of telomerase with telomeres was enhanced following the overexpression of the catalytic subunit, but not in the presence of hTERT-K78E (Figure II.2E). These results confirm that the TPP1-TERT interaction is essential for telomerase recruitment to telomeres.

Previous studies based on IF-FISH experiments reported the relocalization of replicating telomeres to the proximity of CBs (Jady et al., 2004; Jady et al., 2006). This led to a “hand over” model, whereby telomere extension took place within these nuclear bodies. We observed a reduction in MS2-hTR localization to CBs upon hTERT overexpression (Figure II.2F), highly indicative of hTR eviction from CBs when telomeres are elongated. Furthermore, hTERT overexpression did not enhance the association of TRF1 with BFP-Coilin (Figure II.2G). In summary, our data do not support the hand-over model and establish that productive interactions between telomerase and telomeres do not take place exclusively within CBs.

#### **II.5.4 - Dynamic exchange of hTR between Cajal bodies and the nucleoplasm**

In order to investigate the dynamic exchange of hTR molecules between the nucleoplasm and CBs, we co-expressed GFP-MCP and mCherry-labelled Coilin in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells and performed live-cell imaging. The majority of MS2-hTR freely diffused throughout the nucleoplasm and only a small fraction of hTR particles localized to CBs

(Figure II.3A and Movie S4). This observation is in disagreement with previous FISH experiments where hTR appeared to be predominantly concentrated in CBs (Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004). To corroborate our results, we performed dual IF-FISH analysis using Structured Illumination Microscopy (SIM). We adapted single molecule inexpensive FISH (smiFISH) to detect endogenous hTR with a set of 15 hTR-specific probes (Tsanov et al., 2016) and co-stained CBs with coilin antibody. SmiFISH-labelled hTR foci co-localized with CBs and at telomeres in hTR positive cells, including hTR<sup>5MS2</sup>, hTR<sup>Cr4/5MS2</sup> and the parental HeLa 1.3 cells (Figure SII.3A-B). SIM analysis validated live-cell imaging data and indicated that the majority of telomerase RNA molecules are distributed throughout the nucleoplasm with less than 10% of hTR accumulating in CBs (Figures II.3B-C and SII.3C). Interestingly, SIM revealed that hTR foci accumulated at the periphery of CBs, as measured by the eccentricity ratio (Figure SII.3D).

The MS2-hTR trajectories within CBs appeared less diffusive than nucleoplasmic hTR (mean logD of  $-0.97 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  vs.  $0.09 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ ; Figure II.3A and Movie S4), prompting us to further characterize the properties of the RNA in these subnuclear structures. To that end, we fused a photoactivatable version of GFP with MS2CP (termed paGFP-MCP) and co-expressed the fusion protein along with mCherry-Coilin in hTR<sup>5MS2</sup> cells. Specific photoactivation of paGFP-MCP in single CBs was followed by continuous acquisition of fluorescently labeled MS2-hTR (Figure II.3D-E). In the absence of MS2-hTR, photoactivated paGFP-MCP displayed a rapid decay of fluorescence intensity, with a median half-life of 0.4 sec (Figure II.3F). On the other hand, we observed two populations of paGFP-MCP in CBs of hTR<sup>5MS2</sup> cells, including a rapidly diffusing fraction (median half-life of 0.6 sec) due to free paGFP-MCP, and a slow population (median half-life of 7.5 sec) indicative of MS2-hTR molecules (Figure II.3F and Movie S5). To further validate that the paGFP-MCP signal was dependent on the presence of MS2-hTR in CBs, we repeated the photoactivation experiments in hTR<sup>5MS2</sup> TCAB1<sup>-/-</sup> cells generated using CRISPR/Cas9-based genome editing (Figure SII.3E-H). In the absence of TCAB1, fluorescence decay and MS2-hTR half-life in CBs were indistinguishable from that observed in control hTR<sup>WT</sup> cells (Figure II.3F).

Having determined the half-life of hTR within CBs, we then used fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to explore the recruitment of MS2-hTR to CBs.

Photobleaching of GFP-MCP was performed directly in CBs using a pulse of the 405 nm laser and followed by monitoring MS2-hTR recovery (Figure II.3G-H and Movie S6). Fitting of a one-phase recovery curve to the average of these cells revealed that hTR recovers with a half-life of 2.3 seconds (Figure II.3I). Taken together, our results indicate that a small subset of hTR molecules are targeted to CBs with a rapid on-rate and in a TCAB1-dependent manner. A slower off-rate leads to the accumulation of hTR in these nuclear bodies.

### **II.5.5 - hTERT facilitates hTR exit from Cajal bodies**

To explore how hTR might be gated between CBs and telomeres, we explored the role of hTERT in this process. We generated hTERT knockout cells with CRISPR/Cas9 gene editing and derived two independent clones of *hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>-/-</sup>* cells that lack telomerase activity (Figure II.4A-B). Using live-cell imaging and smiFISH, we noted a slight reduction in the accumulation of hTR in CBs in *hTERT<sup>-/-</sup>* cells (Figure SII.4A-B), suggesting that the loss of catalytic subunit does not block the recruitment of telomerase RNA to CBs. We then performed photoactivation experiments and observed a doubling of the half-life of MS2-hTR in CBs in two independent *hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>-/-</sup>* clones (Figure II.4C-D). Complementation of *hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>-/-</sup>* cells with exogenous hTERT rescued hTR trafficking out of CBs (Figure II.4D). Interestingly, FRAP experiments did not reveal a significant difference of hTR recovery dynamics in cells overexpressing hTERT relative to cells with endogenous hTERT (Figure SII.4C). Taken together, our data support a model in which the catalytic subunit of telomerase is important to drive the exit of hTR from CBs, but appears dispensable for targeting the RNA to these specialized subnuclear structures.

### **II.5.6 - Multiple dynamic interactions govern telomerase-telomere association**

We turned our attention to the association of telomerase RNA with its substrate – the telomere – and performed live-cell imaging of MS2-hTR and mCherry-TRF1 in S phase *hTR<sup>5MS2</sup>* cells (Figure II.5A). Single-particle tracking was achieved by constant acquisition at 100 msec/frame for a total of 10 sec and revealed that within this timeframe, hTR particles colocalized with up to 50% of visible telomeres per cell (Figure II.5B and

Movie S7). As expected, overexpression of hTERT increased the fraction of hTR-bound telomeres while hTERT-K78E diminished the co-localization of MS2-hTR and mCherry-TRF1 (median of 31% and <1%, respectively; Figure II.5B). Analysis of hTR trajectories at telomeres highlighted a set of localized tracks that colocalized with TRF1 for more than 5 frames and were enriched in the presence of hTERT but not hTERT-K78E (Figure SII.5A-B). Within the 10 second image-acquisitions, the median residence time of hTR at telomere in hTR<sup>5'MS2</sup> cells was ~0.7 seconds (Figure II.5C). Disrupting the interaction between hTERT and TPP1 greatly diminished the frequency of telomere-hTR colocalization, with a few events remaining within the same dwell time. In contrast, overexpression of hTERT led to a notable increase in colocalization events with longer residence time, including several tracks that lasted well-beyond the 10 sec movies (Figure II.5C). To better study the dynamic of these long interactions, we used time intervals of 5 seconds for a total of 300 seconds acquisition. While long lasting interactions were observed in hTR<sup>5'MS2</sup> cells, their frequency was more pronounced in cells overexpressing hTERT and ranged between 10 and 220 seconds with a median of 25 sec (Figure II.5D). Fitting the distribution of hTR dwell time at telomeres in *hTR<sup>5'MS2</sup>* and *hTR<sup>5'MS2</sup> +hTERT* cell lines revealed similar off-rate, half-life, and mean residence time (Figure SII.5C-D), suggesting that increased hTERT levels did not alter the dynamics properties of telomerase at telomeres. Notably, visualization of hTR tagged with 3MS2 stem-loops at the CR4/5 domain yielded a similar dynamic profile to that of 5'MS2-hTR (Figure SII.5K).

### **II.5.7 - Telomerase oscillates between scanning and engaged states at telomeres**

Analysis of hTR trajectories throughout the nucleoplasm highlighted a small fraction of RNA particles with limited diffusion (Figure II.2A-B), which we postulated to be constrained by telomere-interactions. Therefore, we set out to investigate the diffusive properties of MS2-hTR particles that co-localize with their substrate. We first assessed telomere mobility and determined the diffusion coefficient (D) of TRF1, which displayed a median logD of -1.86  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  with the fastest molecule exhibiting a  $D \sim 0.40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Dimitrova et al., 2008; Schmidt et al., 2016). We determined the diffusion coefficient and radius of

gyration (RoG) of hTR molecules confined at telomeres and compared it with the motility of TRF1. Interestingly, a significant fraction of hTR particles were more diffusive than the telomere itself, even when confined to their substrate (Figure II.5E and SII.5E). This suggests that following TPP1-dependent recruitment to telomeres, telomerase displays two diffusive states, which we term “scanning” and “engaged”. hTR particles with a faster diffusion rate or higher RoG than the telomere chromatin reflect scanning interactions. On the other hand, particles with similar diffusion or RoG properties as telomeres are engaged with their substrate. To validate these results, we performed dual-camera image acquisition and tracked MS2-hTR and TRF1-bound telomeres simultaneously. Kymographs showed that colocalization between an hTR particle and a telomere could be traced for several seconds (Figures II.5F and SII.5F, and Movie S8). Using a running-window analysis of the diffusion coefficient, we noted periods in which hTR and TRF1 displayed similar diffusion rates, but also instances where hTR had a faster diffusion coefficient than TRF1. Similar results were obtained upon measuring the radius of gyration of hTR and telomere (Figure SII.5G-H). In summary, a given hTR molecule is capable of alternating between scanning and engaged modes when interacting with the telomere.

### **II.5.8 - Telomerase retention is dependent on RNA-DNA base pairing**

So far, our data indicate that hTR interaction with telomeres oscillates between scanning and engaged modes, with a dwell-time ranging between 0.5 and 220 seconds. We hypothesized that engaged interactions reflect a retention step during telomere elongation where base pairing of hTR template with the single-stranded overhang restricts telomerase mobility and increases its residence time at chromosome ends. To better define telomerase retention, we treated hTR<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT with GRN163L (Imetelstat) that blocks the template region of telomerase and thus inhibits hTR-ssDNA interaction at telomeres (Herbert et al., 2005). In the presence of GRN163L, colocalization between MS2-hTR and telomeres was significantly reduced (Figure II.5G) and its dwell time did not exceed 5 seconds (Figure II.5H). Survival probability analysis revealed a four-fold reduction in the half-life of hTR at telomeres and a concomitant increase in its off-rate when base-pairing with the telomere overhang was blocked (Figure SII.5I-J). Interestingly, the population of telomere-localized hTR with the lowest diffusion coefficient was nearly eliminated in the presence of GRN163L (Figure II.5I-J). Altogether,

our results suggest that following TPP1-mediated recruitment, telomerase retention at telomeres is an independent step driven by base-pairing interactions between the template region of hTR and telomere ssDNA.

### **II.5.9 - ATM and ATR act upstream of TPP1 to facilitate telomeres access to telomerase**

We next aimed to decipher the different states of telomerase-telomere interactions using genetic perturbations known to alter telomere length homeostasis. Signaling by ATM and ATR was previously shown to promote telomere elongation, however, the exact step(s) of telomerase trafficking controlled by these kinases remain unknown (Lee et al., 2015; Tong et al., 2015). We treated *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT with the kinase inhibitors KU60019 and VE-822 at concentrations previously shown to inhibit the activity of ATM and ATR, respectively (Fokas et al., 2014; Hickson et al., 2004). We then monitored the dynamic properties of hTR trajectories at telomeres using live-cell imaging. Consistent with previous studies, ATM inhibition led to a 42% decrease in the percentage of telomerase at chromosome ends (Figure II.6A), while inhibition of ATR resulted in a smaller (20%) but significant reduction in telomere-telomerase association (Figure II.6B and SII.6A). Repression of ATM activity did not impact the duration of short interactions (Figure SII.6B), nor did it significantly alter long-lasting interactions (Figure SII.6C). We confirmed these results using shRNA-mediated depletion of ATM (Figure II.6C and SII.6D-F). Collectively, our data revealed that ATM is the major upstream signaling kinase that regulates the frequency of telomerase recruitment to chromosome ends without impacting its dwell-time at telomeres.

### **II.5.10 - POT1 negatively regulates telomere length by preventing telomerase retention at chromosome ends**

It is well established that the shelterin component POT1 acts as a negative regulator of telomerase. Expression of POT1 mutations, including those commonly found in human cancers and those lacking the OB fold domain of POT1 (POT1- $\Delta$ OB), lead to rapid telomere elongation in cancer cells (Loayza and De Lange, 2003; Pinzaru et al., 2016). However, FISH- and ChIP-based assays failed to detect the impact of POT1

depletion or mutations on the telomerase interaction with telomeres *in vivo* (Abreu et al., 2010; Gu et al., 2017). We transduced *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT with lentiviral particles expressing POT1-WT and POT1-ΔOB (Figure SII.6G) and observed an increase in the percentage of hTR colocalization with telomeres in the presence of mutant POT1 (Figure II.6D). Consistent with previous data, mutant POT1 triggered an ATR-dependent DNA damage response at telomeres (Figure SII.6H). However, the increased localization of hTR at telomeres in POT1-ΔOB cells was independent of ATR kinase activity (Figure SII.6I). Notably, POT1-ΔOB had no effect on short-term interactions (Figure II.6E), instead, it enhanced long interactions of telomerase with its substrate (Figure II.6F). In an independent set of experiments, we transduced *hTR*<sup>5MS2</sup> cells expressing POT1-WT and POT1-ΔOB with lentiviral particles for hTERT-K78E. As expected, the localization of hTR to telomeres was greatly diminished in cells co-expressing hTERT-K78E and POT1-WT (Figures II.6G and SII.6J-K). However, we detected significant association of hTR with telomeres in the presence of mutant POT1, even when the interaction between hTERT and TPP1 was reduced (Figure II.6G and SII.6K). This observation suggested that enhanced telomere-telomerase interactions observed in the presence of POT1-ΔOB are mediated by hTR base-pairing with telomeric ssDNA. Consistent with this idea, hTR-telomere interactions were diminished upon treatment of *hTR*<sup>5MS2</sup> cells co-expressing POT1-ΔOB and hTERT-K78E with GRN163L (Figure II.6G). Altogether, our data support a model where POT1 acts downstream of TPP1 and inhibits telomerase retention by occluding the single-stranded telomere overhang from binding to the template region of hTR.

## II.6 - DISCUSSION

### II.6.1 - A “Recruitment – Retention” model for telomere extension

Since its discovery over 30 years ago (Greider and Blackburn, 1985), telomerase has been extensively studied through biochemical and genetic analysis in different model organisms. However, the dynamic properties of this enzyme *in vivo* are poorly understood. Here, we successfully adapted the MS2 tagging system and fully depicted the spatio-



temporal regulation of the specialized RNA throughout the various steps of telomerase assembly, maturation, trafficking, and recruitment to telomere ends. Our results reveal a two-step, “Recruitment – Retention” model (Figure II.7), where TPP1-mediated recruitment leads to a series of short and highly diffusive telomere-telomerase associations. Subsequently, a subset of telomerase molecules is retained at telomeres through base-pairing of the hTR template region with the single-stranded telomere overhang. The latter molecules exhibit a longer residence time and slow diffusive properties. Whether telomerase retention is enacted by factors along the telomere chromatin is yet to be determined. It is worth noting that the retention step has not been delineated for telomerase in lower eukaryotes. Emerging evidence from yeast indicate that telomerase recruitment is driven by protein-protein interactions in a way that is analogous to TPP1-mediated recruitment of hTERT (Chandra et al., 2001; Tomita and Cooper, 2008). Interestingly, genetic studies identified specific alleles, including Est3 in budding yeast (Rao et al., 2014) and TAZ1 K57A in fission yeast (Armstrong et al., 2014) that support telomerase recruitment but fail to maintain telomere length. It has been postulated that these mutants are defective in activating telomerase. Nevertheless, it is tempting to speculate that such alleles modulate a step equivalent to telomerase retention.

### **II.6.2 - Cajal bodies as assembly sites for telomerase RNP**

hTR was first reported to accumulate to CBs in cancer cells and the organelle was later shown to be critical for hTR biogenesis and maturation (Schmidt and Cech, 2015). So far, investigation of telomerase association with CBs has been limited to the analysis of fixed cells using RNA FISH. This led to the current dogma that telomerase RNA is predominantly concentrated in CBs and telomere-targeting to these nuclear bodies facilitate their elongation (Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004). In contrast, data from live-cell and super-resolution imaging show that less than 10% of hTR molecules reside in CBs (Figure II.3A-C). Furthermore, we show that telomere elongation takes place outside CBs (Figure II.2F-G). hTR molecules have an extended residence time in these nuclear bodies (Figure II.3D-F) and this could explain, at least in part, why low sensitive RNA FISH only detects endogenous hTR in CBs. Our data is consistent with a model where CBs act as temporary assembly sites for properly modified and processed hTR molecules to be accessed by hTERT. Unlike hTR, the association of hTERT with CBs is

highly transient (Schmidt et al., 2016), implying that the loading of hTERT onto a hTR scaffold is among the last steps during telomerase assembly. Interestingly, super-resolution imaging revealed that hTR molecules protrude from the coilin core of CBs (see also (Jady et al., 2004)), suggesting a model where hTERT may assemble with hTR at the edge of CBs. What accounts for the extended residence time of hTR in CBs remains unknown. Coilin contains an intrinsically disordered RG-rich motif that has the propensity to oligomerize and create higher order structures that could potentially trap RNA within these nuclear bodies (Hebert et al., 2001). Alternatively, homotypic and heterotypic RNA-RNA interaction could confine hTR mobility in CBs.

### **II.6.3 - Unique properties of hTR relative to hTERT and yeast *TLC1***

The dynamic behavior of the reverse transcriptase was monitored using Halo-tag and demonstrated that hTERT is highly diffusive in the nucleoplasm and displays long and short interactions with telomeres (Schmidt et al., 2016). Overall, these observations are consistent with results obtained in our study, however, there are important differences between the dynamics of HaLo-hTERT and MS2-hTR. First, HaLo-hTERT interaction with Cajal bodies is more transient than hTR, potentially highlighting distinct maturation pathways for each subunit. Second, MS2-hTR particles are present in the nucleolus, whereas HaLo- and GFP-tagged hTERT are excluded from this subnuclear domain in cancer cells (Schmidt et al., 2016; Wong et al., 2002). Third, MS2-hTR and HaLo-hTERT behave differently at telomeres. For instance, using dual-camera imaging we observed scanning interactions between hTR and telomeres (Figure SII.5A-B). In contrast HaLo-hTERT interactions are either probing (transient) or stably associated (localized) at telomeres. Furthermore, while the kinetic of hTERT binding to telomeres was not affected by GRN163L treatments (Schmidt et al., 2018a), the drug significantly impacted the dwell time and off-rate of MS2-hTR (Figure II.5). The different dynamic properties could be explained by a faster rate of acquisition during imaging of HaLo-hTERT compared to MS2-hTR. Although, we cannot rule out that compromised telomerase activity due to hTERT tagging (Chiba et al., 2017; Schmidt et al., 2018a) could have altered the dynamic behavior of the enzyme at telomeres.

In addition, our analysis of human telomerase RNA reveals significant differences in the dynamics of telomere elongation between human and budding yeast. We previously employed the MS2 system to label telomerase RNA in *S. cerevisiae* and found that telomere elongation in late S phase is dependent on stable accumulation of multiple telomerase complexes with no apparent scanning interactions (Gallardo et al., 2011). Unlike yeast *TLC1* RNA, hTR molecules did not cluster at human telomeres. Mutants affecting telomere elongation in yeast – most notably being tel1 kinase – inhibit telomerase recruitment at short telomeres and disrupt clustering of yeast telomerase (Gallardo et al., 2011; Goudsouzian et al., 2006). In the case of human telomerase, we found that inhibition of ATM, and to a lesser extent ATR, impacts the access of the RNP to telomeres. In both cases, downstream targets of ATM and ATR remain elusive. Furthermore, how these kinases influence telomerase targeting to short vs. long telomeres is unknown.

#### **II.6.4 - POT1 regulates telomerase retention at telomeres**

Our work also provides insight into the mechanism by which POT1 regulates telomerase activity at telomeres. So far, conflicting models have been proposed for the function of POT1 at telomeres. Genetic and biochemical evidence suggest that POT1 inhibits telomerase, possibly by sequestering the telomeric overhang. Specifically, deletion or point mutations in the OB-fold domain of POT1 lead to unrestricted telomere elongation by telomerase (Loayza and De Lange, 2003). However, depletion or mutations in POT1 did not reduce telomerase access to telomeres, as measured by RNA-FISH or ChIP (Abreu et al., 2010; Gu et al., 2017). Moreover, biochemical assays have shown that the TPP1-POT1 complex stimulates telomerase processivity *in vitro* (Wang et al., 2007). Our results uncover the mechanism by which POT1 regulate telomere elongation *in vivo*. We show that OB-fold mutation of POT1 enhances telomerase retention by increasing overhang accessibility. Our data support a model whereby POT1 OB-fold domains, where most cancer-associated mutations incur, compete with hTR for the binding to the telomere overhang. The negative regulation of telomerase retention by POT1 underscores the importance of restricting telomere elongation by telomerase and potentially highlights a mechanism that has gone awry in an increasing number of solid and lymphoid malignancies with POT1 mutations.

## II.7 - STAR Methods:

### II.7.1 - Key resource Table

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti-TRF2 rabbit	Novus Biologicals	Cat#NB110-57130; RRID: AB_844199
Anti-coilin, monoclonal mAb	Sigma	Cat#C1862; RRID: AB_476827
Alexa Fluor488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	Cat#715-545-150; RRID: AB_2340846
Alexa Fluor594 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	Cat#715-585-152
Anti-ATM antibody [Y170]	Abcam	Cat#ab32420; RRID:AB_725574
Anti-Telomerase antibody [Y182]	Abcam	Cat#ab32020 ; RRID:AB_778296
TCAB1 antibody	Artandi lab (Stanford)	N/A
Anti-c-MYC monoclonal antibody (clone 9E10)	Millipore	Cat# 05-419
anti-γ-Tubulin monoclonal antibody (GTU-88)	Abcam	Cat#ab11316
anti-FLAG monoclonal antibody (clone M2)	Sigma Aldrich	Cat#F1804
anti-53BP1 Rabbit polyclonal antibody	Novus Biologicals	Cat#100-304A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
VE-822 ATR inhibitor	Selleck Chemicals	S7102
KU 60019 ATM inhibitor	Tocris Bioscience	4176/5
GRN163L	Geron	A gift from Jerry Shay (UTSW)
Puromycin 2HCL 100mg	Wisent	400-160-EM
Hygromycin B sterile 20 ml	Sigma	400052
Blasticidin S HCL 50mg	Fisher	R21001
ProLong Glass antifade mountant	Thermo Fisher Scientific	P36982
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Trapeze Telomerase detection kit	Millipore	S7700
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Cat# 27106
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Cat# 74106
iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	Cat# 1725034
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher	Cat# 4368814
SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher	Cat# 4309155
Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR MasterMix	Agilent	Cat# 600882
FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche	Cat# 04738420001

Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher	Cat# 13778150
Gel extraction kit	EZNA	Cat# D2500-02
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
293T	ATCC	CRL-3216
HeLa 1.3 (HeLa 1.2.11 clone 1.3)	De Lange Laboratory, Rockefeller University	N/A
HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2	This paper	N/A
HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1 <sup>-/-</sup>	This paper	N/A
HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TERT <sup>-/-</sup>	This paper	N/A
HeLa 1.3 hTR-CR4/5-3xMS2	This paper	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
gRNA for introducing MS2 stem loops at the 5' end of hTR: gRNA4 (5') TCCGCAACCCGGTGCCTGC, gRNA5 (5') GCAGCGCACCCGGTTGCGGA	This paper	N/A
gRNA for introducing MS2 stem loops at the CR4/5 region of hTR : gRNA9 (CR4/5) TCGGCCCGGGGCTTCTCCGG	This paper	N/A
Primers for genotyping PCR for MS2 insertion: RA_in Fw3: AGCCCGCCCGAGAGAGTG and LA_in Rv1: ATGTGTGAGCCGAGTCCTGGG	This paper	N/A
Primers for genotyping PCR for MS2 insertion: LA_out Rv2: AGAATGGCCTGTTTGTTCCTTCAACCTAGT GGG and RA_in Fw2 TTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCG	This paper	N/A
gRNA for knocking out TCAB1: GTCCGCATTTTTATTTCATCG and TTTATTTCATCGGGGAAGCGT	This paper	N/A
Primers for genotyping PCR for TCAB1-KO F4: AGAAGAGGAGGGAAGCACAGG and R2: TTCCATGGCTTTT CCAGACCCC	This paper	N/A
gRNA for knocking out hTERT gRNA1: CACCGCTTCGGGGTCCACTAGCGTG and gRNA5: CACCGCGCAGCTACCTGCCCAACA	This paper	N/A
primers for genotyping PCR for hTERT-KO geno Rev RAD out: AACAGGGGCCCGCATTTGCCAGTAGC and genoPURO fwd: GGGTGCCCGCCTTCCTGG	This paper	N/A
hTR probes for Northern Blot : hTR-1/16-R:CCACCCTCCGCAACCC, hTR hTR-43/66-R: GCCCTTCTCAGTTAGGGTTAGAC, hTR- 143/166-R: GCTCTAGAATGAACGGTGAAGG, hTR hTR- 304/322-R: CGGCTGA CAGAGCCCAAC, hTR- 368/388-R: ACTCGCTCCGTTCTCTTCC, hTR 407/ 424-R: CGTCCC ACAGCTCAGGG	This paper	N/A

MS2 probe for Northern Blot: ACATGGGTGATCCTCATGT	This paper	N/A
Probes for hTR smiFISH	See Table S1	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
pHageUBC-MCP-sfGFP	This paper	N/A
pHageUBC-MCP-PAGFP	This paper	N/A
pHage2-EF1a-mCherry-hCoilin-IRES-Hygro	This paper	N/A
pHage2-EF1a-mCherryTRF1-IRES-Blast	This paper	N/A
pHage2-EF1a-TagBFP-hCoilin	This paper	N/A
pHage2-EF1a-TERT-IRES-Puro	This paper	N/A
pHage2-EF1a-TERT K78E-IRES-Puro	This paper	N/A
pLKO.1-ATMsh#2-Puro	Sigma	N/A
pLKO.1-shScrambl-Puro	Sigma	N/A
pLKO.1-shNTC-Puro	Ferbeyre lab (UdeM)	N/A
pcDNA3.1(Hygro) TagBFP-hNucleolin	This paper	N/A
pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9	Addgene	Addgene plasmid # 42230
pMSCVsin-PGK-PURO-U1-hTR	This paper	N/A
pHAGE-EF1a-POT1-WT-IRES-puro	This paper	N/A
pHAGE2-EF1a-POT1-deltaOB-IRES-puro	This paper	N/A
pWZL hygro-hTCAB1	This paper	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
ImageJ v1.52p	Schneider et al., 2012	<a href="https://imagej.net">https://imagej.net</a>
TrackMate v4.0.1	Tinevez et al., 2017	<a href="https://imagej.net/TrackMate">https://imagej.net/TrackMate</a>
3D ImageJ Suite with RoiManager 3D V3.96	Ollion et al., 2013	
DiAna ImageJ plug-in	Gilles et al., 2017	
SpotOn	Hansen et al 2018	<a href="https://spoton.berkeley.edu">https://spoton.berkeley.edu</a>
Oligostan	Tsanov et al., 2016	
GraphPad Prism version 8	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>
MATLAB version R2017b	Mathworks Inc.	
FRAP Profiler	Jeff Hardin	<a href="http://worms.zoology.wisc.edu/research/4d/4d.html">http://worms.zoology.wisc.edu/research/4d/4d.html</a>
Nikon Elements	Nikon	
Zen Microscopy software version ZEN 2.6	Zeiss	
<b>Other</b>		
TetraSpeck™ Microspheres, 0.1 µm	ThermoFisher Scientific	T7279

## **II.7.2 - RESOURCE AVAILABILITY**

### **Lead Contact and Materials Availability**

Further information and requests should be directed to the Lead Contact, Agnel Sfeir ([agnel.sfeir@med.nyu.edu](mailto:agnel.sfeir@med.nyu.edu)).

### **Materials Availability**

Requests for Material will be fulfilled after execution of a suitable Materials Transfer Agreement. Plasmids generated in this study are available at Addgene.

### **Data and Code Availability**

Imaging data supporting the current study are available from the corresponding author on request.

## **II.7.3 - Experimental Model and Subject Details**

### **Cell culture procedures and treatments**

293T cells were obtained from ATCC. HeLa 1.3 cells were cloned from parental HeLa and have long telomeres, identified by the de Lange lab (Takai et al., 2010). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Corning) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (BCS, Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), and 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco). Cells were passaged every 48-72 hours and maintained mycoplasma free by using Plasmocin (Invivogen) per manufacturer indication. For ATM inhibition, cells were treated with 3  $\mu$ M of KU60019 (Tocris Bioscience) for 24 hours. ATR inhibition was achieved by treating cells with 0.5  $\mu$ M of VE822 (Selleck Chemicals) for 3 hours. For inhibition of Telomerase template annealing, 3  $\mu$ M of GRN163L was added for 24 hours. Transduction of GFP-MCP, hTERT, BFP-coilin, mCherry-CDT1-TRF1, and TCAB1, was achieved using lentivirus-containing supernatant generated in 293T cells.

Viral supernatants were supplemented with 4 g/ml polybrene. Infections were followed by puromycin selection for 3 days or sorted with GFP in the case of GFP-MCP.

## **II.7.4 - Methods Details**

### **II.7.4.1 - CRISPR/Cas9 gene editing**

#### *hTR-MS2 targeting:*

HeLa MS2 knock-in cells were generated by CRISPR/Cas9 targeting. Briefly, HeLa cells were transfected using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) using a donor plasmid of 3xMS2 repeats flanked by homologous hTR sequences and 3 different gRNAs cloned into a Cas9 Nuclease plasmid, pSpCas9(BB) (PX330) (Addgene #42230). Targeting was done for the 5' and CR4/5 sites, independently. (gRNA sequences: gRNA4 (5') TCCGCAACCCGGTGCCTGC, gRNA5 (5') GCAGCGCACCGGGTTGCGGA and gRNA9 (CR4/5) TCGGCCCGGGGCTTCTCCGG]. Cells were selected 24 hours post transfection using 600 ng/mL of Puromycin. Selection was removed after 24 hours and surviving cells were plated at clonal density. Individual clones were isolated and used to establish targeted cell lines.

The initial genotyping PCR was performed to determine donor integration using primers that bind within donor sequence. (RA\_in Fw3: AGCCCGCCCGAGAGAGTG and LA\_in Rv1: ATGTGTGAGCCGAGTCCTGGG). Hits identified from the initial genotyping screen were further validated by additional PCR and by Northern blot analysis. To validate site-specific integration of the MS2 sequences, a restriction enzyme digestion was performed on a PCR product obtained using hTR and donor primers (LA\_out Rv2: AGAATGGCCTGTTTGTCTTTCAACCTAGTGGG and RA\_in Fw2 TTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCG). 1450bp amplicon corresponds to non-targeted allele, while a band of 1550bp indicates MS2 integration. Amplicon from targeted alleles yield two bands when digested with Hpy991. Successful targeting of the 5' end of hTR generated bands of 1200bp and 350bp, while targeting at the Cr4/5 region 900bp



and 600bps indicated successful targeting of the CR4/5 region. Finally, to confirm site the site-specific integration, the hTR regions were sequenced.

*TCAB1 targeting:*

TCAB1 (WRAP53) was targeted in MS2\_hTR HeLa cells (clone 15.5) using CRISPR/Cas9 targeting. A mixture of 2 sgRNAs that specific for exon 1 (~100bp downstream of the ATG) were cloned into Cas9 nuclease (pX330\_puro). gRNA sequence: GTCCGCATTTTTATTCATCG and TTTATTCATCGGGGAAGCGT. A single stranded DNA oligo to serve as a homologous recombination donor was designed and purchased from IDT. The donor introduces a premature stop codon, a frameshift substitution and XbaI restriction enzyme. HeLa cells were transfected with the gRNAs and ss donor DNA using a nucleofector (Lonza, solution SE, Program CN-114, 1M cells/reaction +8ug DNA). Puromycin (600ng/mL) was added 24 hours after transfection and cells were selected for 3 days. clonally derived cell lines were established. Clones were screened for ssDonor integration and TCAB1 KO by PCR amplification and XbaI restriction enzyme digest (primers: F4: AGAAGAGGAGGGGAAGCACAGG and R2: TTCCATGGCTTTTCCAGACCCC). A wildtype band corresponds to 497bp and cleaved into 220bp and 227bp upon targeting. Proper integration was further confirmation by sequencing the locus.

*hTERT targeting:*

hTERT was knocked out using CRISPR/Cas9 targeting of MS2\_hTR HeLa1.3 cells (clone 15.5). gRNAs were designed to target exon 2 of the TERT locus. Two gRNAs were cloned into the EmptySpCas9n(Bbs)(Bsa)-2A-GFP plasmid to allow for double nuclease cutting of the target sequence sites. [gRNA sequences: gRNA1: CACCGCTTCGGGGTCCACTAGCGTG and gRNA5: CACCGCGCAGCTACCTGCCCAACA]. A donor plasmid was designed and contained two 500bp sequenced with homology to the hTERT locus. Cells were transfected with the donor plasmid and gRNAs/Cas9 and sorted for GFP expression of the Cas9. Cells were recovered for 1 week and then selected for Puro integration. Surviving cells were plated

for clonal expansion and screened for on-target Puro integration and hTERT knockout. (primers: geno Rev RAD out: AACAGGGGCCGCATTTGCCAGTAGC and genoPURO fwd: GGGTGCCCCGCCTTCCTGG)

#### **II.7.4.2 - Western Blot analysis**

Cell pellets were collected and protein was isolated by lysing the cells using a RIPA buffer and sonication. Protein was quantified using a BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Pierce) and 20µg of protein/sample was loaded in the gel. the gel was transferred to a membrane using the BioRad turbo blot. The membrane was blocked in 5% (w/v) milk for 1 hour and then incubated with an affinity purified TCAB1 antibody (Artandi Lab) diluted 1:10000 in 5% (w/v) milk at 4°C overnight, or gamma-Tubulin, diluted 1: 5000 in 5% (w/v) milk at 4°C, overnight. Primary antibody was washed 3 times with TBS-T and blotted with either rabbit (1:5000 - TCAB1) or mouse (1:5000 - Tubulin) for 30 minutes at room temperature. The membrane was washed again and the signal was detected using BioRad ECL. Recombinant anti-ATM antibody (Y170, Abcam ab32420), anti-c-Myc antibody clone 9E10 (Millipore, 1:1000 dilution), and Recombinant Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody (Y182, Abcam ab32020) were incubated diluted 1:1000 in 3% (w/v) BSA in TBS-T at 4°C, overnight).

#### **II.7.4.3 - Telomere length analysis**

Analysis of telomere length was performed using pulse-field gel electrophoresis and in gel hybridization as previously described (Hockemeyer et al., 2006).

