

Université de Montréal

**Trafic intranucléaire de l'ARN de la télomérase et la
réponse aux dommages à l'ADN chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

par

Faissal Ouenzar

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de de Philosophiae Doctor (PhD)
en biochimie et médecine moléculaire

Août 2015

© Faissal Ouenzar, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Trafic intranucléaire de l'ARN de la télomérase et la réponse aux dommages à
l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Présenté par :

Faissal Ouenzar

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Archambault, président-rapporteur

Pascal Chartrand, directeur de recherche

Martine Raymond, membre du jury

Chantal Autexier, examinateur externe

Elliot Drobetsky, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les cassures double-brins d'ADN (CDBs) constituent une menace pour la viabilité cellulaire et l'intégrité du génome puisque l'absence de la réparation d'une CDB pourrait conduire à la mort cellulaire. En plus de la réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) en phase G1 et de la recombinaison homologe (RH) en phase S et G2, les CDBs peuvent être réparées par l'ajout de télomères par l'action de la télomérase; un phénomène qui s'appelle l'ajout de télomères *de novo*. Ce phénomène pourrait mettre en danger la stabilité génomique parce qu'il engendre, dans la plupart des cas, une perte du bras chromosomique du fragment non-centromérique. En conséquence, ceci engendre soit une perte de l'hétérozygotie (LOH) dans les cellules diploïdes ou la mort cellulaire dans les cellules haploïdes. Dans le but d'empêcher la formation de télomères *de novo*, la cellule possède des mécanismes et des voies qui préviennent l'action inappropriée de la télomérase à des CDBs. Une des principales questions dans le domaine est de comprendre comment la cellule inhibe l'ajout de télomères *de novo* par la télomérase en favorisant la réparation des CDBs par les autres voies (NHEJ et la RH).

Dans ce projet, nous utilisons la technique *d'hybridation in situ en fluorescence* (FISH) sur le facteur limitant de la télomérase, l'ARN *TLC1* de la levure *S. cerevisiae*. Nous avons pu montrer que l'ARN *TLC1* fait un trafic intranucléaire durant le cycle cellulaire des cellules sauvages. En phase G1/S, l'ARN *TLC1* adopte une localisation nucléoplasmique avec les télomères, alors qu'il s'accumule au nucléole en phase G2/M. Nous avons fait l'hypothèse que l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole en G2/M pourrait réduire la compétition entre la RH, qui est exclusivement nucléoplasmique, et la télomérase pour la réparation des CDBs. Pour tester cette hypothèse, nous avons employé la bléomycine (blm), un composé chimique générant des CDBs, pour traiter des cellules sauvages ou déficientes de la RH par la délétion du gène *RAD52* (*rad52Δ*). Nous avons observé que l'ARN *TLC1* conserve une localisation nucléolaire dans les cellules sauvages traitées par la blm en phase G2/M, alors que dans les

cellules *rad52Δ* exposées à la blm, l'ARN *TLC1* se localise maintenant au nucléoplasme et s'associe partiellement aux sites de cassures. De plus, nous avons trouvé que l'accumulation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* dans les cellules *rad52Δ* traitées à la blm, dépend de la voie de dommage à l'ADN (MRX, ATM/Tel1 et ATR/Mec1) et de la sumoylation par la SUMO E3 ligase, Siz1. Plus particulièrement, l'association de la télomérase à des CDBs dépend de son interaction avec Cdc13, une protéine qui recrute la télomérase aux télomères. D'une manière surprenante, nous avons observé une accumulation rapide de Cdc13 à des CDBs en absence de Rad52, bien que nos résultats suggèrent que Rad52 empêche l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme par l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 aux sites de cassures. L'ensemble de nos résultats ont mis en évidence que la télomérase est normalement exclue des sites de la réparation d'ADN. Cependant, en absence d'une voie fonctionnelle de la RH, la télomérase se localise du nucléole au nucléoplasme et s'accumule partiellement à des CDBs d'une manière dépendante de Cdc13 et Siz1.

La biogénèse de la télomérase débute avec la transcription de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme. Cet ARN subit ensuite plusieurs étapes de maturation dans le nucléoplasme, puis le nucléole, avant d'être exporté au cytoplasme pour s'associer avec les protéines du complexe télomérase (Est1, Est2 et Est3) et le complexe yKu70/80. De nombreux facteurs qui sont impliqués dans l'export nucléaire de l'ARN *TLC1* ont été identifiés. Cependant, le mécanisme par lequel l'ARN *TLC1* est transporté dans le noyau avant son association avec ces facteurs reste une question sans réponse. La deuxième partie de mon projet fut de caractériser le rôle que joue la protéine nucléolaire Nsr1, un homologue de la nucléoline humaine, dans la maintenance des télomères. Cette protéine a été identifiée dans un criblage de gènes qui affectent la taille des télomères, montrant que sa délétion engendre un phénotype d'élongation des télomères. En plus à la maintenance des télomères, Nsr1 est impliqué dans le trafic des petits ARN nucléolaire (snoRNA) dans le nucléole. Afin de caractériser le rôle de Nsr1 dans la maintenance de télomères, nous avons utilisé les techniques de *FISH* et de co-immunoprécipitation chez la levure *S. cerevisiae*. Nos résultats montrent que la protéine Nsr1 interagit avec l'ARN *TLC1 in vivo* et qu'elle est impliquée dans son trafic au nucléole. Nous avons observé que Nsr1 agit après la maturation de l'ARN *TLC1* au nucléole, mais avant son

association avec les facteurs d'export nucléaire au nucléoplasme. D'une manière intéressante, nous avons pu montrer que la protéine Nsr1 agit directement dans la voie de la biogénèse de la télomérase. Ces résultats suggèrent que la biogénèse de la télomérase est un processus complexe et elle requiert l'intervention de plusieurs facteurs de transport nucléaire et nucléocytoplasmique.

Mots-clés : ARN *TLC1*, télomérase, cassure double-brins, ajout de télomères de *nov*, trafic intranucléaire, Rad52, Cdc13, Siz1, Nsr1, biogénèse de la télomérase

Abstract

DNA double-strand breaks (DSB) constitute a threat to genome integrity and cell survival if they are not repaired. In addition to canonical DNA repair systems such as non-homologous end joining (NHEJ) in G1 and homologous recombination (HR) in S and G2 phases, DSBs can also be repaired by addition of new telomeres by telomerase. This phenomenon is referred to as telomere healing or *de novo* telomere addition. This process threatens genome stability since it results in chromosome arm loss, which could be lethal in haploid cells and lead to loss of heterozygosity (LOH) in diploid cells. Therefore, cells possess mechanisms that prevent the untimely action of telomerase on DSBs. One of the questions driving this field is to understand how telomere addition by telomerase is inhibited and DSBs repair can be efficiently performed by canonical DSB repair (NHEJ and HR).

In this project, we used *fluorescent in situ hybridization (FISH)* to detect the endogenous *TLC1* RNA, which is the limiting component of telomerase of the budding yeast. Using this technique, we found that *TLC1* RNA traffics inside the nucleus during the cell cycle of wild-type cells. In G1 and S phases, *TLC1* RNA adopts a nucleoplasmic localization, which is related to its function in telomere elongation, while it accumulates in the nucleolus in G2/M. We hypothesize that the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in G2/M may reduce the possibility that telomerase interferes with HR to repair DNA DSB, since HR is excluded from the nucleolus and occurs only in the nucleoplasm. To test this hypothesis, we treated wild-type and *rad52Δ* (HR deficient cells) with bleomycin, a radiomimetic agent that generates preferentially DSBs. Our results show that after induction of DSB with bleomycin, *TLC1* RNA remains nucleolar in wild-type cells in G2/M, but accumulates in the nucleoplasm and colocalizes partially with DSBs sites in *rad52Δ* cells, suggesting that *RAD52* inhibits the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in the presence of DSBs. Nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DSB induction requires the DNA damage pathway (MRX, ATM/Tel1 and ATR/Mec1), and the SUMO ligase E3 Siz1. Interestingly, association of *TLC1*

RNA with DSBs depends on the single-strand telomeric binding protein Cdc13, which rapidly accumulates at sites of DNA damage, while Rad52 suppresses this process by inhibiting Cdc13 accumulation at DSBs. These results suggest that telomerase is normally excluded from sites of DNA repair. In the absence of functional homologous recombination, telomerase leaves the nucleolus and accumulates partially at DSB in the nucleoplasm in a Cdc13- and Siz1-dependent manner.

Telomerase biogenesis starts with transcription of the *TLC1* RNA in the nucleoplasm. This RNA undergoes several steps of maturation in the nucleus and nucleolus before its export to cytoplasm for association with the other telomerase components (Est1, Est2 and Est3) and yKu70/80 complex. Many factors involved in the nuclear export of the *TLC1* RNA have been identified. However, how *TLC1* RNA is transported inside the nucleus before its association with these factors is unclear.

In a second project, we characterized the role of the nucleolar protein Nsr1, the yeast homologue of the human nucleolin in telomere maintenance. This protein has been identified in a screen of genes that affect telomere length, since deletion of *NSR1* results in telomere elongation. Nsr1 is also involved in the trafficking of small nucleolar RNA (snoRNA) inside the nucleolus. Using co-immunoprecipitation and FISH experiment to characterize the role of Nsr1 in telomere maintenance, our results show that Nsr1 interacts with *TLC1* RNA *in vivo* and it is involved in *TLC1* RNA nuclear trafficking. Indeed, deletion of *NSR1* leads to the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA during all phases of the cell cycle. Surprisingly, we found that this interaction occurs after the maturation of the *TLC1* RNA in the nucleolus and before its association with the nuclear export factors in the nucleoplasm. Altogether, these results suggest that Nsr1 acts in the telomerase biogenesis pathway.

These results show that telomerase biogenesis is a complex process that requires the intervention of several factors involved in nuclear, nucleolar and nucleo-cytoplasmic transport.

Keywords: *TLC1* RNA, telomerase, double strand-breaks, *de novo* telomere addition, intranuclear trafficking, Rad52, Cdc13, Siz1, Nsr1, telomerase biogenesis

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xix
1 Introduction.....	1
1.1 Les cassures double-brins (CDB).....	1
1.1.1 Origine des CDBs.....	1
1.1.2 Les conséquences des CDBs : l'instabilité chromosomique (INC).....	2
1.1.3 La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>) comme organisme modèle pour étudier les CDBs.....	3
1.2 La réponse aux dommages à l'ADN (DDR).....	4
1.2.1 Les points de contrôles des dommages à l'ADN.....	4
1.2.1.1 Les senseurs et les protéines kinase de DDR.....	4
1.2.1.2 Les transducteurs et les effecteurs des dommages à l'ADN.....	10
1.2.2 La réparation d'ADN.....	12
1.2.2.1 La NHEJ.....	12
1.2.2.2 La MMEJ.....	13
1.2.2.3 La RH.....	15
1.2.2.3.1 Les protéines impliquées dans la RH.....	16
1.2.2.3.2 La sumoylation.....	19
1.2.2.3.3 La régulation de la RH par la sumoylation.....	20
1.3 Les télomères.....	22
1.3.1 La structure et les protéines des télomères.....	22
1.3.1.1 La structure des télomères chez <i>S.cerevisiae</i>	25

1.3.1.2 Les protéines télomériques et leurs rôles dans la maintenance des télomères et l'inhibition des dommages à l'ADN.....	26
1.3.1.2.1 Rap1.....	26
1.3.1.2.2 Rif1 et Rif2.....	26
1.3.1.2.3 L'hétérodimère yKu70/80.....	27
1.3.1.2.4 Le complexe CST (Cdc13-Stn1-Ten1).....	28
1.3.2 L'élongation des télomères par la télomérase.....	29
1.3.2.1 La télomérase.....	29
1.3.2.2 L'ARN <i>TLC1</i> , squelette et matrice de la télomérase.....	30
1.3.2.3 La biogénèse de la télomérase.....	33
1.3.3 Recrutement de la télomérase au télomère court en fin de la phase S.....	36
1.3.3.1 La reconnaissance d'un télomère court.....	36
1.3.3.2 L'interaction Cdc13-Est1 est essentielle pour le recrutement de la télomérase à un télomère court.....	37
1.3.3.3 Recrutement de la télomérase au télomère court se fait en fin de la phase S.....	38
1.3.3.4 Recrutement de la télomérase et les modifications post-traductionnelles.....	39
1.3.4 La fin de l'élongation des télomères par la télomérase	40
1.4 L'ajout d'un nouveau télomère à une CDB.....	41
1.4.1 Les sites préférentiels pour la formation de télomère de novo.....	43
1.4.2 Recrutement de la télomérase sur une CDB.....	45
1.4.3 Les mécanismes contrôlant la formation de télomère <i>de novo</i>	45
1.4.3.1 L'hélicase Pif1.....	45
1.4.3.2 La phosphorylation de Cdc13 par la kinase Mec1.....	46
1.4.3.3 La résection de la CDB.....	48
1.5 Hypothèses et objectifs de la thèse.....	49
2 La protéine Rad52 contrôle la séparation spatiale de la télomérase aux sites de dommages à l'ADN.....	51
2.1 Présentation de l'article 1.....	52
2.2 Article 1.....	53