#### **II.7.4.4 - Northern Blot analysis**

Total cellular RNA was prepared using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer instructions. 20 µg RNA was loaded onto 1.5% (v/v) formaldehyde agarose gels and separated by gel electrophoresis for 17hours at 40V / 4°C. RNA was transferred

to a Hybond membrane. The blot was prehybridized at 60°C for 1 h in Church mix (0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS, and 1% (w/v) BSA), followed by hybridization at 60°C overnight with probes for hTR and MS2. A combination of six P<sup>32</sup>-labeled probes tiling the hTR were used (hTR probes: hTR-1/16-R:CCACCCTCCGCAACCC, hTR hTR-43/66-R: GCCCTTCTCAGTTAGGGTTAGAC, hTR-143/166-R: GCTCTAGAATGAACGGTGGGAAGG, hTR hTR-304/322-R: CGGCTGA CAGAGCCCAAC, hTR-368/388-R: ACTCGCTCCGTTCTCTTCC, hTR 407/ 424-R: CGTCCC ACAGCTCAGGG). A single P<sup>32</sup>-labeled MS2 probe was used (MS2 probes: ACATGGGTGATCCTCATGT). The blot was exposed to a PhosphorImager screen and scanned using Image-Quant software.

#### **II.7.4.5 - TRAP assay**

Cell extracts were prepared from cells with CHAPS 1X lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.1mM Benzamidine, 5mM β-mercaptoethanol, 0.5% (v/v) CHAPS, 10% (v/v) glycerol). TRAP assay was performed on cells extract with TRAPeze telomerase detection kit (Millipore) according to the manufacturer instruction. The TS primer was radiolabeled with γ-<sup>32</sup>P-ATP prior to PCR amplification. DNA amplicons were separated by a 10% (v/v) poly-acrylamide gel electrophoresis. The gel was dried and exposed with a PhosphorImager screen and scan with Image-Quant.

#### **II.7.4.6 - Imaging**

For live-cell microscopy, cells were plated on glass-bottom 35mm dishes (Fluorodish FD35-100 WPI) in growth media. Three hours before imaging, growth media was replaced with imaging media (DMEM phenol red free with 10% (v/v) FBS and 25mM HEPES pH7.4) and cells were imaged on a Zeiss Axio-Observer Z1 Yokogawa CSU-X1 spinning disk inverted confocal microscope equipped with two EMCCD Evolve cameras (Photometrics, 512×512 pixels, 16 μm). The images were acquired with a 100X NA 1.46 oil objective. The pixel size of the images obtained was 0.133μm. Zeiss TempModule was set to 37°C two hours prior to imaging in order to allow all components of the imaging chamber to

reach the appropriate temperature. The different lasers (405nm 50mW OPSSL, 488nm 100mW diode, and 561nm 40mW diode) were turned on for a minimum of one hour before imaging.

For DualCamera imaging of hTR-GFP and mCherry-hTRF1, cells were excited simultaneously with the 488nm and 561nm lasers. Emission was split by a Zeiss FT 560 beam splitter. The Zeiss DualCamera calibration Wizard software was calibrated with a slide of multi-fluorescent tissue to apply an Affine (translation + rotation + isoscaling) transform to the 561nm laser image. Images were acquired continuously with 70ms exposure time (plus 30 ms transfer, resulting in 100 ms interval) for 400 images. To determine the localization precision of the hTR-GFP and mCherry-hTRF1 imaged in DualCamera mode, 100 nm TetraSpeck beads were suspended in glycerol droplets to achieve diffusion coefficients similar to that of telomeres. The localization precision of the 488nm and 561nm images of the beads was 45 nm.

For short tracks imaging, hTR-GFP was filmed continuously at 100ms exposure time for 100 images on a single Evolve camera (frame rate of 10 images per second). A single image of the mCherry-hTRF1 signal with 350ms exposure was acquired both at the start and the end of the time series. For long tracks, mCherry-hTRF1 and hTR-GFP were acquired sequentially on a single Evolve camera at 5 second intervals for 60 images. GFP was acquired with 100ms exposure time and mCherry with 150ms exposure time. Focus was maintained with the Zeiss Definite Focus LED IR 835nm laser every 10 images.

Still images of GFP-MS2CP (488nm laser), TRF1-mCherry (560 nm) and Coilin-BFP(405nm) were captured using Nikon Eclipse Ti2 inverted scope with Confocal A1R (25 z-stacks).

#### **II.7.4.7 - Photoactivation**

For photoactivation experiments, cells expressing mCherry-hCoilin and paGFP-MCP were plated as described above for live-cell imaging. The cells were imaged with mCherry filter in Live mode. The Cajal body marked with mCherry-hCoilin was positioned in the center of the field of view (FOV), so that it could be targeted by the centered 1.5  $\mu\text{m}$

diameter illumination area of the Zeiss Direct-FRAP module with the 405nm laser for photoactivation. Five pre-bleach images were acquired. The center of the FOV was then exposed to the 405nm laser for 500ms, and 195 images were then acquired to follow the  $hTR^{5MS2}$ -paGFP signal. The time series was filmed continuously at 150ms exposure time (plus 30 ms transfer, resulting in 180ms interval).

Analysis of the photoactivation experiments was carried out by loading Zeiss czi files in Image J and saving then as single channel 16-bit TIFFs. The exponential fit bleach correction was applied to the paGFP image series. A 7 pixels diameter circle (0.93  $\mu$ m) ROI was used to measure fluorescence grey levels (integrated density) of paGFP in the center of the Cajal body of FOV position. The fluorescence background of paGFP was measured in four 7 pixels diameter circular regions in the nucleoplasm and the average background at each time-point was subtracted from the value of the  $hTR$ -paGFP in the CB. The value of fluorescence in the Cajal body center in the first image after the 405nm laser photoactivation, was set to 1. All subsequent values were reported as a fraction of 1. The paGFP fluorescence decay curves were analyzed in GraphPad prism with exponential decay equations. The parental HeLa  $hTR^{WT}$  cells had a single population of paGFP-MCP that fits the one-phase decay equation. The CBs of  $hTR^{5MS2}$  cells in which  $hTR$  was detected had two populations of paGFP-MCP (free and  $hTR^{5MS2}$ -bound) and were analyzed with a two-phase decay equation.

#### **II.7.4.8 - Telomere Dysfunction Induced Foci (TIF) Analysis**

The TIF assay was performed as previously described (Takai et al., 2003). Cells expressing POT1 variants and treated with ATRi were fixed and subjected to IF-FISH. The primary antibodies used were 53BP1 (100-304A, rabbit polyclonal; Novus Biologicals; 1:1000). The secondary antibodies used were raised against rabbit and conjugated with Alexa 488 (Jackson Immuno Research).

#### **II.7.4.9 - Photobleaching**

Cells were grown on 35 mm glass bottom (#1.5) dishes (MatTek). Prior to each imaging session, cells were transferred to DMEM lacking phenol red and supplemented with HEPES. Imaging was performed on a Nikon Eclipse Ti2 equipped with a Yokogawa Electric CSU-W1 spinning disk module, and using a 100x objective (NA 1.35, Plan Apo). Image acquisition was performed using Nikon Elements software. A Tokai Hit stage-top incubator was used to control temperature, humidity, and CO<sub>2</sub> levels. CBs with colocalizing hTR were identified, and a circle of 2 micron diameter around the Cajal body was bleached with 405 nm beam (Bruker). Five initial images were taken of each cell before bleaching. After bleaching, images were taken every 600 ms with a 100 ms exposure time for 60 s. Images were collected using two Andor iXon 88 Life EMCCD cameras connected by a twin-camera module (Cairn). Cells were illuminated with 488 nm light (for MS2-hTR) and 564 nm light (for mCherry-Coilin). Registration was corrected using Tetra Speck beads (Invitrogen) and images were flat-field corrected for the 488 nm channel using a solution of fluorescein (Model and Burkhardt, 2001). FRAP analysis was performed in FIJI (Schindelin et al., 2012) using the FRAP Profiler plugin (<http://worms.zoology.wisc.edu/research/4d/4d.html>). FRAP curves were fit to averages of the data sets in Prism using a one-phase association model.

#### **II.7.4.10 - smiFISH and Super-resolution microscopy**

Single molecule RNA FISH against hTR was performed according to the method described in (Tsanov et al., 2016) with some modifications. HeLa cells were plated on acid washed glass coverslips (22x22mm no1.5) and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized in 0.5% (v/v) Triton-X100 at room temperature for 5 minutes and transferred to 1X SSC 15% (v/v) formamide solution for hybridization. A 15 hTR smiFISH probe set was designed with Oligostan R script described in (Tsanov et al., 2016) with additional 4 probes within the MS2 sequence (Table S1). The hTR probe sets were hybridized with a FLAP-Cy5 oligo. Hybridization was carried out overnight at 37°C. Coverslips were washed with 1XSSC; 15% (v/v) formamide then rinsed in PBS and blocked in 0.1% (v/v) Triton-X100; 2% (w/v) BSA for 1 hour. Cells

were then incubated with coilin antibody (1:500 in blocking solution) for 2 hours at room temperature. Alexa488 anti-mouse secondary antibody (1:6500 in blocking solution) was incubated for 50 minutes at room temperature. Lastly, cells were stained with H33342 (0.5 $\mu$ g/ml in PBS) and mounted with Prolong Glass antifade (ThermoFisher P36982) for 72 hours prior to image acquisition.

hTR smiFISH images were acquired with a 63X NA 1.46 oil objective on a Zeiss Elyra PS.1 super resolution microscope equipped with an Andor EMCCD iXon3 DU-885 CSO VP461 camera (1004x1002 pixels). Lasers used included: 50 mW 405 nm HR diode, 100mW 488 nm HR diode, 150mW 642 nm HR diode were used to image H33342 (DNA stain), AF488 and CY5 dyes respectively. Structured illumination images from z-stack were acquired using three rotations and a grid size of 42  $\mu$ m for all channels. TetraSpeck microspheres (ThermoFisher T7279 0.1 $\mu$ m) in the same mounting media (Prolong Glass ThermoFisher) as the samples were imaged in all channels to correct for pixel shift. A built-in channel alignment tool in ZEN 2012 SP5 which uses an Affine image alignment algorithm was used for image registration. Maximum intensity projection images are shown in the smiFISH-IF figures, but the hTR spots and CBs were analyzed as volumes with the 3D ImageJ Suite tools (Ollion et al., 2013). The voxel size after the SR-SIM image processing was 0.04 $\mu$ m in X, Y with a step size of 0.18 $\mu$ m in Z. A 3D reconstruction of the nucleus was used to quantify the size and number of hTR foci. The eccentricity ratio was calculated by measuring the center to center distance between the Cajal body and a hTR foci, divided by the radius of the Cajal body along the same axis.

#### **II.7.4.11 - Quantification and Statistical Analysis**

All quantitative analyses were performed with a minimum of two or three independent replicates. The Student's t test was used to determine statistical significance. Values are reported as mean  $\pm$  SD as indicated in figure and supplementary figure legends.

#### II.7.4.12 - Single particle tracking

For single camera images, Zeiss czi files were opened in Image J and saved as single channel 16 bit TIFFs. The exponential fit bleach correction was applied to all image series that showed decay. The outline of the nucleus was drawn with the freehand tool using the mCherry-hCdt1 /mCherry-hTRF1 image and saved as an ROI. Image J TrackMate plugin (Tinevez et al., 2017) was used for single particle tracking within nuclear ROI. The Laplacian of Gaussian spot detection matrix was set to four pixels (0.53  $\mu\text{m}$ ) and median filter and sub-pixel localization were selected. TrackMate simple LAP tracker was used with a linking max distance of 0.8  $\mu\text{m}$ , and zero gap-closing. A filter was set such that only tracks with 5 or more consecutive spots were considered. The diffusion coefficient (D) is the slope of the MSD over time. The Mean Square Displacement (MSD) is calculated with the formula:

$$MSD = \sum_{0-i} \left[ \sqrt{(x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2} - \sqrt{(x_{i-1} - x_0)^2 + (y_{i-1} - y_0)^2} \right]^2$$

We calculated D as the slope of the MSD over time for the first five points of each track. To calculate D for the thousands of hTR-GFP tracks in the nucleoplasm, an R Studio script was designed to obtain D for all tracks from the TrackMate output.

For Dual Camera images, Zeiss czi files were exported to the OME TIFF format from within the ZEN 3.0 (blue edition) software to conserve the Affine alignment of the second camera images. OME TIFF files were then analyzed in Image J. Exponential fit bleach correction was applied to all image series that showed decay. ImageJ TrackMate plugin was used to track hTR-GFP and mCherry-hTRF1 within a 21 pixel round region of interest (ROI) positioned over a single telomere. The Laplacian of Gaussian spot detection matrix was set to four pixels (0.53  $\mu\text{m}$ ) and median filter and sub-pixel localization were selected. TrackMate simple LAP tracker was used with a linking max distance of 0.2  $\mu\text{m}$ , and zero gap-closing.



The formula for the radius of gyration was:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i^n ((x_i - \bar{X})^2 + (y_i - \bar{Y})^2)}$$

To represent the variation in amplitude movement of hTR and telomeres in DualCamera images, a sliding window of 500 ms moving in increments of 100 ms was applied to either the diffusion coefficient or the radius of gyration, and sliding window values were calculated. The sliding window of diffusion coefficient and radius of gyration of 100 nm TetraSpeck beads in glycerol droplets were calculated to determine the amplitude of variation of perfectly colocalized signals with the DualCamera microscope. The difference between the radius of gyration of the bead in 488nm and 561nm laser images was 0.012 $\mu$ m. For the diffusion coefficient, the average difference between the D in the two colors was 0.01  $\mu$ m<sup>2</sup>/sec. These values represent the precision of these diffusion measures with the imaging conditions we used.

The coordinates dataset from single particle tracking made with TrackMate on nuclear hTR-5'MS2 were analyzed with the Spot-On software (<https://spoton.berkeley.edu>). The jump length histogram was created with a bin width of 0.01  $\mu$ m and eight time points, four jumps were considered in each track, with a maximum jump length of 3  $\mu$ m. The  $\Delta t$  was set to 100 ms, the frame rate for hTR acquisition. We fitted a two states model with a maximum  $D_{\text{bound}}$  and a minimal  $D_{\text{free}}$  set to 0.2566  $\mu$ m<sup>2</sup>/s, corresponding to our maximal telomere diffusion. Our maximum localization error was measured on hTR-5'MS2-GFP particles as describe in Spot-On documentation and set to 0.47  $\mu$ m. The depth of field was set to 0.72  $\mu$ m, corresponding to our microscope.

## **II.8 - Acknowledgements**

We thank Steven Artandi, Titia de Lange, and Jerry Shay for providing key reagents for this study. We acknowledge M. Anh-Tien Ton (Serohijos lab) and Dr. Nicolas Stifani (UdeM) for their assistance in writing scripts for image analysis. Frank Yeung, Michal Cammer, and Aleks Penev are thanked for their help in the early stages of the study. We acknowledge the microscopy core at NYU School of Medicine and UdeM. We thank members of the Sfeir and Chartrand lab for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Hirschl-Weill-Caulier foundation (A.S.), the Canadian Institutes of Health Research (PJT-162156) and the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI) to P.C. P.C holds a Research chair from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

## **II.9 - Authors Contribution**

A.S. and P.C. conceived the experimental design. H.L. performed key experiments with help from E.Q., D.G., E.P., and D.C. D.G. constructed and validated the MS2-hTR system. E.Q. and M.J.S. performed experiments related to CBs. D.C. performed still image analysis. H.C. performed all gene editing experiments. A.S. and P.C. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

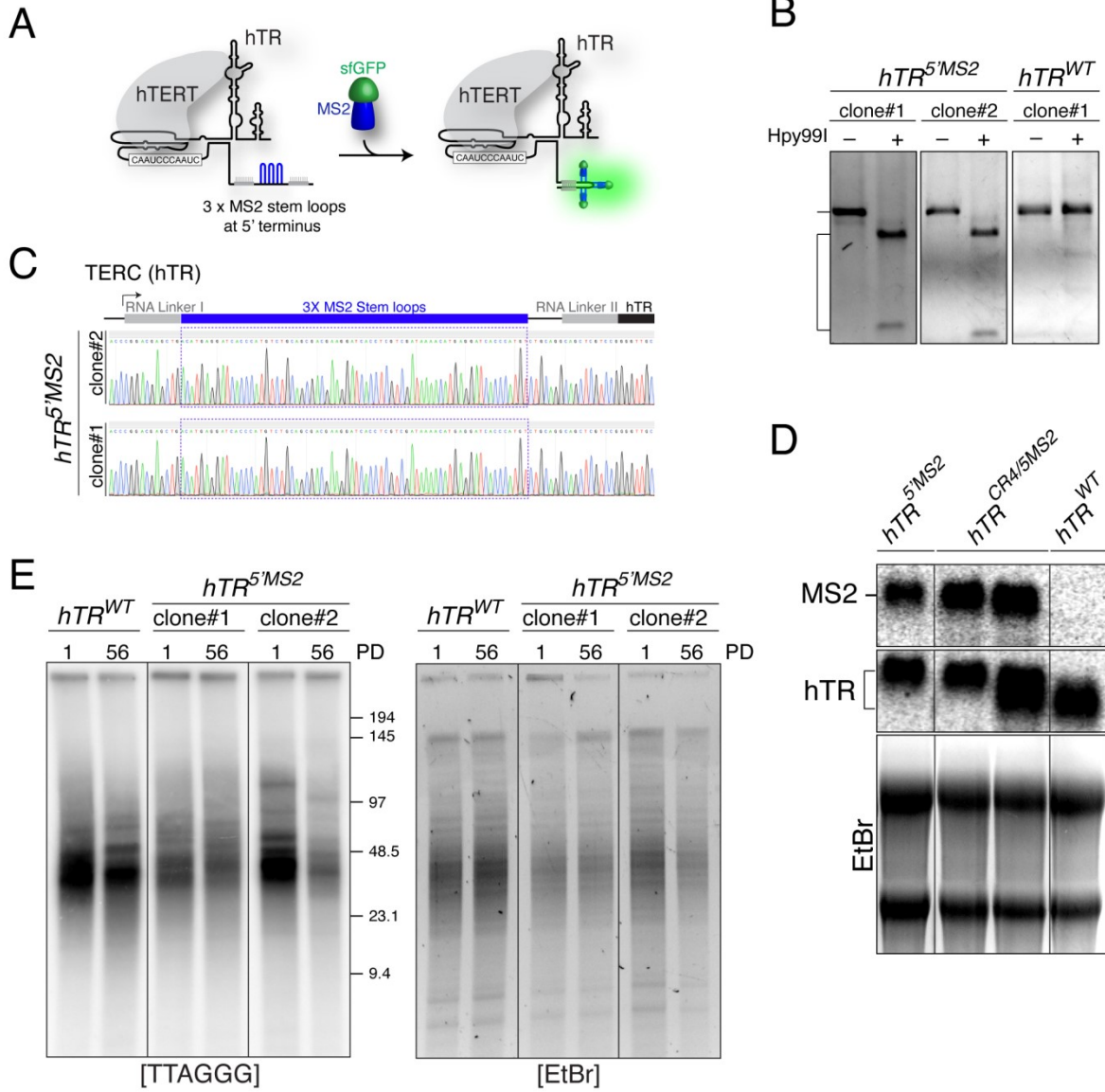
## **II.10 - Declaration of Interests**

Agnel Sfeir is a co-founder of Repare Therapeutics and a member of its scientific advisory board.

## **II.11 - Authors information**

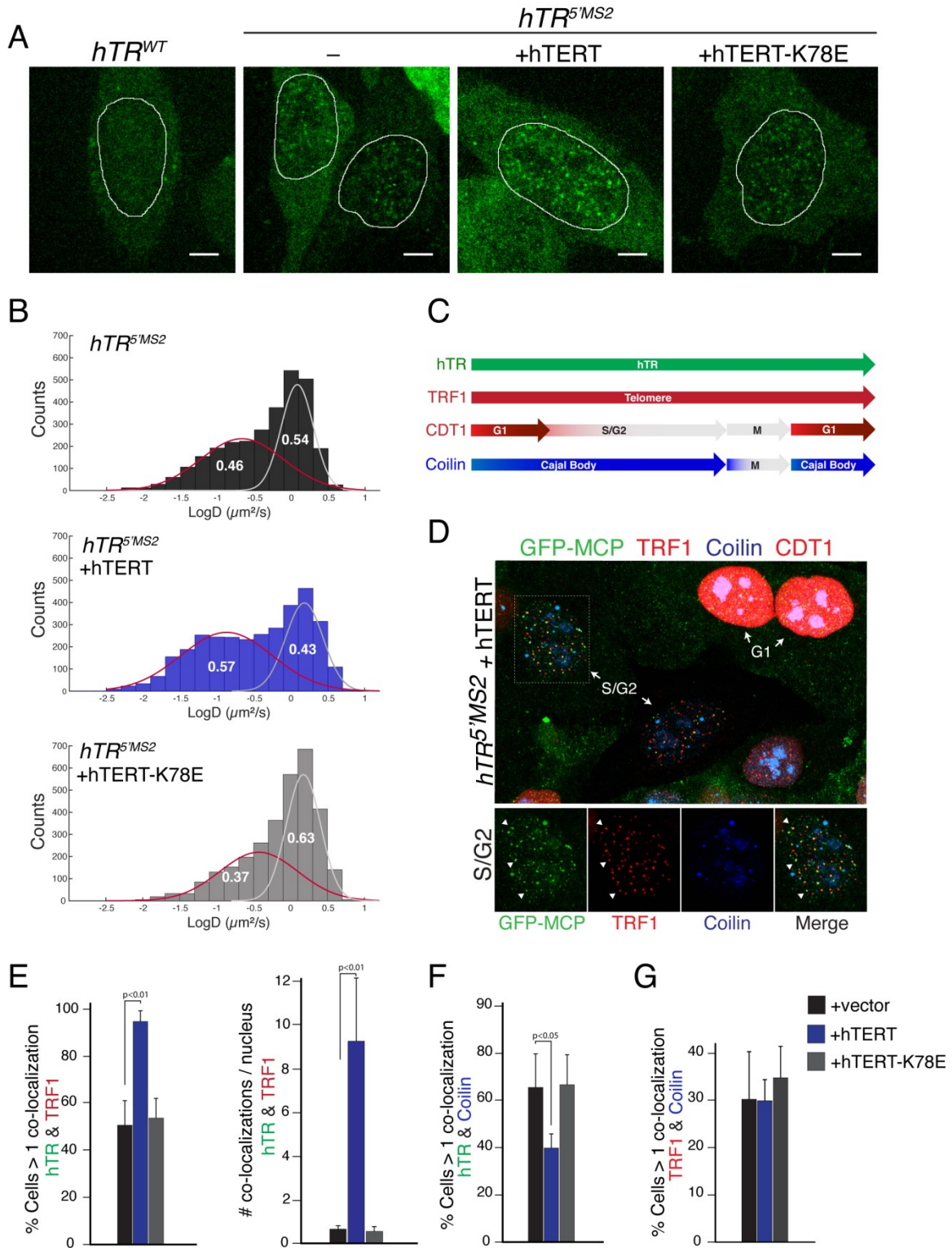
Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C. [p.chartrand@umontreal.ca](mailto:p.chartrand@umontreal.ca) and A.S. [agnel.sfeir@med.nyu.edu](mailto:agnel.sfeir@med.nyu.edu)

## II.12 – Figures



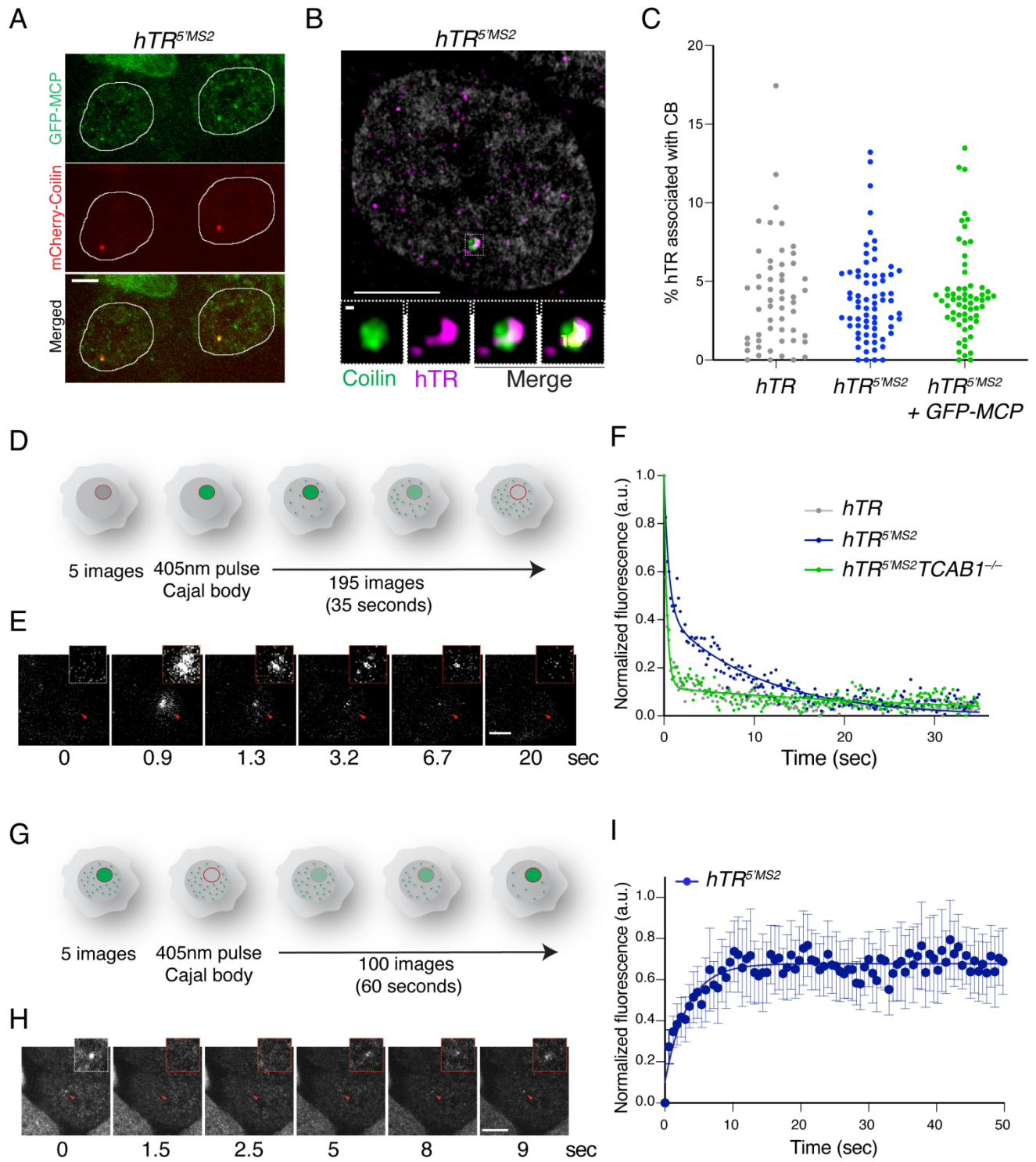
**Figure II.1: Tagging endogenous hTR with MS2 stem loops.**

**(A)** Schematic depiction of hTR tagged at the 5'-end with three MS2 stem-loops flanked by stabilizing RNA linkers. MS2-hTR is bound by GFP-labelled MS2 coat protein (GFP-MCP). **(B)** Genotyping PCR on DNA isolated from HeLa 1.3 cells to detect homozygous targeting of the endogenous hTR locus with three MS2 stem loops. Integration of the stem-loops generates a new Hpy99I cleavage site that is used to assess proper gene targeting. **(C)** Sanger sequencing to confirm proper integration of three stem-loops at the 5'-end of the hTR locus. **(D)** Northern blot analysis using MS2 (top) and hTR (bottom) probes on RNA isolated from the indicated cell lines. EtBr marking 28S and 18S rRNA serves as a loading control. **(E)** Southern blot analysis to monitor telomere length over time in HeLa 1.3 cells with the indicated genotype over time. *Mbo*I and *A**lu*I digested DNA resolved on a gel electrophoresis and probed with end-labeled [AACCCCT]<sub>4</sub>. EtBr-stained DNA serves a loading control.



**Figure II.2: Single particle tracking of endogenous MS2-tagged hTR displays two dynamic populations.**

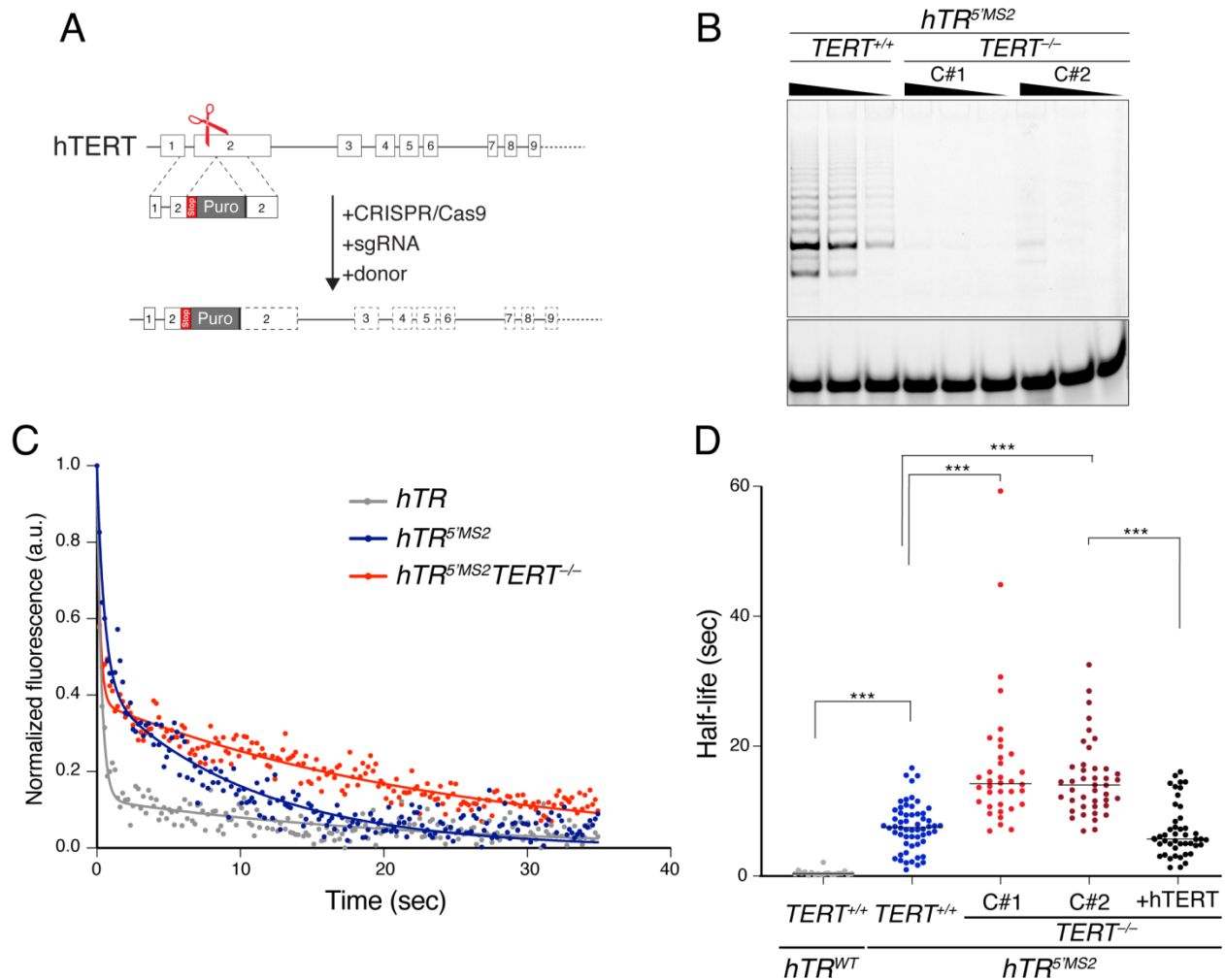
**(A)** Still images from movies showing MS2-hTR foci (in green) in  $hTR^{5MS2}$  cells and  $hTR^{5MS2}$  cells overexpressing hTERT-WT or hTERT-K78E following transduction with GFP-MCP. Non-targeted ( $hTR^{WT}$ ) cells transduced with GFP-MCP serve as a negative control (scale bar = 5 $\mu$ m). **(B)** Frequency distribution analysis of diffusion coefficient from MS2-hTR particles in  $hTR^{5MS2}$  cells overexpressing hTERT-WT, hTERT-K78E and control cells (3277 particles for  $hTR^{5MS2}$ +hTERT, 2875 particles for  $hTR^{5MS2}$ +hTERT-K78E and 2919 particles for  $hTR^{5MS2}$ ). Gaussian fitting identified two mobile populations: a highly diffusive fraction (white curve) and a more static fraction (red curve). Percentage of each fraction is indicated. **(C)** Schematic representation of the different fluorescent markers to track MS2-hTR (GFP-MCP), telomeres (TRF1), and CBs (Coilin) and to mark the cell cycle (CDT1). **(D)** Colocalization analysis between MS2-hTR/GFP-MCP, BFP-Coilin and mCherry-TRF1 in  $hTR^{5MS2}$  cells overexpressing hTERT. Marked G1 cells (top right) are mCherry-CDT1 positive while S/G2 cells are negative for mCherry-CDT1. Telomeres (labeled with mCherry-TRF1) are clearly visible in S/G2 cells and colocalization with MS2-hTR are indicated by arrowheads. Images were collected using a laser scan confocal microscope (Nikon-Ti2 microscope). **(E)** Quantification of colocalization events between hTR and TRF1, hTR and coilin **(F)** and TRF1 and coilin **(G)**. Imaging was performed in  $hTR^{5MS2}$  cells overexpressing hTERT-WT, hTERT-K78E and control (vector only). Colocalizations are expressed as percentage of cells with more than 1 colocalization and as number of colocalization per nucleus. N=3 independent experiments with SDs and P values.



### **Figure II.3: Dynamics of hTR association with Cajal bodies.**

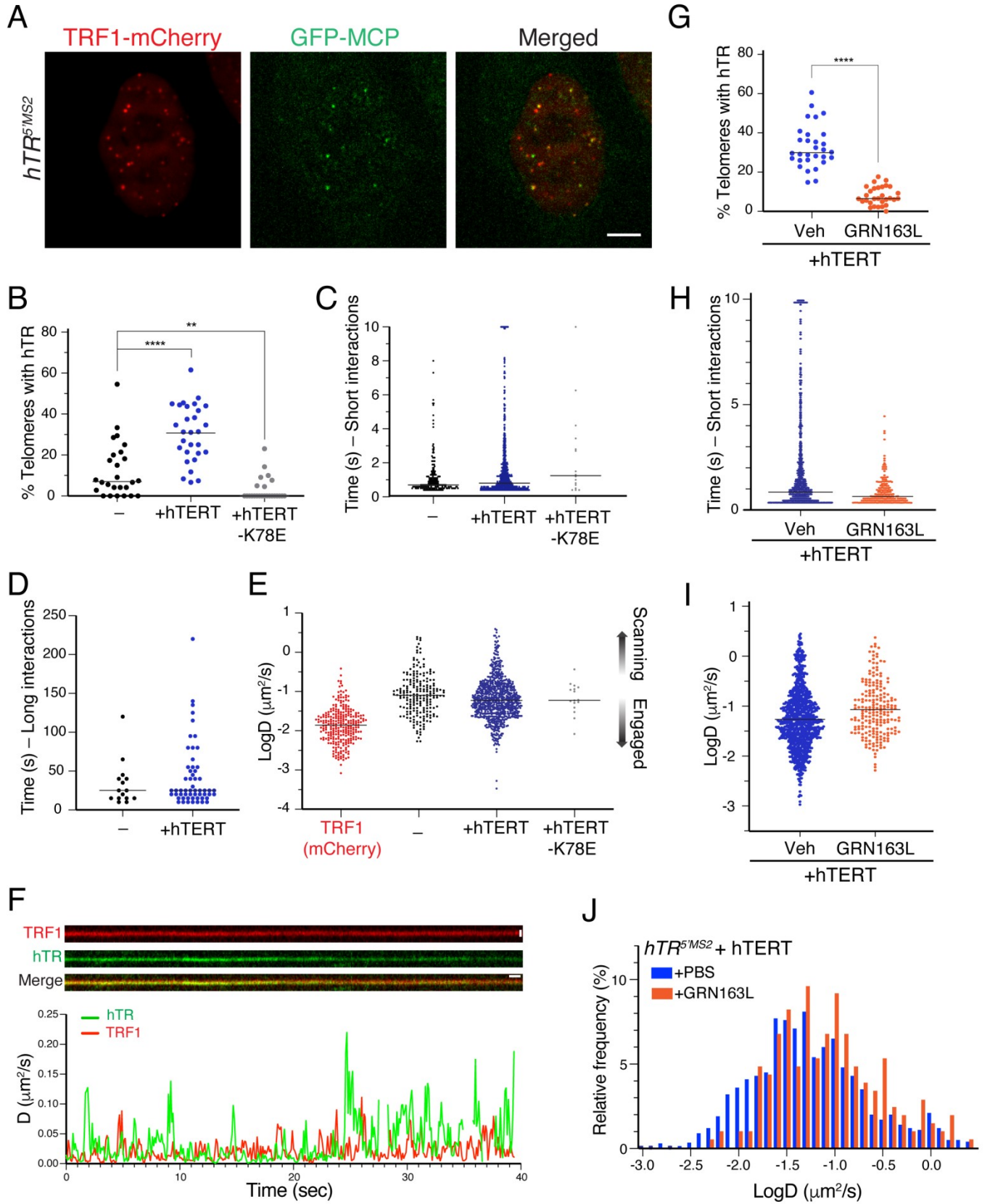
**(A)** Still images obtained from movies which show colocalization between GFP-tagged MS2-hTR and mCherry-Coilin in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells. **(B)** Validation of MS2-hTR localization at CBs by combining smiFISH for hTR with Coilin immunofluorescence using super-resolution microscopy (SIM). Coilin-hTR colocalization regions are overlaid in yellow. **(C)** Quantification of hTR associated with CBs relative to the total amount of hTR per nucleus in *hTR<sup>WT</sup>* and *hTR<sup>5MS2</sup>* cells. **(D)** Schematic depiction of photoactivation experiment. **(E)** Time-lapse of paGFP-MCP photoactivation in the Cajal body of a *hTR<sup>5MS2</sup>* cell. Red arrow indicates the photoactivated Cajal body. **(F)** Fluorescence decay curves of paGFP-MCP following photoactivation in CBs from *hTR<sup>WT</sup>*, *hTR<sup>5MS2</sup>* and *hTR<sup>5MS2</sup> TCAB1<sup>-/-</sup>* cells. For each cell line, four decay curves are averaged. **(G)** Schematic depiction of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. **(H)** Representative FRAP image from *hTR<sup>5MS2</sup>* cells. Red arrow highlights photobleached Cajal body. **(I)** Graph depicting normalized fluorescence intensity recovery of photobleached MS2-hTR in CBs of *hTR<sup>5MS2</sup>* cells as a function of time (N= 37 cells). All scale bars = 5µm, except Coilin scale bar = 0.2µm.





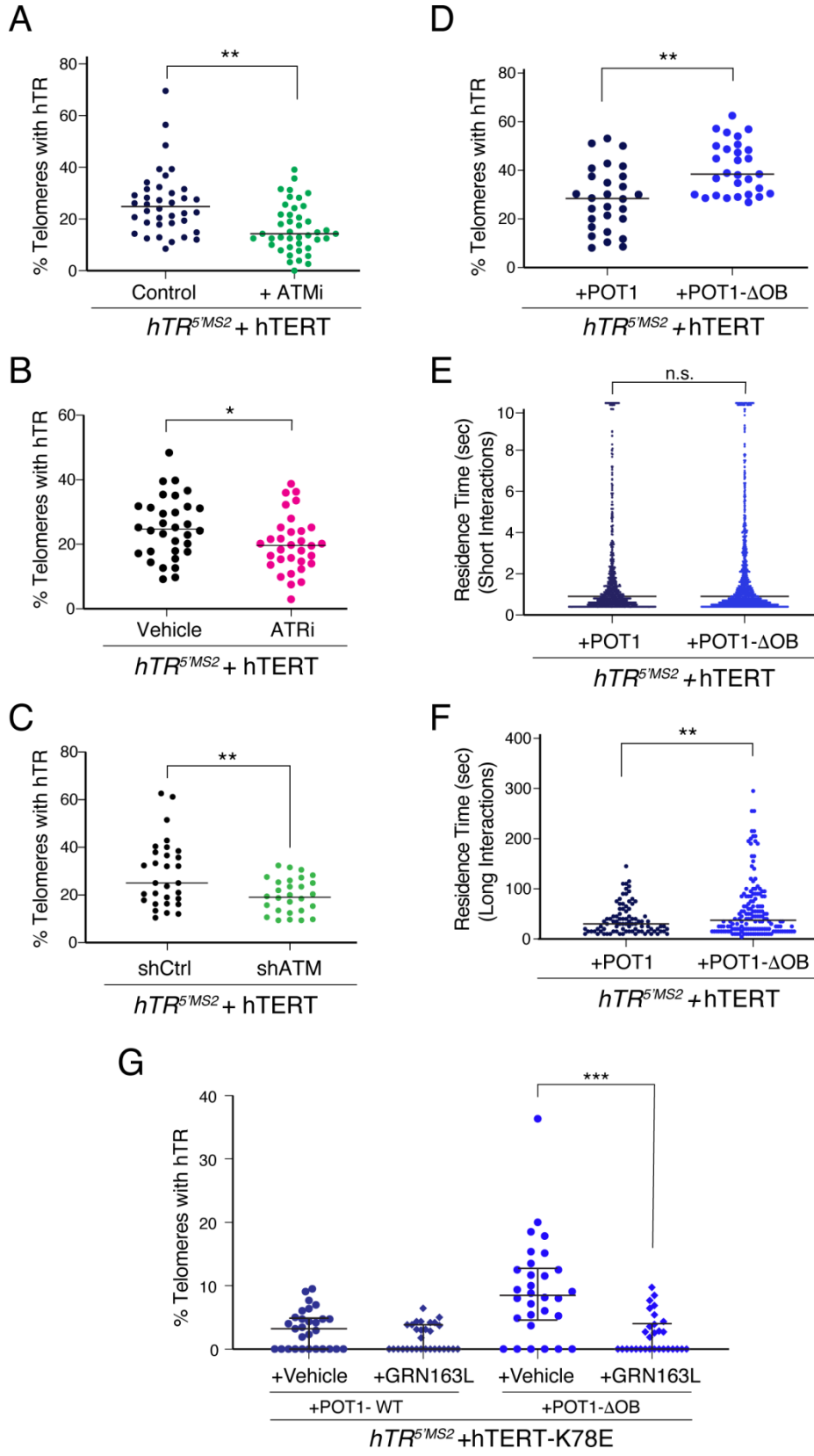
**Figure II.4: hTERT promotes the exit of hTR from Cajal bodies.**

(A) Genome editing strategy to knockout hTERT in  $hTR^{5MS2}$  cells. Cas9-mediated disruption of exon 2 of human *TERT* and the integration of a PURO selection cassette. (B) Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay to validate the loss of telomerase activity in two clonally derived  $hTR^{5MS2} TERT^{-/-}$  cells lines. (C) Fluorescence decay of paGFP-MCP following photoactivation in CBs from  $hTR^{WT}$ ,  $hTR^{5MS2}$ , and  $hTR^{5MS2} TERT^{-/-}$  cells. (D) Half-life of MS2-hTR in CBs of cells with the indicated genotype and treatment (N=2 independent experiments). \*\*\*  $p < 0.005$ .



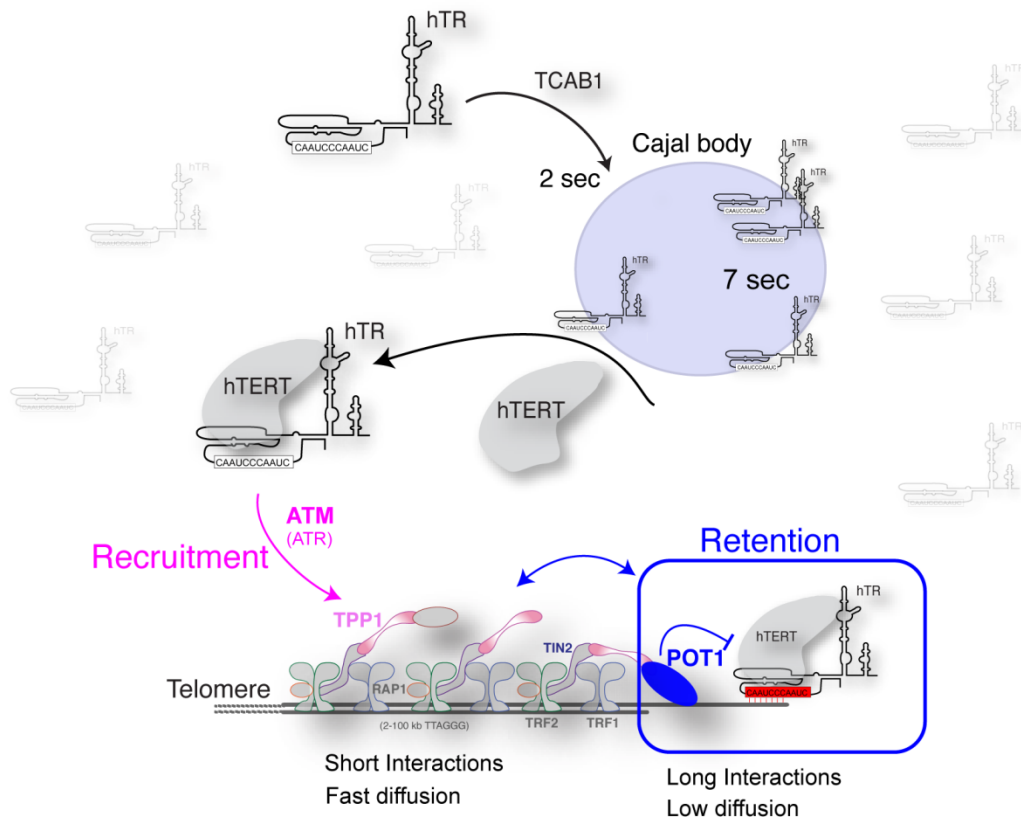
**Figure II.5: Deciphering the dynamic properties of hTR interaction with telomeres.**

**(A)** Representative image depicting the colocalization of MS2-hTR/GFP-MCP with telomeres labelled with mCherry-TRF1 in *hTR<sup>5MS2</sup>* (Scale bar = 5 $\mu$ m). **(B)** Percentage of telomeres colocalizing with MS2-hTR in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells and in cells overexpressing hTERT-WT or hTERT-K78E. Median values are 7% for *hTR<sup>5MS2</sup>*, 31% for *hTR<sup>5MS2</sup>* + hTERT WT and <1% for *hTR<sup>5MS2</sup>* + hTERT-K78E. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ . **(C)** Short-term residence time of hTR particles at telomeres in HeLa *hTR<sup>5MS2</sup>* cells, and in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells overexpressing hTERT-WT and hTERT-K78E. **(D)** Residence time of long interactions between hTR particles and telomeres in *hTR<sup>5MS2</sup>* with or without hTERT overexpression. **(E)** Graph depicting diffusion coefficients of hTR particles at telomeres in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells, and in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells overexpressing hTERT-WT and hTERT-K78E. LogD of TRF1 was used as a reference for telomere mobility. Top and down arrows correspond to scanning and engaged hTR particles, respectively. **(F)** Dual-camera imaging of hTR at a telomere. Top – representative kymograph for hTR and TRF1 tracks. (Vertical scale bar = 0.80  $\mu$ m, horizontal scale bar = 1 second). Bottom – running-window analysis of diffusion coefficients for TRF1 and hTR as a function of time over a span of 40 seconds. **(G)** Percentage of telomeres associated with MS2-hTR in *hTR<sup>5MS2</sup>* cells treated with 3 $\mu$ M GRN163L for 24 hours. \*\*\*\*  $p < 0.001$ . **(H)** Graph depicting residence time of MS2-hTR at telomeres in cells treated with vehicle or GRN163L. **(I)** LogD analysis of *hTR<sup>5MS2</sup>* +hTERT cells treated with GRN163L. Note the reduction in the frequency of slow diffusive particles upon treatment with 3  $\mu$ M GRN163L for 24 hours. **(J)** Histogram depicting the relative frequency of LogD distribution for MS2-hTR in cells as in (I).



**Figure II.6: ATM and POT1 regulate different steps of hTR interaction with telomeres.**

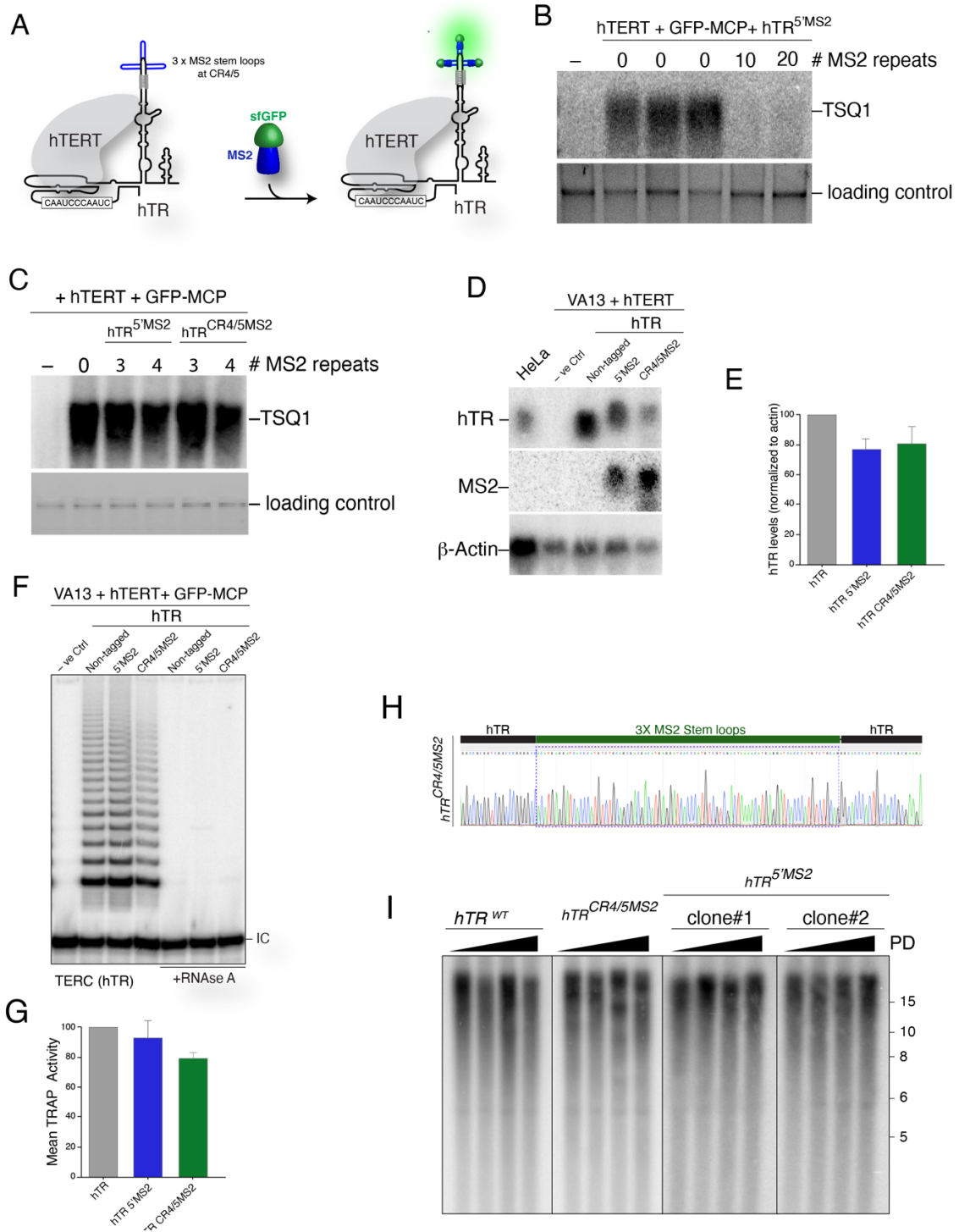
**(A)** Treatment of hTR<sup>5MS2</sup>+hTERT cells with ATM inhibitor reduces the colocalization between hTR and telomeres. Cells were treated with 3  $\mu$ M of KU60019 (ATMi) and DMSO (control) for 24 hrs. \*\* p<0.01. (N=42 cells with ATMi and 38 DMSO-treated cells). **(B)** Percentage of telomeres colocalized with hTR in hTR<sup>5MS2</sup>+hTERT cells treated with DMSO (control) and 0.5  $\mu$ M of VE822 (ATRi). \* p<0.05. (N=32 cells). **(C)** shRNA-mediated depletion of ATM reduced the localization of hTR at telomeres. Percentage of telomeres colocalization with hTR in hTR<sup>5MS2</sup>+hTERT cells expressing shCtrl or ShATM. \*\* p<0.01. (N=30 cells). **(D)** Expression of mutant POT1 increases the localization of hTR at telomeres. Graph represents percentage co-localization of TRF1 and MS2-hTR in hTR<sup>5MS2</sup>+hTERT cells transduced with POT1-WT and POT1- $\Delta$ OB. (N=29 cells expressing POT1- $\Delta$ OB and 28 cells expressing POT1-WT). \*\* p<0.01. **(E)** Short-term residence time of hTR at telomeres is independent of POT1 (N= 29 cells for POT1- $\Delta$ OB and 28 for POT1-WT). **(F)** Long-term residence time of hTR at telomeres is increased in hTR<sup>5MS2</sup> cells expressing POT1- $\Delta$ OB compared to POT1-WT. \*\*p<0.01. (N=10 cells). **(G)** POT1 inhibits the interaction of telomerase RNA template with single-stranded telomere overhang. hTR<sup>5MS2</sup>+hTERT-K78E cells expressing POT1 WT or POT1- $\Delta$ OB were treated 24h with GRN163L or vehicle control. (N=30 cells per condition). \*\*\*p<0.005.



**Figure II.7: Model for hTR dynamics between CBs, nucleoplasm, and telomeres.**

Our study unveils the life-cycle of hTR in cancer cells. The majority of hTR particles are highly diffusive throughout the nucleoplasm. A small fraction of the RNA is targeted by TCAB1 to CBs, where it is retained for an extended time. The exit of hTR from CBs is facilitated by hTERT and the assembly of a full RNP. Telomere elongation is governed by a “Recruitment – Retention” model. Recruitment of telomerase to telomere is mediated by interaction between hTERT and TPP1, and facilitated by ATM and to a lesser extent ATR. This allows a series of short interactions in which telomerase is more diffusive than its substrate. A fraction of these telomerase particles is retained at chromosome ends upon base pairing of template region of hTR with the telomere overhang. Interestingly, the retention step is regulated by the binding of POT1 OB-fold domains to the telomeric ssDNA.

## II.13 - Supplementary figures:

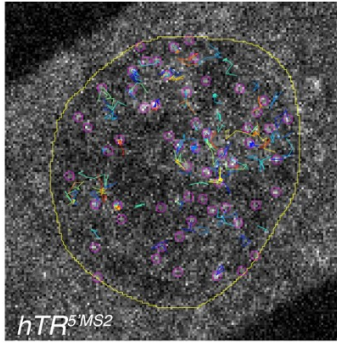


## Figure SII.1: Validation of MS2-tagged hTR, related to Figure 1.

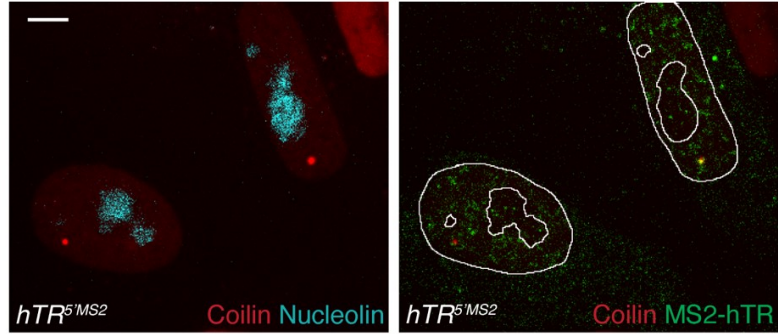
**(A)** Schematic depiction of hTR tagging in the CR4/5 region with 3MS2 stem loops that are recognized by GFP-MS2 coat protein. Dual RNA linkers were incorporated to stabilize the folding of the MS2 stem-loops. **(B)** Southern blot analysis detects incorporation of TSQ1 sequences at telomeres in 293T cells overexpressing hTERT, GFP-MCP and hTR<sup>5MS2</sup> with 0, 10, and 20 MS2 stem-loops. **(C)** Detection of TSQ1 sequences at telomeres in 293T cells expressing hTERT, GFP-MCP and hTR<sup>5MS2</sup> or hTR<sup>CR4/5MS2</sup> with 0, 3, and 4 MS2 stem-loops. **(D)** Northern blot in cells with the indicated treatment. Probes were used to detect MS2, hTR and  $\beta$ -actin (control). **(E)** Quantification of Northern blot in D. **(F)** TRAP assay to detect telomerase activity in VA13 cells with the indicated expression plasmids. **(G)** Quantification of TRAP assay in F. **(H)** Sanger sequencing confirming the integration of 3MS2 stem-loops in the CR4/5 region of the hTR locus. **(I)** Southern blot analysis to monitor telomere length in HeLa 1.3 cells with the indicated genotype for ~50 populations doublings (PDs) per genotype. Individual lanes represent increasing PDs spanning PD1-PD50.



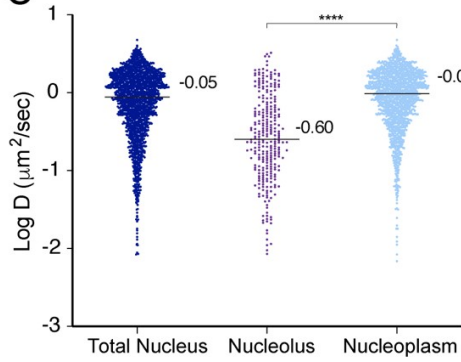
A



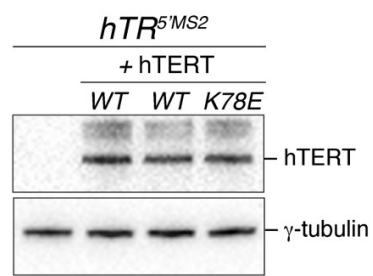
B



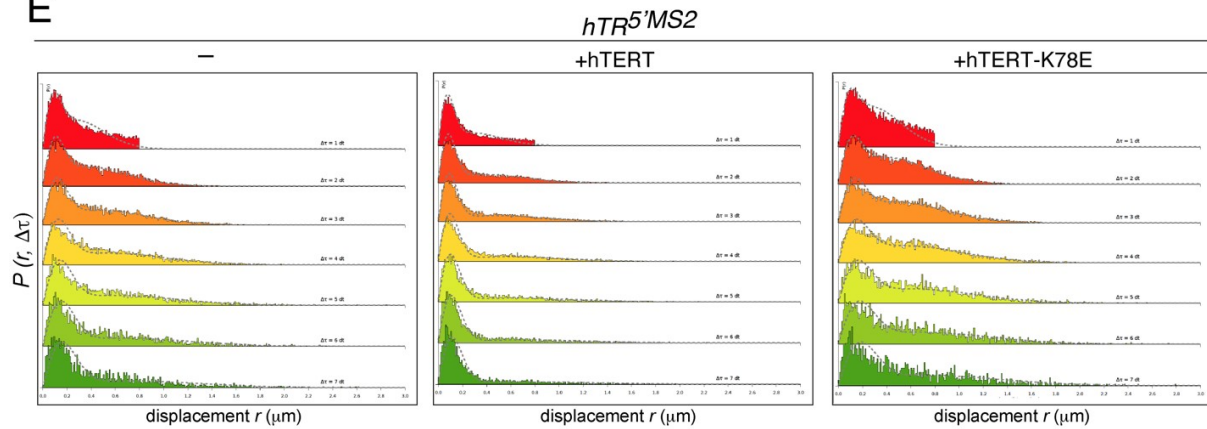
C



D



E

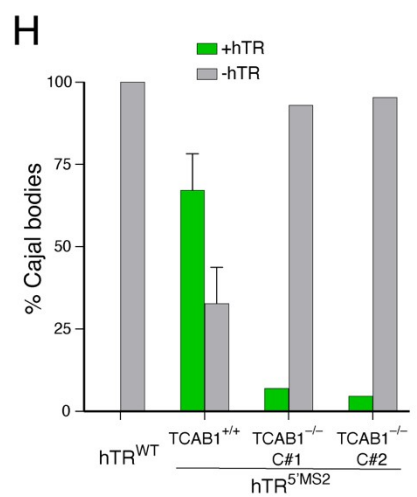
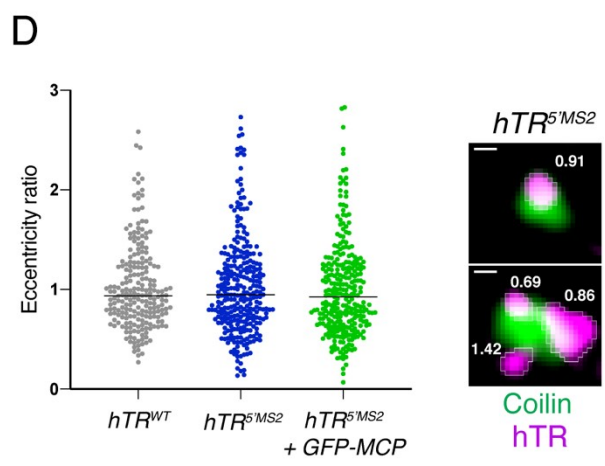
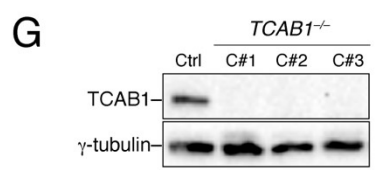
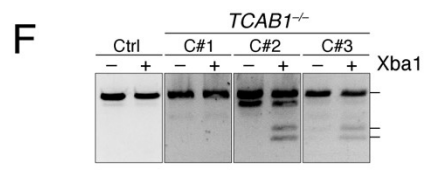
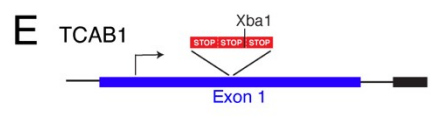
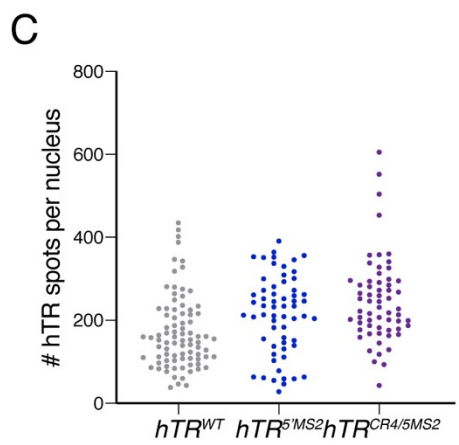
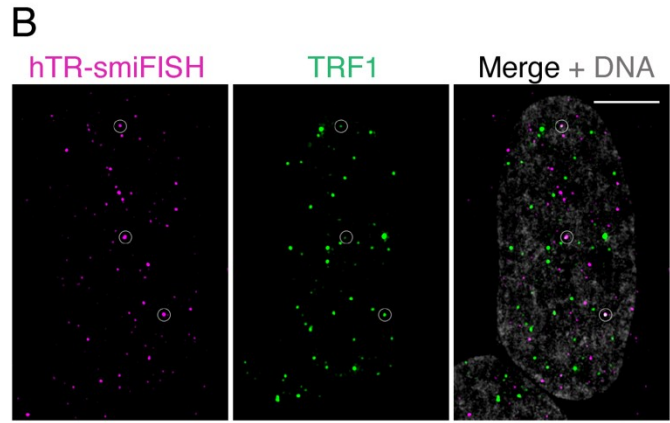
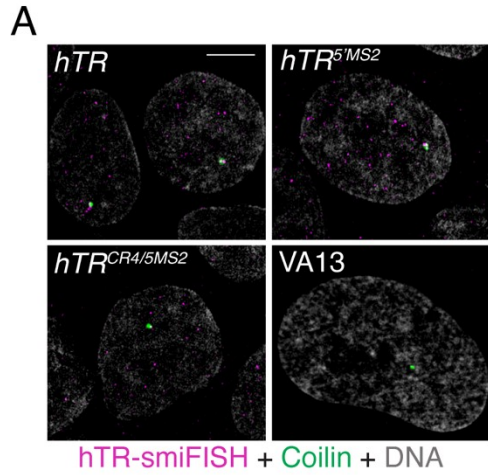


F

	<i>hTR<sup>5MS2</sup></i>		
	-	+hTERT	+hTERT-K78E
Bound Fraction	23.40%	39.10%	17.20%
$D_{\text{bound}}$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$0.015 \pm 0.0001$	$0.006 \pm 0.000$	$0.020 \pm 0.0001$
$D_{\text{free}}$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$0.387 \pm 0.0008$	$0.404 \pm 0.0011$	$0.407 \pm 0.0007$

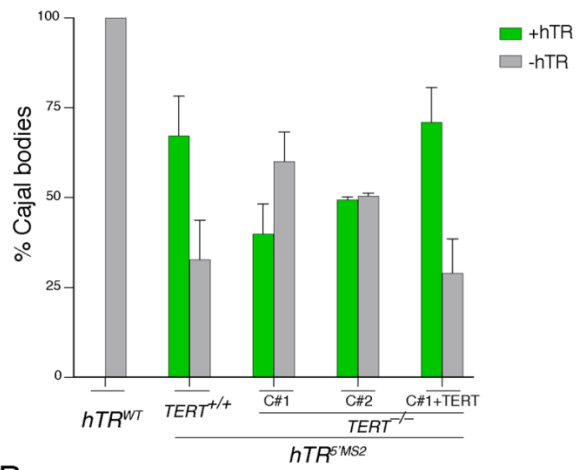
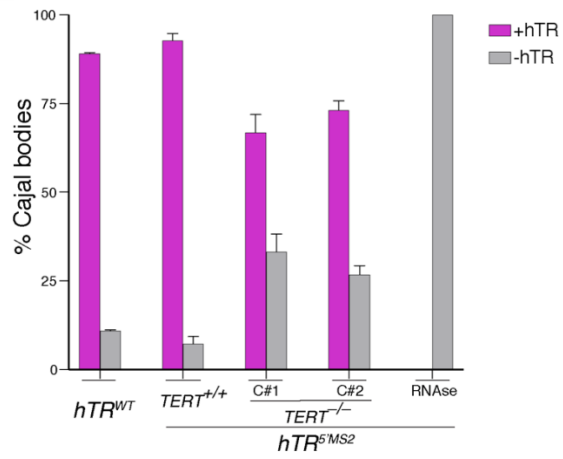
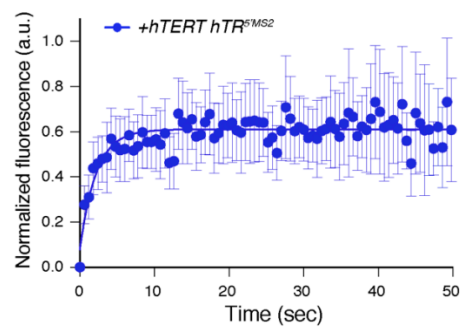
**Figure SII.2: Particle tracking of MS2-hTR, related to Figure 2.**

**(A)** Examples of MS2-hTR tracks detected by TrackMate. **(B)** hTR particles are detected in the nucleolus. Representative images of MS2-hTR labelled with GFP-MCP (green), nucleolin (blue) and coilin (red). The nuclear membrane, CBs and nucleoli are outlined in white. MS2-hTR particles are visible in the nucleoli. See Movie S4. Scale bar = 5 $\mu$ m. **(C)** Diffusion coefficient of MS2-hTR particles in the total nucleus, nucleolus and nucleoplasm. \*\*\*\*  $p < 0.001$ . **(D)** Western blot analysis to monitor expression level of wild-type hTERT and hTERT-K78E in HeLa *hTR*<sup>5MS2</sup> cells. **(E)** Histograms of displacement for multiple  $\Delta t$  of hTR<sup>5MS2</sup> in HeLa *hTR*<sup>5MS2</sup>, *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT or *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT K78E cells, made with Spot-On. **(F)** Bound fraction,  $D_{\text{bound}}$  and  $D_{\text{free}}$  of hTR<sup>5MS2</sup> in HeLa *hTR*<sup>5MS2</sup>, *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT or *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT K78E cells, calculated with Spot-On.



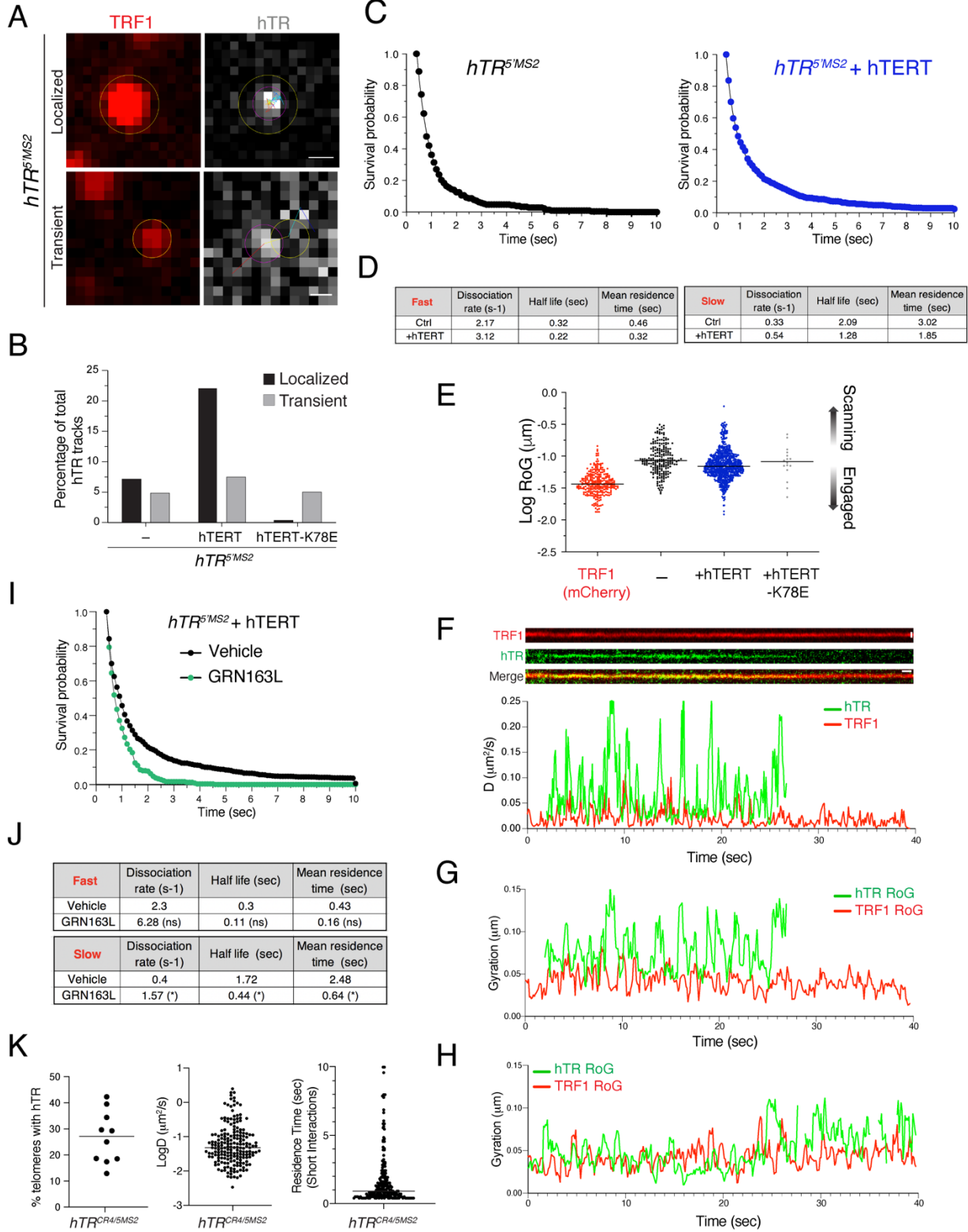
**Figure SII.3: Validation of smiFISH and TCAB1 knockout cell lines for photoactivation experiments, related to Figure 3.**

**(A)** Representative SIM images of HeLa  $hTR^{WT}$ ,  $hTR^{5MS2}$ ,  $hTR^{Cr4/5MS2}$  and VA13 cells stained with hTR-smiFISH (15 probes-magenta) and coilin-IF (green). Scale bar: 5  $\mu$ m. **(B)** Representative SIM images of  $hTR^{5MS2}$  cells stained with hTR-smiFISH (19 probes-magenta) and mCherry-TRF1 (green). Scale bar: 5  $\mu$ m. **(C)** Quantification of the number of hTR foci per nucleus in  $hTR^{WT}$ ,  $hTR^{5MS2}$  and  $hTR^{Cr4/5MS2}$  cells. **(D)** Quantification of the eccentricity ratio of hTR foci in CBs. Two examples are shown, with their eccentricity ratio indicated. Scale bar = 0.2  $\mu$ m. **(E)** Genome editing strategy to knockout TCAB1 gene in  $hTR^{5MS2}$  HeLa 1.3 cells. A donor cassette coding for three tandem stop codons was introduced by CRISPR/Cas9 gene editing to disrupt the first exon. **(F)** Genotyping PCR on DNA isolated from targeted  $hTR^{5MS2}$  to validate TCAB1 knockout clones. **(G)** Validation of TCAB1 knockout clones by Western blot. **(H)** Quantification of MS2-hTR accumulation in CBs of  $hTR^{5MS2}$  TCAB1<sup>+/+</sup> and  $hTR^{5MS2}$  TCAB1<sup>-/-</sup> cells using live-cell photoactivation of paGFP-MCP.