2.2.1	Abstarct.....	54
2.2.2	Introduction.....	55
2.2.3	Results.....	57
2.2.4	Discussion.....	66
2.2.5	Materials and Methods.....	70
2.2.6	Acknowledgements.....	73
2.2.7	Autors contribution.....	74
2.2.8	References.....	75
2.2.9	Figures and Legends.....	82
2.2.10	Supplementary Data.....	93
3	Trafic nucléaire de l'ARN de la télomérase est le facteur nucléolaire Nsr1.....	100
3.1	Présentation de l'article 2.....	101
3.2	Article 2.....	102
3.2.1	Abstarct.....	103
3.2.2	Introduction.....	104
3.2.3	Results.....	106
3.2.4	Discussion.....	109
3.2.5	Materials and Methods.....	110
3.2.6	References.....	112
3.2.7	Figures and Legends.....	115
4	Discussion.....	120
4.1	Trafic intranucléaire de l'ARN <i>TLC1</i> durant le cycle cellulaire.....	121
4.2	L'hélicase Pif1 contrôle la localisation de l'ARN <i>TLC1</i> au nucléole en phase G2/M.....	122
4.3	Rad52 inhibe l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN <i>TLC1</i> aux CDBs.....	124

4.4 L'ARN <i>TLC1</i> colocalise partiellement avec les sites de CDBs en absence de Rad52.....	130
4.5 L'ajout de télomères de <i>nov</i> o en absence de Rad52.....	132
4.6 La SUMO E3 ligase Siz1 contrôle la localisation de l'ARN <i>TLC1</i> au nucléoplasme indépendamment de l'accumulation de Cdc13 aux CDBs.....	135
4.7 Modèle du trafic intranucléaire de l'ARN <i>TLC1</i> au cours du cycle cellulaire et en réponse aux dommages à l'ADN.....	137
4.8 Nsr1/Nucléoline : un nouvel acteur de la biogénèse de la télomérase.....	141
4.9 Le complexe yKu70/80 et le recrutement de la télomérase au télomère en phase G1.....	143
4.10 Conclusion.....	145
Bibliographie.....	147
Annexe 1 Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model.....	168
Annexe 2 The principal role of Ku in telomere length maintenance is promotion of Est1 association with telomeres.....	190

Liste des tableaux

1- **Chapitre1** Introduction

Tableau 1.1 La liste des protéines impliquées dans l'activation du point de contrôle.....5

Tableau 1.2 La liste des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.....17

Chapitre 2 Article 1

Supplementary Table 2.1 Yeast strains used in this study.....98

Supplementary Table 2.2 Plasmids used in this study.....99

Liste des figures

Chapitre 1 Introduction

Figure 1.1 Représentation schématique de la cascade du signal des points de contrôle des dommages à l'ADN chez la levure.....	9
Figure 1.2 Régulation du choix de la voie de réparation des CDBs.....	14
Figure 1.3 Représentation schématique du cycle de la sumoylation et les trois effets observés de la sumoylation du substrat.....	20
Figure 1.4 Représentation schématique de l'exclusion nucléolaire de la machinerie de la RH.....	21
Figure 1.5 Représentation schématique du complexe shelterine associé au télomère.....	24
Figure 1.6 Schéma simplifié de la structure nucléoprotéique du télomère chez <i>S.cerevisia</i>	25
Figure 1.7 Schéma simplifié de la structure télomérique chez <i>S.cerevisiae</i>	26
Figure 1.8 Structure secondaire de l'ARN <i>TLC1</i> mettant en évidence les sites de liaisons des protéines Est, du complexe yKu et les protéines Sm sur l'ARN <i>TLC1</i>	32
Figure 1.9 Modèle de la biogenèse de la télomérase	35
Figure 1.10 Illustration du recrutement de la télomérase au télomère	37
Figure 1.11 Illustration des modifications post-traductionnelles de Cdc13 participant à la régulation de la télomérase en fonction de la progression du cycle cellulaire.....	40
Figure 1.12 Illustration de l'action de l'hélicase Pif1 au télomère	41
Figure 1.13 Représentation schématique du bras gauche du chromosome V utilisé pour caractériser le taux de GCR de type ajout de télomère de <i>novo</i>	44
Figure 1.14 Illustration des mécanismes qui contrôlent la formation du télomère de <i>novo</i> chez la levure <i>S.cerevisiae</i> en absence de répétition TG adjacent à la CDB.....	47

Chapitre 2 Article 1

Figure 2.1 Intranuclear distribution of <i>TLC1</i> RNA during the cell cycle in WT and <i>pif1Δ</i> strains.....	82
Figure 2.2 <i>TLC1</i> RNA accumulates in the nucleoplasm in G2/M in <i>rad52Δ</i> cells after DNA damage	84
Figure 2.3 <i>TLC1</i> RNA partially colocalizes with DSB sites in <i>rad52Δ</i> cells	85
Figure 2.4 Genetic requirements for nucleoplasmic accumulation of <i>TLC1</i> RNA after DNA damage in <i>rad52Δ</i> cells.....	86
Figure 2.5 Cdc13 accumulates at sites of DNA break in <i>rad52Δ</i> , but not in <i>rad51Δ</i> cells....	88
Figure 2.6 Kinetics of accumulation of Cdc13 and <i>TLC1</i> RNA at sites of DNA damage in <i>rad52Δ</i> cells.....	90
Figure 2.7 The E3 SUMO ligase Siz1 is required for the accumulation of <i>TLC1</i> RNA in the nucleoplasm of <i>rad52Δ</i> cells after DNA damage.....	91
Supplementary Figure 2.1 γ -H2A foci formation per cell in the yeast population after treatment with bleomycin	93
Supplementary Figure 2.2 <i>TLC1</i> RNA localization in WT and <i>cdc13-2</i> strains before and after bleomycin treatment.....	94
Supplementary Figure 2.3 Formation of Cdc13-GFP foci in living yeast cells with DNA damage	95
Supplementary Figure 2.4 Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters after induction of DNA damage	96
Supplementary Figure 2.5 Quantification of <i>TLC1</i> RNA localization in Cdc13-13Myc background <i>rad52Δ</i> and <i>siz1Δ rad52Δ</i> strains with and without bleomycin	97

Chapitre 3 Article 2

Figure 3.1 <i>TLC1</i> RNA accumulates in the nucleolus in G1/S in <i>nsr1Δ</i> cells.....	115
Figure 3.2 <i>NSR1</i> is epistatic to <i>PIF1</i>	116
Figure 3.3 Nsr1 acts upstream of the yKu70/80 complex.....	117
Figure 3.4 <i>NSR1</i> is not required for <i>TLC1</i> RNA 5' cap hypermethylation by Tgs1.....	118
Figure 3.5 Nsr1 interacts with <i>TLC1</i> RNA <i>in vivo</i>	119

Chapitre 4 Discussion

Figure 4.1 La localisation de l'ARN <i>TLC1</i> dans les cellules sauvages et mutantes <i>pif1-m2</i>	123
Figure 4.2 Modèle proposé du trafic intranucléaire de la télomérase durant le cycle cellulaire et en réponse à des dommages à l'ADN dans les cellules sauvages.....	137
Figure 4.3 Modèle proposé du trafic intranucléaire de la télomérase en réponse à des dommages à l'ADN des cellules déficientes de la voie de la RH.....	139

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomal
ADNsb	ADN simple-brin
ADNdb	ADN double-brin
ARN	acide ribonucléoprotéique
ARS	autonomously replicating sequence
ATRIP	ATR-interacting protein
APC	Anaphase Promoting Complex
Aos1	Activation of Smt3
b, pb, kb	base, paire de base, kilobase
BRCA2	Breast cancer 2
BLM	Bloom
Bub2	Budding Uninhibited by Benzimidazole
CDB	cassure double brin (<i>Double-strand break</i>)
CSB	cassure simple brin (<i>Single-strand break</i>)
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Cdc13	Cell division cycle 13
Cdc20	Cell division cycle 20
Crm1	Chromosome Region Maintenance

CTC1	conserved telomere maintenance component 1
DAPI	diamidino phényl-indol
dNTP	désoxyribonuclétide tri-phosphate
Dna2	DNA synthesis defective 2
DDR	<i>DNA damage response</i>
Ddc1	<i>DNA Damage Checkpoint 1</i>
DNA-Pkc	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
Dun1	DNA-damage uninducible 1
Dbp11	Dead Box Protein 11
Dbp5	Dead Box Protein 5
Dnl4	DNA Ligase
Exo1	Exonuclease 1
FISH	<i>Hybridation In Situ en Fluorescence</i>
HR	Homologous Recombination
hTERT	Human TElomerase ReverseTranscriptase
hTR	<i>Human Telomerase RNA</i>
HUS1	HUS1 checkpoint clamp component
IR	Ionizing radiation
Kap122	Karyopherin 122
Lif1	Ligase Interacting Factor 1
Mrc1	Mediator of the Replication Checkpoint 1
Mec1	Mitosis Entry Checkpoint 1
Mex67	Messenger RNA EXport factor of 67 kDa
Mre11	Meiotic recombination11
MEN	mitosis exit network
MMEJ	Micro-homology mediated end joining
MAT	Mating type locus

MMS	Methyl methane sulphonate
Mtr2	Mrna Transport
NPC	complexe de pore nucléaire
Nej1	Nonhomologous End-Joining defective
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Non-homologous end-joining
PCR	réaction en chaine par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pds1	Precocious Dissociation of Sisters 1
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
Pif1	Petite Integration Frequency 1
<i>pif1-m2</i>	<i>petite integration frequency 1-mutant2</i>
<i>pif1-m1</i>	<i>petite integration frequency 1-mutant1</i>
Pol1	POLymerase
ROS	Reactive oxygen species
Rad	Radiation sensitive
<i>RFC</i>	Replication factor C
<i>RPA</i>	Replication protein A
Rif1	Rap1-Interacting Factor 1
Rif2	Rap1-Interacting Factor 2
<i>RRD1</i>	Resistant to Rapamycin Deletion
snARN	petit ARN nucléaire (<i>Small nuclear</i>)
snoARN	petit ARN nucléolaire (<i>Small nucleolar</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S	Serine
Sgs1	Slow Growth Suppressor 1
Sae2	Sporulation in the Absence of spo Eleven 2
<i>SML1</i>	Suppressor of Mec1 Lethality 1

SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
Siz1	SAP and mIZ-finger domain 1
Siz2	SAP and mIZ-finger domain 2
Tcr	T cell receptor
Tel1	<i>TeLomere maintenance</i>
T	Threonine
TPE	Telomere position effect
Tgs1	TrimethylGuanosine Synthase 1
Uba2	UBiquitin Activating2
Ubc9	UBiquitin-Conjugating9
Ulp1	UbL-specific Protease1
Ulp2	UbL-specific Protease2
UV	Ultraviolet
WT	sauvage (<i>wild type</i>)
Xrs2	X-Ray Sensitive
<i>YFP/GFP/CFP</i>	Yellow/Green/Cyan Fluorescent Proteins

À la mémoire de mon frère, Mohammed Ouenzar

Remerciements

Au cours de mes années passées au doctorat, j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer plusieurs personnes sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Aussi, dans les paragraphes qui suivent, je tiens à les remercier.

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, Pascal Chartrand, qui m'a généreusement accueillie dans son laboratoire. Pascal, merci pour votre confiance, votre ouverture d'esprit et votre humanité. Votre passion pour la science fait de vous un scientifique de haut niveau, et je vous souhaite tout le succès que vous méritez. Enfin, merci pour votre patience au cours de la dernière année. Je sais que je n'ai pas toujours été facile à suivre...

Bien sûr je remercie aussi l'ensemble du laboratoire Pascal. Emmanuelle, Karen (Mr. Ban ki-moon), David, Maxime, Hadrien, Mark, Marjolaine. Merci pour votre présence quotidienne. Avec le temps, vous êtes devenus une deuxième famille et ne plus vous voir va faire un grand vide.

Un remerciement tout particulier à Emmanuelle Querido, pour les commandes des réactifs, la lecture critique de mon premier papier et son support durant mes années de doctorat.

Je remercie également les anciens du laboratoire que j'ai surtout côtoyés pendant mes premières années de doctorat. Merci à Zhifa, Franck, Anne-laure, Jean-François, Catherine, Carmina, Emilio (Cannavaro le capitaine), Geneviève et Amélie, de même qu'à tous les autres étudiants qui ont été de passage.

Je remercie les collaborateurs : Dr Alison Bertuch, Dr Tom Cech et Dr Wellinger pour la productivité de nos collaborations et la qualité de la recherche qu'ils produisent.

Bien entendu, je ne saurais exprimer ma gratitude envers ma mère, mes frères, mes sœurs pour le support inconditionnel pendant toutes ces années. Un remerciement particulier à mon ami Hafid et son épouse Hind de m'avoir convaincue à plusieurs fois de ne pas abandonner le doctorat. Merci aussi pour toutes les discussions autour d'un tagine ou d'un couscous ainsi que les invitations durant les mois de Ramadan.

Je remercie mes amis : Rachid Daoud, Morad, Rachid Amrani, Rachid Benhamman, Haitam, Mohammed ould Aissa, Ahmed Mansour, Sebastien, Alexis, Véro, Karine Boulay, Karine Richer, Mehdi, Fred, Paul, Khalid, Amira, Emmanuelle Tchekanda, Vincent, Sami. Également un gros merci à toute l'équipe de soccer du département de biochimie.

Je voudrai remercier les membres de mon comité de thèse et du comité de défense : le Dr Luc DesGroseillers pour sa disponibilité et son implication, Dr Éric Lécuyer, Dr Daniel Zenklusen et les Dr Autexier, Archambault et Raymond pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie tout le personnel administratif du département (Sylvie, Elaine et Lorraine) pour leur patience et leur efficacité constante.

Merci pour tout

1) Introduction

1.1 Les cassures double-brin de l'ADN (CDBs)

1.1.1 Origine des CDBs :

Des milliers de lésions dans l'ADN apparaissent chaque jour dans les cellules humaines et menacent l'intégrité génomique. Parmi ces lésions, on retrouve les altérations spontanées ou les mésappariements d'ADN qui résultent de l'incorporation de dNTP durant la réplication de l'ADN, la perte des bases suivant la dépurination ou la modification par l'alkylation de l'ADN (Lindhal & Barnes, 2000). De plus, les dérivés réactifs d'oxygène (ROS) peuvent générer des cassures simple-brins (CSB) ainsi que l'oxydation des bases de l'ADN, alors que les réactions hydrolytiques et la méthylation non-enzymatique génèrent d'autres types de lésions dans l'ADN (Tolle-Sander et al, 2004). Par contre, les CDBs sont considérées comme étant les lésions les plus toxiques pour la cellule, puisque les 2 brins d'ADN sont endommagés. Ainsi, cela empêche l'utilisation du brin d'ADN complémentaire au brin endommagé comme matrice pour la réparation (Sandell & Zakian, 1993; van Gent et al, 2001).

Les CDBs peuvent avoir différentes origines, et sont issues de processus aussi variés que le stress mécanique, les mécanismes de diversification des immunoglobulines dans les lymphocytes (Maizels, 2005), la méiose responsable de la génération de la diversité génétique (Keeney & Neale, 2006) et la réplication de l'ADN. Ces facteurs endogènes peuvent être à l'origine de la formation des CDBs. Les CDBs peuvent également être le résultat de l'action directe ou indirecte d'agents exogènes, comme les radiations ultraviolettes émises par le soleil (UV), les radiations ionisantes (RIs) et certains agents thérapeutiques.

L'induction artificielle des CDBs est très utilisée dans le contexte d'une thérapie anticancéreuse, durant laquelle l'accumulation des CDBs tue les cellules cancéreuses. C'est le cas des traitements par des agents radiomimétiques tels que la bléomycine et la

néocarzinostatine qui produisent des CDBs de façon directe (Povirk, 1996), des radiations ionisantes (Ward, 1988) et des inhibiteurs de topoisomérase (Li & Liu, 2001). En plus des CDBs, la bléomycine génère aussi des cassures simple-brin d'ADN; le clivage d'ADN étant dépendant du temps d'incubation et de la concentration de bléomycine (Iqbal et al, 1976). Les radiations ionisantes induisent différents types de lésions en simultané : CSBs, modifications des bases, dommages au niveau du squelette sucre-phosphate et CDBs. La topoisomérase est une enzyme qui contrôle la superhélicité de l'ADN au cours de différents processus cellulaires. Elle est caractérisée par la formation d'une liaison covalente avec l'ADN pendant son cycle catalytique (Wang & Eastmond, 2002). Cette étape de transition est stabilisée par les inhibiteurs des topoisomérases, comme l'étoposide et la camptothécine, qui induisent de cette façon des cassures simple-brin ou double-brin sur l'ADN.

1.1.2 Les conséquences des CDBs: l'instabilité chromosomique (INC)

Les CDBs peuvent interférer avec la réplication et la transcription de l'ADN des cellules en division. Par conséquent, elles peuvent donc menacer la viabilité cellulaire dans le cas où elles ne sont pas réparées. Les cellules peuvent s'adapter à un faible niveau de dommages irréparables de l'ADN. Cependant, la présence d'une CDB peut conduire à la mort cellulaire en entraînant une désactivation d'un gène essentiel (Lee et al, 1998; Rich et al, 2000). Les CDBs peuvent entraîner l'instabilité chromosomique (INC), soit la forme la plus dominante de l'instabilité génomique, si elles sont incorrectement réparées. L'INC est souvent associée à des défauts du développement, la neurodégénération, la déficience immunitaire, la radiosensibilité, la stérilité ainsi que la prédisposition au cancer (Jackson & Bartek, 2009). L'INC correspond soit à un changement du nombre de chromosomes ou soit à un gain ou une perte du matériel chromosomique. Ces événements peuvent conduire à la tumorigenèse si la perte touche une région chromosomique qui code pour un suppresseur de tumeur ou bien si l'amplification affecte une région qui code pour un gène avec un potentiel oncogénique. L'INC la plus observée dans les cellules tumorales est un résultat de la translocation où les bras chromosomiques sont échangés. Ces translocations peuvent parfois provoquer la fusion de gènes, ce qui entraîne la dérégulation ou l'altération de la fonction d'un proto-oncogène

(Nikiforova et al, 2000). Dans ce contexte, il a été montré que les CDBs sont impliquées dans la génération de translocations dans les tumeurs lymphoïdes au niveau des chromosomes 2, 7, 14 et 22 portant les loci d'immunoglobulines (Ig) et des récepteurs des lymphocytes T (Tcr) (Vanasse et al, 1999). L'introduction d'une CDB dans un site spécifique du chromosome peut aussi être un inducteur potentiel de la translocation chez la levure et chez les cellules humaines (Harrison & Haber, 2006; Richardson & Jasin, 2000). L'introduction directe d'une CDB dans un site bien défini peut-être accomplie par l'expression de l'endonucléase HO ou de l'endonucléase I-SceI dans les cellules portant le site de coupure HO ou I-SceI.

1.1.3 La levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) comme organisme modèle pour étudier les CDBs :

Depuis longtemps, la levure constitue un des modèles pour étudier la génétique, la biochimie et la biologie cellulaire des eucaryotes (Botstein & Fink, 2011). De fait, plusieurs découvertes ont été effectuées dans cet organisme, notamment la régulation du cycle cellulaire et le concept des points de contrôles du cycle cellulaire (voir ci-dessous) (Hartwell et al, 1974; Weinert & Hartwell, 1988). Plusieurs études qui connectent les protéines avec leurs fonctions dans la cellule sont dérivées de travaux effectués chez la levure (Botstein & Fink, 2011). En 1996, elle fut le premier organisme eucaryote dont le génome fut complètement séquencé. L'aspect le plus essentiel de l'utilisation de *S. cerevisiae* comme organisme modèle provient des principes de base de l'évolution. La conservation des gènes chez les eucaryotes constitue le fondement de la conservation fonctionnelle, en permettant que les inférences sur le gène et la fonction d'une protéine de la levure puissent être transférées aux cellules humaines. En effet, 44% des gènes de la levure ont clairement des homologues humains et au moins 1000 gènes appartiennent à des familles de gènes qui sont liés à des maladies humaines (Heinicke et al, 2007). Un avantage particulier de l'utilisation de la levure pour l'étude de la réparation de l'ADN est qu'une grande partie des protéines qui réparent les CDBs après traitement avec des agents exogènes sont conservées chez l'humain (Tableau 1).

1.2 La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) :

L'action délétère des CDBs représente une sérieuse menace pour la viabilité des cellules et leur stabilité génomique. Par conséquent, tous les organismes eucaryotes possèdent des mécanismes de surveillance appelés réponse aux dommages de l'ADN ou « DDR ». La DDR implique deux réponses : l'activation des points de contrôle ou « checkpoints », lesquels entraînent un arrêt ou un délai dans la progression du cycle cellulaire, et la réparation des lésions d'ADN (Lydall, 2009). Le tableau 1 présente une liste des protéines impliquées dans la signalisation du point de contrôle à des dommages à l'ADN chez la levure *S. cerevisiae* et chez l'humain ainsi que leurs fonctions.

1.2.1 Les points de contrôle des dommages à l'ADN :

Le concept du point de contrôle est né des études réalisées dans la levure où la progression du cycle cellulaire est visible par sa physiologie. L'activation du point de contrôle se manifeste par un arrêt dans une phase particulière du cycle cellulaire. Chez la levure, une CDB est suffisante pour activer le point de contrôle et arrêter le cycle cellulaire en métaphase, juste avant la ségrégation des chromosomes. Cette phase est souvent nommée « l'arrêt en G2/M ». Les protéines du point de contrôle peuvent être classées selon leur fonction dans la transduction du signal : senseurs, transducteurs, médiateurs et effecteurs (Tableau 1). Les senseurs du signal sont évidemment les premiers participant à la réponse cellulaire (les premières protéines liant les dommages d'ADN). Les senseurs permettent l'activation des protéines kinase qui vont ensuite activer une série de protéines dont les médiateurs et les effecteurs.

1.2.1.1 Les senseurs et les protéines kinase de DDR :

Les joueurs clés de la signalisation du point de contrôle sont les deux membres conservés des protéines kinase de la famille PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) (d'Adda di Fagagna et al, 2004). Chez l'humain, ces PIKK sont nommées ATM

Tableau 1.1 : La liste des protéines impliquées dans l'activation du point de contrôle.

Rôle	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Humain	La fonction
Senseurs	Mre11-Rad50-Xrs2	Mre11-Rad50-Nbs1	Senseur de CDB avec une activité nucléase
	Rfa1-Rfa2-Rfa3	Rpa1-Rpa2-Rpa3	Complexe hétérotrimère lie l'ADN simple-brin
	Rad17-Mec3-Ddc1	RAD1-HUS1-RAD9	Activation de Mec1
	Rad24	Rad17	Chargeur du complexe 9-1-1
	Dbp11	TopBP1	Interagit avec Ddc1 et active la kinase Mec1
Les protéines kinase PIKK	Mec1	ATR	La réponse aux dommages à l'ADN (DDR)
	Ddc2	ATRIP	Partenaire de Mec1/ATR
	Tel1	ATM	DDR
Médiateurs	Rad9	53BP1	Médiateur du point de contrôle
	Mrc1	Claspin	Adaptateur moléculaire
Transducteurs	Rad53	Chk2	Une kinase Ser/Thr
	Chk1	Chk1	Une kinase Ser/Thr
Régulateurs	Sae2	CtIP	Résection limitée
	Exo1	Exo1	Résection extensive
	Sgs1	BLM/WRN	Résection extensive
	Dna2	Dna2	Résection extensive

(Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM et Rad3-related), alors que chez la levure *S. cerevisiae* elles sont nommées respectivement Tel1 et Mec1. Ces protéines kinase ont une grande préférence pour la phosphorylation des résidus Serine (S) ou Thréonine (T) suivis par la Glutamine (Q) (Cimprich & Cortez, 2008; Mallory & Petes, 2000). En effet, ATM/Tel1 et ATR/Mec1 sont activées par des dommages à l'ADN, bien que leur spécificité à ces dommages soit différente. ATM/Tel1 est activée par des CDBs alors qu'ATR/Mec1 l'est par des lésions qui induisent la génération d'ADNsb (Ciccia & Elledge, 2010). Génétiquement, *MEC1* et *TEL1* sont partiellement redondants, mais pas complètement. Par exemple, les deux

kinases peuvent phosphoryler le marqueur spécifique des CDBs, l'histone H2A sur la Serine 129 (serine 139 dans les cellules humaines) pour former γ -H2A (γ -H2AX humain). Cependant, la kinase Tel1 est plus importante dans la formation de γ -H2A en phase G1 alors que Mec1 l'est davantage en phase S et G2 (Ira et al, 2004).