**A****B****C**

**Figure SII.4: Validation of hTERT knockout clones, related to Figure 4.**

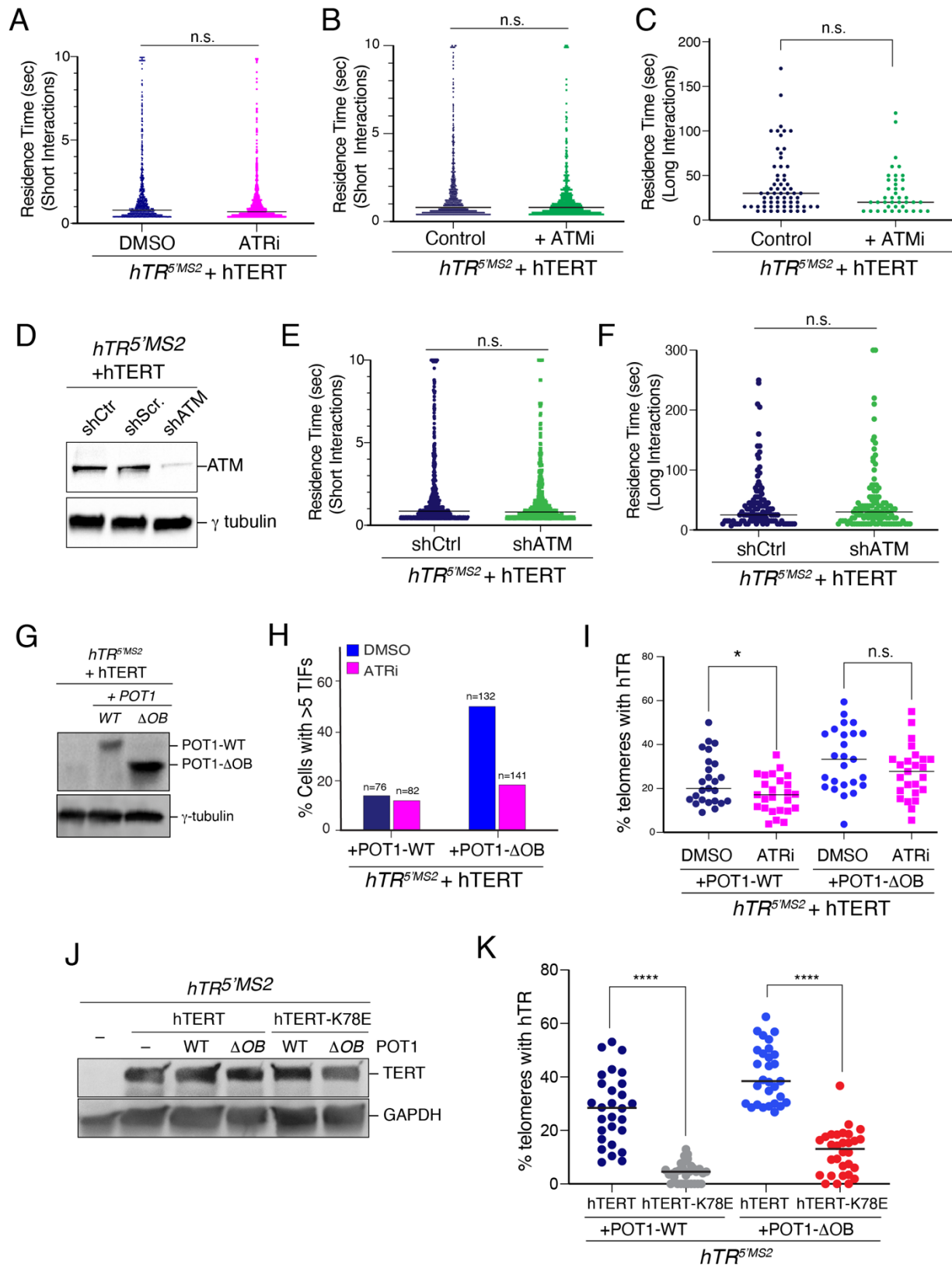
Quantification of hTR accumulation in CBs of hTR<sup>WT</sup>, hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>+/+</sup>, two independent clones of hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>-/-</sup> cells, and HeLa hTR<sup>5MS2</sup> hTERT<sup>-/-</sup> clone #1 complemented with hTERT using live-cell photoactivation of paGFP-MCP in **(A)** and hTR-smiFISH (19 probes) in **(B)**. **(C)** Fluorescence recovery after photobleaching of MS2-hTR in CBs of *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT (N=27 cells).



**Figure SII.5: Dual-camera imaging of MS2-hTR and telomeres, Related to Figure 5.**

**(A)** MS2-hTR particle tracking at telomere (TRF1) reveals localized (top) or transient (bottom) particles at telomeres. Tracks are considered “transient” when an hTR particle remained for only one frame at a telomere, while “localized” tracks correspond to an hTR particle which exhibited telomere interactions that lasted 5 frames or more. Since “transient” hTR tracks were independent of hTERT and persisted in cells expressing hTERT-K78E, they are likely driven by free hTR that is not part of an active telomerase RNP. In contrast, “localized” tracks were significantly increased in the presence of hTERT, but not hTERT-K78E and therefore indicative of productive telomerase-telomere interactions. Yellow circle: telomere position; pink circle: hTR position. Multicolored lines indicate tracks of hTR particles (top scale bar = 0.4 $\mu$ m; bottom scale bar = 0.3  $\mu$ m). **(B)** Quantification of the percentage of total hTR tracks present at telomeres, either transient or localized, in *hTR*<sup>5MS2</sup>, *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT, and *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT K78E cells. **(C)** Survival probability analysis of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> or *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT cells fit a bi-exponential distribution. **(D)** Dissociation rate, half-life and mean residence time of fast and slow populations of hTR at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> (Ctrl) or *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT cells. **(E)** Graph depicting radius of gyration (RoG) of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells, and in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT-WT and hTERT-K78E. RoG of TRF1 was used as a reference for telomere mobility. Top and down arrows correspond to scanning and engaged hTR particles, respectively. **(F)** Top – representative kymograph for hTR and TRF1 tracks. (Vertical scale bar = 0.80  $\mu$ m, horizontal scale bar = 1 second). Bottom – Running-window analysis of diffusion coefficients at 0.1 second intervals for colocalized hTR (green) and telomere (TRF1, red) over a period of 40 seconds. Notice the loss of MS2-hTR signal at the telomere at t=27 sec. **(G-H)**, Running-window analysis of the radius of gyration (RoG) at interval of 0.1 second for colocalized hTR (in green) and telomere (TRF1, red) from tracks depicted in Figure 5F **(G)** or Figure S5F **(H)**. **(I)** Survival probability analysis of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT cells treated with vehicle (black) or GRN163L (green). **(J)** Dissociation rate, half-life and mean residence time of fast and slow populations of hTR at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> + hTERT cells treated with vehicle or GRN163L. (\*) p<0.05; (ns) non-significant. **(K)** Validation of MS2-hTR expressed in *hTR*<sup>CR4/5MS2</sup> cells: Left - Percentage of telomeres colocalized with MS2-labelled hTR. Center – Diffusion coefficient of hTR particles at telomeres. Right - Short-term residence time of hTR particles at telomeres.





**Figure SII.6: ATM and POT1 regulate telomerase access and residence time at telomeres, Related to Figure 6.**

**(A)** Short-term residence time of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT-WT treated with 0.5 μM of ATR inhibitor VE-822 (ATRi) or DMSO (control) for 3hrs (N=32 cells). **(B)** Short-term residence time of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT-WT treated with 3 μM of ATM inhibitor KU60019 (ATMi) or DMSO (control) for 24hrs (N=42 cells for ATMi, N=38 cells for DMSO). **(C)** Long-term residence time of hTR at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup>+hTERT cells treated with 3 μM of KU60019 (ATMi) compared to DMSO (control). **(D)** Western blot analysis of ATM expression in *hTR*<sup>5MS2</sup>+hTERT cells expressing either control shRNA (shCtr), scrambled non-targeting shRNA (shScr) or ATM-targeting shRNA (shATM). **(E)** Short-term residence time of hTR particles at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells overexpressing hTERT-WT with either shATM or shCtrl (N=30 cells). **(F)** Long-term residence time of hTR at telomeres in *hTR*<sup>5MS2</sup>+hTERT cells with either shATM or shCtrl. **(G)** Western blot analysis of POT1-WT and POT1-ΔOB in *hTR*<sup>5MS2</sup>+hTERT cells. **(H)** Telomere dysfunction induced foci analysis of cells expressing POT1-WT and POT1-ΔOB, and treated with ATR inhibitor. Graph represents percentage of cells displaying >5 co-localization events of 53BP1 with telomeres (marked with FISH probes). Results indicate that ATR inhibition reduced the telomere induced damage due to mutant POT1. **(I)** Percentage of telomeres colocalized with hTR in *hTR*<sup>5MS2</sup> +POT1-WT cells, and *hTR*<sup>5MS2</sup> + POT1-ΔOB cells treated with ATR inhibitor and control DMSO. **(J)** Western blot analysis of hTERT-WT and hTERT-K78E expression in *hTR*<sup>5MS2</sup> cells, *hTR*<sup>5MS2</sup> + POT1-WT cells and *hTR*<sup>5MS2</sup> +POT1-ΔOB cells. **(K)** Percentage of telomeres colocalized with hTR in *hTR*<sup>5MS2</sup> +hTERT+POT1-WT cells, *hTR*<sup>5MS2</sup> +hTERT-K78E+POT1-WT cells, *hTR*<sup>5MS2</sup> +hTERT+POT1-ΔOB cells and *hTR*<sup>5MS2</sup> +hTERT-K78E+POT1-ΔOB cells. \* p<0.05, \*\*\*\* p< 0.001.

**TABLE S1: Related to STAR Methods. Oligonucleotides.**

Oligonucleotides for hTR smiFISH

FLAP Y-Cy5	/5Cy5/AATGCATGTCGACGAGGTCCGAGTGTA/3Cy5Sp/
TRProbe1	GCATGTGTGAGCCGAGTCCTGGGTGCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe2	CGCGCGGGGACTCGCTCCGTTCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe3	TTCCTGCGCCTGAAAGGCCTGAACTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe4	GGGCCAGCAGCTGACATTTTTTGTGTTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe5	GGCTTTCCGCCCGCTGAAAGTCAGCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe6	GTCCACAGCTCAGGGAATCGCGCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe7	GCCCAACTCTTCGCGGTGGCAGTGTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe8	GCGGCCTCCAGGCGGGTTCGGGTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe9	CCGCAGGTCCCCGGGAGGGGCGATTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe10	AGAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGGCCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe11	CGCTACGCCCTTCTCAGTTAGGGTTTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe12	CCCCGAGAGACCCGCGCTGACATTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe13	CCTCCGGAGAAGCCCCGGGCCGATTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe14	GAAAAACAGCGCGGGGAGCAAAGCACTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
TRProbe15	ACAAAAATGGCCACCACCCTCCCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
MS2probe3	CTGCAGACATGGGTGATCCTCATGTTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
MS2probe4	GACATGGGTGATCCTCATGTCTGCTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
MS2probe2	GCCTGCAGACATGGGTGATCCTCATTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
MS2probe1	TTTATCGACGAGGTGATCCTCGTCGCTGTTACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

## II.14 - Movie legends

### **Movies S1-S2-S3. Related to Figure 2. Dynamics of MS2-hTR**

GFP-MCP fluorescence in four cell lines expressing endogenous *hTR*<sup>WT</sup> (control), *hTR*<sup>5'MS2</sup> and *hTR*<sup>5'MS2</sup>+TERT-WT, respectively and co-expressing GFP-MCP. The images were continuously acquired for 10 seconds with an exposure time of 100 msec (scale bar = 5  $\mu$ m). All the live-cell imaging in the supplementary movies was performed with a spinning disk confocal microscope

### **Movie S4. Related to Figure 2 and Figure S2. hTR localization with Coilin and Nucleolin**

GFP-MCP fluorescence in *hTR*<sup>5'MS2</sup> cells co-expressing mCherry-Coilin and TagBFP-Nucleolin as shown in supplemental Figure 2 panel B. Cajal bodies are outlined by a circle, where an accumulation of MS2-hTR is visible. The GFP-MCP images were continuously acquired for 20 seconds with an exposure time of 100 msec (scale bar = 5  $\mu$ m).

### **Movie S5. Related to Figure 3. Photoactivation experiments of MS2-hTR using paGFP-MCP**

Two different movies shown side by side. Photoactivation of paGFP-MCP in CBs of *hTR*<sup>WT</sup> (left) and *hTR*<sup>5'MS2</sup> cell (right). A Cajal body targeted by the 405nm pulse is outlined in white (in red in the first 5 frames). The movies were continuously acquired for 36 seconds with an exposure time of 150 msec (interval 180ms because of 30ms transfer delay). (Scalebar = 10  $\mu$ m).

### **Movie S6. Related to Figure 3. FRAP analysis of MS2-hTR**

Representative cell from fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. Dual-camera imaging was used to visualize mCherry-Coilin (left) and GFP-MCP bound to hTR (right) simultaneously. hTR foci that colocalize with CBs were

identified (arrow), imaged once a second for 5 seconds to establish baseline intensities, bleached, and then allowed to recover while being imaged every 600ms for 1 minute. (Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ ).

#### **Movie S7. Related to Figure 5. Dual imaging of telomerase RNA and telomeres**

Overlay of dual-camera movies. Images of mCherry-hTRF1 (telomeres) and GFP-MCP hTR<sup>5MS2</sup> were continuously acquired with dual-cameras for 40 seconds and an exposure time of 70 msec (interval 100ms because of 30ms transfer delay). Arrowheads point to one colocalization event, shown in Figure 5F and Movie S8. (Scale bar = 2  $\mu\text{m}$ ).

#### **Movie S8. Related to Figure 5. Dynamics of hTR at telomeres**

Side by side representation of dual-camera movies. Images of mCherry-hTRF1 (left) and GFP-MCP hTR<sup>5MS2</sup> (right) were continuously acquired simultaneously with dual-cameras for 40 seconds and an exposure time of 70 msec (interval 100ms because of 30ms transfer delay). The overlay of tracks was generated with the Trackmate software. (Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ ).

## II.15 - References

- Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., and Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* 30, 2971-2982.
- Armstrong, C.A., Pearson, S.R., Amelina, H., Moiseeva, V., and Tomita, K. (2014). Telomerase activation after recruitment in fission yeast. *Current biology : CB* 24, 2006-2011.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., and Long, R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2, 437-445.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I., and Lundblad, V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & development* 15, 404-414.
- Chen, Y., Deng, Z., Jiang, S., Hu, Q., Liu, H., Songyang, Z., Ma, W., Chen, S., and Zhao, Y. (2015). Human cells lacking coilin and Cajal bodies are proficient in telomerase assembly, trafficking and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 43, 385-395.
- Chiba, K., Vogan, J.M., Wu, R.A., Gill, M.S., Zhang, X., Collins, K., and Hockemeyer, D. (2017). Endogenous Telomerase Reverse Transcriptase N-Terminal Tagging Affects Human Telomerase Function at Telomeres In Vivo. *Mol Cell Biol* 37.
- Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315, 1850-1853.
- Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R.M., Terns, M.P., and Lingner, J. (2007). Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* 27, 882-889.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 19, 2100-2110.

Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* *456*, 524-528.

Diolaiti, M.E., Cimini, B.A., Kageyama, R., Charles, F.A., and Stohr, B.A. (2013). In situ visualization of telomere elongation patterns in human cells. *Nucleic acids research* *41*, e176.

Fokas, E., Prevo, R., Hammond, E.M., Brunner, T.B., McKenna, W.G., and Muschel, R.J. (2014). Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* *40*, 109-117.

Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 273-300.

Gallardo, F., Laterreur, N., Cusanelli, E., Ouenzar, F., Querido, E., Wellinger, R.J., and Chartrand, P. (2011). Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell* *44*, 819-827.

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*, 603-610.

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

Gu, P., Wang, Y., Bisht, K.K., Wu, L., Kukova, L., Smith, E.M., Xiao, Y., Bailey, S.M., Lei, M., Nandakumar, J., *et al.* (2017). Pot1 OB-fold mutations unleash telomere instability to initiate tumorigenesis. *Oncogene* *36*, 1939-1951.

Hansen, A.S., Woringer, M., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Tjian, R., and Darzacq, X. (2018). Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with Spot-On. *Elife* *7*.

Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B., and Matera, A.G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & development* *15*, 2720-2729.

Herbert, B.S., Gellert, G.C., Hochreiter, A., Pongracz, K., Wright, W.E., Zielinska, D., Chin, A.C., Harley, C.B., Shay, J.W., and Gryaznov, S.M. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene* 24, 5262-5268.

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research* 64, 9152-9159.

Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63-77.

Jady, B.E., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* 164, 647-652.

Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 944-954.

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

Lee, S.S., Bohrs, C., Pike, A.M., Wheelan, S.J., and Greider, C.W. (2015). ATM Kinase Is Required for Telomere Elongation in Mouse and Human Cells. *Cell Rep* 13, 1623-1632.

Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.

Martinez, P., and Blasco, M.A. (2017). Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *The Journal of cell biology* 216, 875-887.



Model, M.A., and Burkhardt, J.K. (2001). A standard for calibration and shading correction of a fluorescence microscope. *Cytometry* *44*, 309-316.

Moser, B.A., Chang, Y.T., Kosti, J., and Nakamura, T.M. (2011). Tel1ATM and Rad3ATR kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. *Nature structural & molecular biology* *18*, 1408-1413.

Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., and Cech, T.R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* *492*, 285-289.

Nguyen, T.H.D., Tam, J., Wu, R.A., Greber, B.J., Toso, D., Nogales, E., and Collins, K. (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature* *557*, 190-195.

Ollion, J., Cochenec, J., Loll, F., Escude, C., and Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* *29*, 1840-1841.

Pinzaru, A.M., Hom, R.A., Beal, A., Phillips, A.F., Ni, E., Cardozo, T., Nair, N., Choi, J., Wuttke, D.S., Sfeir, A., *et al.* (2016). Telomere Replication Stress Induced by POT1 Inactivation Accelerates Tumorigenesis. *Cell reports* *15*, 2170-2184.

Querido, E., and Chartrand, P. (2008). Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol* *85*, 273-292.

Rao, T., Lubin, J.W., Armstrong, G.S., Tucey, T.M., Lundblad, V., and Wuttke, D.S. (2014). Structure of Est3 reveals a bimodal surface with differential roles in telomere replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 214-218.

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*. *Molecular and cellular biology* *19*, 6065-6075.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* *9*, 676-682.

Schmidt, J.C., and Cech, T.R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev* 29, 1095-1105.

Schmidt, J.C., Dalby, A.B., and Cech, T.R. (2014). Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife* 3.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2016). Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell* 166, 1188-1197 e1189.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Kufer, R., and Cech, T.R. (2018). Dynamics of human telomerase recruitment depend on template- telomere base pairing. *Molecular biology of the cell*.

Sexton, A.N., Regalado, S.G., Lai, C.S., Cost, G.J., O'Neil, C.M., Urnov, F.D., Gregory, P.D., Jaenisch, R., Collins, K., and Hockemeyer, D. (2014). Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes & development* 28, 1885-1899.

Sfeir, A., and de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 336, 593-597.

Sfeir, A., and Denchi, E.L. (2016). Stressed telomeres without POT1 enhance tumorigenesis. *Oncotarget* 7, 46833-46834.

Stern, J.L., Zyner, K.G., Pickett, H.A., Cohen, S.B., and Bryan, T.M. (2012). Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol* 32, 2384-2395.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current biology : CB* 13, 1549-1556.

Takai, K.K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R., and de Lange, T. (2010). In vivo stoichiometry of shelterin components. *The Journal of biological chemistry* 285, 1457-1467.

Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L., and Eliceiri, K.W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 115, 80-90.

Tomita, K., and Cooper, J.P. (2008). Fission yeast Ccq1 is telomerase recruiter and local checkpoint controller. *Genes & development* 22, 3461-3474.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 955-965.

Tong, A.S., Stern, J.L., Sfeir, A., Kartawinata, M., de Lange, T., Zhu, X.D., and Bryan, T.M. (2015). ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. *Cell Rep* 13, 1633-1646.

Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A.M., Gostan, T., Weber, C., Zimmer, C., Zibara, K., Walter, T., Peter, M., *et al.* (2016). smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic acids research* 44, e165.

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

Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323, 644-648.

Vogan, J.M., Zhang, X., Youmans, D.T., Regalado, S.G., Johnson, J.Z., Hockemeyer, D., and Collins, K. (2016). Minimized human telomerase maintains telomeres and resolves endogenous roles of H/ACA proteins, TCAB1, and Cajal bodies. *Elife* 5.

Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506-510.

Wong, J.M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002). Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 4, 731-736.

Zhao, Y., Sfeir, A.J., Zou, Y., Buseman, C.M., Chow, T.T., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2009). Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* *138*, 463-475.

Zhong, F.L., Batista, L.F., Freund, A., Pech, M.F., Venteicher, A.S., and Artandi, S.E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* *150*, 481-494.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell* *15*, 81-90.

# **Chapitre III - Article 2 - A single-particle view of telomerase recruitment at telomere in living cells**

## **III.1 – Mise en contexte**

L'article présenté dans les pages suivantes est présentement en préparation et demande des expériences complémentaires, qui n'ont pu être réalisées faute de temps, pour pouvoir être soumis à un journal dans le futur.

Le premier article a permis de développer un nouvel essai pour étudier la télomérase et un nouveau modèle de recrutement de la télomérase aux télomères. Dans ce modèle, l'ARN hTR transite par les corps de Cajal et la télomérase y termine sa maturation avec le chargement de hTERT. Dans le nucléoplasme, la télomérase va ensuite aller sonder les télomères et, dans certaines conditions, former une interaction stable au télomère. La suite logique était d'utiliser notre système d'imagerie en particule uniques pour étudier la dynamique du recrutement de la télomérase au cours du cycle cellulaire, qui bien que décrit comme spécifique à la phase S par des méthodes de FISH, pourrait cacher une partie du contrôle du recrutement. Nous avons aussi voulu vérifier si le recrutement de la télomérase serait lié à son activité enzymatique en utilisant un mutant catalytique inactif de hTERT. Finalement, afin de savoir si, chez l'humain, la télomérase est présente aux télomères comme un dimère ou un monomère, nous avons utilisé une méthode de quantification de fluorescence pour estimer combien de molécules de télomérase étaient présentes au télomère dans des cellules vivantes.

## **III.2 - Contribution des auteurs**

La conception des expériences a été faite par Hadrien Laprade, Emmanuelle Querido et Pascal Chartrand.

Les expériences d'imagerie en particules uniques et leurs analyses ont toutes été réalisées par Hadrien Laprade

L'expérience de 'single molecule FISH' et son analyse a été réalisée par Emmanuelle Querido.

Le projet a été supervisé par Pascal Chartrand.

L'écriture de l'article a été faite par Hadrien Laprade et Pascal Chartrand.

# **A single-particle view of telomerase recruitment at telomere in living cells**

Hadrien Laprade<sup>1</sup>, Emmanuelle Querido<sup>1</sup>, Pascal Chartrand<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

<sup>2</sup> Corresponding author: [p.chartrand@umontreal.ca](mailto:p.chartrand@umontreal.ca)

## **III.3 - Abstract**

Telomerase is the ribonucleoprotein complex responsible for maintaining telomeres, allowing stem cells and most of cancer cells to divide continuously. Telomerase recruitment to telomeres is a key step for telomere maintenance and is under a fine regulation. Here, we performed single-particle imaging of the MS2-tagged telomerase RNA in living cells. In contrast with previous work, we show that telomerase interaction with telomeres is not restricted to the S-phase and is not dependent on its reverse transcriptase activity. Whether active telomerase acts as a monomer or needs to dimerize to form an active complex at telomeres is still an open debate. In the following work, we provide the first quantification of telomerase stoichiometry at telomeres in living cells and support the hypothesis of a monomeric telomerase acting on its substrate.

## III.4 - Introduction

The human telomeres are composed of repeated TTAGGG DNA sequences. These extremities are protected by the shelterin complex, a complex containing six proteins, from being recognized by the DNA damage response (de Lange, 2005; Sfeir and de Lange, 2012). Due to the end replication problem, these extremities lose repeats at each genome replication. This shortening limits the division capability of a cell and ultimately results in replicative senescence (Stewart and Weinberg, 2006). To counteract the attrition of telomeres, eukaryotic cells express the telomerase ribonucleoprotein (RNP). This RNP is responsible for adding telomeric repeats and its active core is composed of hTR, the telomerase RNA subunit, and hTERT, the subunit with a reverse transcriptase activity. Unlike stem cells, somatic cells do not express telomerase and are thus subjected to the progressive loss of telomeric tracts, leading to senescence. In these cells, reactivation of telomerase plays a major role in cellular transformation and allows cells to bypass their replication limit (Bodnar et al., 1998; Kim et al., 1994).

Telomerase recruitment to telomeres is a critical step for telomere maintenance. This recruitment is based mainly on the interaction between the telomerase protein hTERT and the shelterin subunit TPP1, as this interaction is needed to maintain telomeres (Nandakumar et al., 2012; Schmidt et al., 2014; Zhong et al., 2012). This interaction has been described to promote short probing interactions between telomerase and telomeres (Laprade et al., 2020; Schmidt et al., 2016). In S phase, to establish a more stable interaction, annealing of the hTR template to the telomeric overhang is required (Laprade et al., 2020). Telomerase recruitment to telomeres is under a fine regulation; this enzyme acts preferentially at short telomeres and fluorescent in situ hybridization (FISH) experiments have shown that telomerase localization at telomeres is specific to S phase in human cells (Britt-Compton et al., 2009; Jady et al., 2006; Tomlinson et al., 2006). In yeast, telomerase assembly and localization are two mechanisms finely regulated throughout the cell cycle to restrict telomerase activity to S phase and avoid *de novo* telomere addition at DNA breaks (Vasianovich et al., 2019). In human cells, restriction of telomerase recruitment to S phase is also needed, but how this cell cycle-regulated localization is achieved is still poorly known.



Knowledge of telomerase structure is a key step to understand how this holoenzyme is assembled, achieve its activity and can interact with its environment. The stoichiometry of the telomerase holoenzyme complex has been established using telomerase purified from human cells (Egan and Collins, 2010; Nguyen et al., 2018). But whether active human telomerase holoenzyme acts as a monomer or a dimer at telomeres has not been clearly answered yet. In yeast, quantitative multicolor FISH experiments have shown that the mature telomerase RNP appears as a monomer *in vivo* (Bajon et al., 2015), but its active form is able to form a cluster at telomeres in S phase (Gallardo et al., 2011). The monomeric property of *Tetrahymena thermophila* telomerase has also been suggested by cryo-electron microscopy (Cryo-EM) after telomerase purification (Jiang et al., 2015) and by gel filtration of recombinant minimal telomerase (Bryan et al., 2003). In human, gel filtration on reconstituted minimal telomerase has shown that the complex can form active homodimers (Wenz et al., 2001). Later, the purification of ‘super-telomerase’ from HEK293T cells also supports the dimeric nature of telomerase complexes (Sauerwald et al., 2013). In contrast, single-molecule imaging of purified minimal RNPs bound to their substrate suggests that the active form of telomerase is a monomer (Wu et al., 2015). Cryo-EM structure reconstruction of complete active telomerase bound to DNA also supports its monomeric nature (Nguyen et al., 2018).

In this work, we used the MS2-tagging system and live-cell microscopy to track the recruitment of single particles of telomerase to telomeres in HeLa cells. In combination with the FUCCI system, we show that telomerase can access the telomeres throughout the cell cycle. The use of a catalytic dead mutant of hTERT in S-phase suggests that its recruitment is not dependent on telomerase catalytic activity. Quantitative fluorescence analyses of hTR particles in endogenous conditions show that telomerase interacts with telomeres as a monomer in S phase.

## III.5 - Results

### III.5.1 - Telomerase recruitment at telomeres during the cell cycle

To image single particles of telomerase in living cells, we took advantage of the MS2 system. We used HeLa cells genetically engineered to express endogenously and homozygously an hTR version modified with three MS2 stem-loops at its 5' end. Combining these modifications with the expression of the fusion protein MCP-GFP allowed us to detect and track single particles of telomerase RNA in HeLa nuclei by live-cell fluorescent microscopy (Laprade et al., 2020). This system has been demonstrated to produce a mature hTR and a fully active telomerase complex (Laprade et al., 2020). To locate the telomeres and monitor the recruitment of *hTR*<sup>5'MS2</sup> to telomeres, we labeled the shelterin protein TRF1 with the mCherry fluorescent protein. Our cell line was also modified to overexpress hTERT in order to increase the formation of telomerase complex and the frequency of hTR interaction with telomeres.

To differentiate cells in G1, S, and G2, we adapted the FUCCI system (Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicators) (Marcus et al., 2015). We generated HeLa *hTR*<sup>5'MS2</sup> cell lines expressing the G1 and G2 specific proteins Cdt1 and Geminin labeled with mCherry or miRFP670. G1 cells were identified by a high expression of Cdt1 and the absence of Geminin fluorescence (Figure III.1A). The degradation of Cdt1 and the synthesis of Geminin start in S phase; thereby cells with residual expression of Cdt1 and accumulation of Geminin fluorescence can be categorized as in early S phase (figure 1A). The S/G2 cells can be discriminated by the presence of Geminin and the absence of Cdt1 fluorescence in the nucleus (figure III.1A). Since Cdt1 and Geminin fused with mCherry interfere with the detection of TRF1-mCherry at telomeres, we used two cell lines: one expressing the fusion protein Cdt1-miRFP670, which does not interfere with TRF1-mCherry imaging, for G1 cells (Figure III.1B). The second cell line overexpresses Cdt1-mCherry and Geminin-miRFP670, upon entering S phase Cdt1-mCherry is degraded and enables the detection of TRF1 mCherry for S and G2 cells (Figure III.1B). For each cell line, 10 seconds movies were acquired with a frame rate of 100 ms. hTR particles were tracked in nuclei by using the TrackMate plugin (ImageJ). From the tracking data, we

determined the proportion of telomeres co-localizing with hTR, the diffusion coefficient of hTR particles, and their residence time at telomeres (figure III.1B-E).

Our preliminary results reveal the colocalization of hTR with 20% of the telomeres in G1 and early S phase cells (Figure III.1C). For G1 cells, we observed two populations of cells: one group of cells with around 30% of their telomeres colocalizing with hTR, and a second group with only 10% of their telomeres showing colocalization. We observed an increase in hTR colocalization with telomeres in S/G2 cells (median of 31%) compared with G1 and early S cells. This increase probably denotes the maintenance of telomeres by telomerase after telomeres replication. The residence time of telomerase at telomeres over a period of 10 seconds did not seem to change between G1 and S phase in our conditions (figure III.1D). We observed a slight general decrease, although not significant, in the diffusion coefficient in S/G2 phase compared to G1 and early S (figure III.1E). This change may be caused by a more stable association of telomerase with its substrate at the time of telomerase activity.

### **III.5.2 - Telomerase recruitment at telomeres does not depend on its catalytic activity**

To further analyze whether telomerase recruitment to telomeres is linked to its catalytic activity, we used HeLa cells overexpressing a dominant-negative allele of hTERT (DN-hTERT). This mutant of hTERT possesses two substitutions in its reverse transcriptase domain (D710A and V711I) and is catalytically inactive (Hahn et al., 1999).

Our results show an increased number of telomeres harboring a telomerase particle in cells overexpressing DN-hTERT versus cells overexpressing wild type hTERT (figure III.2A). The presence of telomerase at telomeres in DN-hTERT conditions suggests that its recruitment is independent of catalytic activity. The residence time of telomerase at telomere does not appear to vary between cells overexpressing wild type hTERT (median of 0.8 second) and DN-hTERT (median of 0.9 second) (figure III.2B). The increase in the percentage of telomeres with localized telomerase may be the result of an increased number of long-lasting interactions between telomerase and telomeres.

We did not observe any difference in the distribution of LogD between telomerase particles in cells expressing wild type hTERT (median of  $-1.23 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and cells with DN-hTERT (median of  $-1.25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (figure III.2C). This distribution in LogD suggests that even in the case when the telomerase is unable to achieve its function, telomerase still can probe several telomeres or become engaged with them, as we described in Laprade et al, 2020.

### III.5.3 - Assessing telomerase stoichiometry at telomeres

Recent cryo-EM analysis of purified telomerase revealed that this holoenzyme is constituted of one copy of hTERT and hTR, but with two sets of the dyskerin/Gar1/Nop10/Nhp2 proteins (Nguyen et al., 2018). Whether the human telomerase acts as a monomer or a dimer at telomeres is still debated. To bring new insights into this matter, we measured the fluorescence intensity of hTR<sup>5MS2</sup> particles colocalized with telomeres and compared these particles with the fluorescence of free nucleoplasmic hTR<sup>5MS2</sup> particles. Considering the high affinity of the MS2 coat protein for the MS2 RNA stem-loops and the saturating concentration of MCP-GFP in our cells, most hTR<sup>5MS2</sup> molecules in the nucleoplasm should be associated with six MCP-GFP and therefore have similar fluorescence intensities when observed in a single plane of a spinning-disk confocal microscope. We first measured the average fluorescence intensity of hTR particles colocalizing with telomeres and free diffusive hTR particles. Particles of both types have the same limited range of fluorescence intensities, each group showing a single population in cells expressing endogenous hTERT or overexpressing hTERT (figure III.3A). The variations in fluorescence among this population are likely due to particle movements (see further) and their relative position from the focal plane. Next, we compared the fluorescence of telomeres-localized hTR particles with the fluorescence of highly diffusive single hTR particles in the nucleoplasm of the same cells. This comparison reveals similar fluorescence intensities between diffusive and telomeres-localized hTR particles, suggesting that only one telomerase particle is recruited at a given time on a telomere (figure III.3B). Increasing the concentration of telomerase complexes by overexpressing hTERT lead to the same results (figure III.3B), supporting the idea that

increasing the number of active telomerases does not raise the number of telomerase visiting a single telomere at a given time, but can increase the number of telomeres visited in the same period of time.