La kinase Tel1/ATM fut identifiée dans un criblage de gènes qui affectent la longueur des télomères (Lustig & Petes, 1986). Tel1/ATM est recrutée à des CDBs grâce à son interaction avec le domaine C-terminal de la protéine Xrs2/Nbs1 du complexe MRX : Mre11-Rad50-Xrs2 (Mre11-Xrs2-Nbs2 dans les cellules humaines) (Figure 1.1). En effet, la délétion d'un composant du complexe MRX ou de la région C-terminale de Xrs2 entraîne un arrêt de la localisation de Tel1/ATM à la CDB ainsi que l'absence de son activité (Stracker & Petrini, 2011). De plus, la fusion des protéines Mre11 et Tel1 avec la protéine fluorescente GFP montre que les foci de Mre11-GFP et Tel1-GFP sont les premiers qui apparaissent après induction des CDBs par les RIs et que la formation des foci de Tel1-GFP dépend du complexe MRX (Lisby et al, 2004).

Les trois gènes du complexe MRX: *MRE11*, *RAD50* et *XRS2* ont été identifiés chez la levure par leurs rôles dans la recombinaison méiotique et la réparation des dommages à l'ADN qui sont induits par les RIs (Krogh & Symington, 2004). Les trois protéines interagissent ensemble pour former un complexe hétérohexamérique qui lie l'ADN et qui contient un dimère pour chaque sous-unité (van der Linden et al, 2009; Williams et al, 2010). D'une manière générale, le complexe MRX possède plusieurs fonctions dans le métabolisme des cassures de chromosomes : il est un senseur de CDBs, il amorce la réparation par la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ), il contrôle la génération de l'ADNsb de l'extrémité 5' vers 3' (résection) et il est aussi requis pour la maintenance des télomères. Bien que la perte de ces fonctions soit tolérée chez la levure, les trois gènes sont essentiels pour la prolifération cellulaire chez les vertébrés (Stracker & Petrini, 2011).

Après son recrutement à la CDB, le complexe MRX ainsi que l'endonucléase Sae2/CtIP commencent tous les deux une dégradation limitée de l'extrémité 5' pour générer une extension 3' sortante (la résection). L'intervention du complexe MRX et l'endonucléase Sae2

dépend de la nature des extrémités d'ADN (Figure 1.2). En effet, l'initiation de la résection des extrémités modifiées générées par des agents tels que les RIs, la bléomycine et la camptothécine, qui produisent des adduits d'ADN, requiert l'intervention de ces deux facteurs pour enlever ces adduits et nettoyer ces extrémités. En revanche, la résection d'une CDB induite par des endonucléases (HO ou I-SceI) génère des extrémités propres (sans adduit d'ADN) et la génération de l'ADNsb peut se faire en absence du complexe MRX et de l'endonucléase Sae2 (Figure 1.2). Dans ce dernier cas, il a été suggéré que les deux facteurs interviennent seulement pour accélérer l'initiation de la résection (Mimitou & Symington, 2011). Après, la résection limitée par le complexe MRX-Sae2, la résection extensive s'effectue par l'exonucléase 5'-3' Exo1 et l'hélicase d'ADN 3'-5' Sgs1 (homologue de BLM) qui forme un complexe avec l'endonucléase Dna2 (tableau 1). Cette résection est exécutée selon deux voies parallèles: la première est assurée par Exo1 alors que la deuxième l'est par Sgs1/Dna2. La délétion d'*EXO1* et *SGS1* (*exo1Δsgs1Δ*) réduit la formation d'ADNsb alors que les cellules sont viables en présence de dommages à l'ADN; cependant la délétion de *MRE11* dans un fond génétique *exo1Δsgs1Δ* bloque totalement la résection et conduit à la mort cellulaire (Mimitou & Symington, 2008). L'intervention de tous les facteurs de la résection (MRX, Sae2, Exo1 et Sgs1-Dna2) permet l'accumulation d'ADNsb selon un taux de 4,4 kb/heure pendant les phases S et G2 (Fishman-Lobell et al, 1992; Zhu et al, 2008).

L'ADNsb formé est recouvert ensuite par un complexe essentiel : RPA (Replication protein A; Figure 1.1). Le complexe formé par RPA et l'ADNsb est reconnu en tant que signal d'ADN endommagé, sur la base d'expériences *in vivo* et *in vitro* réalisées dans la levure, chez l'humain et dans le xénope (Zou & Elledge, 2003). L'hétérotrimère RPA est composé de trois sous-unités essentielles Rfa1, Rfa2 et Rfa3 de poids moléculaire respectifs de 70, 32 et 14 KDa. Ce complexe agit pour empêcher la dégradation de l'ADNsb par les nucléases et pour prévenir la formation des structures secondaires. En plus de ces fonctions, le complexe RPA joue un rôle dans la résection de CDB *via* le recrutement du complexe Sgs1-Dna2. *In vivo*, l'utilisation d'un mutant conditionnel de la grande sous unité du complexe RPA (td-RFA1) réduit la localisation de Dna2 et Sgs1 à la CDB, mais n'affecte pas celle d'Exo1 (Chen et al, 2013).

Le complexe RPA recrute ensuite la kinase Mec1/ATR et le complexe Rad24-Rfc₂₋₅ (Replication factor C). Ce dernier charge ensuite le complexe 9-1-1 (Rad17-Mec3-Ddc1 chez la levure; RAD9-RAD1-HUS1 dans les cellules humaines) sur la jonction d'ADNdb/sb des sites de dommages (Figure 1.1). Le recrutement de tous ces facteurs est accompagné par la dissociation du complexe MRX, Sae2 et Tel1 au site de dommage à l'ADN. Chez la levure et les cellules humaines, l'activation de la kinase ATM/Tel1 favorise l'accumulation de l'ADNsb. Par contre, la génération d'ADNsb engendre une désactivation de cette kinase. Ce mécanisme assure un changement du signal d'ATM/Tel1 vers ATR/Mec1. Le processus par lequel ATM/Tel1 intervient dans la résection des CDBs n'est pas élucidé. Une possibilité serait que la kinase Tel1 influence positivement la fonction du complexe MRX dans la résection de la CDB, de la même façon qu'elle agit aux télomères (Martina et al, 2012).

Le recrutement d'ATR/Mec1 s'effectue grâce à son partenaire ATRIP/Ddc2 (Figure 1.1). ATRIP/Ddc2 forme un complexe avec ATR/Mec1 indépendamment des dommages à l'ADN, alors que l'interaction entre Mec1-Ddc2 et RPA entraîne sa localisation au site de dommages (Harrison & Haber, 2006). La délétion de *DDC2* produit le même défaut observé dans les cellules ayant une délétion de *MEC1*, soit une perte complète de l'arrêt par le point de contrôle. Cette perte est caractérisée par un arrêt de la phosphorylation des substrats de la kinase Mec1 et aussi par une grande sensibilité aux agents générant des dommages à l'ADN. L'interaction entre Mec1/Ddc2 et le complexe RPA/ADNsb est suffisante pour le recrutement de la kinase Mec1 à la CDB mais elle est insuffisante pour son activation complète. Chez la levure, la colocalisation des complexes Mec1-Ddc2 et 9-1-1 aux sites de CDBs stimule fortement l'activité kinase de Mec1 (Majka et al, 2006; Navadgi-Patil & Burgers, 2009). En effet, il a été démontré que le complexe 9-1-1 intervient dans l'activation de Mec1/ATR *via* le recrutement de la protéine activatrice Dbp11 (Figure 1.1). Ce mécanisme est conservé chez les cellules humaines où l'activation d'ATR/ATRIP est dépendante de TopBP1.

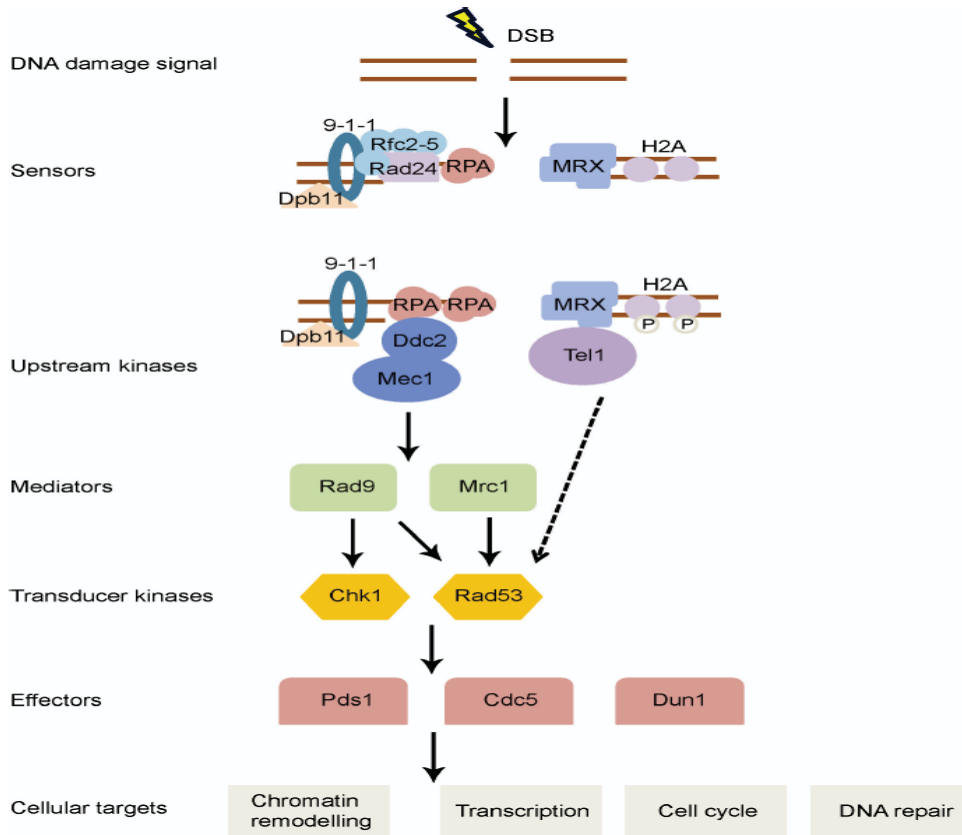


Figure 1.1 : Représentation schématique de la cascade du signal des points de contrôle des dommages à l'ADN chez la levure. En réponse à des dommages à l'ADN (CDB), la résection des extrémités de la CDB entraîne en la production d'une extension 3' d'ADNsb et du recrutement de la kinase Mec1 *via* l'interaction de Ddc2 avec le complexe RPA. Le complexe Rad24-Rfc_{2,5} lie la jonction ADNdb/sb et charge le complexe 9-1-1 qui recrute ensuite la protéine activatrice de Mec1, Dpb11. D'autre part, le complexe MRX lie les extrémités de la CDB et recrute la protéine kinase Tel1 qui entraîne ensuite la phosphorylation de la partie C-terminale de l'histone H2A sur la chromatine. De la même manière, Mec1 phosphoryle aussi l'histone H2A autour de la CDB. Mec1 active les kinases transductrices Chk1 et Rad53 *via* la protéine Rad9 ou Mrc1 (point de contrôle de la réplication). Dans certaines circonstances où la kinase Mec1 est absente, Tel1 peut activer certaines kinases, telles que Rad53 (comme indiqué par la flèche en pointillé). Finalement, le signal des transducteurs se transmet à des protéines effectrices, telles que la sécurine Pds1, et les kinases Cdc5 et Dun1 conduisant à des changements de la chromatine, à l'induction de gènes induits par les dommages, à l'arrêt du cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN (Zhang & Durocher, 2012).