To further confirm these results, we also measured the evolution of hTR fluorescence intensity over time for short and long interactions at telomeres (figure III.3C and D). The variation in fluorescence intensity of hTR at telomeres is always within a window of 50% above or below the average intensity of diffusive hTR particles. Although we can clearly see that the longer interaction exhibits a globally higher fluorescence intensity (figure III.3D), we can still conclude that only one particle is present at telomeres. Considering that our reference particles are diffusive, the measure of their fluorescence intensity can be underestimated as the light of a fast-moving object is seen with motion blur when captured by a camera, scattering its photons on more pixels compared to an immobile object. Thus, the intensity of the long static interaction can be slightly overestimated; supporting our observation that only one telomerase particle is present on a single telomere.

To further confirm these results, we used single-molecule fluorescent in situ hybridization (smiFISH) combined with structured illumination microscopy (SIM) to quantify the size of hTR foci at telomeres and Cajal bodies (Figure III.4A). We measured the volume of hTR particles in voxels in the cell nucleus in our SIM images. The vast majority of the hTR foci in the nucleus have a volume between 100 and 400 voxels, with only a few foci that have a volume approximately two to ten times bigger (figure III.4B). The majority of hTR molecules in the nucleus are in the nucleoplasm, with only a subset at the telomeres or in Cajal bodies (Laprade et al., 2020). Our results show that the volume of telomeric hTR foci varies between 100-400 voxels, similar to the volume of nucleoplasmic hTR foci, suggesting that the number of molecules of hTR in a telomerase particle remains the same after its recruitment at telomeres. Interestingly, almost all the hTR foci with large volumes are located in Cajal bodies, which are known to harbor several telomerase molecules (figure III.4B).

## III.6 - Discussion

The understanding of telomerase dynamics *in vivo* is only at its beginning and is promising to unveil a new view of telomerase activity and regulation. In this work, we used the MS2 system to track the telomerase RNA in order to study its recruitment over the cell cycle. Our results show that telomerase can be recruited at telomeres for several seconds not only in S phase when telomeres are elongated but also in G1. We also show that the recruitment of hTR to telomeres in S phase is not tied to its catalytic activity. Finally, analysis of hTR fluorescence in live-cell microscopy and super-resolution microscopy suggest that a single telomerase molecule is present at telomeres in S phase.

As suggested by RNA FISH experiments, telomerase has been described to be present at telomeres almost exclusively in S phase (Tomlinson et al., 2006). Here, we thought to establish an assay based on the FUCCI system to detect and quantify in living cells telomerase localization events at telomeres in G1, early S phase, and S/G2 phase. Our observations show that the highest proportion of telomeres harboring an interaction with hTR occurs in S/G2 phase, concomitant with the time when telomeres are replicated. But we also see a significant number of telomeres with telomerase molecules in G1 and early S phase. These interactions have a similar dynamic in each phase, showing both probing and engaged interactions by comparing their residence times and diffusion coefficients. It has been suggested that the maximum hTERT localization at telomeres occurs in mid S phase in HeLa and returns to basal levels in late S phase (Xi et al., 2015). This is consistent with our results showing an increase from early S to S/G2. However, our assay cannot differentiate mid to late S phase cells. Our timeline of acquisition of hTR at telomeres is also limited to a maximum of 10 seconds, and longer interactions between hTR and telomeres are expected in S phase (Laprade et al., 2020; Schmidt et al., 2016), and could be the mark of stable interactions and telomerase actively elongating telomeres. We also observed interactions that last up to 10 seconds in G1 phase. Previous studies showed specific localization of hTR at telomeres in S phase in HeLa cells (Jady et al., 2006; Tomlinson et al., 2006), this specific localization may be due to the FISH assay, which may not be able to capture short interactions between hTR and telomeres. This assumption points to the necessity of studying long interactions in each phase to understand fully the dynamics of telomerase recruitment during the cell cycle.

Furthermore, in this preliminary study, we used HeLa cells overexpressing hTERT to increase the proportion of active telomerase complexes. Hence, we cannot rule out the possibility that this overexpression affects the cell cycle regulation of telomerase assembly and recruitment at telomeres. This analysis will need to be repeated using endogenous hTERT levels.

Since telomerase recruitment to telomeres does not appear to be restricted to S phase, we asked the question of whether this recruitment is linked to telomerase catalytic activity. For this purpose, we used HeLa cells expressing a catalytically inactive version of hTERT. Our results show that telomerase is still associated with telomeres even when hTERT is unable to elongate telomeres. This shows that telomerase recruitment and activity are distinct. Here the TEN domain of hTERT is not affected and is still able to bind TPP1, allowing telomerase to probe telomeres (Laprade et al., 2020; Schmidt et al., 2016). Also, the fact that long-lasting interactions are still present suggests that hTR is annealed to telomeric repeats and helps to retain telomerase on its substrate (Laprade et al., 2020). Interestingly, we detected a significant increase in telomerase-telomeres stable interactions in the catalytically dead hTERT mutant. One possibility is that the catalytically inactive telomerase may remain for a longer time at telomeres before its removal, which would explain the increased number of telomeres associated with telomerase in this cell line. Time-lapse imaging for a period of several minutes will be required to explore this question. This also indicates that even if long interactions can be interpreted as stable interaction required for telomerase activity, we cannot use this observation to assess whether a telomere is elongated or not.

Whether telomerase is recruited as a monomer or a dimer is still an open question. To date, the different studies on human telomerase stoichiometry have mostly been performed on purified complexes or with minimal telomerase reconstitution. Here, we present the first quantification of human telomerase stoichiometry at telomeres in living cells under endogenous conditions. In this work, we took advantage of the MS2 system, single-particle imaging in living cells, and super-resolution microscopy to show that a single telomerase complex is recruited to a telomere in S phase. Some studies suggested that active telomerase holoenzyme could be monomeric in human, ciliates, and yeast

(Bajon et al., 2015; Egan and Collins, 2010; Jiang et al., 2015; Nguyen et al., 2018; Wu et al., 2015), while others suggested that it can be a dimer in human (Sauerwald et al., 2013; Wenz et al., 2001). But this point remained unclear as reconstituted telomerase can form heterogeneous active complexes (Wu et al., 2015). Since purified human telomerase is monomeric, we could use the fluorescence of free nucleoplasmic telomerase RNA molecules as a benchmark to evaluate the number of hTR molecules at a single telomere. Since we did not detect a significant change in fluorescence between nucleoplasmic hTR and telomeric hTR, our data support the hypothesis of a monomeric telomerase acting at telomeres. Our analysis of hTR voxels using smiFISH also independently confirmed these results.

## **III.7 - Materials and Methods**

### **Experimental model and Cell culture procedures**

HeLa cells used in this study express hTR<sup>5<sup>MS5</sup></sup> obtained by genome editing for the work Laprade et al. 2020. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Corning) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (BCS, Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), and 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco). Transduction of GFP-MCP, hTERT, DN-hTERT, mCherry-CDT1-TRF1, CDT1-miRFP670, and Geminin-miRFP670 was achieved using lentivirus-containing supernatant generated in 293T cells. Viral supernatants were supplemented with 4 g/ml polybrene.

### **Fluorescent in situ hybridization and super-resolution microscopy**

Single-molecule in situ hybridization and super-resolution microscopy for visualization of hTR, telomeres, and Cajal bodies was performed as described in Laprade et al. (2020).



## Live cell imaging and single-particle tracking

For live-cell microscopy, cells were plated in a 35mm Fluorodish (Fluorodish FD35-100 WPI), first in growth media, then three hours before imaging, the media was changed for imaging media (DMEM phenol red free with 10% (v/v) FBS and 25mM HEPES pH7.4). Cells were imaged with a Zeiss Axio-Observer Z1 Yokogawa CSU-X1 spinning disk inverted confocal microscope with two EMCCD Evolve cameras attached (Photometrics, 512×512 pixels, 16 μm). All live-cell images were made with a 100X NA 1.46 oil objective. An imaging chamber was used and pre-heated at 37°C two hours before imaging to keep the cells at the appropriate temperature during the experiment. Three lasers were switched on 1h before imaging to allow their power stabilization (488nm 100mW diode, and 561nm 40mW diode and 635nm 30mW diode). Short tracks acquisition of hTR-GFP were made by continuous streaming with 100ms of exposure time of 10 seconds (frame rate of 10 images per second). mCherry-TRF1 and Cdt1-mCherry (when present) signals were acquired a single time with 350ms of exposure at the start and the end of the film. Cdt1-miRFP670 and Geminin-miRFP670 signals were acquired by a single image with 100 ms of exposure.

Zeiss czi files of hTR tracks acquisition were open in ImageJ. An exponential fit bleach correction was made to all movies that show signal decay. The nuclei were outlined by hand drawing tools using the Cdt1-mCherry or Cdt1-miRFP670 fluorescence. Single-particle tracking of hTR was performed by using the Trackmate plugin in ImageJ (Tinevez et al., 2017). The Laplacian of Gaussian function was used for detection of 4 pixels spot (0.53 μm), median filter, and sub-pixel localization were selected. For link creation, simple LAP tracker was used with a linking max distance of 0.8 μm and no gap closing. Only tracks with a minimum of five consecutive spots were kept. The Mean Squared displacement (MSD) was calculated with the following formula:

$$MSD = \sum_{0-i} \left[ \sqrt{(x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2} - \sqrt{(x_{i-1} - x_0)^2 + (y_{i-1} - y_0)^2} \right]^2$$

The diffusion coefficient (D) was calculated as the slope of the MSD over time for the first five points in each track. This calculation was made with an R Studio script.

### **Single-particle fluorescence intensity measurements**

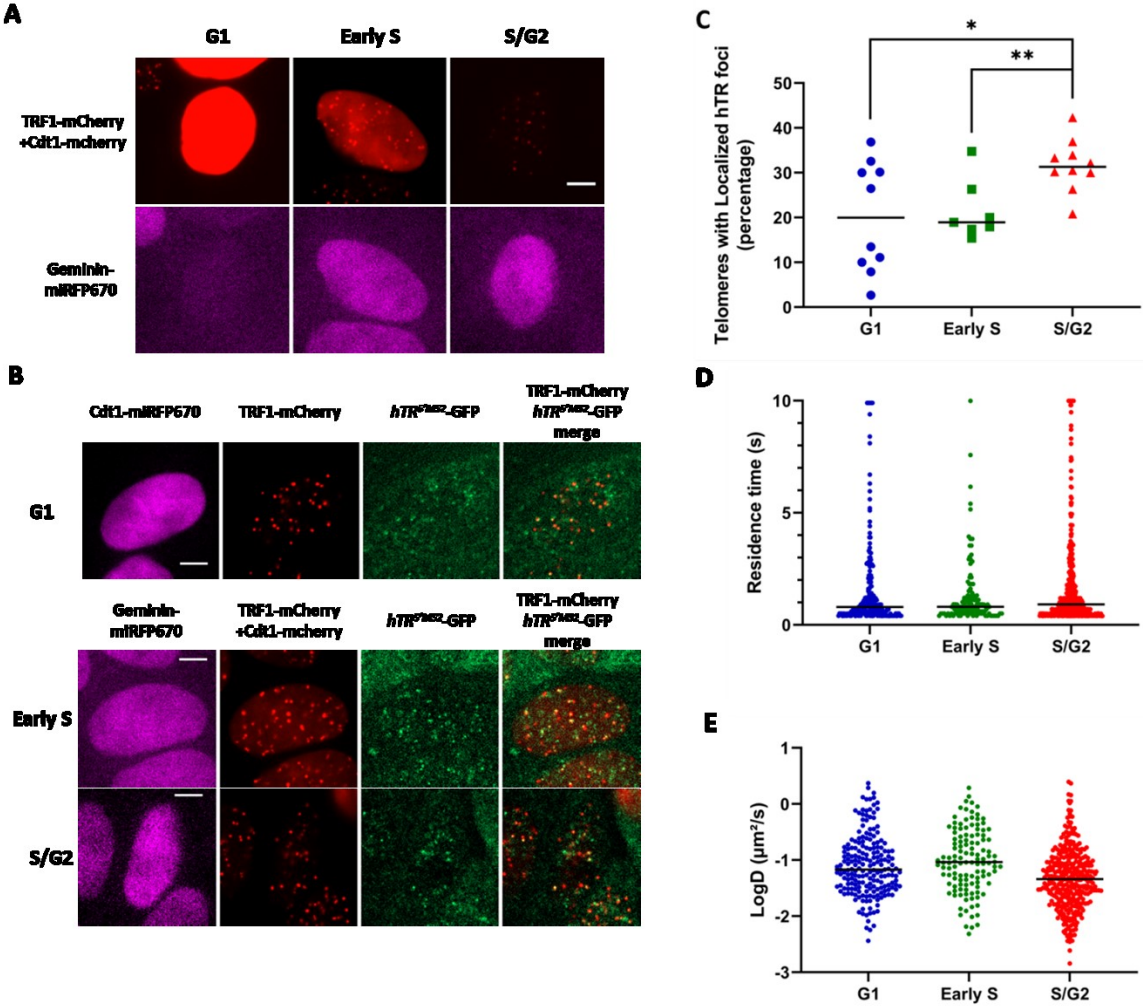
For measuring hTR<sup>5MS2</sup> particle fluorescence intensities at telomeres, we captured movies and tracking results were used to assess telomerase dynamics in cells expressing endogenous hTERT or overexpressing hTERT (Laprade et al. 2020). First, the nucleus background fluorescence intensity was measured at five random areas without hTR<sup>5MS2</sup> particle with a circle of 5 pixels of diameter. The background fluorescence intensity was subtracted to all subsequent particle intensity measures made in the same nucleus for normalization. Five diffusive hTR<sup>5MS2</sup> particles per nucleus that did not colocalize with a telomere at any point in their path were randomly selected and their fluorescence intensity was measured in an area of 5 pixels of diameter for each time point when they are visible, the values obtained from each time point were then averaged. The fluorescence intensity of hTR<sup>5MS2</sup>/MCP-GFP localized at telomeres was measured in an area of 5 pixels in diameter for each time point when they colocalized with a telomere. The values obtained from each time point were divided by the values obtained from the diffusive hTR particles in the same nucleus to estimate the number of telomerase unit at a telomere.

### **Measurement of hTR voxel size using super-resolution images**

Z stacks of smiFISH images from super-resolution microscopy were analyzed by using the 3D ImageJ suite for the 3D quantification of hTR foci (Ollion et al., 2013). For nuclei segmentation, the GaussianBlur3D filter was applied with the correct threshold, segmentation was made with the 3D simple Segmentation tool, segments were imported in the 3D ROI manager. For hTR and TRF1 foci, background subtraction was performed, the MaximumLocal filter was applied with the 3DFastFilter tool. Then the 3D Watershed tool was used for foci segmentation. Segmented hTR and TRF1 spots from each nucleus were imported in the 3D ROI Manager and associated with their respective nucleus. hTR spots from every analyzed nucleus were selected in the 3D ROI Manager and their voxel

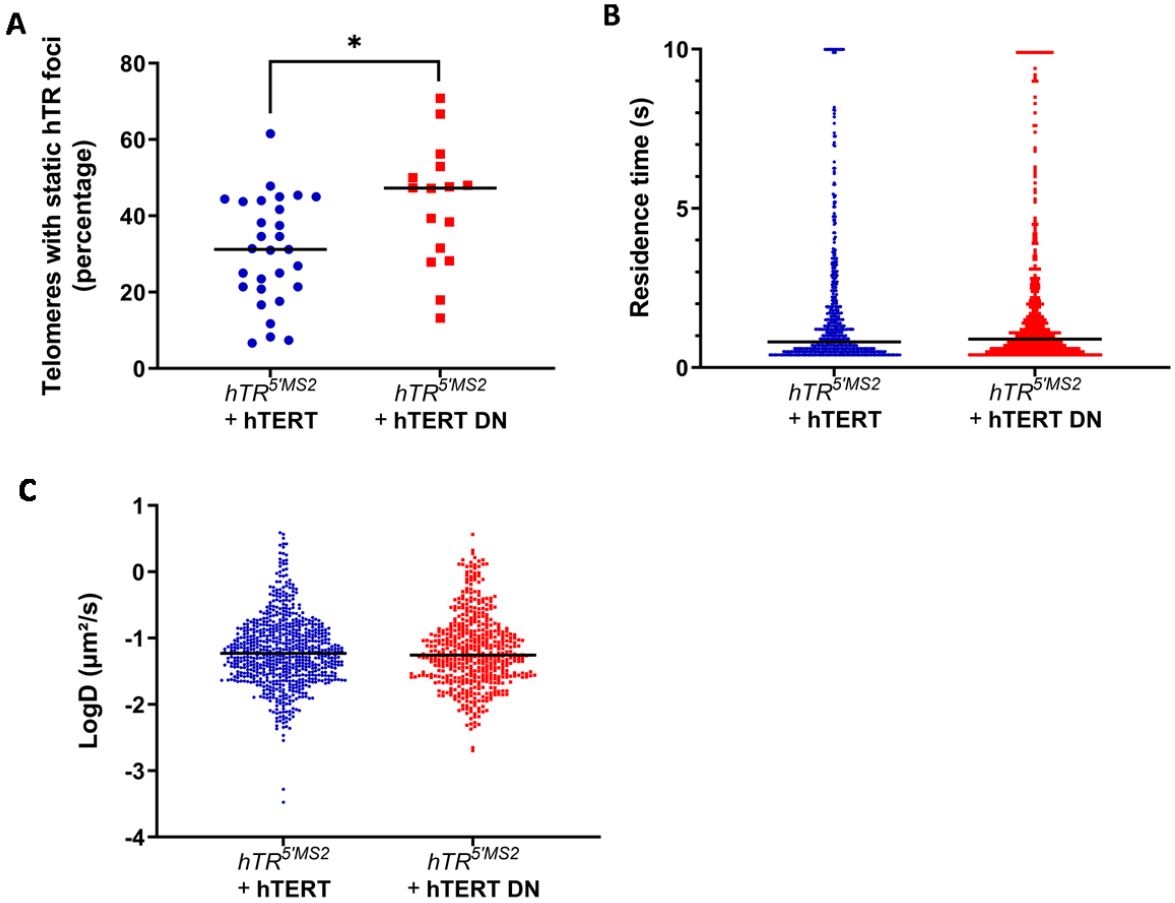
size was measure with the 3D Quantif tool. For Cajal Bodies segmentation, background subtraction was made, the MaximumLocal filter was applied with the 3DFastFilter tool. Then CB spots were segmented using a gaussian classical fit with the 3D Spot Segmentation tool. CB spots were imported in the 3D ROI Manager. The Colocalization tool was used to separate hTR foci colocalizing with either TRF1 foci or CB from nucleoplasmic hTR.

# III.8 - Figures



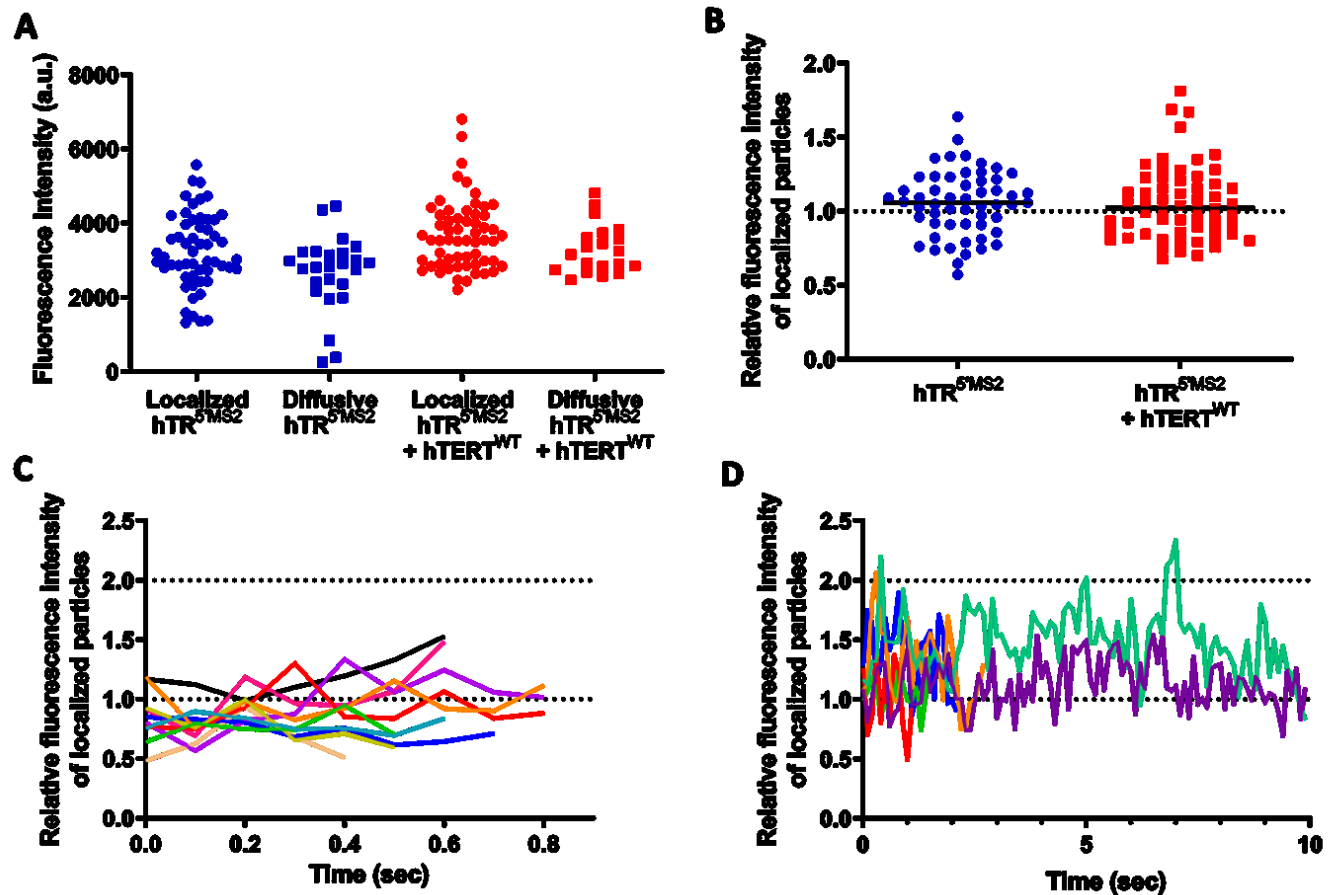
### Figure III.1: hTR is present at telomeres along the cell cycle

**A)** Live-cell fluorescent microscopy images illustrating Cdt1-mCherry and Geminin-miRFP670 fluorescence used for selecting cells in G1, early S or S/G2. **B)** Live-cell fluorescent microscopy images representing the co-localization of hTR<sup>5MS2</sup>/MCP-GFP (in green) with telomeres tagged with TRF1-mCherry (in red). G1 cells were selected using Cdt1-miRFP670 (in magenta) fluorescence in the nucleus (upper row). Early S and S/G2 cells were selected using combined Cdt1-mCherry (in red) and Geminin-miRFP670 (in magenta) (two bottom rows). Scale bars=5 $\mu$ m. **C)** Proportion of telomeres colocalizing with hTR<sup>5MS2</sup> in cells overexpressing hTERT. Median values are 20% for G1 cells, 19% for early S cells and 31% for S/G2 cells. 10 cells for G1, 7 cells for early S and 10 cells for S/G2 were scored (n=1). \* p<0.05, \*\* p<0.01. **D)** Graphic showing the residence time of hTR<sup>5MS2</sup> at telomeres in cells overexpressing hTERT in G1, early S and S/G2 phase. Median values are 0.8 second for G1 and early S, 0.9 second for S/G2 cells. 198 particles for G1 cells, 122 particles for early S cells, 349 particles for S/G2 cells. **E)** Diffusion coefficients (LogD) of hTR<sup>5MS2</sup> at telomeres in cells overexpressing hTERT in G1, early S and S/G2 cells.



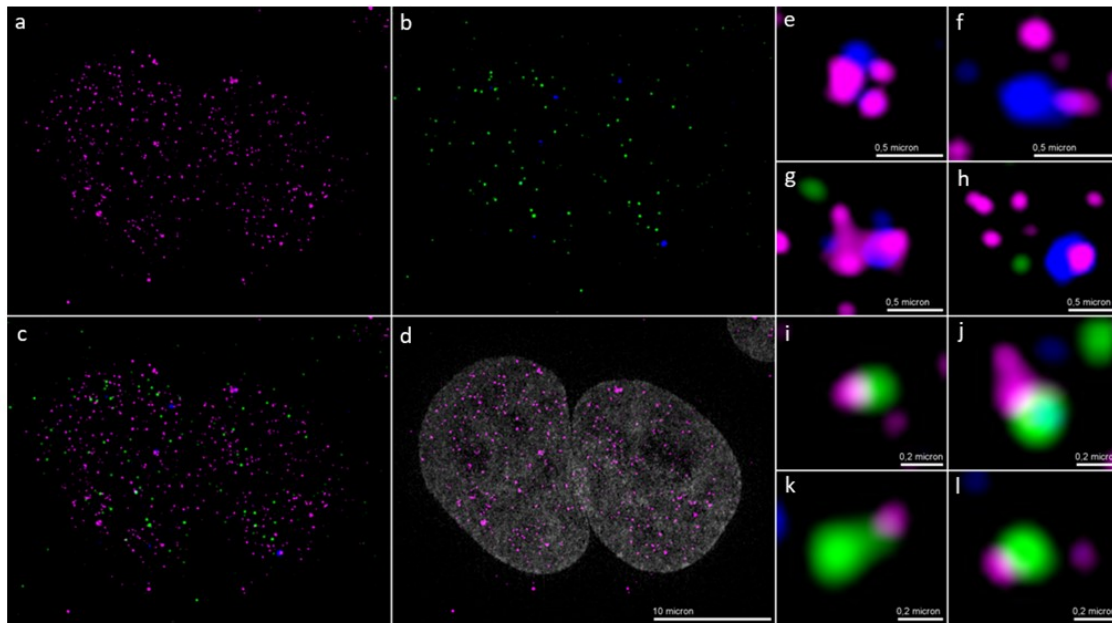
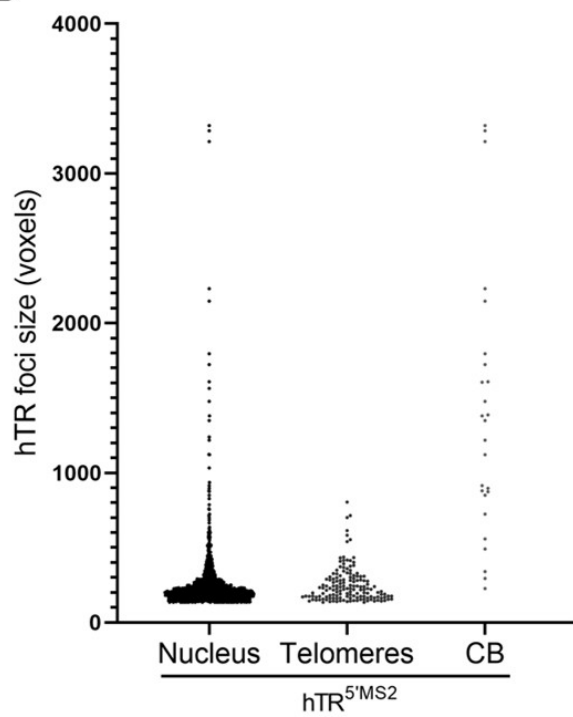
**Figure III.2: Impact of telomerase catalytic activity on its interaction with telomeres**

**A)** Graph of the percentage of telomeres colocalizing with hTR<sup>5MS2</sup> in cells overexpressing either wild type hTERT or DN-hTERT. \* p<0.05. Median values are 31% for wild type hTERT and 47% for DN-hTERT. **B)** Graph showing the residence time at telomeres of hTR<sup>5MS2</sup> particles in cells overexpressing wild type hTERT or DN-hTERT. Median values are 0.8 second for wild type hTERT and 0.9 second for DN-hTERT. **C)** Graph of the diffusion coefficient of hTR<sup>5MS2</sup> particles localized at telomeres in HeLa cells overexpressing wild type hTERT or DN-hTERT. Median values are -1.2 μm<sup>2</sup>/s for wild type hTERT and DN-hTERT.



**Figure III.3: Assessing telomerase stoichiometry at telomeres**

**A)** Distribution of absolute fluorescence intensities (arbitrary units) of  $hTR^{5MS2}$  free diffusive (circles) and localized at telomeres particles (squares) in HeLa cells expressing endogenous hTERT and overexpressing hTERT. **B)** Graph showing the relative fluorescence intensity of  $hTR^{5MS2}/MCP-GFP$  particles localized at telomeres compared to average intensity of free diffusive hTR particles in cells expressing endogenous hTERT or overexpressing hTERT. The dotted line shows the normalized intensity level of diffusive hTR particles. **C-D)** The evolution of  $hTR^{5MS2}/MCP-GFP$  intensity in function of time for short (<1 sec) interactions (**C**) and longer interactions (10 sec) (**D**) in HeLa cells with endogenous expression of hTERT. The bottom dotted line represents the normalized intensity level of diffusive hTR particles; the top dotted line shows the normalized intensity level at twice the fluorescence of diffusive particles.

**A****B**



### **Figure III.4: Quantification of Telomerase RNA stoichiometry from smiFISH images**

**A)** Images of smiFISH against (a) hTR (magenta). (b) Overlay between coilin-BFP (blue) and TRF1-mcherry (green). (c) Overlay between hTR, coilin-BFP and TRF1-mcherry. (d) Overlay between hTR and Hoechst signal (gray). (e,f,g,h) Zoom on coilin-BFP shows Cajal body and hTR colocalizations. (i,j,k,l) Zoom on TRF1-mCherry shows telomeres and hTR colocalization. **B)** Distribution of hTR<sup>5MS2</sup> foci volume (in voxels) measured from super-resolution FISH images in the whole nucleus, localized at telomeres, and at the Cajal bodies.

### III.9 - References

Bajon, E., Laterreur, N., and Wellinger, R.J. (2015). A Single Templating RNA in Yeast Telomerase. *Cell Rep* 12, 441-448.

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

Britt-Compton, B., Capper, R., Rowson, J., and Baird, D.M. (2009). Short telomeres are preferentially elongated by telomerase in human cells. *FEBS Lett* 583, 3076-3080.

Bryan, T.M., Goodrich, K.J., and Cech, T.R. (2003). Tetrahymena telomerase is active as a monomer. *Mol Biol Cell* 14, 4794-4804.

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.

Egan, E.D., and Collins, K. (2010). Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Mol Cell Biol* 30, 2775-2786.

Gallardo, F., Laterreur, N., Cusanelli, E., Ouenzar, F., Querido, E., Wellinger, R.J., and Chartrand, P. (2011). Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell* 44, 819-827.

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

Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 944-954.

Jiang, J., Chan, H., Cash, D.D., Miracco, E.J., Ogorzalek Loo, R.R., Upton, H.E., Cascio, D., O'Brien Johnson, R., Collins, K., Loo, J.A., *et al.* (2015). Structure of Tetrahymena telomerase reveals previously unknown subunits, functions, and interactions. *Science* 350, aab4070.

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

Laprade, H., Querido, E., Smith, M.J., Guerit, D., Crimmins, H., Conomos, D., Pourret, E., Chartrand, P., and Sfeir, A. (2020). Single-Molecule Imaging of Telomerase RNA Reveals a Recruitment-Retention Model for Telomere Elongation. *Mol Cell*.

Marcus, J.M., Burke, R.T., DeSisto, J.A., Landesman, Y., and Orth, J.D. (2015). Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor, selinexor. *Sci Rep* 5, 14391.

Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., and Cech, T.R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* 492, 285-289.

Nguyen, T.H.D., Tam, J., Wu, R.A., Greber, B.J., Toso, D., Nogales, E., and Collins, K. (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature* 557, 190-195.

Ollion, J., Cochennec, J., Loll, F., Escude, C., and Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29, 1840-1841.

Sauerwald, A., Sandin, S., Cristofari, G., Scheres, S.H., Lingner, J., and Rhodes, D. (2013). Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol* 20, 454-460.

Schmidt, J.C., Dalby, A.B., and Cech, T.R. (2014). Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife* 3.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2016). Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell* 166, 1188-1197 e1189.

Sfeir, A., and de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 336, 593-597.

Stewart, S.A., and Weinberg, R.A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 531-557.

Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L., and Eliceiri, K.W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 115, 80-90.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 955-965.

Vasianovich, Y., Krallis, A., and Wellinger, R.J. (2019). Telomerase in Space and Time: Regulation of Yeast Telomerase Function at Telomeres and DNA Breaks. In *Telomerase and non-Telomerase Mechanisms of Telomere Maintenance*, T.A. Morrish, ed. (IntechOpen).

Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J* 20, 3526-3534.

Wu, R.A., Dagdas, Y.S., Yilmaz, S.T., Yildiz, A., and Collins, K. (2015). Single-molecule imaging of telomerase reverse transcriptase in human telomerase holoenzyme and minimal RNP complexes. *Elife* 4.

Xi, L., Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Ascarrunz, D.R., and Cech, T.R. (2015). A novel two-step genome editing strategy with CRISPR-Cas9 provides new insights into telomerase action and TERT gene expression. *Genome Biol* 16, 231.

Zhong, F.L., Batista, L.F., Freund, A., Pech, M.F., Venteicher, A.S., and Artandi, S.E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150, 481-494.

## Chapitre IV – Discussion

Le maintien de la longueur des télomères est un processus tenant un rôle majeur dans la maintenance des cellules souches, ainsi que des cellules cancéreuses. Ceci passe par l'ajout de nouvelles répétitions télomériques par la télomérase. La régulation de la biosynthèse et du recrutement de la télomérase aux télomères sont au cœur du contrôle de l'immortalisation des cellules cancéreuses. Au cours de la dernière décennie, notre laboratoire s'est intéressé à la compréhension de la dynamique de la télomérase dans le noyau ainsi que du contrôle de son accès aux télomères, d'abord chez la levure et maintenant chez l'humain. Récemment, nous avons développé un nouvel outil pour suivre l'ARN de la télomérase dans des cellules HeLa vivantes. Les résultats présentés dans cette thèse apportent de nouveaux indices sur le contrôle du recrutement de cette enzyme ainsi que de son trafic nucléaire dans des cellules cancéreuses humaines. Savoir comment la télomérase est régulée autant au niveau de sa biogénèse que de son accès aux télomères permet de mieux comprendre le processus de transformation cellulaire et pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles pour le traitement contre le cancer.

### IV.1 – La dynamique de hTR

#### IV.1.1 – hTR<sup>5'MS2</sup> comme système efficace de suivi du trafic de la télomérase

Dans le premier article, nous décrivons une nouvelle méthode de marquage de l'ARN de la télomérase dans des cellules HeLa pour son observation par microscopie à fluorescence. Ce marquage repose sur le système MS2 et permet de suivre la course de particules uniques de télomérase dans des cellules vivantes. Nous avons montré que ce système produit des ARN hTR matures ainsi qu'une télomérase totalement fonctionnelle. L'avantage de notre système est que nous pouvons suivre avec précision l'ARN de la télomérase depuis sa biosynthèse jusqu'à son action aux télomères. L'attachement de six GFP sur l'ARN hTR produit une fluorescence suffisante par rapport au bruit de fond et

consistante pour toutes nos expériences, mais limite notre vitesse d'acquisition du fait d'une relativement faible fluorescence de chaque particule individuelle.

Un autre système de marquage de la télomérase fusionnant hTERT à la protéine HaloTag a précédemment été publié (Schmidt et al., 2016). Ce système est performant car il permet une vitesse d'imagerie plus rapide, due à la liaison au HaloTag d'un fluorophore organique qui possède une intensité de fluorescence plus forte. De plus, ce système permet l'acquisition d'images pendant plus longtemps, à cause de la stabilité du fluorophore. Néanmoins, même si cette méthode est un bon moyen d'étudier le recrutement de la télomérase, elle ne permet pas l'étude de la maturation de l'enzyme étant donné que l'on suit le facteur chargé en dernier. Aussi il a été décrit que l'ajout du HaloTag affecte l'activité de la télomérase (Chiba et al., 2017; Schmidt et al., 2018b).

#### **IV.1.2 – La dynamique de hTR dans le noyau**

Nous avons pu observer que hTR diffuse librement et de façon homogène dans tout le noyau. Les particules analysées ont été observées dans le nucléoplasme, aux télomères, aux CBs, ainsi que dans le nucléole. Sa localisation au nucléole est en adéquation avec des résultats précédents suggérant qu'une partie de la maturation de hTR se passe au nucléole (Nguyen et al., 2015). Nous avons observé que dans le nucléole hTR possède un coefficient de diffusion plus faible que dans le nucléoplasme, ceci pourrait provenir de la liaison de protéines pour sa maturation; créant ainsi une augmentation temporaire de la taille du complexe et limitant sa diffusion. Aussi le nucléole est connu pour être un environnement plus dense que le nucléoplasme, pouvant aussi limiter la diffusion de hTR dans ce compartiment (Kim and Guck, 2020). hTERT n'est pas présent dans le nucléole dans les cellules cancéreuses (Schmidt et al., 2016; Wong et al., 2002). Cette différence de localisation entre hTR et hTERT montre que nous observons la télomérase à différentes étapes de son assemblage. Toutefois, nous ne pouvons pas déterminer si une particule est chargée avec hTERT ou non lors de son observation. Aussi la localisation au télomère d'une particule de hTR peut être un bon indice de la présence de hTERT dans le complexe, étant donné que hTERT est nécessaire pour le recrutement de la télomérase aux télomères (figure II.5B)(Schmidt et al., 2016).

## **IV.2 – Les Corps de Cajal comme lieu d’assemblage de la télomérase**

### **IV.2.1 – Localisation de hTR aux corps de Cajal**

Les CBs ont été décrit précédemment comme lieu d’accumulation de la télomérase chez l’humain (Jady et al., 2004; Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004). Dans cette thèse, nous avons pu voir qu’à un temps donné, moins de 10% du total des molécules de hTR dans le noyau sont présentes dans les CBs. L’absence d’accumulation de hTERT au CB en phase S a aussi été observée récemment dans des cellules vivantes (Schmidt et al., 2016). Cette différence de résultat provient très probablement de l’écart de sensibilité dans technique de FISH utilisé précédemment et notre méthode en cellules vivantes. En effet les techniques de FISH utilisées pour montrer la concentration de hTR aux CBs pourraient ne pas avoir la sensibilité nécessaire pour détecter des molécules uniques de hTR dans le nucléoplasme, donnant l’impression que la majorité de hTR est présent aux CBs. Aussi, l’étape de fixation pourrait augmenter le nombre de télomérase présent au CB. Ceci est supporté par l’observation que dans des cellules vivantes, la sortie de hTR du CB est moins rapide que son entrée, pouvant ainsi résulter en une certaine accumulation (voir figure II.3). Il est à noter que par l’utilisation du smiFISH, nous avons observé que la vaste majorité des molécules de hTR sont présentes en dehors des CBs. De façon intéressante, l’utilisation de mutants de TPP1 et hTERT perturbant leur l’interaction provoque l’accumulation de hTR aux CBs (Nandakumar et al., 2012; Schmidt et al., 2014). Nous n’avons pas regardé l’effet du mutant de hTERT K78E sur la dynamique de hTR au CB dans notre modèle.

Le précédent modèle pour la fonction des CBs (outre leur implication dans la maturation et l’assemblage de la télomérase) suggérait qu’ils facilitent l’accès de la télomérase au télomères par une colocalisation de ces trois composantes, limitant le nombres de télomères pouvant être allongés par cycle cellulaire (Jady et al., 2006). Ici, nous avons pu observer que la télomérase diffuse de façon rapide dans tout le noyau et interagit de façon dynamique avec de nombreux télomères au même moment. Ceci s’oppose à l’idée que les télomères et les CBs doivent être proches pour faciliter le

recrutement de la télomérase, surtout au vu de la faible mobilité des télomères que nous avons observée. Nos résultats supportent un trafic transitoire de la télomérase au CB nécessaire pour son assemblage.

#### **IV.2.2 – Le chargement de hTERT sur hTR dans les corps de Cajal**

Les CBs sont un compartiment important pour la fin de maturation de la télomérase (revue dans Schmidt and Cech (2015)). Ici nous avons montré que hTR est associé avec les CB de façon transitoire et que hTERT facilite la sortie de hTR du CB. Ceci suggère que la localisation de hTR au CB pourrait permettre la fin de l'assemblage de la télomérase avec le chargement de hTERT. Cette idée est supportée par le fait qu'il a été montré que hTERT transite par le CB plus rapidement que hTR (Schmidt et al., 2016). La localisation de hTR au CB est dirigée par TCAB1, et cette protéine est nécessaire pour la maintenance des télomères (Cristofari et al., 2007; Stern et al., 2012; Venteicher et al., 2009). Mais la délétion de la coiline, qui est importante pour la formation des CBs, n'affecte pas la maintenance des télomères, suggérant que les CBs ne sont pas essentiels à l'assemblage de la télomérase et que cet assemblage peut aussi avoir lieu hors des corps de Cajal (Chen et al., 2015; Vogan et al., 2016). Des travaux récents ont montré que TCAB1 a une fonction dans le repliement des tiges-boucles P6.1 et P6b dans le domaine CR4/5 de hTR et permet une bonne association de hTERT et hTR (Chen et al., 2018b). Nous pouvons imaginer que l'association de TCAB1 et hTR peut permettre le recrutement de hTERT sur hTR hors des CBs.

Ainsi, il pourrait être intéressant de voir avec notre système si en l'absence de corps de Cajal nous observons un changement dans la dynamique nucléaire de la télomérase. De plus pour confirmer que hTERT est bien chargé sur hTR lors de son passage dans le CB, nous pourrions combiner notre marquage de hTR avec MS2 au marquage de hTERT avec HaloTag pour observer si les particules de hTR sortent ou entrent dans le CB avec ou sans hTERT. Bien que le rôle de la localisation des CBs dans la fin de l'assemblage de la télomérase se précise, les corps de Cajal peuvent avoir d'autres rôles dans la maturation de la télomérase. Il a été récemment rapporté que l'exonucléase TOE1 qui est associé au CBs participe à la maturation de l'extrémité 3' de hTR (Deng et al., 2019; Son et al., 2018). Bien que ce processus soit redondant avec la



fonction de PARN, qui participe aussi la déadénylation de hTR, PARN et TOE1 pourraient favoriser la maturation de hTR de façon successive; d'abord au nucléole puis au CBs. Aussi cette redondance pourrait jouer un rôle dans la formation d'une télomérase active en absence de CBs.

## **IV.3 – La recherche des télomères par la télomérase**

### **IV.3.1 – Le recrutement de hTR aux télomères au cours du cycle cellulaire**

Il y a maintenant une quinzaine d'années, des travaux ont montré par des expériences de FISH que la télomérase était recrutée aux télomères principalement en phase S dans des cellules HeLa (Jady et al., 2006; Tomlinson et al., 2006). Cette restriction de la localisation est largement acceptée du fait que l'élongation des télomères est censée se faire en phase S, après leur réplication, et quand le pic d'activité de la télomérase a été décrit (Zhu et al., 1996). Par microscopie sur des cellules HeLa vivantes, nous avons observé que hTR pouvait être recruté aux télomères aussi en phase G1 (voir figure III.1). Nous n'avons pas observé de différence dans la dynamique de la télomérase entre les différentes phases du cycle cellulaire. Toutefois nous avons observé des interactions pouvant durer 10 secondes (le maximum observable avec la technique utilisée), et nous savons que des interactions plus longues sont possibles et montrent une stabilisation de la télomérase sur son substrat (Laprade et al., 2020). En conséquence, il est nécessaire de mesurer les interactions plus longues au cours du cycle cellulaire, si elles apparaissent préférentiellement en phase S cela pourrait expliquer l'augmentation de recrutement aux télomères que nous observons en phase S/G2. Chez la levure, il a été montré que la télomérase peut être localisée aux télomères en phase G1, et cette localisation est transitoire, de l'ordre de quelques secondes (Gallardo et al., 2011; Gallardo et al., 2008; Taggart et al., 2002). Récemment il a été suggéré que cette localisation en G1 est favorisée par l'interaction entre l'ARN *TLC1* et le complexe yKu-Sir4 qui dirigerait la télomérase dans la région double brin du télomère (Chen et al., 2018a). Il a été proposé que cette localisation en G1 pourrait faciliter l'accès de la

téломérase à Cdc13 et à l'extrémité des télomères en phase S. Cependant, cela n'est pas consistant avec la diffusion de la téломérase et son association transitoire en phase G1 (Gallardo et al., 2011). Il se pourrait que l'association de hTR avec les télomères en G1 puisse dépendre de l'interaction hTERT-TPP1. Cependant, comme chez la levure, une autre voie de recrutement de la téломérase pourrait exister chez l'humain et expliquerait en partie cette localisation de la téломérase aux télomères durant cette phase du cycle cellulaire.

L'étude du recrutement de la téломérase dans le chapitre III a été faite dans des conditions de surexpression de hTERT. L'utilisation de cellules 'super téломérase' qui surexpriment à la fois hTR et hTERT, a montré que la localisation de la téломérase pouvait être forcée aux télomères, ainsi que la coiline et d'autres protéines qui ne sont pas connues pour participer à des fonctions liées à la téломérase (Zhong et al., 2012). Ainsi, la surexpression de la téломérase peut déréguler la localisation de facteurs nucléaires. Il est aussi envisageable que la surexpression de hTERT seule suffit à forcer la téломérase aux télomères et à lever la restriction de sa localisation en phase S. Cette hypothèse suggère que ces expériences soient répétées dans des conditions endogènes pour l'expression des composantes de la téломérase.

La détermination de la localisation de hTR selon les phases du cycle cellulaire a nécessité l'utilisation du système FUCCI. Nous avons dû utiliser deux lignées cellulaires afin de ne pas masquer la fluorescence de mCherry-TRF1 avec Cdt1-mCherry pour observer la localisation de hTR aux télomères en G1. L'utilisation de Cdt1-miRFP670 seul pour sélectionner des cellules en phases G1 peut créer une certaine incertitude. En effet, dans ce cas-ci nous ne pouvons ni nous servir de la détection des télomères, ni de la synthèse de Geminin pour mesurer l'entrée en phase S. Aussi étant donné qu'en début de phase S tout Cdt1 n'est pas encore dégradé, il est possible que des cellules en début de phase S aient été sélectionnées par erreur; surestimant ainsi la localisation de hTR aux télomères dans ces cellules. Il serait donc utile de répéter cette expérience en utilisant une seule lignée cellulaire exprimant Cdt1, Geminin et TRF1 marqué avec trois protéines fluorescentes différentes pour bien identifier la transition G1/S en évitant le masquage des télomères tout au long du cycle.

### **IV.3.2 – La télomérase scanne les télomères via l'interaction TPP1-hTERT**

Notre suivi de hTR a permis de mettre en évidence qu'en phase S, la télomérase visite environ 7% des télomères visibles dans une fenêtre de 10 secondes. La plupart de ces associations sont transitoires (inférieure à 1 seconde) et une grande proportion des molécules de hTR aux télomères montrent une diffusion plus élevée que ceux-ci. Étant donné qu'une phase S dure plusieurs heures, il est très probable que tous les télomères soient visités au moins une fois lors de chaque cycle cellulaire.

Le recrutement de la télomérase aux télomères dépend de l'interaction directe entre le domaine TEL de TPP1 (TEL patch) et le domaine TEN de hTERT (Nandakumar et al., 2012; Schmidt et al., 2014; Zhong et al., 2012). Nous avons pu confirmer que non seulement le recrutement de la télomérase dépend de cette interaction, mais aussi qu'elle permet des interactions courtes et diffusives avec les télomères. Quelques rares particules de hTR formant ces interactions seront maintenues de façon plus stable au télomère par l'appariement de bases entre la matrice de hTR et l'extrémité 3' simple brin du télomère. Ainsi la fonction de TPP1 dans le recrutement de la télomérase serait de permettre un grand nombre d'interactions entre télomérase et télomère pour faciliter l'accès de la télomérase à l'extrémité du télomère en vue de son élongation. Dans des cellules HeLa, il y aurait environ 250 molécules de télomérase pour environ 80 chromosomes, soit plus de 300 télomères après leur réplication, qui représentent seulement une faible proportion de la chromatine totale (Macville et al., 1999; Xi and Cech, 2014). Au vu du faible nombre de molécules de télomérase, trouver l'extrémité d'un télomère par simple diffusion aléatoire peut limiter le nombre de rencontre avec une extrémité, lors d'une phase S. Comme TPP1 est présent en plusieurs copies le long d'un télomère, qui peut atteindre jusqu'à 15-20 Kb, augmentant ainsi les possibilités d'interactions avec la télomérase. La capacité de TPP1 à créer des interactions courtes avec la télomérase évite qu'elle soit piégée hors d'atteinte de son substrat, mais permet son rapprochement avec son substrat (idée aussi discutée dans Schmidt et al. (2016)).

La télomérase semble allonger de façon préférentielle les télomères courts, visitant qu'une portion des télomères à chaque réplication du génome, chez l'humain et la levure

(Britt-Compton et al., 2009; Teixeira et al., 2004). Nous montrons qu'il est probable que l'ensemble des télomères soient visités, mais pas forcément allongés. En faisant le lien avec la fonction proposée de TPP1, il est possible de concilier les deux idées. Nous pouvons envisager que lorsqu'un télomère est court, il contient un moins grand nombre de TPP1, et forcément plus proche de l'extrémité que dans le cas d'un télomère long. Dans ce cas, la télomérase interagit plus proche de son substrat ou fait moins d'évènements de scanning pour s'y associer, augmentant ainsi la probabilité d'élongation de ce télomère. A l'inverse, un télomère long a des chances de voir la télomérase être recrutée de façon plus interne sur le chromosome, limitant l'accès à l'extrémité simple-brin. Pour tenter de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de créer un système inductible pour la formation d'un télomère court dans notre modèle cellulaire.

### **IV.3.3 – ATM et ATR sont des activateurs du recrutement de la télomérase aux télomères**

ATM et ATR sont des kinases connues pour jouer un rôle dans la promotion du recrutement de la télomérase aux télomères et leur élongation (Lee et al., 2015; Tong et al., 2015). Dans cette thèse, nous avons pu confirmer qu'ATM facilite l'interaction de la télomérase aux télomères et qu'ATR a le même effet mais dans une moindre mesure. Néanmoins, l'étape du recrutement ciblé par ces deux protéines n'est pas encore connue chez l'humain. Le fait que nous n'avons pas vu d'effet sur le temps de résidence de la télomérase aux télomères dans des conditions où ces kinases sont réprimées ou inhibées nous amène à proposer que leur activité faciliterait l'accès de hTERT à TPP1. De plus amples investigations sont nécessaires pour identifier la ou les cibles d'ATM et ATR dans le contrôle du recrutement de la télomérase chez l'humain.

Chez la levure, l'homologue d'ATM, Tel1 est aussi un promoteur du recrutement de la télomérase aux télomères. Des résultats suggèrent que la phosphorylation de Cdc13 (une protéine liant l'extrémité simple brin du télomère et interagissant avec la télomérase) par Tel1 favorise son interaction avec Est1 (une protéine du complexe télomérase chez la levure) (Shen et al., 2014; Tseng et al., 2006). Aussi, Tel1 est décrit pour être localisé préférentiellement aux télomères courts et cette localisation promeut l'accès de la télomérase aux télomères (Bianchi and Shore, 2007; Goudsouzian et al., 2006; Hector et

al., 2007; Sabourin et al., 2007). Le modèle actuel suggère que la localisation de Tel1 aux télomères est contrôlée par la quantité de Rif2 présent sur celui-ci. Un télomère court contient moins de Rif2 et faciliterai l'accès de Tel1 sur celui-ci, ce qui augmentera le recrutement de la télomérase à ce télomère court. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ATM aurait une fonction similaire chez l'humain. Ainsi ATM pourrait cibler des composants de la shelterine pour induire un contrôle en fonction de la longueur des télomères. TRF1 est une cible d'ATM et sa phosphorylation induit sa dissociation du télomère (Kishi et al., 2001; McKerlie et al., 2012). Il a été proposé qu'ATM jouerait un rôle impliquant la dissociation de TRF1 dans le recrutement de la télomérase (McKerlie et al., 2012; Tong et al., 2015).

#### **IV.3.4 – POT1 contrôle l'accès de la télomérase à l'extrémité simple brin du télomère**

L'utilisation d'un mutant de POT1 dont le domaine OB-fold est tronqué nous a permis d'affiner le modèle actuel de régulation de la télomérase par POT1. Dans lequel POT1 est décrit comme un inhibiteur de la télomérase en limitant son accès à l'extrémité simple brin des télomères. Les domaines OB-fold en N-terminal de POT1 interagissent avec l'ADN simple brin (Lei et al., 2003; Lei et al., 2004). La mutation ou délétion de ce domaine mène à l'allongement des télomères (Loayza and De Lange, 2003). Nos résultats montrent *in vivo* que POT1 régule l'accès de la télomérase à l'extrémité des télomères. L'expression de POT1<sup>ΔOB</sup> augmente le recrutement ainsi que la rétention de la télomérase aux télomères. De plus, le traitement de nos cellules exprimant POT1<sup>ΔOB</sup> avec GRN163L montre que l'accès favorisé de la télomérase quand POT1 est muté provient de l'accessibilité de l'extrémité d'ADN simple brin. Enfin, la co-expression de POT1<sup>ΔOB</sup> et hTERT<sup>K78E</sup> (ne liant plus TPP1) permet toujours un plus grand recrutement (mais limité) comparativement à la co-expression de POT1<sup>WT</sup>/hTERT<sup>K78E</sup>. Ceci suggère que la télomérase peut se passer de la liaison TPP1-hTERT dans le cas où l'extrémité simple brin du télomère est libre, et démontre l'importance du scanning via TPP1 dans des conditions normales où l'extrémité des télomères est gardée par POT1. De nombreuses mutations de POT1, et notamment dans les domaines OB-fold, ont été identifiées comme associées à des cancers (voir COSMIC, Catalogue Of Somatic

Mutation In Cancer)(Ramsay et al., 2013). Il est suggéré que ces mutations peuvent affecter la capacité de POT1 à lier l'ADN simple brin et augmentent la taille des télomères (Ramsay et al., 2013). Ceci supporte l'importance de POT1 dans la régulation de la télomérase pour limiter l'apparition de cancers.

L'élongation des télomères par la télomérase requiert l'appariement de bases entre hTR et l'extrémité 3' simple brin des télomères. Ceci donne un rôle prédominant à POT1 dans le contrôle de la longueur des télomères. Il est intéressant de noter que POT1 a aussi été décrit comme un activateur de la processivité de la télomérase *in vitro* (Wang et al., 2007). Cela suggère que POT1, bien que décrit comme inhibiteur, est nécessaire à l'élongation des télomères. Quelle régulation serait exercée sur POT1 pour libérer l'extrémité simple brin du télomère et permettre son élongation n'est pas encore connu. Cette question mérite une attention particulière pour déterminer les conditions qui dirigent l'élongation d'un télomère en particulier ou de tous les télomères.

#### **IV.3.5 – Le recrutement et la rétention de hTR aux télomères ne dépendent pas de l'activité catalytique de hTERT**

Nous avons montré que la télomérase scanne les télomères via l'interaction avec TPP1 et qu'elle forme, dans de rare cas, une interaction stable grâce à l'appariement de la matrice de hTR et de l'extrémité du télomère sous le contrôle de POT1. L'expression d'un mutant de hTERT sans activité catalytique (hTERT-DN) résulte en une augmentation de la localisation de hTR aux télomères en phase S. La dynamique de hTR aux télomères, tant au niveau de son temps d'interaction que de sa diffusion, reste similaire à celle de cellules exprimant hTERT sauvage. Ces résultats montrent tout d'abord qu'il existe une séparation de fonction entre recrutement de la télomérase et synthèse de répétitions télomériques au sein de hTERT. Aussi, ces résultats suggèrent que la présence de la télomérase sur un télomère, même dans le cas d'une interaction stable, ne signifie pas nécessairement que ce télomère est allongé. Il n'existe pas de technique pour le moment permettant de savoir si une particule de télomérase est active ou non sur un télomère *in vivo*.

Une séparation de fonction similaire est aussi retrouvée chez la levure *S. cerevisiae*. La protéine de levure Est3 (une protéine du complexe télomérase et

homologue de TPP1 chez l'humain) est essentielle à l'activité de la télomérase *in vivo* et son recrutement au sein de la télomérase pourrait servir de commande pour activer la télomérase (Tucey and Lundblad, 2014). Est3 peut être mutée de sorte que son interaction avec la télomérase est maintenue mais les télomères ne sont plus allongés (Rao et al., 2014). De plus, une délétion d'Est3 n'affecte pas la liaison de la télomérase au télomère, mais la présence de cette protéine est toujours nécessaire pour la maintenance des télomères (Tuzon et al., 2011).

nous n'avons pas encore pu mesurer s'il y avait une différence dans le temps de résidence des interactions longues entre hTERT sauvage et hTERT-DN. Toutefois, comme nous observons une augmentation du recrutement quand hTERT-DN est exprimé, mais pas de différence dans la dynamique des interactions courtes, nous pouvons supposer que ceci peut être dû à un défaut de dissociation de la télomérase des télomères. Chez la levure, l'hélicase Pif1 est un inhibiteur de la télomérase et est connue pour dissocier la télomérase des télomères en perturbant l'appariement de base entre l'ARN *TLC1* et le télomère (Boule et al., 2005; Boule and Zakian, 2007; Zhou et al., 2000). Cette enzyme contrôle la longueur des télomères en s'associant préférentiellement avec les télomères longs (Phillips et al., 2015). Chez l'humain, Pif1 a été rapporté pour être associée avec la télomérase et sa surexpression cause un raccourcissement des télomères dans des cellules cancéreuses (Mateyak and Zakian, 2006; Zhang et al., 2006). De plus, Pif1 inhibe la processivité de la télomérase *in vitro* (Zhang et al., 2006). Il n'est pas connu si l'inhibition de la télomérase par l'hélicase Pif1 humaine défait l'appariement en hTR et le télomère. Il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de Pif1 sur le recrutement de la télomérase dans notre système et voir si cela peut avoir un impact sur le temps de résidence de la télomérase aux télomères à la fois dans des conditions endogènes et avec l'expression de hTERT-DN.

#### **IV.4 – La nature monomérique de la télomérase**

La stœchiométrie du complexe télomérase est un sujet débattu depuis de nombreuses années. Bien que des évidences existent que la télomérase humaine puisse être un dimère (Sauerwald et al., 2013; Wenz et al., 2001), des travaux récents suggèrent

que la télomérase active est monomérique (Wu et al., 2015). Ceci est supporté par la structure résolue par cryo-microscopie électronique de complexes télomérase complets (Nguyen et al., 2018). Par contre, cette structure ne reflète pas nécessairement la télomérase présente aux télomères. Dans cette thèse, nous avons quantifié pour la première fois le nombre de particules de télomérase présentes aux télomères. Nos résultats ont montré qu'une seule particule de télomérase est recrutée à la fois sur un télomère. Nous ne pouvons pas tirer de conclusion précise sur le nombre de molécules de hTR présentes dans une particule visible aux télomères. Cependant, compte tenu des évidences en faveur de la monomérisation de la télomérase, nous pouvons émettre l'hypothèse que la télomérase reste monomérique tout au long de sa vie. Au vu de la haute affinité de MCP-GFP pour les tiges-boucles présentes sur hTR, leur ancrage sur hTR se fait de façon co-transcriptionnelle, nous pouvons suivre hTR dès sa synthèse. La fluorescence mesurée de hTR présente aux télomères est similaire à celle des particules de hTR diffusives dans le nucléoplasme. Ces dernières montrent aussi une fluorescence similaire entre elles dans une même cellule, avec suffisamment peu de variation pour réfuter l'hypothèse que la quantité de molécules hTR au sein d'une particule peut varier. De nombreuses autres mesures sont nécessaires pour affiner nos résultats et permettre une conclusion plus claire. Toutefois, il a été montré que des télomérases purifiées avaient tendance à former des dimères, ce qui soulève des questions sur la validité des expériences montrant la dimérisation de la télomérase (Wu et al., 2015).

La nature monomérique de la télomérase est aussi conservée entre les espèces. Il a été montré chez *S. cerevisiae* que la télomérase est un monomère (Bajon et al., 2015) et des résultats suggèrent que cette même caractéristique est présente chez *T. thermophila* (Jiang et al., 2015). Toutefois chez la levure un regroupement de molécules de télomérase actives aux télomères est observé en phase S, formant un regroupement nommé T-Rec (Telomerase Recruitment cluster) (Gallardo et al., 2011). Ce regroupement pourrait suggérer que plusieurs molécules de télomérase ont besoin d'être concentrées pour l'élongation des télomères. Nous n'avons pas observé de telle accumulation de molécules de hTR sur un télomère dans les cellules humaines. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que la télomérase de *S. cerevisiae* n'est pas très processive, puisqu'elle n'effectue qu'un cycle de synthèse (turnover). Ainsi il peut être nécessaire



d'amener plusieurs molécules de télomérases proches d'un télomère pour accomplir plusieurs cycles de polymérisation et allonger un télomère durant un cycle cellulaire. Comme la télomérase humaine est processive et est capable de faire plusieurs cycles de polymérisation successifs, une molécule peut être suffisante pour allonger un télomère.

## Conclusion

Le maintien de la longueur des télomères est un processus normalement restreint aux cellules souches et embryonnaires qui doivent renouveler et créer de nouveau tissus. Cette maintenance passe par la télomérase dont la dérégulation peut mener à l'immortalisation de la cellule et à la formation de tumeurs. La régulation de cette enzyme recèle encore de nombreuses zones d'ombre et, bien que faisant l'objet de plusieurs travaux, comment agissent ses régulateurs connus sur son recrutement n'est pas bien compris. Ce recrutement est une étape importante dans la limitation de l'accès aux télomères. Le suivi de particules uniques par microscopie à déjà par le passé montré qu'elle permet de révéler des processus cachés par d'autres méthodes.

Dans ce projet, nous avons réussi à adapter le système MS2 pour le suivi de molécules uniques de hTR en cellules vivantes. Ceci révèle pour la première fois la dynamique de cet ARN dans le noyau de cellules HeLa et révèle plusieurs mécanismes impliqués dans son transit par les corps de Cajal et dans le contrôle de son recrutement aux télomères. La transition de hTR aux corps de Cajal est affectée par hTERT qui pourrait être chargé sur la télomérase à cet endroit et permettre la sortie de la télomérase des CBs. Pour confirmer cette hypothèse avec notre méthode, il va être essentiel de suivre simultanément hTERT et hTR en direct pour voir si ce chargement se fait bien au CBs. Aussi la coiline ne paraît pas essentielle pour ce processus, par cette même méthode nous pourrions déterminer le lieu d'assemblage alternatif ainsi que l'impact de la dynamique de recrutement de la télomérase aux télomères dans le cas où la coiline est absente ou mutée.

Nous avons montré que la télomérase peut scanner l'intégralité des télomères dans un cycle de réplication via de nombreuses interactions TPP1-hTERT et former de plus rares interactions stables sous le contrôle de POT1 sur l'appariement entre la matrice de hTR et le télomère. Il est maintenant primordial de comprendre si ce contrôle permet un allongement préférentiel des télomères les plus courts. Pour ceci la création de lignées cellulaires dans lesquelles nous pouvons induire un ou plusieurs télomères courts allié à notre approche d'imagerie permettrait de comparer la dynamique de la télomérase sur des télomères normaux et courts. Cela permettra de déterminer si un télomère court

facilite la création d'interactions stables entre le télomère et la télomérase. L'utilisation dans ces conditions de mutants et inhibiteurs de hTERT, POT1, TCAB1, ATM et ATR nous permettrait de connaître leur impact sur le recrutement de la télomérase aux télomères courts. Nous avons observé qu'ATM et ATR ont un rôle dans le recrutement de la télomérase mais s'ils ont un rôle dans l'adressage de la télomérase à tous les télomères ou préférentiellement aux courts reste inconnu.

Au vu de son implication dans la plupart des cancers l'étude de la télomérase représente des enjeux importants. Ce projet a permis d'éclaircir les mécanismes dynamiques impliqués dans le recrutement de la télomérase aux télomères. Connaître s'il y a un signal permettant d'allonger préférentiellement les télomères courts est la prochaine étape importante dans la compréhension de ces processus. Si les télomères courts sont effectivement allongés en priorité, le signal pour leur élongation pourrait être une cible de choix dans le développement de traitement anticancer étant donné que la capacité de réplication des cellules est dictée par le télomère le plus court.

## Références bibliographiques

- Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., and Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* 30, 2971-2982.
- Armstrong, C.A., Pearson, S.R., Amelina, H., Moiseeva, V., and Tomita, K. (2014). Telomerase activation after recruitment in fission yeast. *Current biology : CB* 24, 2006-2011.
- Azhibek, D., Skvortsov, D., Andreeva, A., Zatsepin, T., Arutyunyan, A., Zvereva, M., and Dontsova, O. (2016). TERRA mimicking ssRNAs prevail over the DNA substrate for telomerase in vitro due to interactions with the alternative binding site. *J Mol Recognit* 29, 242-247.
- Bachand, F., and Autexier, C. (1999). Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 38027-38031.
- Bae, N.S., and Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Mol Cell* 26, 323-334.
- Bajon, E., Laterreur, N., and Wellinger, R.J. (2015). A Single Templating RNA in Yeast Telomerase. *Cell Rep* 12, 441-448.
- Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O'Neil, N.J., Petalcorin, M.I., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M., *et al.* (2008). RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* 135, 261-271.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8, 177-180.
- Bell, R.J., Rube, H.T., Kreig, A., Mancini, A., Fouse, S.D., Nagarajan, R.P., Choi, S., Hong, C., He, D., Pekmezci, M., *et al.* (2015). Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 348, 1036-1039.

Bensidoun, P., Raymond, P., Oeffinger, M., and Zenklusen, D. (2016). Imaging single mRNAs to study dynamics of mRNA export in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 98, 104-114.

Bernards, A., Michels, P.A., Lincke, C.R., and Borst, P. (1983). Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes. *Nature* 303, 592-597.

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., and Long, R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2, 437-445.

Bianchi, A., and Shore, D. (2007). Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev* 21, 1726-1730.

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

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

Boule, J.B., Vega, L.R., and Zakian, V.A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* 438, 57-61.

Boule, J.B., and Zakian, V.A. (2007). The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA DNA substrates. *Nucleic Acids Res* 35, 5809-5818.

Britt-Compton, B., Capper, R., Rowson, J., and Baird, D.M. (2009). Short telomeres are preferentially elongated by telomerase in human cells. *FEBS Lett* 583, 3076-3080.

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

Bryan, T.M., Goodrich, K.J., and Cech, T.R. (2003). Tetrahymena telomerase is active as a monomer. *Mol Biol Cell* 14, 4794-4804.

Calvete, O., Garcia-Pavia, P., Dominguez, F., Bougeard, G., Kunze, K., Braeuninger, A., Teule, A., Lasa, A., Ramon, Y.C.T., Lloret, G., *et al.* (2017). The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet* *25*, 1278-1281.

Celli, G.B., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* *7*, 712-718.

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

Chen, C.H., and Chen, R.J. (2011). Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* *110*, 275-289.

Chen, H., Xue, J., Churikov, D., Hass, E.P., Shi, S., Lemon, L.D., Luciano, P., Bertuch, A.A., Zappulla, D.C., Geli, V., *et al.* (2018a). Structural Insights into Yeast Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell* *172*, 331-343 e313.

Chen, J., Zhang, Z., Li, L., Chen, B.C., Revyakin, A., Hajj, B., Legant, W., Dahan, M., Lionnet, T., Betzig, E., *et al.* (2014). Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell* *156*, 1274-1285.

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

Chen, J.L., Opperman, K.K., and Greider, C.W. (2002). A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Res* *30*, 592-597.

Chen, L., Roake, C.M., Freund, A., Batista, P.J., Tian, S., Yin, Y.A., Gajera, C.R., Lin, S., Lee, B., Pech, M.F., *et al.* (2018b). An Activity Switch in Human Telomerase Based on RNA Conformation and Shaped by TCAB1. *Cell* *174*, 218-230 e213.

Chen, L., Roake, C.M., Galati, A., Bavasso, F., Micheli, E., Saggio, I., Schoeftner, S., Cacchione, S., Gatti, M., Artandi, S.E., *et al.* (2020). Loss of Human TGS1 Hypermethylase Promotes Increased Telomerase RNA and Telomere Elongation. *Cell Rep* *30*, 1358-1372 e1355.

Chen, L.Y., Redon, S., and Lingner, J. (2012). The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* 488, 540-544.

Chen, Y., Deng, Z., Jiang, S., Hu, Q., Liu, H., Songyang, Z., Ma, W., Chen, S., and Zhao, Y. (2015). Human cells lacking coilin and Cajal bodies are proficient in telomerase assembly, trafficking and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 43, 385-395.

Chen, Y., Yang, Y., van Overbeek, M., Donigian, J.R., Baciou, P., de Lange, T., and Lei, M. (2008). A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* 319, 1092-1096.

Chiba, K., Vogan, J.M., Wu, R.A., Gill, M.S., Zhang, X., Collins, K., and Hockemeyer, D. (2017). Endogenous Telomerase Reverse Transcriptase N-Terminal Tagging Affects Human Telomerase Function at Telomeres In Vivo. *Mol Cell Biol* 37.

Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315, 1850-1853.

Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R.M., Terns, M.P., and Lingner, J. (2007). Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* 27, 882-889.

Cusanelli, E., Romero, C.A., and Chartrand, P. (2013). Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell* 51, 780-791.

Daigle, N., and Ellenberg, J. (2007). LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods* 4, 633-636.

Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R.H., and Meier, U.T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J Cell Biol* 173, 207-218.

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* *19*, 2100-2110.

de Lange, T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet* *52*, 223-247.

Denchi, E.L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* *448*, 1068-1071.

Deng, T., Huang, Y., Weng, K., Lin, S., Li, Y., Shi, G., Chen, Y., Huang, J., Liu, D., Ma, W., *et al.* (2019). TOE1 acts as a 3' exonuclease for telomerase RNA and regulates telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* *47*, 391-405.

Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* *456*, 524-528.

Diolaiti, M.E., Cimini, B.A., Kageyama, R., Charles, F.A., and Stohr, B.A. (2013). In situ visualization of telomere elongation patterns in human cells. *Nucleic acids research* *41*, e176.