1.2.1.2 Les transducteurs et les effecteurs des dommages à l'ADN :

Une fois que les dommages sont détectés par les senseurs en amont, une cascade de kinases amplifie le signal, entraînant un arrêt du cycle cellulaire, la transcription de gènes induits par les dommages ainsi que l'activation des voies de la réparation d'ADN (Figure 1.1 et 1.2). Ces fonctions importantes sont effectuées par les protéines effectrices Rad53/Chk2 et Chk1, lesquelles ciblent les effecteurs pour exécuter l'arrêt du cycle cellulaire (Sanchez et al, 1999).

Chez la levure, le premier transducteur est Rad53 qui appartient à la famille kinase Chk2. L'activation de Rad53 nécessite la protéine médiatrice Rad9 (53BP1 humain, Tumor suppressor p53-binding protein 1) et aussi la kinase Mec1. La protéine kinase Rad9 est le premier médiateur qui a été génétiquement défini. Sa région C-terminale possède un domaine BRCT (BRCA1 C-terminal) important pour les interactions protéine-protéine et aussi un domaine Tudor qui lie la kinase Rad9 à l'histone H3 méthylée au résidu 79 (H3me79). En absence de dommages, Rad9 est déjà présente sur la chromatine grâce à l'interaction entre son domaine Tudor et H3me79 (Granata et al, 2010). Après induction des dommages, le recrutement de Rad9 sur un site de dommage est renforcé par l'interaction de son domaine BRCT avec l'histone phosphorylée γ -H2A (Hammet et al, 2007). Ce recrutement de Rad9 fait en sorte que cette protéine devient un substrat pour la kinase Mec1 et/ou Tel1. En conséquence, la phosphorylation de Rad9 crée un site du recrutement pour la kinase Rad53. L'interaction entre Rad53 et Rad9 déclenche ensuite l'activation catalytique de Rad53 et son auto-phosphorylation (Durocher et al, 2000). La kinase Mec1 phosphoryle aussi Rad53 en entraînant une activation supplémentaire de cette protéine (Sanchez et al, 1996). Enfin, la kinase Rad53 complètement activée est relâchée du site de dommages pour cibler des protéines effectrices dans le noyau (Gilbert et al, 2001). En plus de Rad53, Rad9 intervient aussi dans l'activation du deuxième transducteur Chk1. Les cellules *chk1* Δ se caractérisent par une réduction partielle de l'activation des points de contrôle et de l'arrêt du cycle cellulaire en présence d'une CDB (Gardner et al, 1999).

L'activation de la kinase Chk1 permet de réguler la stabilité de la sécurine (Pds1), dont l'activité est essentielle pour l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 1.1). En présence des dommages à l'ADN, Pds1 est hyper-phosphorylée d'une manière dépendante des kinases Mec1, Rad9 et Chk1 et indépendante de la kinase Rad53 (Cohen-Fix & Koshland, 1997). Cette phosphorylation de Pds1 empêche son ubiquitination par le complexe promoteur de l'anaphase (APC) (qui forme un complexe avec la sous-unité Cdc20) et sa dégradation par le protéasome (Agarwal et al, 2003). Par conséquent, la persistance de Pds1 inhibe la coupure de la cohésine par la séparase et la relâche des chromatides sœurs en anaphase. De la même manière, la kinase Rad53 est aussi impliquée dans la régulation de la stabilité de Pds1 en bloquant l'interaction *in vivo* entre Cdc20 du complexe APC et de la sécurine Pds1 (Agarwal et al, 2003).

Néanmoins, les cellules délétées du gène *RAD53* ont un défaut plus prononcé d'activation des points de contrôle que les cellules *pds1Δ*, suggérant que la régulation de Pds1 n'est pas la seule cible de Rad53 (Gardner et al, 1999; Sanchez et al, 1999). Étant donné que Pds1 inhibe l'entrée en mitose, il a été démontré que Rad53 inhibe la sortie de la mitose par la maintenance des niveaux élevés de l'activité CDK durant l'arrêt par le point de contrôle, un effet qui s'effectue par l'inhibition de Cdc5 (Cheng et al, 1998) (Figure 1.1). La kinase Cdc5 exerce son effet par l'inhibition du complexe Bub2/Bfa1 qui, à son tour, inhibe le réseau de la sortie en mitose (MEN) (de Bettignies & Johnston, 2003). Par conséquent, l'inhibition de Cdc5 par Rad53 inhibe la progression durant la mitose et aide pour maintenir l'arrêt du cycle cellulaire par le point de contrôle (Putnam et al, 2009). La cible la plus connue de Rad53 est la kinase Dun1 (Figure 1.1), ainsi, les cellules *dun1Δ* ont approximativement le même défaut du point de contrôle que ceux de *rad53Δ*. La kinase Dun1 phosphoryle l'inhibiteur de la ribonucléotide réductase Sml1, entraînant ainsi sa dégradation et une augmentation de la production des nucléotides (dNTPs) nécessaires à la synthèse de l'ADN. L'activation de la production des dNTPs dépendante de Rad53 apparaît comme un rôle essentiel de Rad53 puisque la létalité des mutants *rad53Δ* (ou de *mec1Δ*) est supprimée par la délétion du gène *SML1* (Zhao et al, 1998).

1.2.2 La réparation d'ADN :

Le rôle central de DDR est d'arrêter ou d'induire un délai du cycle cellulaire pour procéder à la réparation des dommages à l'ADN. La réparation des CDBs s'effectue par deux grandes voies: la réparation par jonctions d'extrémités non-homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (RH). La NHEJ implique la ligation directe des deux extrémités d'ADN. Il s'agit d'un mode de réparation qui n'est pas fidèle, où la dégradation des extrémités de la CDB résulte en la perte de l'information génétique après la ligation. La RH est le mode le plus fidèle de la réparation d'ADN puisqu'il implique un échange direct de l'information génétique du locus donneur qui porte la séquence homologue au locus receveur qui contient la CDB. En plus de ces deux voies, un troisième mode appelé jonction d'extrémités médiées par micro-homologie (MMEJ), intervient pour réparer les dommages à l'ADN. Le MMEJ utilise l'hybridation des séquences avec une courte homologie (micro-homologie) pour appairer les extrémités de la CDB avant la ligation. Le choix entre ces différentes voies dépend de la résection de CDB, de la structure des extrémités (propres ou modifiées) d'ADN et de la phase du cycle cellulaire (Figure 1.2) (Symington & Gautier, 2011).

1.2.2.1 La NHEJ :

La NHEJ produit une réparation «error-prone», car une partie de l'information génétique est possiblement perdue après la réparation des lésions. Chez la levure, les CDBs sont détectées en premier lieu et d'une façon indépendante par les complexes MRX et yKu (Lisby et al, 2004; Wu et al, 2008). Ces derniers lient d'une manière directe les extrémités d'ADN et jouent différents rôles dans la NHEJ (Milne et al, 1996). Chez la levure, le complexe yKu, un hétérodimère très conservé dans les cellules eucaryotes, est formé par deux protéines de 70 et 80 kDa appelées respectivement yKu70 et yKu80 (tableau 1.2). Le complexe yKu70/80 intervient pour empêcher la résection dépendante d'Exo1 de l'extrémité 5' des CDBs en phase G1, avant la réplication de l'ADN (Daley et al, 2005; Lee et al, 1998). En effet, la délétion du composant yKU70 dans un fond génétique *exo1Δ* engendre un arrêt de la résection de CDBs en phase G1 (Maringele & Lydall, 2002). Le complexe MRX est

impliqué dans l'attachement des deux extrémités de la CDB pour la ligation (Lobachev et al, 2004). Cette dernière s'effectue par l'ADN ligase IV (encodé par *DNL4* chez la levure) et par les protéines ligases accessoires Lif1/Xrcc4 et Nej1/Xlf, dont le recrutement au site de la cassure dépend du complexe yKu70/80 (Zhang et al, 2007). Contrairement aux cellules humaines, la levure *S. cerevisiae* ne possède pas de nucléases qui font partie du cœur de NHEJ, telle que Artemis qui possède des activités endonucléases 5' et 3' (Lieber, 2010). Par conséquent, la NHEJ répare seulement, avec une haute-fidélité, les CDBs avec des extrémités compatibles (propres) comme celles générées par les endonucléases (Figure 1.2). Chez les vertébrés, la voie de NHEJ nécessite la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-Pkc, un membre de la famille PIKK) (tableau 2). Cette dernière est recrutée et activée à la CDB *via* le complexe Ku (Ku70/86) (Smith & Jackson, 1999). Ensuite, DNA-Pkcs recrute XRCC4 et l'ADN ligase IV pour effectuer la fusion des extrémités (Mahaney et al, 2009).

1.2.2.2 La MMEJ :

L'inhibition du NHEJ par la délétion d'yKU ou de la ligase IV résulte toujours d'une activité robuste de jonction d'extrémités d'ADN (Zhang et al, 2010). Chez la levure *S. cerevisiae*, la ligation indépendante du complexe yKu s'effectue seulement par la voie MMEJ. La MMEJ est une voie de réparation des CDBs qui utilise une séquence de courte homologie d'une dizaine de bases (de 5 à 25 paires de base) pour s'hybrider avant la ligation. Au début, la MMEJ a été suggérée comme étant une voie qui apparaît seulement en absence de NHEJ. Par contre, des études récentes ont pu montrer que la voie de MMEJ fonctionne aussi en présence de NHEJ (Lee-Theilen et al, 2011; Zhang & Jasin, 2011). Un facteur important influençant le choix entre MMEJ et NHEJ est la résection des CDBs. La résection déplace le complexe Ku des sites de CDBs et inhibe par conséquent la voie de NHEJ. Toutefois, la voie de MMEJ est dépendante de la résection limitée par le complexe MRX-Sae2 et entraîne toujours des larges délétions des séquences qui entourent le site de la cassures (McVey & Lee, 2008). En effet, les gènes *MRE11*, *XRS2*, *RAD50*, *SAE2* et *TEL1* sont essentielles pour la voie de MMEJ. En accord avec les études chez la levure, la régulation négative de Mre11 par l'utilisation des

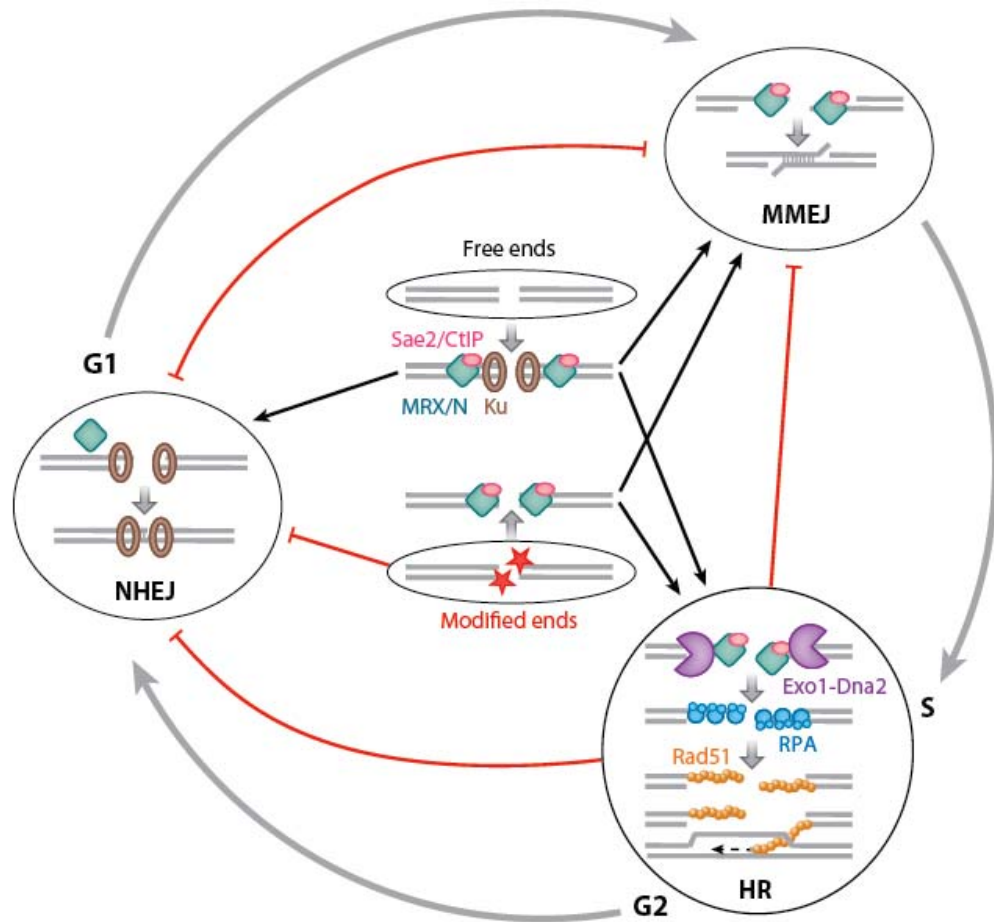


Figure 1.2 : Régulation du choix de la voie de réparation des CDB. Les trois modes de réparation des CDBs d'ADN: NHEJ, MMEJ et la RH. Les extrémités des CDBs chimiquement modifiées ne peuvent pas être réparées par NHEJ et elles requièrent la résection, alors que les extrémités libres peuvent être réparées par l'une de ces trois voies. La résection par le complexe MRX-Sae2 déplace Ku et inhibe la voie de NHEJ. Une résection extensive entraîne la formation de nucléofilaments de Rad51 et l'inhibition de MMEJ. Le NHEJ a lieu en phase G1, la RH en phase S et G2 et la MMEJ peut avoir lieu durant dans toutes les phases du cycle cellulaire (Symington & Gautier, 2011).

petits ARN interférants dans les cellules *Xrcc4*^{-/-} déficientes de NHEJ résulte en une diminution de MMEJ dans les cellules de mammifères (Rass et al, 2009). De la même façon, l'inactivation de Nbs1 ou CtIP (homologue de Sae2 de la levure) montre une forte réduction de la fréquence de MMEJ, reflétant que la résection par le complexe MRN-CtIP est aussi essentielle pour la voie de MMEJ (Bennardo et al, 2008; Bennardo et al, 2009). En conclusion, ces données montrent que la résection par la voie de MRN-CtIP (MRX-Sae2) génère des extensions simple-brin et permet d'exposer des micro-homologies qui vont s'hybrider au cours de la réparation par MMEJ.

1.2.2.3 La RH :

La réparation des CDBs par la voie de la RH se produit pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Cette dernière permet de copier des séquences d'ADN homologues présentes sur la chromatide sœur ou sur le chromosome homologue à la séquence endommagée (Figure 1.2). La RH est soit conservative en préservant la structure globale du chromosome ou bien non-conservative si elle est mal régulée. Dans ce cas, elle pourrait générer de Grands Réarrangements Chromosomiques (GCR), tels que les translocations non-réciproques, les délétions et les duplications (Kolodner et al, 2002). La réparation par la voie de la RH est dépendante de trois phases : pré-synapse, synapse et post-synapse. Le joueur central qui agit dans toutes ces phases est la protéine d'échange du brin nommée Rad51, un homologue de la famille recombinase RecA des bactéries (Figure 1.2). La phase de pré-synapse commence par la résection des CDBs en générant un ADNsb. Le complexe RPA se charge sur l'ADNsb et inhibe la voie de MMEJ. En effet, l'utilisation d'un mutant de la grande sous unité Rfa1 (Rfa1-D228Y) qui lie moins bien l'ADNsb engendre une forte augmentation de la réparation des CDBs par la voie de MMEJ (Deng et al, 2014). Ensuite, la protéine Rad51 remplace RPA sur l'ADNsb en formant un complexe Rad51-ADNsb appelé filament présynaptique ou nucléoprotéique (Figure 1.2). Durant la synapse, l'extrémité 3' de l'ADNsb envahit un ADNdb pour s'apparier avec une séquence homologue et former une structure appelée boucle D (ou D-loop) (Figure 1.2). La synapse est un évènement important pour l'hybridation des

séquences homologues de l'ADN et il se produit dans tous les échanges de la RH (Paques & Haber, 1999). La phase post-synapse se caractérise par la synthèse d'ADN en utilisant l'extrémité 3' du brin envahissant comme amorce; la protéine Rad51 se dissocie de l'ADNdb pour exposer l'extrémité 3'OH pour la synthèse d'ADN.

Par ailleurs, la compréhension des mécanismes de réparation de la CDB par la RH provient des études du changement de type sexuel chez la levure (Haber, 2012). Ce processus est initié par l'induction d'une CDB par l'endonucléase HO dans le locus MAT. La réparation de cette cassure s'effectue par la voie de la RH en utilisant une des cassettes transcriptionnellement silencieuses *HML* ou *HMR* comme un donneur. Le placement du gène de l'endonucléase HO sous le contrôle du promoteur Gal permet l'induction expérimentale d'une CDB dans une population de cellules par l'ajout de galactose en milieu de culture (Jensen & Herskowitz, 1984).

1.2.2.3.1 Les protéines impliquées dans la RH

Le criblage génétique des gènes requis pour la résistance aux RIs a classé les gènes *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TIDI*, *RFA1* et *MRE11* dans le groupe d'épistasie *RAD52* (Game & Mortimer, 1974). Les produits de ces gènes exécutent les différentes étapes de la RH : la résection, la recherche d'homologie, la formation de synapse et l'échange (Symington, 2002). Les fonctions des protéines appartenant à ce groupe sont hautement conservées chez les eucaryotes, de la levure à l'humain. Le Tableau 2 présente une liste des membres du groupe d'épistasie Rad52 de la levure *S. cerevisiae* et leurs homologues chez les eucaryotes supérieurs. Rad51 est une protéine bien conservée de la levure aux mammifères, elle assure l'appariement homologue et l'échange du brin (Kowalczykowski et al, 1994). Chez la levure, Rad51 est requise à toutes les réactions mitotiques d'invasion du brin, bien que sa délétion n'entraîne pas la mort cellulaire. Par contre, sa délétion dans les cellules de souris entraîne une mortalité embryonnaire précoce (Lim & Hasty, 1996). Rad51 possède une faible activité d'échange de brins d'ADN. Cette

Tableau 1.2 : La liste des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN :

Rôle	<i>S.cerevisiae</i>	Humain	Fonction
Protéines de la réparation d'ADN	yKu70	Ku70	NHEJ
	yKu80	Ku86	NHEJ
	Dnl4-Lif1-Nej1	Lig4-XRCC4	NHEJ
		DNA-PKc	NHEJ
	Rad52	Rad52	RH
	Rad51	Rad51, Rad51B, C, D	RH
	Rad54	RAD54	RH
	Rad59	RAD52B	RH

activité augmente seulement si le complexe RPA est ajouté à l'ADNsb après l'ajout de Rad51. Cependant, si RPA et Rad51 sont ajoutés simultanément à l'ADNsb, la formation du filament présynaptique est inhibée (Sugiyama et al, 1997; Sung, 1994). Pour s'opposer à l'inhibition opérée par RPA, l'intervention de la protéine médiatrice Rad52 est essentielle pour l'assemblage du filament présynaptique. Chez la levure, Rad52 est une protéine essentielle pour la réparation de CDB par la voie de la RH. Par conséquent, sa délétion entraîne à la fois une inhibition totale de la réparation des CDBs par la RH et aussi une grande sensibilité aux différents agents générant les dommages à l'ADN (Game & Mortimer, 1974; Lisby et al, 2004). Rad52 interagit directement avec la protéine Rad51 et le complexe RPA en permettant de recruter la protéine Rad51 à l'ADNsb recouvert de RPA. Cette action de Rad52 entraîne l'échange du complexe RPA par Rad51 et la formation du filament nucléoprotéique (Figure 1.2). Néanmoins, l'interaction de Rad52 avec RPA n'est pas suffisante pour déplacer le complexe RPA. Cette action est accomplie une fois que la protéine Rad51 interagit avec le complexe Rad52-RPA. En accord avec ceci, une étude *in vivo* où les différentes protéines de

la RH sont fusionnées à la GFP a pu montrer que le recrutement de Rad52 à la CDB est assuré par le complexe RPA, mais il est indépendant de Rad51. De la même manière, le foyer de Rad51-GFP et des autres protéines de la machinerie de la RH (*RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TIDI*) sont absents dans les cellules délétées de *RAD52* (Lisby et al, 2004). Cela suggère que Rad52 est recruté à la CDB juste après le complexe RPA et elle est responsable du recrutement des autres protéines de la machinerie de la RH.

Par ailleurs, malgré le fait que la protéine Rad52 des cellules humaines possède des similarités structurales et biochimiques avec la protéine Rad52 de la levure, il n'a pas été montré que Rad52 humaine possède une activité de médiateur de la recombinaison. Ceci pourrait expliquer le rôle mineur de Rad52 dans la RH des vertébrés et aussi le remplacement de Rad52 par BRCA2 dans le chargement de Rad51 sur l'ADNsb (Fujimori et al, 2001).

En plus de la résection et de la formation du complexe ADNsb-RPA, l'interaction RPA-Rad52 va nécessiter l'activité kinase dépendante des cyclines Cdk1 qui est active seulement pendant les phases S et G2 (Barlow & Rothstein, 2009). En effet, le traitement des cellules synchronisées en phase G1 par des RIs peut entraîner la formation d'un foyer de la fusion Rfa1-GFP, ce qui suggère ainsi une résection de ces cassures durant cette phase. Toutefois, la formation de foyer de Rad52 n'a été détectée que pendant les phases S et G2 (Barlow et al, 2008). L'intervention de Cdc28 dans la régulation de cette interaction n'est pas claire mais il est possible que cela s'effectue *via* la phosphorylation de Rad52 ou par la modification de RPA, dépendante du cycle cellulaire. D'une manière similaire à la phosphorylation, la sumoylation joue aussi un rôle important dans la régulation de la RH. Ainsi, la mutation des enzymes de la sumoylation ou de la désomoylation chez la levure conduit à une série de phénotypes tels que l'hyper-sensibilité aux agents générant les dommages à l'ADN et l'accumulation des intermédiaires de la recombinaison (Branzei et al, 2006; Zhao & Blobel, 2005).

1.2.2.3.2 La sumoylation:

La sumoylation est une modification post-traductionnelle caractérisée par une liaison covalente d'une petite protéine SUMO (small ubiquitin-like modifier) d'approximativement 100 acides aminés à un résidu ou à des résidus de lysines (K) des protéines cibles. Cette modification s'effectue au niveau de plusieurs protéines participant à différents processus cellulaires tels que, entre autres, la réparation de l'ADN, la réplication et la transcription (Hay, 2005). Les protéines SUMO sont traduites sous forme de précurseurs immatures, alors que des protéases spécifiques à SUMO appelées déSUMOylases induisent un clivage catalytique qui expose deux glycines terminales. Le mécanisme de conjugaison de la SUMO mature à la protéine cible s'effectue en trois étapes analogues à celles de l'ubiquitylation, mais avec des composantes différentes (Hay, 2005) (Figure 1.3). La première étape commence par l'activation de la protéine SUMO au niveau de sa région N-terminale par l'enzyme activatrice de SUMO (E1), un hétérodimère composé par Uba2 et Aos1. SUMO est transférée à l'enzyme de conjugaison E2 (UBC9). UBC9 se distingue par la capacité à reconnaître le substrat et à catalyser la formation d'un lien isopeptidique entre SUMO et la protéine cible. Cette dernière étape est facilitée par l'action des SUMO E3 ligases qui, en plus de leurs interventions dans l'augmentation du taux de la sumoylation, elles contribuent à la spécificité du substrat (Johnson, 2004). La plupart des organismes contiennent une seule enzyme E1 et E2 essentielle et plusieurs E3 qui ont des fonctions partiellement redondantes. La levure *S. cerevisiae* possède trois enzymes SUMO E3, dont deux protéines homologues Siz: Siz1 et Siz2 (PIAS dans les cellules humaines), en plus de la sous-unité Mms21 du complexe essentiel Smc5/6. Finalement, la sumoylation est un processus réversible. L'action des déSUMOylases (Ulp1/Ulp2 chez la levure; SENPs chez les cellules humaines) catalyse la dissociation entre SUMO et des protéines cibles. L'attachement de SUMO permet soit de bloquer les interactions qui se passent au niveau ou proche du site d'attachement, soit il sert de surface d'interaction protéine-protéine. Dans ce dernier cas, la protéine qui interagit avec SUMO doit posséder un site de liaison spécifique à SUMO appelé SIM (SUMO-interacting motif). Au niveau fonctionnel, il a été suggéré que la sumoylation peut affecter la stabilité ou l'activité d'une enzyme. Elle peut aussi altérer la localisation ou bien médier de nouvelles interactions

protéine-protéine avec d'autres protéines contenant les motifs SIM (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007) (Figure 1.3).