Doksani, Y. (2019). The Response to DNA Damage at Telomeric Repeats and Its Consequences for Telomere Function. *Genes (Basel)* *10*.

Doksani, Y., Wu, J.Y., de Lange, T., and Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* *155*, 345-356.

Egan, E.D., and Collins, K. (2010). Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Mol Cell Biol* *30*, 2775-2786.

Elf, J., Li, G.W., and Xie, X.S. (2007). Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science* *316*, 1191-1194.



Erdel, F., Kratz, K., Willcox, S., Griffith, J.D., Greene, E.C., and de Lange, T. (2017). Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Rep* 18, 41-53.

Fairall, L., Chapman, L., Moss, H., de Lange, T., and Rhodes, D. (2001). Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 8, 351-361.

Fokas, E., Prevo, R., Hammond, E.M., Brunner, T.B., McKenna, W.G., and Muschel, R.J. (2014). Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* 40, 109-117.

Frank, A.K., Tran, D.C., Qu, R.W., Stohr, B.A., Segal, D.J., and Xu, L. (2015). The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. *PLoS Genet* 11, e1005410.

Frescas, D., and de Lange, T. (2014). Binding of TPP1 protein to TIN2 protein is required for POT1a,b protein-mediated telomere protection. *J Biol Chem* 289, 24180-24187.

Gal, N., Lechtman-Goldstein, D., and Weihs, D. (2013). Particle tracking in living cells: a review of the mean square displacement method and beyond. *Rheologica Acta* 52, 425-443.

Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.

Gallardo, F., Laterreur, N., Cusanelli, E., Ouenzar, F., Querido, E., Wellinger, R.J., and Chartrand, P. (2011). Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell* 44, 819-827.

Gallardo, F., Olivier, C., Dandjinou, A.T., Wellinger, R.J., and Chartrand, P. (2008). TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J* 27, 748-757.

Goldfarb, K.C., and Cech, T.R. (2013). 3' terminal diversity of MRP RNA and other human noncoding RNAs revealed by deep sequencing. *BMC Mol Biol* 14, 23.

Gong, Y., and de Lange, T. (2010). A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signaling at telomeres through RPA exclusion. *Mol Cell* 40, 377-387.

Gong, Y., Stock, A.J., and Liu, Y. (2020). The enigma of excessively long telomeres in cancer: lessons learned from rare human POT1 variants. *Curr Opin Genet Dev* 60, 48-55.

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, 603-610.

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

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

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

Gu, P., Wang, Y., Bisht, K.K., Wu, L., Kukova, L., Smith, E.M., Xiao, Y., Bailey, S.M., Lei, M., Nandakumar, J., *et al.* (2017). Pot1 OB-fold mutations unleash telomere instability to initiate tumorigenesis. *Oncogene* 36, 1939-1951.

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

Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., de Lange, T., and Nishimura, Y. (2001). NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J Mol Biol* 312, 167-175.

Hansen, A.S., Woringer, M., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Tjian, R., and Darzacq, X. (2018). Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with Spot-On. *Elife* 7.

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

Hatsugai, K., Ohishi, T., Sugimoto, Y., and Seimiya, H. (2010). Tankyrase-1 assembly to large protein complexes blocks its telomeric function. *FEBS Lett* 584, 3885-3890.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.

Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B., and Matera, A.G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & development* 15, 2720-2729.

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, 851-858.

Herbert, B.S., Gellert, G.C., Hochreiter, A., Pongracz, K., Wright, W.E., Zielinska, D., Chin, A.C., Harley, C.B., Shay, J.W., and Gryaznov, S.M. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene* 24, 5262-5268.

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research* 64, 9152-9159.

Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63-77.

- Hom, R.A., and Wuttke, D.S. (2017). Human CST Prefers G-Rich but Not Necessarily Telomeric Sequences. *Biochemistry* 56, 4210-4218.
- Jady, B.E., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* 164, 647-652.
- Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 944-954.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., and Shay, J.W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 8, 69.
- Janouskova, E., Necasova, I., Pavlouskova, J., Zimmermann, M., Hluchy, M., Marini, V., Novakova, M., and Hofr, C. (2015). Human Rap1 modulates TRF2 attraction to telomeric DNA. *Nucleic Acids Res* 43, 2691-2700.
- Jiang, J., Chan, H., Cash, D.D., Miracco, E.J., Ogorzalek Loo, R.R., Upton, H.E., Cascio, D., O'Brien Johnson, R., Collins, K., Loo, J.A., *et al.* (2015). Structure of Tetrahymena telomerase reveals previously unknown subunits, functions, and interactions. *Science* 350, aab4070.
- Kabir, S., Hockemeyer, D., and de Lange, T. (2014). TALEN gene knockouts reveal no requirement for the conserved human shelterin protein Rap1 in telomere protection and length regulation. *Cell Rep* 9, 1273-1280.
- Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O.K., Bakkenist, C., Kastan, M.B., Petrini, J.H., and de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2, E240.
- Kelleher, C., Kurth, I., and Lingner, J. (2005). Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* 25, 808-818.

Kim, K., and Guck, J. (2020). The relative densities of cell cytoplasm, nucleoplasm, and nucleoli are robustly conserved during cell cycle and drug perturbations. 2020.2004.2014.040774.

Kim, N.K., Theimer, C.A., Mitchell, J.R., Collins, K., and Feigon, J. (2010). Effect of pseudouridylation on the structure and activity of the catalytically essential P6.1 hairpin in human telomerase RNA. *Nucleic Acids Res* 38, 6746-6756.

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

Kim, S.H., Beausejour, C., Davalos, A.R., Kaminker, P., Heo, S.J., and Campisi, J. (2004). TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* 279, 43799-43804.

Kishi, S., Zhou, X.Z., Ziv, Y., Khoo, C., Hill, D.E., Shiloh, Y., and Lu, K.P. (2001). Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem* 276, 29282-29291.

Konig, A.I., Sorkin, R., Alon, A., Nachmias, D., Dhara, K., Brand, G., Yifrach, O., Arbely, E., Roichman, Y., and Elia, N. (2020). Live cell single molecule tracking and localization microscopy of bioorthogonally labeled plasma membrane proteins. *Nanoscale* 12, 3236-3248.

Laprade, H., Lalonde, M., Guerit, D., and Chartrand, P. (2017). Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA. *Methods* 114, 46-53.

Laprade, H., Querido, E., Smith, M.J., Guerit, D., Crimmins, H., Conomos, D., Pourret, E., Chartrand, P., and Sfeir, A. (2020). Single-Molecule Imaging of Telomerase RNA Reveals a Recruitment-Retention Model for Telomere Elongation. *Mol Cell*.

Latrick, C.M., and Cech, T.R. (2010). POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. *EMBO J* 29, 924-933.

Lee, S.S., Bohrson, C., Pike, A.M., Wheelan, S.J., and Greider, C.W. (2015). ATM Kinase Is Required for Telomere Elongation in Mouse and Human Cells. *Cell Rep* 13, 1623-1632.

Lei, M., Podell, E.R., Baumann, P., and Cech, T.R. (2003). DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. *Nature* 426, 198-203.

Lei, M., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2004). Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1223-1229.

Leulliot, N., Godin, K.S., Hoareau-Aveilla, C., Quevillon-Cheruel, S., Varani, G., Henry, Y., and Van Tilbeurgh, H. (2007). The box H/ACA RNP assembly factor Naf1p contains a domain homologous to Gar1p mediating its interaction with Cbf5p. *J Mol Biol* 371, 1338-1353.

Li, B., and de Lange, T. (2003). Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* 14, 5060-5068.

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

Lim, F., and Peabody, D.S. (1994). Mutations that increase the affinity of a translational repressor for RNA. *Nucleic Acids Res* 22, 3748-3752.

Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.

Machyna, M., Neugebauer, K.M., and Stanek, D. (2015). Coilin: The first 25 years. *RNA Biol* 12, 590-596.

MacNeil, D.E., Bensoussan, H.J., and Autexier, C. (2016). Telomerase Regulation from Beginning to the End. *Genes (Basel)* 7.

Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., and Ried, T. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59, 141-150.

Manzo, C., and Garcia-Parajo, M.F. (2015). A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights. *Rep Prog Phys* 78, 124601.

Marcus, J.M., Burke, R.T., DeSisto, J.A., Landesman, Y., and Orth, J.D. (2015). Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor, selinexor. *Sci Rep* 5, 14391.

Martinez, P., and Blasco, M.A. (2017). Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *The Journal of cell biology* 216, 875-887.

Martínez, P., Gómez-López, G., Pisano, D.G., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2016). A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance. *Aging Cell* 15, 1113-1125.

Mateyak, M.K., and Zakian, V.A. (2006). Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase. *Cell Cycle* 5, 2796-2804.

McKerlie, M., Lin, S., and Zhu, X.D. (2012). ATM regulates proteasome-dependent subnuclear localization of TRF1, which is important for telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 40, 3975-3989.

Meier, U.T. (2017). RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biol* 14, 693-700.

Mitchell, J.R., Cheng, J., and Collins, K. (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* 19, 567-576.

Model, M.A., and Burkhardt, J.K. (2001). A standard for calibration and shading correction of a fluorescence microscope. *Cytometry* 44, 309-316.

Moon, D.H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., Tai, A.K., and Agarwal, S. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet* 47, 1482-1488.

Moravec, M., Wischnewski, H., Bah, A., Hu, Y., Liu, N., Lafranchi, L., King, M.C., and Azzalin, C.M. (2016). TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep* 17, 999-1012.

Moser, B.A., Chang, Y.T., Kosti, J., and Nakamura, T.M. (2011). Tel1ATM and Rad3ATR kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. *Nature structural & molecular biology* 18, 1408-1413.

Muraki, K., and Murnane, J.P. (2018). The DNA damage response at dysfunctional telomeres, and at interstitial and subtelomeric DNA double-strand breaks. *Genes Genet Syst* 92, 135-152.

Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., and Cech, T.R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* 492, 285-289.

Nelles, D.A., Fang, M.Y., O'Connell, M.R., Xu, J.L., Markmiller, S.J., Doudna, J.A., and Yeo, G.W. (2016). Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9. *Cell* 165, 488-496.

Nguyen, D., Grenier St-Sauveur, V., Bergeron, D., Dupuis-Sandoval, F., Scott, M.S., and Bachand, F. (2015). A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep* 13, 2244-2257.

Nguyen, T.H.D., Tam, J., Wu, R.A., Greber, B.J., Toso, D., Nogales, E., and Collins, K. (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature* 557, 190-195.

Okamoto, K., Bartocci, C., Ouzounov, I., Diedrich, J.K., Yates, J.R., 3rd, and Denchi, E.L. (2013). A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature* 494, 502-505.



- Ollion, J., Cochenec, J., Loll, F., Escude, C., and Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29, 1840-1841.
- Ouellet, J. (2016). RNA Fluorescence with Light-Up Aptamers. *Front Chem* 4, 29.
- Ouellette, M.M., Liao, M., Herbert, B.S., Johnson, M., Holt, S.E., Liss, H.S., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *J Biol Chem* 275, 10072-10076.
- Penzo, M., and Montanaro, L. (2018). Turning Uridines around: Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function. *Biomolecules* 8.
- Phillips, J.A., Chan, A., Paeschke, K., and Zakian, V.A. (2015). The pif1 helicase, a negative regulator of telomerase, acts preferentially at long telomeres. *PLoS Genet* 11, e1005186.
- Pike, A.M., Strong, M.A., Ouyang, J.P.T., and Greider, C.W. (2019). TIN2 Functions with TPP1/POT1 To Stimulate Telomerase Processivity. *Mol Cell Biol* 39.
- Pinzaru, A.M., Hom, R.A., Beal, A., Phillips, A.F., Ni, E., Cardozo, T., Nair, N., Choi, J., Wuttke, D.S., Sfeir, A., *et al.* (2016). Telomere Replication Stress Induced by POT1 Inactivation Accelerates Tumorigenesis. *Cell reports* 15, 2170-2184.
- Porreca, R.M., Glousker, G., Awad, A., Matilla Fernandez, M.I., Gibaud, A., Naucke, C., Cohen, S.B., Bryan, T.M., Tzfati, Y., Draskovic, I., *et al.* (2018). Human RTEL1 stabilizes long G-overhangs allowing telomerase-dependent over-extension. *Nucleic Acids Res* 46, 4533-4545.
- Poulet, A., Pisano, S., Faivre-Moskalenko, C., Pei, B., Tauran, Y., Haftek-Terreau, Z., Brunet, F., Le Bihan, Y.V., Ledu, M.H., Montel, F., *et al.* (2012). The N-terminal domains of TRF1 and TRF2 regulate their ability to condense telomeric DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 2566-2576.

Qiao, F., and Cech, T.R. (2008). Triple-helix structure in telomerase RNA contributes to catalysis. *Nat Struct Mol Biol* 15, 634-640.

Querido, E., and Chartrand, P. (2008). Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol* 85, 273-292.

Ramsay, A.J., Quesada, V., Foronda, M., Conde, L., Martinez-Trillos, A., Villamor, N., Rodriguez, D., Kwarciak, A., Garabaya, C., Gallardo, M., *et al.* (2013). POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 45, 526-530.

Rao, T., Lubin, J.W., Armstrong, G.S., Tucey, T.M., Lundblad, V., and Wuttke, D.S. (2014). Structure of Est3 reveals a bimodal surface with differential roles in telomere replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 214-218.

Redon, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 38, 5797-5806.

Redon, S., Zemp, I., and Lingner, J. (2013). A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. *Nucleic Acids Res* 41, 9117-9128.

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*. *Molecular and cellular biology* 19, 6065-6075.

Roake, C.M., and Artandi, S.E. (2020). Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

Roake, C.M., Chen, L., Chakravarthy, A.L., Ferrell, J.E., Jr., Raffa, G.D., and Artandi, S.E. (2019). Disruption of Telomerase RNA Maturation Kinetics Precipitates Disease. *Mol Cell* 74, 688-700 e683.

Sabourin, M., Tuzon, C.T., and Zakian, V.A. (2007). Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 27, 550-561.

Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., and Yan, J. (2010). Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat* 192, 284-291.

Sarek, G., Vannier, J.B., Panier, S., Petrini, J.H.J., and Boulton, S.J. (2016). TRF2 Recruits RTEL1 to Telomeres in S Phase to Promote T-Loop Unwinding. *Mol Cell* 61, 788-789.

Sauerwald, A., Sandin, S., Cristofari, G., Scheres, S.H., Lingner, J., and Rhodes, D. (2013). Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol* 20, 454-460.

Savage, S.A., and Alter, B.P. (2009). Dyskeratosis congenita. *Hematol Oncol Clin North Am* 23, 215-231.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.

Schmidt, J.C., and Cech, T.R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev* 29, 1095-1105.

Schmidt, J.C., Dalby, A.B., and Cech, T.R. (2014). Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife* 3.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2016). Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell* 166, 1188-1197 e1189.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Kufer, R., and Cech, T.R. (2018a). Dynamics of human telomerase recruitment depend on template- telomere base pairing. *Molecular biology of the cell*.

Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Kufer, R., and Cech, T.R. (2018b). Dynamics of human telomerase recruitment depend on template-telomere base pairing. *Mol Biol Cell* 29, 869-880.

Schmutz, I., Timashev, L., Xie, W., Patel, D.J., and de Lange, T. (2017). TRF2 binds branched DNA to safeguard telomere integrity. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 734-742.

Sexton, A.N., Regalado, S.G., Lai, C.S., Cost, G.J., O'Neil, C.M., Urnov, F.D., Gregory, P.D., Jaenisch, R., Collins, K., and Hockemeyer, D. (2014). Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes & development* 28, 1885-1899.

Sfeir, A., and de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 336, 593-597.

Sfeir, A., and Denchi, E.L. (2016). Stressed telomeres without POT1 enhance tumorigenesis. *Oncotarget* 7, 46833-46834.

Sfeir, A., Kabir, S., van Overbeek, M., Celli, G.B., and de Lange, T. (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science* 327, 1657-1661.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90-103.

Shav-Tal, Y., Darzacq, X., Shenoy, S.M., Fusco, D., Janicki, S.M., Spector, D.L., and Singer, R.H. (2004). Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* 304, 1797-1800.

Shay, J.W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov* 6, 584-593.

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

Shen, H., Tauzin, L.J., Baiyasi, R., Wang, W., Moringo, N., Shuang, B., and Landes, C.F. (2017). Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications. *Chem Rev* 117, 7331-7376.

Shen, Z.J., Hsu, P.H., Su, Y.T., Yang, C.W., Kao, L., Tseng, S.F., Tsai, M.D., and Teng, S.C. (2014). PP2A and Aurora differentially modify Cdc13 to promote telomerase release from telomeres at G2/M phase. *Nat Commun* 5, 5312.

Shukla, S., Schmidt, J.C., Goldfarb, K.C., Cech, T.R., and Parker, R. (2016). Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nat Struct Mol Biol* 23, 286-292.

Smith, E.M., Pendlebury, D.F., and Nandakumar, J. (2020). Structural biology of telomeres and telomerase. *Cell Mol Life Sci* 77, 61-79.

Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., and de Lange, T. (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* 12, 1635-1644.

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

Snow, B.E., Mateyak, M., Paderova, J., Wakeham, A., Iorio, C., Zakian, V., Squire, J., and Harrington, L. (2007). Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 1017-1026.

Son, A., Park, J.E., and Kim, V.N. (2018). PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs. *Cell Rep* 23, 888-898.

Steinert, S., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1095-1098.

Stern, J.L., Zyner, K.G., Pickett, H.A., Cohen, S.B., and Bryan, T.M. (2012). Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol* 32, 2384-2395.

Stewart, S.A., and Weinberg, R.A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 531-557.

Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25, 5775-5782.

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

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current biology : CB* 13, 1549-1556.

Takai, K.K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R., and de Lange, T. (2010). In vivo stoichiometry of shelterin components. *The Journal of biological chemistry* 285, 1457-1467.

Takai, K.K., Kibe, T., Donigian, J.R., Frescas, D., and de Lange, T. (2011). Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Mol Cell* 44, 647-659.

Teixeira, M.T., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell* 117, 323-335.

Theimer, C.A., Jady, B.E., Chim, N., Richard, P., Breece, K.E., Kiss, T., and Feigon, J. (2007). Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Mol Cell* 27, 869-881.

Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L., and Eliceiri, K.W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 115, 80-90.

Tomita, K., and Cooper, J.P. (2008). Fission yeast Ccq1 is telomerase recruiter and local checkpoint controller. *Genes & development* 22, 3461-3474.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 955-965.

Tong, A.S., Stern, J.L., Sfeir, A., Kartawinata, M., de Lange, T., Zhu, X.D., and Bryan, T.M. (2015). ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. *Cell Rep* 13, 1633-1646.

Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A.M., Gostan, T., Weber, C., Zimmer, C., Zibara, K., Walter, T., Peter, M., *et al.* (2016). smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic acids research* 44, e165.

Tseng, C.K., Wang, H.F., Burns, A.M., Schroeder, M.R., Gaspari, M., and Baumann, P. (2015). Human Telomerase RNA Processing and Quality Control. *Cell Rep* 13, 2232-2243.

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, 6327-6336.

Tucey, T.M., and Lundblad, V. (2014). Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex. *Genes Dev* 28, 2077-2089.

Tuzon, C.T., Wu, Y., Chan, A., and Zakian, V.A. (2011). The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 in vitro. *PLoS Genet* 7, e1002060.

Tycowski, K.T., Shu, M.D., Kukoyi, A., and Steitz, J.A. (2009). A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell* 34, 47-57.

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

Vasianovich, Y., Krallis, A., and Wellinger, R.J. (2019). Telomerase in Space and Time: Regulation of Yeast Telomerase Function at Telomeres and DNA Breaks. In *Telomerase and non-Telomerase Mechanisms of Telomere Maintenance*, T.A. Morrish, ed. (IntechOpen).

Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323, 644-648.

Vogan, J.M., Zhang, X., Youmans, D.T., Regalado, S.G., Johnson, J.Z., Hockemeyer, D., and Collins, K. (2016). Minimized human telomerase maintains telomeres and resolves endogenous roles of H/ACA proteins, TCAB1, and Cajal bodies. *Elife* 5.

Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciou, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506-510.

Weinhold, N., Jacobsen, A., Schultz, N., Sander, C., and Lee, W. (2014). Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet* 46, 1160-1165.

Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J* 20, 3526-3534.

Wong, J.M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002). Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 4, 731-736.

Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y.J., and Singer, R.H. (2016). Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science* 352, 1430-1435.



Wu, R.A., Dagdas, Y.S., Yilmaz, S.T., Yildiz, A., and Collins, K. (2015). Single-molecule imaging of telomerase reverse transcriptase in human telomerase holoenzyme and minimal RNP complexes. *Elife* 4.

Wu, R.A., Upton, H.E., Vogan, J.M., and Collins, K. (2017). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu Rev Biochem* 86, 439-460.

Xi, L., and Cech, T.R. (2014). Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT. *Nucleic Acids Res* 42, 8565-8577.

Xi, L., Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Ascarrunz, D.R., and Cech, T.R. (2015). A novel two-step genome editing strategy with CRISPR-Cas9 provides new insights into telomerase action and TERT gene expression. *Genome Biol* 16, 231.

Yan, X., Hoek, T.A., Vale, R.D., and Tanenbaum, M.E. (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell* 165, 976-989.

Yang, D., He, Q., Kim, H., Ma, W., and Songyang, Z. (2011). TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase. *J Biol Chem* 286, 23022-23030.

Yuan, P., Wang, Z., Lv, W., Pan, H., Yang, Y., Yuan, X., and Hu, J. (2014). Telomerase Cajal body protein 1 depletion inhibits telomerase trafficking to telomeres and induces G1 cell cycle arrest in A549 cells. *Oncol Lett* 8, 1009-1016.

Zhang, D.H., Zhou, B., Huang, Y., Xu, L.X., and Zhou, J.Q. (2006). The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Res* 34, 1393-1404.

Zhao, Y., Dunker, W., Yu, Y.T., and Karjoolich, J. (2018). The Role of Noncoding RNA Pseudouridylation in Nuclear Gene Expression Events. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 8.

Zhao, Y., Sfeir, A.J., Zou, Y., Buseman, C.M., Chow, T.T., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2009). Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* 138, 463-475.

Zhong, F., Savage, S.A., Shkreli, M., Giri, N., Jessop, L., Myers, T., Chen, R., Alter, B.P., and Artandi, S.E. (2011). Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev* 25, 11-16.

Zhong, F.L., Batista, L.F., Freund, A., Pech, M.F., Venteicher, A.S., and Artandi, S.E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150, 481-494.

Zhou, J., Monson, E.K., Teng, S.C., Schulz, V.P., and Zakian, V.A. (2000). Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* 289, 771-774.

Zhu, X., Kumar, R., Mandal, M., Sharma, N., Sharma, H.W., Dhingra, U., Sokoloski, J.A., Hsiao, R., and Narayanan, R. (1996). Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6091-6095.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell* 15, 81-90.

Zimmermann, M., Kibe, T., Kabir, S., and de Lange, T. (2014). TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev* 28, 2477-2491.

# **Annexes**

**Annexe I – Methods – Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA**



# Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA



Hadrien Laprade<sup>1</sup>, Maxime Lalonde<sup>1</sup>, David Guérit, Pascal Chartrand\*

Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, Qc H3C 3J7, Canada

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 May 2016

Received in revised form 11 July 2016

Accepted 23 July 2016

Available online 26 July 2016

### Keywords:

Yeast

Telomerase

Telomeres

*TLC1* RNA

TERRA

MS2-GFP

## ABSTRACT

In most eukaryotes, the ribonucleoprotein complex telomerase is responsible for maintaining telomere length. In recent years, single-cell microscopy techniques such as fluorescent *in situ* hybridization and live-cell imaging have been developed to image the RNA subunit of the telomerase holoenzyme. These techniques are now becoming important tools for the study of telomerase biogenesis, its association with telomeres and its regulation. Here, we present detailed protocols for live-cell imaging of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA subunit, called *TLC1*, and also of the non-coding telomeric repeat-containing RNA TERRA. We describe the approach used for genomic integration of MS2 stem-loops in these transcripts, and provide information for optimal live-cell imaging of these non-coding RNAs.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Both fixed and live cell imaging are used to determine the expression, localization, interactions and dynamics of RNA molecules. Insights into the biogenesis of several ribonucleoprotein complexes, such as snRNPs, snoRNPs or scaRNPs came from imaging of their RNA moieties [1,2]. Mechanistic understanding of the telomerase biogenesis pathway greatly changed with the development of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to image telomerase RNA. In human cells, FISH revealed that telomerase RNA (hTR) accumulates in Cajal bodies in cancer cells [3,4]. Localization of hTR to Cajal bodies was shown to depend on a specific motif called the CAB box, which is present in the CR7 domain at the 3' end of this RNA [3]. The CAB box is recognized by TCAB1, which accumulates in Cajal bodies and is required for localization of hTR in Cajal bodies [5,6]. TCAB1 turned out to be an important component of the human telomerase holoenzyme, since mutations in TCAB1 or defective TCAB1 folding disrupt telomerase localization and biogenesis [7,8].

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the telomerase RNA (*TLC1*) acts as a scaffold for the assembly of the holoenzyme and possess the template for the reverse transcriptase activity. It is among the lowest abundant subunit of the complex, suggesting that it is a limiting component of the telomerase holoenzyme [9,10]. Most of the protein components of telomerase, such as

the yKu complex, Est1, Est2 and Sm proteins directly bind this RNA, during most of the cell cycle [11–13]. Therefore, tracking of its RNA moiety should reveal insights into telomerase localization, biogenesis and activity. Indeed, high sensitivity FISH-based imaging revealed that the *TLC1* RNA shuttles between the nucleus and the cytoplasm, and its nuclear export is essential for the assembly of a functional telomerase holoenzyme complex [14–17]. Key post-transcriptional modifications, such as the hypermethylation of the mono-methyl guanosine cap of *TLC1* RNA, occur in the nucleolus [15,18]. Furthermore, *TLC1* RNA imaging showed that the yKu complex plays a key role in the nuclear retention of this RNA [15,19]. Finally, evidence that yeast telomerase is a monomer *in vivo* also emerged from a single molecule FISH (smFISH) approach [20].

Telomeric repeat-containing RNA or TERRA is another non-coding RNA that recently emerged as a novel regulator of telomere homeostasis [21]. In budding yeast, TERRA molecules are expressed at low levels since they are rapidly degraded by the 5'–3' exonuclease Rat1 [22]. However, FISH revealed the stable accumulation of TERRA expressed from a single telomere in a small number of cells within a yeast population, suggesting cell-specific events leading to the stable accumulation of TERRA [23]. Current evidence shows that telomere shortening is responsible for TERRA expression and accumulation in a yeast cell [23].

In the following sections, we describe in detail how to use a genetically encoded RNA tagging system for labeling endogenous yeast telomerase (*TLC1*) RNA and telomeric repeat-containing RNA (TERRA) in order to image these transcripts using live-cell microscopy. We also discuss the conditions for optimal image acquisition of these non-coding RNAs.

\* Corresponding author.

E-mail address: [p.chartrand@umontreal.ca](mailto:p.chartrand@umontreal.ca) (P. Chartrand).

<sup>1</sup> Equal contribution.



## 2. Method for live cell imaging of telomerase and TERRA

FISH allows the study of endogenous RNA localization in yeast, but the information on the dynamics of single RNA molecules is lost as the cells are fixed with formaldehyde. To bypass the limitations of this technique, novel approaches for real time live-cell imaging of RNA have been developed. Several reagents are now used for the detection and imaging of RNA in living cells, such as molecular beacons, RNA-binding dyes or GFP-mimic aptamers [24]. However, genetically encoded fluorescent proteins fused to bacteriophage coat proteins constitute the most widely used approach to label a specific RNA *in vivo* [25,26]. Among these phage coat proteins, the MS2 and PP7 bipartite systems (engineered from the phage MS2 or PP7 coat-proteins, which bind a stem-loop in the phage single-stranded RNA genome) are the most commonly used. The 19 nucleotides MS2 stem-loop is specifically recognized by the MS2 coat-protein (MCP) and each stem-loop binds two MCPs. The MCP and MS2 stem-loop have been engineered for higher binding affinity. The MCP V291/dIFG variant shows a  $K_d$  around  $\sim 0.4$  nM with the WT MS2 stem-loop (compared to a  $K_d$  of  $\sim 3$  nM for the wild-type protein), while the interaction of MCP with the MS2 U-5C variant stem-loop has a  $k_{off}$  of  $0.0017 \text{ min}^{-1}$  (compare to a  $k_{off}$  of  $0.15 \text{ min}^{-1}$  for the wild-type stem-loop) [27–29]. Combining these modifications makes the MCP/MS2 interaction nearly irreversible. The MS2 coat protein can be fused to any fluorescent protein, and it binds specifically to RNA containing MS2 stem-loops to allow real-time imaging of this RNA by following the fluorescence signal of the MCP-GFP/RNA complex [25,30]. It is therefore possible to detect single RNA molecules by insertion of multiple MS2 stem-loops in an RNA, which greatly increases the signal-to-noise ratio. While free MCP-GFP participates in the fluorescent background during imaging, this background can be reduced by either targeting the free MCP-GFP to the nucleus using a nuclear localization signal (NLS) or by decreasing the expression level of MCP-GFP [25].

However, insertion of multiple MS2 stem-loops might perturb the stability and function of an RNA. While several studies have shown that MS2-tagged mRNAs are properly transcribed, exported, localized and translated [31,32], a recent study reported that the presence of MS2 stem-loops in the 3'UTR of specific mRNAs may interfere with the 5'–3' degradation machinery, leading to the accumulation of degradation intermediates [33]. The impact of multiple MS2 stem-loops on the function of a non-coding RNA is even more important to take into account since these stem-loops may locally disrupt the secondary structure of the RNA, reduce the binding of specific subunits or even interfere with the processing of the transcript. Therefore, several controls must be performed to assure that the inserted stem-loops do not interfere with the normal function of the non-coding RNA. Northern blot analysis can validate the processing and expression of the MS2-tagged RNA, and FISH can be used to confirm the proper localization of the MS2-tagged RNA in the cell [34].

## 3. Live-cell imaging of telomerase and TERRA RNA

### 3.1. Labeling endogenous *TLC1* with MS2 stem-loops

The first step is to integrate the MS2 stem-loops at the endogenous *TLC1* locus to allow the expression of *TLC1*-MS2 RNA in the strain of interest. The number of stem-loops inserted in the RNA is an important factor for the resulting fluorescent signal once coupled with MCP-GFP protein. Since *TLC1* is a low-abundance RNA in yeast [10], the MS2 system is well suited to study telomerase dynamics because it allows a fine-tuning of the signal by modifying the number of MS2 stem-loops, and *TLC1* can tolerate a high number of MS2 stem-loops [34]. Ten MS2 stem-loops allows

the binding of twenty MCP-GFP proteins, and this number is sufficient to have a good signal-to-noise ratio without affecting the processing and the function of *TLC1* RNA [34]. While this number may not be optimal in term of fluorescent signal, insertion of 24xPP7 stem-loops at the 3' end of *TLC1* reduces telomerase activity *in vivo* [20], suggesting that above a certain number, the presence of multiple stem-loops can disrupt telomerase activity. Insertion of the MS2 cassette is performed at the 3' end of the *TLC1* locus, at nucleotide 1140, just upstream of the Sm-binding site. While the *TLC1* RNA is transcribed as a precursor with a poly A tail, the mature and functional form of *TLC1* is bound by Sm proteins and the 3' poly A tail is cleaved [35,36]. The integration site was chosen upstream of the Sm-binding site in order to avoid the removal of the MS2 stem-loops during *TLC1* maturation, which could destabilize this RNA (Fig. 1).

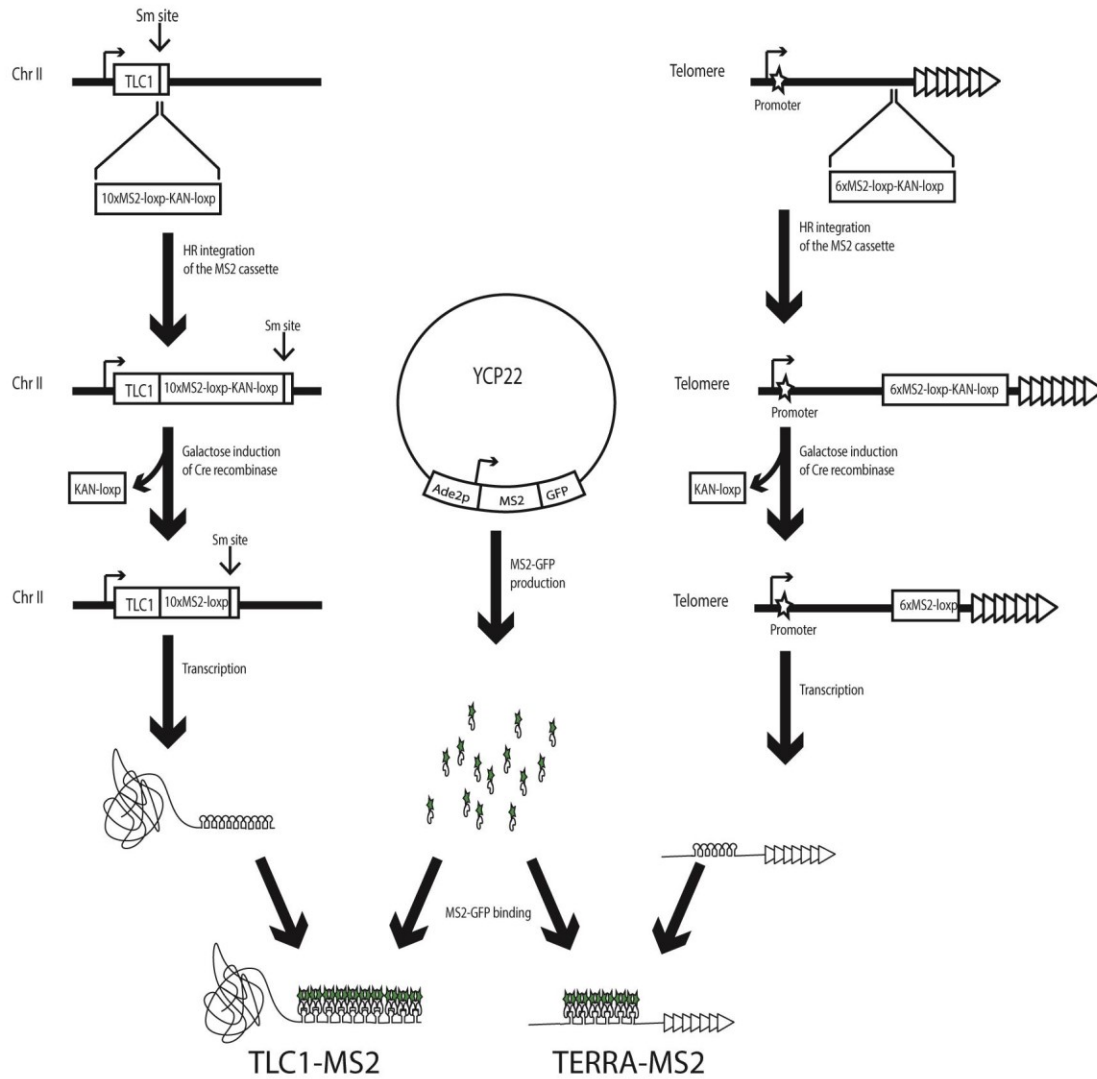
In yeast, genomic integration is performed by using homologous recombination for the insertion of an exogenous DNA cassette containing sequences homologous to a specific target site in the genome. In order to label *TLC1* with ten MS2 stem-loops at its 3' end, a DNA cassette is amplified by PCR using the 3'*TLC1*-10xMS2-pUG6-loxp-KAN plasmid as a template, with the 3'*TLC1*-prS and 3'*TLC1*-HR-prAS primers described in Table 1. The 3'*TLC1*-prS primer anneals on the *TLC1* sequence of the 3'*TLC1*-10xMS2-pUG6-loxp-KAN plasmid, providing a first homology region with the *TLC1* locus; the second homology region is provided by the primer 3'*TLC1*-HR-prAS. The integration cassette, which contains 10xMS2 repeats and the KAN selection marker flanked by two loxP sites, is transformed in a yeast strain by using a classic LiAc/SS-DNA/PEG transformation protocol [37]. The yeasts are then allowed to grow for 4 h for the expression of the KAN resistance and plated on a YEPD-G418 plate (G418 at 200 mg/L) for selection. Colonies are isolated and genomic DNA extracted to verify the integration of the cassette by PCR.