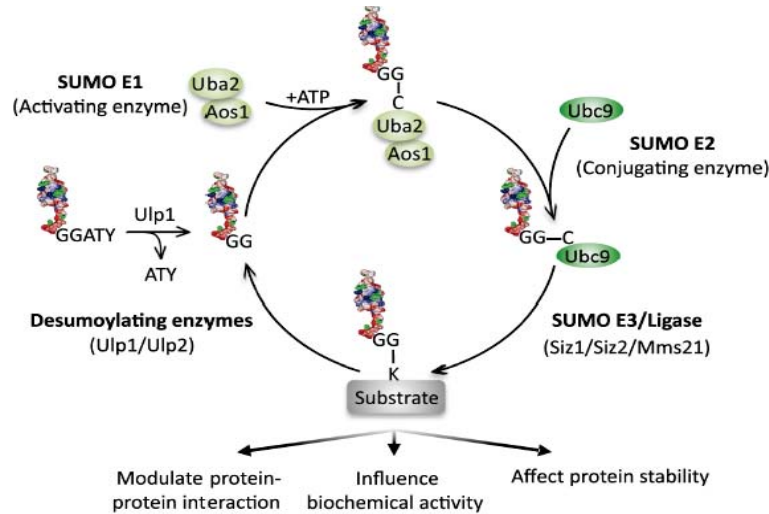


Figure 1.3: Représentation schématique du cycle de la sumoylation et les trois effets observés de la sumoylation du substrat (Cremona et al, 2012b).

1.2.2.3.3 La régulation de la RH par la sumoylation:

Un des rôles de la sumoylation après l'induction des CDBs est de faciliter la première étape de la recombinaison en permettant la résection pour générer un ADNs_b (Cremona et al, 2012a). La sumoylation peut modifier sept protéines parmi les douze participants dans la résection des CDBs. Ces protéines incluent les trois sous-unités du complexe MRX, l'endonucléase Sae2, l'hélicase Sgs1 et les deux sous-unités du complexe RPA (Rfa1 et Rfa2). C'est pourquoi l'inhibition de la sumoylation par l'utilisation d'un mutant d'Ubc9 (*ubc9-10*) réduit fortement la génération de l'ADNs_b et affecte la réparation de ces cassures par la RH (Cremona et al, 2012a). La sumoylation peut agir aussi sur la protéine clé de la RH, Rad52. Chez la levure *S. cerevisiae*, la SUMO E3 ligase Siz2 catalyse la sumoylation de Rad52 au niveau des lysines 33, 44 et 253, ce qui réduit son activité de la liaison à l'ADNs_b après induction de dommages à l'ADN (Sacher et al, 2006). Les cellules déficientes pour la sumoylation de Rad52 montrent une formation des foci de la fusion Rad52-GFP de plus courte durée comparativement aux cellules sauvages (Altmannova et al, 2010). Finalement, le

recrutement de Rad51 et la formation du nucléofilament sont suivis par la désumoylation de Rad52 en engendrant sa dégradation par le protéasome (Sacher et al, 2006).

Par ailleurs, la présence de quelques régions dans le génome contenant des séquences répétées a soulevé des questions concernant le mécanisme de protection de ces dites régions de la réparation dangereuse par la RH. Une étude du laboratoire de Michael Lisby, où une CDB a été générée par l'endonucléase I-SceI dans le locus d'ADNr a pu montrer que les senseurs de CDB (MRX, RPA) peuvent former des foci dans le nucléole alors que les foci de Rad52 ainsi que des autres facteurs (Rad51, Rad55 et Rad59) se forment seulement dans le nucléoplasme, suggérant que la résection d'une CDB au niveau de l'ADNr se déroule dans le nucléole, bien que l'association avec les facteurs de la RH se produit seulement dans le nucléoplasme (Figure 1.4) (Torres-Rosell et al, 2007). De plus, cette étude a montré que dans les mutants déficients de la sumoylation (*rad52 k43, 44, 253R*), le nombre de foci de Rad52 augmente dans le nucléole, entraînant une hyper-recombinaison entre les différentes répétitions de l'ADNr et un échange inégal des chromatides sœurs. Par conséquent, l'exclusion nucléolaire des protéines de la RH est un événement fonctionnellement important pour la stabilité génomique.

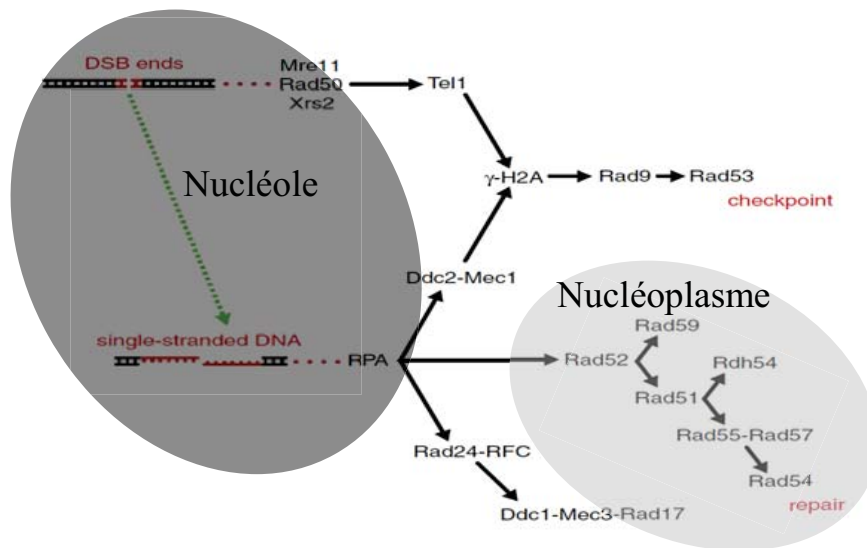


Figure 1.4: Représentation schématique de l'exclusion nucléolaire de la machinerie de la RH. L'induction d'une CDB au niveau de l'ADNr (en rouge) favorise le recrutement et la formation des foci des complexes MRX et RPA dans le nucléole, (la zone gris foncé). La

flèche verte en pointillé présente la résection et l'association du complexe RPA à l'ADNsb. Cependant, l'association des protéines de la RH avec la CDB s'effectue seulement dans le nucléoplasme. Ces facteurs de la RH forment seulement des foci dans ce compartiment (la zone gris clair). L'association des autres facteurs (Rad24, Ddc1, les kinases Tel1 et Mec1) ne sont pas testées pour déterminer si leur association avec la CDB se fait au nucléole ou au nucléoplasme, Adapté de (Torres-Rosell et al, 2007).

1.3 Les télomères

Les études du généticien H.J. Muller sur les chromosomes de *Drosophile* ont donné naissance au concept du télomère (du grec *telos* (fin) et *mere* (segment)). En 1938, Muller avait observé qu'à la suite d'une irradiation, les chromosomes cassés fusionnaient entre eux, alors que les extrémités des chromosomes restaient intactes. Il avait déduit que des structures particulières, présentes aux extrémités des chromosomes mais absentes aux extrémités issues de cassures de l'ADN, protégeaient l'extrémité des chromosomes (Muller, 1938). Il a appelé ces structures les télomères. Ces derniers sont constitués d'un complexe nucléoprotéique dont le rôle essentiel est de protéger les chromosomes de la dégradation par les nucléases, l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, des événements de recombinaison et de fusions, ce qui permet de distinguer les extrémités naturelles coiffées par les télomères des CDBs (Zakian, 1995). L'intégrité de leur fonction est également nécessaire à l'architecture nucléaire, à la bonne ségrégation des chromosomes dans les cellules filles et à la réplication complète des chromosomes. Le Prix Nobel de Médecine 2009 a été attribué à Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider et Jack W. Szostak pour leurs travaux sur la compréhension des télomères et la découverte de la télomérase. La majorité de ces travaux ont été effectués dans des organismes modèles, incluant la levure *S. cerevisiae*.

1.3.1 La structure et les protéines des télomères :

L'ADN télomérique est composé de plusieurs répétitions d'une séquence courte en tandem dont l'un des brins est riche en Guanine (G) et d'un brin complémentaire riche en

Cytosine (C). La séquence de chaque répétition, soit TTAGGG chez l'humain ou la séquence hétérogène 5'T (G₁₋₃)3' chez la levure reflète la séquence de la matrice de l'ARN associée à la télomérase. Les différentes espèces étudiées ont montré que les fonctions et la structure générale des télomères sont conservées; toutefois, la longueur des répétitions télomériques est variable de 300 pb chez la levure *S. cerevisiae* à plusieurs kilobases chez les mammifères. L'ADN télomérique est formé par une région d'ADNdb dont le brin riche en Guanine se prolonge par une extension 3' simple-brin. Cette extension 3' simple-brin sert, d'une part, comme amorce pour l'élongation par la télomérase et d'autre part, comme un site de liaison des protéines télomériques qui coiffent les extrémités des chromosomes en les protégeant de tous les aspects de la DDR. Chez les cellules des mammifères, cette extension 3' d'ADNsb va envahir la portion double-brin du télomère en formant une structure particulière appelée T-loop. Cette dernière protège les télomères de la dégradation par les nucléases et l'activation de la voie de dommages à l'ADN (Griffith et al, 1999). Chez les cellules humaines, le complexe qui protège les télomères est un complexe multiprotéique appelé shelterine, composé de 6 sous-unités (Palm & de Lange, 2008) (Figure 1.5). Les protéines de ce complexe sont : TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2), TIN2 (TRF1 Interacting Nuclear protein 2), RAP1 (Repressor Activator Protein 1), les protéines POT1 (Protection Of Telomere 1) et TPP1 (TIN2 and POT1 interacting Protein 1). TRF1 et TRF2 lient directement les répétitions télomériques double-brin TTAGGG grâce à leur domaine Myb et sont reliés par la protéine TIN2. Contrairement aux protéines TRF1 et TRF2, POT1 est capable de lier les répétitions télomériques simple-brin en utilisant les deux domaines *OB-fold* (oligonucleotide /oligosaccharide binding). La liaison de TPP1 sur POT1 et son interaction avec TIN2 établit un lien entre l'ADNdb et simple-brin. Rap1 est recrutée au télomère *via* son interaction avec la protéine TRF2. La réduction de l'expression d'un seul composant de ce complexe conduit à la déprotection des extrémités des chromosomes et à l'activation de DDR aux télomères (Denchi & de Lange, 2007).

La levure *S. cerevisiae* ne possède pas du complexe comme la shelterine, mais elle possède des protéines qui lient les extrémités chromosomiques, telles que Rap1, yKu70/80 et le complexe CST (Cdc13-Stn1-Ten1) (Figure 1.6). L'ADN télomérique double-brin est recouvert par la protéine Rap1 qui lie la séquence télomérique 5'T (G₁₋₃) 3' et assure chez la



Figure 1.6: Schéma simplifié de la structure nucléoprotéique du télomère chez *S.cerevisiae*. La protéine Rap1 se fixe sur les répétitions d'ADN télomérique double-brin et interagit avec les protéines Rif1 et Rif2 pour contrôler la longueur des télomères. Le complexe Cdc13-Stn1-Ten1 se lie à l'ADN télomérique simple-brin. L'hétérodimère yKu se lie à la jonction entre l'ADN simple-brin et double-brin. Figure adaptée de (Teixeira, 2013).

Dans cette section, je décrirai la structure des télomères et le rôle des protéines télomériques dans la maintenance des télomères ainsi que dans l'inhibition de l'activation du signal de dommages à l'ADN chez la levure.