To allow the expression of a fully functional *TLC1* RNA, the selection marker should be removed. The pSH47 plasmid for expression of the Cre recombinase under the control of a Gal1 promoter is transformed in yeast [37]. The Cre recombinase recognizes the two loxP sites and removes the region located between them by recombination, leaving only one loxP at the integration site. The yeasts are grown in a synthetic complete (SC) medium lacking uracil and supplemented with 2% raffinose. Expression of the Cre recombinase is induced by growing the cells 3 h in a SC medium lacking uracil and supplemented with 3% galactose, allowing the excision of the KAN marker. Cells are plated on a YEPD plate and colonies are replicated on a YEPD-G418 plate to identify clones that have lost the KAN selection marker and express *TLC1*-10xMS2 RNA. The pSH47 plasmid is removed from the yeast by growth on a SC agar medium containing 5-fluoroorotic acid (5-FOA) at 1 g/L for 2 days. 5-FOA is transformed into a toxic by-product in cells expressing the *URA3* gene, which selects cells that have lost the pSH47 plasmid. Plasmid loss is further controlled by replicating the colonies on a SC medium without uracil.

### 3.2. Labeling endogenous TERRA with MS2 stem-loops

As for *TLC1*, imaging of endogenous TERRA RNA can be performed using the MS2 system. This RNA can be labelled with two or six MS2 stem-loops for live cell microscopy. Yeast telomeres are transcribed from their subtelomeric regions toward the telomeric tract into RNA which contains telomeric repeats and can largely vary in size [22]. Currently, only the TERRA transcription start site (TSS) on the telomere 1L has been identified at 346 nucleotides upstream of the telomeric repeats [38]. The precise TSS on other telomeres is still unknown, for this reason the MS2 stem-loops must be inserted as close as possible to the telomeric repeats in order to ensure that TERRA transcripts include the





**Fig. 1.** Illustration of the process to integrate MS2 stem-loops in *TLC1* and *TERRA* RNAs.

**Table 1**

Primer sequences for amplification of the MS2 cassettes.

Primer name	Sequence
3'TLC1-prS	<u>TTCCAAGCGGAAGGAACCGTG</u>
3'TLC1-HR-prAS	<u>GCATACCTCCGCCTATCCGCCTATCCCTCGTCATGAACAATCAATTAAGCGCTTATAAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
HRchr6prS-MS2-6s	<u>AACCAGTGAGGCCAATTTCCGTGTGATGTATCCGAACCTCAGTTACTATTGATGGAAATGAGGAGGTACCTAATTGCCTAG</u>
HRchr6prAS	<u>GGCGTACGCACAGTATGCTAAAGTATATAITACTTCACTCCATTGCGCCCATGACCCAGTGTAGTGGATCTGATATCACC</u>
HRchr6prS-MS2-6sB	<u>AACCAGTGAGGCCAATTTCCGTGTGATGTATCCGAACCTCAGTTACTATTGATGGAAATGAGGCCAGCTGAAGCTTCGTACG</u>
HRchr1LprS-MS2s	<u>GTAGAGGGATGGATGTTGGTTCGGAGTGGTATGTTGAATGGGACAGGGTAACGAGTGGAGGCAAGGTACCTAATTGCCTAG</u>
HRchr1LprS-MS2-6s	<u>GTAGAGGGATGGATGTTGGTTCGGAGTGGTATGTTGAATGGGACAGGGTAACGAGTGGAGGCAACAGCTGAAGCTTCGTACG</u>
HRchr1LprAS	<u>CTACCCTAACACAGCCCTAATCTAACCCCTGGCCAACCTGTCTCTCAACTTACCCTCCAITTACCCTAGTGGATCTGATATCACC</u>

stem-loops (Fig. 1). The number of MS2 stem-loops integrated near a telomere should be limited since integration of a large cassette near a telomere may disrupt the local heterochromatin and, consequently, regulation of *TERRA*. In our hands, between 2 and 6xMS2 stem-loops gives optimal detection by imaging, while the expression level remains close to the unlabeled *TERRA* [23]. Furthermore, since several telomeres share homologous regions near their telomeric repeats, labeling a single telomere requires a unique region for site-specific integration of the MS2 stem-loops by homologous recombination. It is to note that in the fission yeast

*Schizosaccharomyces pombe*, different pools of *TERRA* RNA have been identified, some of which are polyadenylated and largely devoid of telomeric repeats [39]. While these variants of *TERRA* have not yet been identified in *S. cerevisiae*, the MS2 labeling protocol described here would not be able to discriminate between these different pools.

Here we describe the constructions used to label *TERRA* expressed from telomeres 1L and 6R (Tel1L and Tel6R *TERRA*) with two or six MS2 stem-loops. For integration, a cassette is amplified by PCR from MS2-pUG6-loxP-kan plasmid, which contains either

two or six MS2 sequences, a *KAN* resistance gene between two loxP sites, and homologous sequences for integration 80 nucleotides upstream of telomeric repeats on telomeres 1L or 6R. Depending on how many MS2 stem-loops the integration cassette contains, the following primer pairs will anneal the 6xMS2-pUG6-loxP-kan plasmid for PCR amplification: HRchr1LprS-MS2s and HRchr1LprAS for 2xMS2 integration at telomere 1L; HRchr1LprS-MS2-6s and HRchr1LprAS for 6xMS2 integration at telomere 1L; HRchr6prS-MS2-6s and HRchr6RprAS for 2xMS2 at telomere 6R; HRchr6prS-MS2-6sB and HRchr6RprAS for 6xMS2 at telomere 6R. Primer sequences with subtelomeric sequence homology regions underlined are described in Table 1.

Integration cassettes are transformed in yeast with a classic LiAc/ssDNA/PEG protocol [37]. Then the yeast are grown for 4 h in liquid YEPD medium for *KAN* expression, and then plated for 2 days on a YEPD-agar medium with 200 mg/L of G418 for selection. After colony isolation, genomic DNA is extracted and integration is verified by PCR. To allow the expression of TERRA RNA without *KAN* sequence, the pSH47 plasmid is transformed and the yeast are grown 3 h in liquid YEP medium supplemented with 3% galactose for CRE recombinase induction. 50–100 cells are plated on YEPD agar medium for 2 days and replicated on G418 medium to discriminate colonies that have lost the *KAN* marker. Then pSH47 is removed by plating the yeast on 5-FOA medium (see Section 3.1).

### 3.3. Validation of *TLC1* RNA or *TERRA* localization by FISH

As we modify the sequence, and by doing so, potentially the structure of our RNA of interest, it is important to validate that the integration of MS2 stem-loops does not affect the stability and/or function of the RNA. For *TLC1* RNA, labeling with 10xMS2 stem-loops has already been verified to not affect *TLC1* RNA abundance, telomerase activity *in vitro* or telomere length regulation by telomerase *in vivo* (see [34] for details). For *TERRA* labeling, RNA expression was verified using qRT-PCR to assure the MS2 system does not affect *TERRA* expression. While the insertion of 2xMS2 in the subtelomeric region did not affect Tel1L and Tel6R *TERRA* expression, insertion of 6xMS2 led to a two-fold increase in Tel6R-*TERRA* expression. Telomere length was also monitored to assure proper telomere length maintenance *in vivo*. Neither of the insertions had any observable effect on telomere length (see [23] for details).

A critical validation step is the verification that the observed signal obtained from the MS2 system corresponds indeed to the RNA of interest (either *TLC1* or *TERRA* RNA). Colocalization of every GFP signal to a *TLC1* or *TERRA* focus must be obtained to validate the system. To do so, RNA FISH can be performed on either *TLC1* or *TERRA* RNA and colocalization of the FISH signal with the GFP signal can be verified. The RNA FISH protocol is performed as described in Gallardo and Chartrand [40], with a few modifications. First, the probes used are described in Table 2. For *TLC1* RNA FISH, a mix of five probes must be used to be able to detect single molecules. For *TERRA* FISH, the probes must target the subtelomeric part of the RNA to allow visualisation of telomere specific *TERRA*. Since most of the subtelomeric sequence is shared between several telomeres, this limits the number of telomere-specific sequences that can be targeted. We were able to design one Tel1L-*TERRA* specific probe and one Tel6R-*TERRA* specific probe. The use of only one probe per RNA allows detection of *TERRA* clusters but not the detection of single *TERRA* molecules. Second, to be able to preserve the fluorescence of GFP after cell fixation and FISH, it is important to let the yeast grow at room temperature to help the proper folding of the GFP and to resuspend the yeast culture in PBS before fixation with paraformaldehyde. Also, for specific detection of Tel1L-*TERRA*, hybridization is performed in 50% formamide instead

**Table 2**  
Sequences of the modified probes used for *TLC1* and *TERRA* RNA FISH.

Probe name	Sequence
TLC1-1	t*gcgcacacacaagcat*ctacactgacaccagcat*actcgaattctt*tg
TLC1-2	ct*aataacaatt*agctgtaacatt*tgtgtgtgggt*gtggtgatgtt*aggc
TLC1-3	t*ccagagttaacgat*aagatagacat*aaagtgcagcgt*tagcacct*
TLC1-4	ttacgt*tcttgatctt*gtgtcattgtt*cagtactgat*cgcccgaacct*
TLC1-5	tgcat*cgaaggcat*taggagaagt*agctgtaat*acaacccaagt*tca
Tel1L- <i>TERRA</i>	ccat*ccctctact*actaccact*caccaccgt*taccctcaat*taccatc
Tel6R- <i>TERRA</i>	acgcacacgt*atgctaagt*atatattact*tactcatt*gcgccccat*gacc

\* Amino allyl modified-T.

of 40%, and the number of washing steps after hybridization is doubled.

### 3.4. Expression of MCP-GFP fusion protein

Controlling the expression level of the MCP-GFP protein is crucial to obtain an optimal fluorescence signal-to-noise ratio, which is needed in order to clearly detect diffraction-limited telomerase foci in the nucleus of yeast cells. A low nuclear concentration of the MCP-GFP protein is important for two main reasons. First, since *TLC1* is not an abundant RNA [10], a high level of free nuclear MCP-GFP protein would result in background noise too strong to be able to detect single foci. Second, GFP proteins tend to aggregate when their concentration is too high, leading to inappropriate background within cells. To produce the appropriate level of GFP, cells are transformed with the YCP22-ADE2-MS2-GFP plasmid. This plasmid expresses MCP-GFP under the control of an *ADE2* promoter, which provides a minimal and homogeneous expression of MCP-GFP, allowing a good signal-to-noise ratio for detection of single molecules of *TLC1* RNA. Since active telomerase molecules are located in the nucleus, it is crucial to avoid accumulation of free MCP-GFP in the nucleus. In order to reduce the background in this compartment, the MCP-GFP protein does not contain a nuclear localization sequence, allowing the free diffusion of the fluorescent protein between the cytoplasm and the nucleus.

### 3.5. Cell growth and stabilization on plate

To be imaged over time, yeast cells have to be attached on a support to ensure that the cells stay in focus during acquisition. As yeasts do not naturally stick to glass or plastic, they need to be visualized on a glass bottom plate coated with concanavalin A. This lectin binds glycoproteins of the yeast cell wall and maintains yeast cells on glass or plastic surfaces. Cells are grown overnight in the appropriate liquid SC medium (YEP medium should not be used for fluorescence microscopy as it induces a high auto-fluorescence background in yeast). If the strain used has the *ade2* selection marker, SC media can be supplemented with 20 µg/mL of adenine in order to avoid the accumulation of an auto-fluorescent adenine metabolic precursor. Cells are then diluted to OD<sub>600</sub> 0.05–0.1 in the same medium and grown for at least two cell-cycle to assure that they are in log phase (OD<sub>600</sub> 0.3–0.4). Avoid allowing the culture to reach OD<sub>600</sub> over 0.6 to keep the auto-fluorescence at the lowest level possible. As yeast cells tend to stick to each other, they are vortexed for 10 s to disrupt clusters, and 100 µL of yeast culture is placed in a 96 well glass bottom coated plate. Cells are allowed to sediment and adhere to the coated glass for 10 min at 30 °C. Wells are washed gently two times with fresh pre-warmed culture medium to remove unattached cells, and then filled with 300 µL of fresh pre-warmed medium. The plate is placed in temperature-controlled chamber at 30 °C. Wait at least 30 min before imaging to allow the cells to recover from these manipulations. Also, it allows the plastic of



the plate to dilate and stabilize, assuring a good constant focus throughout the experiment.

Coating of 96 well glass bottom plate (Matriplate MGB096-1-2-LG-L)

- Prepare a sterile 2 mg/mL type IV concanavalin A solution in H<sub>2</sub>O. The solution can be stored at 4 °C for several weeks.
- Add 100 µL of concanavalin A solution per well and incubate for 10 min at room temperature.
- Remove the concanavalin A solution from the well. The solution can be re-used up to three times if kept sterile.
- Wash the wells two times with 200 µL of sterile water.
- Let the wells dry before use.

### 3.6. Microscopy setup

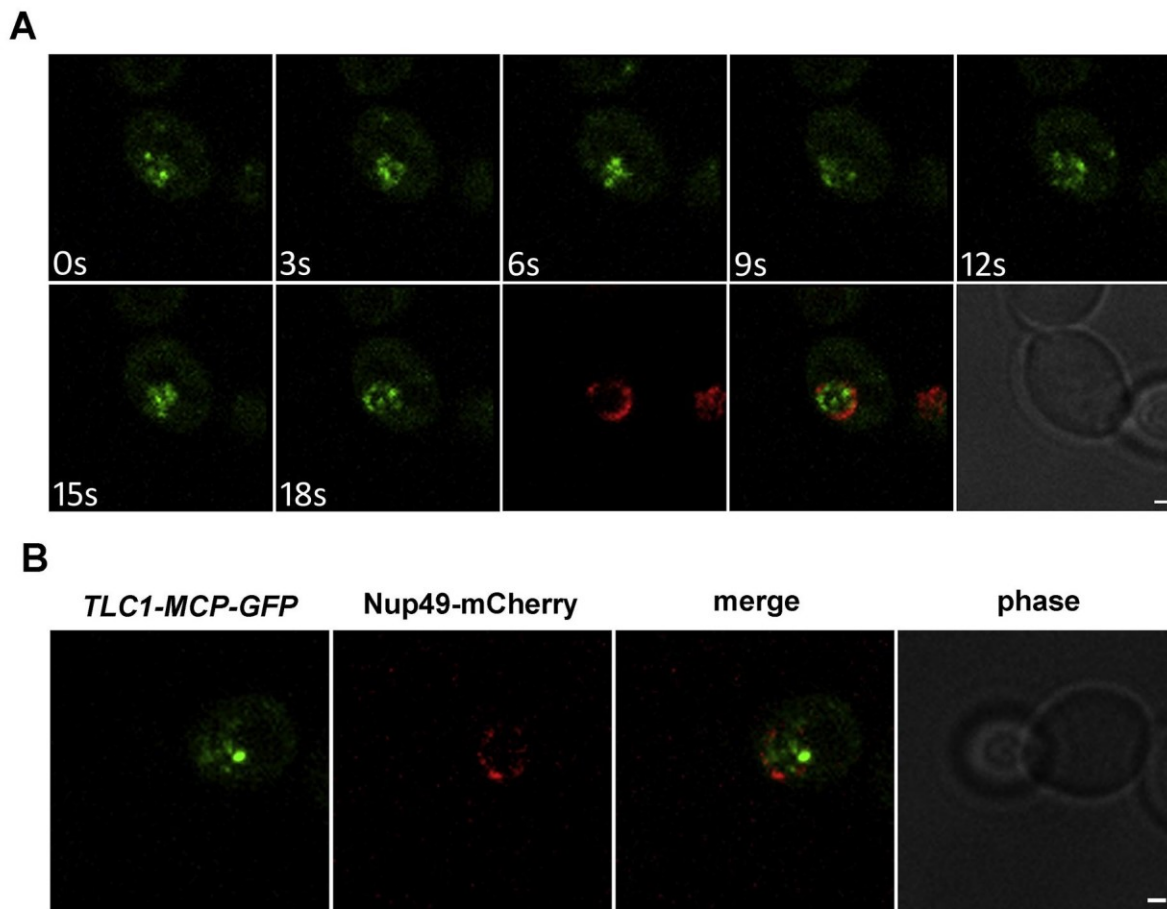
In order to image single molecules of telomerase in real time, some microscope settings are important. The small number of photons emitted by the few telomerase molecules present in yeast produces a low signal-to-noise ratio. To be able to detect *TLC1-MCP-GFP* foci, it is highly recommended to use a spinning disk confocal microscope coupled to an EMCCD camera for real-time imaging. The spinning disk confocal microscope reduces the capture of out-of-focus photons, lowering the background noise. Furthermore, EMCCD cameras have been designed for the detection of objects with low light emission, as they possess excellent quantum efficiency and can detect single photons. Furthermore,

this camera is well suited for the capture of telomerase dynamics, as telomerase foci are fast moving particles in the nucleus and EMCCD camera can be used for high-speed acquisition (i.e. streaming). The ability to detect low signal-to-noise ratio can be increased by time-lapse acquisition instead, at the cost of time resolution. In order to reduce the phototoxicity and photobleaching, the lowest laser exposure per acquisition is used. For long time-lapse acquisition, it is important to equip the microscope with a focus system that adjusts the Z axis of acquisition to compensate for the drift in the Z axis displayed by the microscope stage, especially if a heated chamber is used. For instance, the Zeiss Definite Focus system uses infrared light to realign the Z axis, reducing stage drift.

Our images were acquired using a Zeiss Observer Z1 inverted microscope equipped with a Zeiss 100 x/1.46 N/A oil Alpha Plan Apochromat objective, and a Yokogawa CSU-X1 spinning disk head with single band pass emission filters for GFP (525 nm/50 nm) and for mCherry (617 nm/73 nm). We used 488 nm (100 mW) and 560 nm (40 mW) lasers for GFP and mCherry excitation. An Evolve 512 EMCCD camera was used for image acquisition.

### 3.7. Live cell imaging of *TLC1* RNA

*TLC1* RNA presents two different dynamics in budding yeast. First, it can be observed as fast moving single molecules in the nucleus in the majority of cells and throughout the cell cycle (Fig. 2A). Second, in some S phase cells, which correspond to the phase when telomeres are elongated, a slow moving cluster of



**Fig. 2.** Detection of *TLC1* RNA in living yeast using the MS2 system. A) Sequential acquisitions of *TLC1-10xMS2* foci in G1-phase yeast at 3 s intervals. GFP was imaged a maximal laser power with an acquisition time of 50 ms (in green). An integrated Nup49-mCherry fusion protein was used to label the nuclear envelope (in red). Scale bar = 1 µm B) Imaging of *TLC1-10xMS2* accumulated in a T-Rec in a living yeast in S-phase. GFP acquisition was made with 50% laser power with an acquisition time of 50 ms (in green). An integrated Nup49-mCherry fusion protein was used to label the nuclear envelope (in red). Scale bar: 1 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



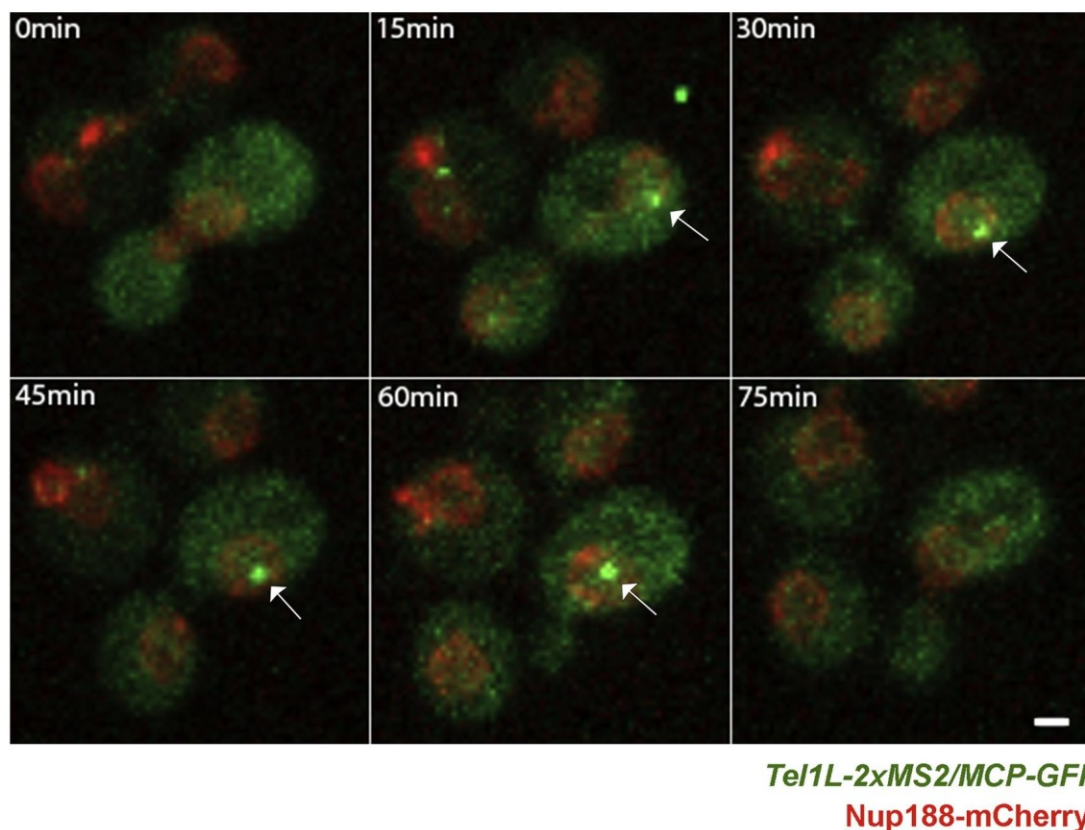
several *TLC1* RNA molecules, called a T-Rec, can be observed [34]. In order to capture the fast dynamics of telomerase single molecules, a spinning disk confocal microscope is required for continuous imaging. Since the rate of continuous image acquisition (i.e. streaming) is limited by the camera, an EMCCD camera with a rate of acquisition lower than one image per 50 ms is well suited. To increase image rate acquisition, a smaller section of the camera chip can be used. For example, the Evolve 512 has a frame rate of 33.7 images per second for its  $512 \times 512$  pixels chip, and a frame rate of 124 images per second if only a section of  $128 \times 128$  pixels is used. We recommend not to acquire images with an exposure time over 50 ms, as *TLC1-MCP-GFP* foci diffuse rapidly, and a higher exposure time can result in blurred foci instead of punctate *TLC1-MCP-GFP* foci. The second setting to optimize when imaging *TLC1-MCP-GFP* is the laser power. Continuous imaging for a few seconds can be performed with 50–100% laser power to increase fluorescence intensity as much as possible. For longer imaging or time-lapse experiments, 10–20% laser power should be used to reduce photobleaching and phototoxicity. Photobleaching is easy to observe, as the fluorescence signal will drop during the experiment. Laser power can then be adjusted in subsequent experiment in order to reduce it. On the other hand, phototoxicity is observed as a cell cycle arrest and can be detected using time-lapse experiments.

Unlike single *TLC1-MCP-GFP* foci, T-Recs present slow dynamics in the nucleus, as they are composed of several telomerase molecules, which make these clusters bigger and brighter than telomerase single molecules (Fig. 2B). Imaging of T-Recs can be performed in S-phase cells, when telomerase is active, with a spinning disk confocal microscope or a standard epifluorescence

microscope. The exposure time can be longer, as T-Recs move slowly (227 nm/s compared to 500 nm/s for *TLC1-MCP-GFP* foci [34]). The laser power should be adjusted depending on the duration of the experiment keeping in mind that lower laser power is always better for long experiments. When T-Recs are imaged, Z-stacks should be acquired in order to not miss any clusters. As T-Recs fluorescence can be seen across  $1 \mu\text{m}$ , taking images between  $0.24 \mu\text{m}$  to  $0.5 \mu\text{m}$  focal plane guarantees to cross every T-Recs in the image field. Since the volume of *S. cerevisiae* is around  $2.5\text{--}3 \mu\text{m}^3$  [41], then the number of Z-stacks should cover the entire volume of the nucleus.

### 3.8. Live cell imaging of TERRA

TERRA RNA in budding yeast is difficult to image at the single molecule level since it is actively degraded and the number of MS2 stem-loops that can be integrated near telomeric repeats without affecting TERRA regulation is limited [22,23]. These limitations only allow the detection of TERRA RNA clusters, using either live-cell imaging or FISH. Both the 2xMS2-TERRA and the 6xMS2-TERRA construction can be used for live-cell imaging, the latter showing slightly larger and brighter foci. For long time-lapse acquisition, it is necessary to use the lowest laser setting possible to avoid photobleaching and phototoxicity. With the microscope setting described above (Section 3.6), TERRA-MCP-GFP clusters can be detected with the 488 nm laser at 12% and 100 ms exposure time. To get a better signal-to-noise ratio, for shorter time-lapse acquisition or to simply take images for a single time point, it is possible to raise the laser power as needed. It is recommended to acquire Z-stacks to make sure to acquire the complete



**Fig. 3.** Detection of TERRA RNA in living yeast using the MCP-GFP system. Imaging of Tel1L-2xMS2/MCP-GFP expression at 15 min intervals in a single cell using a microfluidic chamber. Arrow points to the TERRA-MS2/MCP-GFP focus that appears in the nucleus of the cell at  $T = 15$  min and disappears at  $T = 75$  min. An integrated Nup188-mCherry was used to label the nuclear envelope (in red). Images correspond to maximal projection of a Z stack. Scale bar:  $1 \mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



volume of the nucleus. We usually acquire 7–8 images in the Z axis using 0.24  $\mu\text{m}$  steps. These settings allow the detection of TERRA clusters as a single focus of around 1  $\mu\text{m}^2$  in 10% of the cells (Fig. 3). While doing multi-color acquisition for colocalization studies, it is suggested to acquire all wavelengths at each Z step and to perform the acquisition from the longest wavelength to the shortest.

As TERRA is difficult to image at the single molecule level, the use of a spinning disk confocal microscope is not absolutely needed. A simple epifluorescence microscope is sufficient to be able to detect TERRA clusters, but using a highly sensitive EMCCD camera is still strongly suggested. We routinely image yeast directly between a microscope slide and a coverslip for a short amount of time. We use a Nikon E8000 upright microscope equipped with an objective 100X/1.46 NA and a EMCCD camera Evolve 512. For imaging *TERRA-MCP-GFP*, a standard FITC fluorescence filter can be used with a 100–200 ms exposure time and a camera EM gain of 200. For long time-lapse acquisition, it is better to use an inverted microscope setting and a glass bottom plate coated with concanavalin A, as described in Section 3.5.

#### 4. Concluding remarks

The ability to image endogenous telomerase RNA or TERRA in living yeast cells gives the possibility to study the interaction between these non-coding RNAs and telomeres. Combined with yeast molecular genetics tools, this will allow the detailed exploration of the regulation and activity of telomerase in real time *in vivo*. However, since particle tracking is currently limited to 2D, novel imaging technology that allows tracking in 3D at single molecule resolution will be needed in order to fully use the capacity of this assay.

#### Acknowledgements

This work is funded by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CHIR) MOP-89768 to P.C. H.L. is supported by a CDMC/CREATE fellowship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). M.L. was supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT). P.C. holds a Research Chair from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

#### References

- [1] U. Fischer, C. Englbrecht, A. Chari, Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins, *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* 2 (5) (2011) 718–731.
- [2] T. Kiss, E. Fayet, B.E. Jady, P. Richard, M. Weber, Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71 (2006) 407–417.
- [3] B.E. Jady, E. Bertrand, T. Kiss, Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal, *J. Cell Biol.* 164 (5) (2004) 647–652.
- [4] Y. Zhu, R.L. Tomlinson, A.A. Lukowiak, R.M. Terns, M.P. Terns, Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells, *Mol. Biol. Cell* 15 (1) (2004) 81–90.
- [5] A.S. Venteicher, E.B. Abreu, Z. Meng, K.E. McCann, R.M. Terns, T.D. Veenstra, M. P. Terns, S.E. Artandi, A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis, *Science* 323 (5914) (2009) 644–648.
- [6] K.T. Tycowski, M.-D. Shu, A. Kukoyi, J.A. Steitz, A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles, *Mol. Cell* 34 (1) (2009) 47–57.
- [7] F. Zhong, S.A. Savage, M. Shkreli, N. Giri, L. Jessop, T. Myers, R. Chen, B.P. Alter, S.E. Artandi, Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita, *Genes Dev.* 25 (1) (2011) 11–16.
- [8] A. Freund, Franklin L. Zhong, Andrew S. Venteicher, Z. Meng, Timothy D. Veenstra, J. Frydman, Steven E. Artandi, Proteostatic control of telomerase function through Tric-mediated folding of TCAB1, *Cell* 159 (6) (2014) 1389–1403.
- [9] C.T. Tuzon, Y. Wu, A. Chan, V.A. Zakian, The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 *in vitro*, *PLoS Genet.* 7 (5) (2011) e1002060.
- [10] A.D. Mozdy, T.R. Cech, Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency, *RNA* 12 (9) (2006) 1721–1737.
- [11] T.M. Tucey, V. Lundblad, Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex, *Genes Dev.* 28 (19) (2014) 2077–2089.
- [12] A.G. Seto, A.J. Zaug, S.G. Sobel, S.L. Wolin, T.R. Cech, *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle, *Nature* 401 (6749) (1999) 177–180.
- [13] A.E. Stellwagen, Z.W. Haimberger, J.R. Veatch, D.E. Gottschling, Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends, *Genes Dev.* 17 (19) (2003) 2384–2395.
- [14] F. Ferrezuelo, B. Steiner, M. Aldea, B. Futcher, Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin Mtr10, *Mol. Cell. Biol.* 22 (17) (2002) 6046–6055.
- [15] F. Gallardo, C. Olivier, A.T. Dandjinou, R.J. Wellinger, P. Chartrand, TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres, *EMBO J.* 27 (2008) 748–757.
- [16] H. Wu, D. Becker, H. Krebber, Telomerase RNA TLC1 shuttling to the cytoplasm requires mRNA export factors and is important for telomere maintenance, *Cell Rep.* 8 (6) (2014) 1630–1638.
- [17] T.M. Teixeira, K. Förstemann, S.M. Gasser, J. Lingner, Intracellular trafficking of yeast telomerase components, *EMBO Rep.* 3 (7) (2002) 652–659.
- [18] J. Franke, J. Gehlen, A.E. Ehrenhofer-Murray, Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1, *J. Cell Sci.* 121 (21) (2008) 3553–3560.
- [19] J.S. Pflingsten, K.J. Goodrich, C. Taabazuig, F. Ouenzar, P. Chartrand, T.R. Cech, Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model, *Cell* 148 (2012) 922–932.
- [20] E. Bajon, N. Laterreur, Raymond J. Wellinger, A single templating RNA in yeast telomerase, *Cell Rep.* 12 (3) (2015) 441–448.
- [21] E. Cusanelli, P. Chartrand, Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity, *Front. Genet.* 6 (2015).
- [22] B. Luke, A. Panza, S. Redon, N. Iglesias, Z. Li, J. Lingner, The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell* 32 (4) (2008) 465–477.
- [23] E. Cusanelli, C.A.P. Romero, P. Chartrand, Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres, *Mol. Cell* 51 (6) (2013) 780–791.
- [24] M.O. Urbanek, P. Galka-Marciniak, M. Olejniczak, W.J. Krzyzosiak, RNA imaging in living cells – methods and applications, *RNA Biol.* 11 (8) (2014) 1083–1095.
- [25] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S.M. Shenoy, R.H. Singer, R.M. Long, Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast, *Mol. Cell* 2 (1998) 437–445.
- [26] S. Hocine, P. Raymond, D. Zenklusen, J.A. Chao, R.H. Singer, Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast, *Nat. Methods* 10 (2) (2013) 119–121.
- [27] F. Lim, D.S. Peabody, Mutations that increase the affinity of a translational repressor for RNA, *Nucleic Acids Res.* 22 (18) (1994) 3748–3752.
- [28] S. Boireau, P. Maiuri, E. Basyuk, M. de la Mata, A. Knezevich, B. Pradet-Balade, V. Backer, A. Kornbliht, A. Marcello, E. Bertrand, The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells, *J. Cell Biol.* 179 (2) (2007) 291–304.
- [29] P.T. Lowary, O.C. Uhlenbeck, An RNA mutation that increases the affinity of an RNA-protein interaction, *Nucleic Acids Res.* 15 (24) (1987) 10483–10493.
- [30] D.L. Beach, E.D. Salmon, K. Bloom, Localization and anchoring of mRNA in budding yeast, *Curr. Biol.* 9 (11) (1999) 569–578.
- [31] G. Haimovich, D. Zabezhinsky, B. Haas, B. Slobodin, P. Purushothaman, L. Fan, J. Z. Levin, C. Nusbaum, J.E. Gerst, Use of the MS2 aptamer and coat protein for RNA localization in yeast: A response to “MS2 coat proteins bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by MS2-MCP system”, *RNA* 22 (5) (2016) 660–666.
- [32] H.Y. Park, H. Lim, Y.J. Yoon, A. Follenzi, C. Nwokofor, M. Lopez-Jones, X. Meng, R.H. Singer, Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse, *Science (New York, NY)* 343 (6169) (2014) 422–424.
- [33] J.F. Garcia, R. Parker, Ubiquitous accumulation of 3' mRNA decay fragments in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs with chromosomally integrated MS2 arrays, *RNA* 22 (5) (2016) 657–659.
- [34] F. Gallardo, N. Laterreur, E. Cusanelli, F. Ouenzar, E. Querido, R.J. Wellinger, P. Chartrand, Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres, *Mol. Cell* 44 (5) (2011) 819–827.
- [35] A.G. Seto, A.J. Zaug, S.G. Sobel, S.L. Wolin, T.R. Cech, *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle, *Nature* 401 (6749) (1999) 177–180.
- [36] J.-F. Noël, S. Larose, S. Abou Elela, R.J. Wellinger, Budding yeast telomerase RNA transcription termination is dictated by the Nrd1/Nab3 non-coding RNA termination pathway, *Nucleic Acids Res.* 40 (12) (2012) 5625–5636.
- [37] U. Guldener, S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, J. Hegemann, A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* 24 (13) (1996) 2519–2524.

- [38] V. Pfeiffer, J. Lingner, TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends, *PLoS Genet.* 8 (6) (2012) e1002747.
- [39] M. Moravec, H. Wischniewski, A. Bah, Y. Hu, N. Liu, L. Lafranchi, M.C. King, C.M. Azzalin, TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*, *EMBO Rep.* 17 (7) (2016) 999–1012.
- [40] F. Gallardo, P. Chartrand, Visualizing mRNAs in fixed and living yeast cells, in: E.J. Gerst (Ed.), *RNA Detection and Visualization: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, pp. 203–219.
- [41] P. Jorgensen, N.P. Edgington, B.L. Schneider, I. Rupeš, M. Tyers, B. Futcher, The size of the nucleus increases as yeast cells grow, *Mol. Biol. Cell* 18 (9) (2007) 3523–3532.