1.3.1.1 La structure des télomères chez *S.cerevisiae*

En amont des répétitions télomériques, vers le centromère, on trouve différentes séquences répétitives d'ADN. Chez la levure, deux familles de répétitions se retrouvent exclusivement dans les régions sous-télomériques, soit les éléments X et Y' (Figure 1.7). L'élément Y' se retrouve dans près de 50% des télomères et leur nombre varie entre une à quatre copies. L'élément X est présent dans toutes les régions sous-télomériques chez la levure et existe sous deux formes majeures: 5,2 et 6,7 kb. Les régions X et Y' participent activement à la réplication des télomères puisqu'elles contiennent les dernières ARS responsables de la réplication des extrémités des chromosomes. En fait, il a été montré que les chromosomes linéaires qui n'ont pas de répétitions télomériques ont une faible stabilité et se perdent au cours de la division cellulaire (Lundblad & Szostak, 1989). En revanche, la génération d'un chromosome qui ne contient pas les éléments X et Y' montre une grande stabilité et les

cellules peuvent se diviser (Sandell & Zakian, 1993). Finalement, les régions télomériques sont dépourvues de nucléosomes et sont protégées grâce à une structure particulière appelée télosome (Wright et al, 1992).

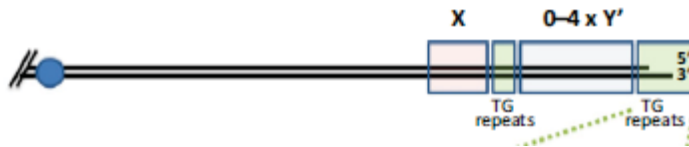


Figure 1.7: Schéma simplifié de la structure télomérique chez *S. cerevisiae* (Kupiec, 2014).

1.3.1.2 Les protéines télomériques et leurs rôles dans la maintenance des télomères et l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN:

1.3.1.2.1 Rap1 :

Rap1 est une protéine essentielle très abondante (4000 molécules dans une cellule haploïde). Elle se lie à l'ADN télomérique double-brin avec une grande affinité *via* ses 2 domaines Myb (Konig et al, 1996). Rap1 joue plusieurs rôles aux télomères : il prévient la fusion télomère-télomère en inhibant la réparation par NHEJ (Pardo & Marcand, 2005), détermine la localisation du télomère à la périphérie nucléaire (Laroche et al, 1998), protège les extrémités des chromosomes et contrôle aussi la longueur des télomères (Marcand et al, 1999; Negrini et al, 2007). En fait, il a été proposé que l'ancrage de Rap1 près d'un télomère induit son raccourcissement, mettant en évidence un rôle négatif de cette protéine dans la régulation de la longueur des télomères (Marcand et al, 1999). Les fonctions télomériques de Rap1 se trouvent dans la région C-terminale, laquelle interagit avec les protéines Rif1 et Rif2, et avec le complexe SIR (Graham et al, 1999). Finalement, Rap1 est utilisé comme un marqueur de position des télomères *in situ* et *in vivo* (Gallardo et al, 2008; Palladino et al, 1993).

1.3.1.2.2 Rif1 et Rif2 :

L'utilisation de la méthode de double hybride chez la levure a permis d'isoler deux facteurs Rif (Rap1 interacting factor), soit Rif1 et Rif2, qui interagissent avec la région C-terminale de Rap1 (Wotton & Shore, 1997). La délétion du gène *RIF1* affecte la taille des télomères, ceux-ci étant rallongés de 200 à 300 pb. De la même façon, Rif2 révèle aussi une fonction similaire à Rif1; toutefois, la délétion de deux gènes génère une hyperélongation de la taille des télomères allant de 600 pb jusqu'à 2,5 kb. Ces données mettent en évidence des fonctions différentes de Rif1 et Rif2 dans la régulation de la taille de télomères (Wotton & Shore, 1997). En fait, il a été suggéré que Rif1 est essentielle à la viabilité des cellules qui présentent un défaut de protection du télomère à cause de la réduction de l'activité du complexe CST (Anbalagan et al, 2011). Cette étude met en évidence un rôle de soutien de Rif1 aux fonctions du complexe CST. La fonction de Rif2 au télomère sera détaillée ci-après.

Par ailleurs, comme l'ADN télomérique ressemble à la moitié d'un chromosome cassé, une des principales fonctions des télomères est de coiffer ces extrémités pour empêcher leur reconnaissance par la machinerie de la réparation d'ADN. Les deux protéines Rif1 et Rif2 jouent un rôle important dans ce processus. En utilisant l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et un essai qui permet de mesurer et de quantifier la génération d'ADNsb (QAOS : *quantification of amplification of single-stranded DNA*), le laboratoire du Dr. David Shore a pu montrer que les protéines Rif1/2 agissent par deux mécanismes différents pour empêcher l'activation de DDR au niveau d'un télomère court. En effet, la délétion de *RIF2* au niveau d'un télomère court augmente fortement la génération de l'ADNsb comparativement aux cellules sauvages. En revanche, la délétion de *RIF1* augmente le recrutement du complexe RPA d'une manière indépendante de la génération de l'ADNsb (Ribeyre & Shore, 2012).

1.3.1.2.3 L'hétérodimère yKu70/80 :

Nous avons précédemment décrit que l'hétérodimère yKu70/80 est impliqué dans la réparation de CDB par la voie de NHEJ. Étant donné que la NHEJ est inhibée aux télomères, il était surprenant que le complexe yKu70/80 fasse partie des composantes du télomère et joue un rôle important dans la maintenance des télomères (Porter et al, 1996). La délétion de la

sous-unité *yKU70* entraîne un raccourcissement des télomères à environ 100 pb avec une augmentation de la longueur du brin riche en G, suggérant alors que le complexe yKu protège les télomères de l'activité exonucléase, surtout en phase G1 (Porter et al, 1996). La délétion de la ligase IV qui catalyse la jonction des deux fragments d'ADN n'a aucun effet sur la longueur des télomères, suggérant ainsi que le rôle de yKu dans la maintenance des télomères est indépendant de son rôle dans la NHEJ (Teo & Jackson, 1997). En plus de la protection des télomères, l'hétérodimère yKu possède d'autres fonctions au télomère : il se lie à la télomérase et jouera un rôle important dans le recrutement de cette enzyme au télomère, surtout en phase G1 (Fisher et al, 2004). Ce complexe permet également l'ancrage des télomères à la périphérie nucléaire (Laroche et al, 1998). Dans cette étude, il a été suggéré que la délétion de la sous-unité *yKu70* ou *yKu80* affecte la position périnucléaire des télomères; ces derniers forment des foci qui se trouvent dispersés dans le nucléoplasme des cellules *ykuΔ* par rapport aux foci périnucléaires des cellules sauvages. D'autres rôles du complexe yKu dans la maintenance des télomères seront discutés en détail ci-après.

1.3.1.2.4 Le complexe CST (Cdc13-Stn1-Ten1):

Le troisième complexe conservé est composé des trois sous-unités Cdc13 (*Cell Division cycle 13*), Stn1 (*Suppressor of cdc Thirteen*) et Ten1 (*Telomeric pathway with Stn1*). Cdc13 lie spécifiquement l'ADN télomérique simple-brin riche en TG₁₋₃, d'une longueur minimale d'au moins 11 nucléotides *in vitro* (Hughes et al, 2000; Lin & Zakian, 1996; Nugent et al, 1996). La liaison du complexe CST au télomère joue un rôle essentiel pour la fonction de coiffe. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle du complexe CST dans la protection de l'ADN télomérique de l'attaque exonucléolytique. La perte de la fonction de la coiffe en utilisant un allèle sensible à la température *cdc13-1* entraîne la dégradation du brin télomérique riche en cytosine et un arrêt du cycle cellulaire dépendant de la kinase Rad9 (Garvik et al, 1995; Lydall & Weinert, 1995; Vodenicharov & Wellinger, 2006). La liaison spécifique de Cdc13 à l'ADN simple-brin riche en G se fait grâce à son domaine *OB-fold* central alors que son homodimérisation au télomère requiert son domaine *OB-fold* de la région N-terminale (Mitton-Fry et al, 2004; Nugent et al, 1996). En plus de la fonction de la coiffe, la région N-terminale de Cdc13 contient un domaine du recrutement de la télomérase

(Recruitment Domain, RD) et un autre domaine qui interagit aussi avec Pol1, une composante du complexe de l'ADN polymérase α afin de répliquer le brin allongé par la télomérase pour former un ADN télomérique double-brin (Grandin et al, 2000; Nugent et al, 1996). L'interaction de Cdc13 avec le complexe Stn1-Ten1 se fait *via* la région C-terminale de Cdc13, alors que la délétion de cette région entraîne une hyperélongation des télomères, mettant en évidence que le complexe Stn1-Ten1 joue le rôle d'un régulateur négatif de l'élongation des télomères (Chandra et al, 2001).

Par ailleurs, le complexe CST est structuralement similaire au complexe RPA (Nugent et al, 1996). Il a été suggéré que la liaison spécifique du complexe CST à l'ADN télomérique simple-brin empêche l'accumulation du complexe RPA et, par conséquent, inhibe le recrutement des protéines de la recombinaison et de l'activation de la cascade du point de contrôle (Khadaroo et al, 2009; Lydall, 2009). Possiblement, c'est la raison pour laquelle les protéines qui sont recrutées par le complexe RPA au CDB, telles que Rad52, Rad51, Mec1 et Rad24, n'ont pas un rôle détectable dans la régulation de la longueur des télomères. Par exemple, la délétion de *RAD52* ou *RAD51* n'affecte pas la taille des télomères, alors que la délétion de *MEC1* entraîne un raccourcissement très léger des télomères (Le et al, 1999; Longhese et al, 2000). Toutefois, dans les cellules où les télomères sont dégradés (par exemple, dans le cas des cellules déficientes de l'activité de la télomérase), la résection de l'ADN télomérique peut continuer jusqu'à la région sous-télomérique, ce qui favorise la liaison de RPA à cette région puis, subséquentement, le recrutement de Mec1, Rad52 et des autres protéines de la RH (Khadaroo et al, 2009).

1.3.2 L'élongation des télomères par la télomérase :

1.3.2.1 La télomérase :

Ce que l'on connaît de la machinerie de réplication conventionnelle, incapable de synthétiser l'extrémité de molécules d'ADN linéaires comme les chromosomes eucaryotes, laissait supposer que les télomères devaient subir des pertes de leur séquence terminale au fil des cycles de réplication. Pour compenser la perte de l'ADN télomérique, la majorité des cellules eucaryotes utilise une enzyme qui s'appelle la télomérase. En 1989, Lundblad et

Szostak imaginèrent un crible génétique chez la levure *S. cerevisiae* destiné à identifier des gènes dont l'activité est nécessaire à l'action de la télomérase *in vivo*. Ils ont identifié pour la première fois la sous unité Est1 (*ever shorter telomeres 1*) (Lundblad & Szostak, 1989). Les cellules *est1Δ* se caractérisent par une perte lente et progressive des répétitions télomériques, ce qui engendre une instabilité chromosomique, une élongation dramatique du cycle cellulaire et la mort cellulaire après 50 à 100 générations. L'ensemble de ces phénotypes est appelé la sénescence réplivative (Lundblad & Szostak, 1989). De la même façon, un criblage similaire a identifié trois gènes, pour qui la délétion (*EST2* ou *EST3*) ou mutation (*EST4*, qui correspond à Cdc13) donnent le même phénotype de sénescence réplivative (Lendvay et al, 1996). Finalement, Singer et Gottschling ont mis en place un crible génétique dans le but d'identifier des facteurs qui, lorsque surexprimés, induiraient la perte de l'effet de la position de télomères (TPE) chez la levure *S. cerevisiae*. Ce criblage a permis l'identification du gène *TLC1* (*Telomerase component 1*), le composant ARN de la télomérase (Singer & Gottschling, 1994). Contrairement aux sous-unités Est (Est1, Est2 et Est3), l'immunoprécipitation de Cdc13 ne conduit pas à la détection de l'ARN *TLC1*, ce qui met en évidence que la protéine Cdc13 ne fait pas partie du complexe télomérasiq (Hughes et al, 2000).

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) qui possède une activité rétrotranscriptase et qui porte sa propre matrice d'ARN, appelée *TLC1* chez la levure et hTR chez l'humain. Cet ARN sert de squelette pour l'assemblage des composants protéiques du complexe (Figure 1.8). Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Est2 (hTERT chez l'humain) est responsable de l'activité catalytique. Elle contient la fonction de rétrotranscriptase et est accompagnée des sous-unités régulatrices Est1 et Est3, qui sont accessoires à l'activité catalytique *in vitro*, mais essentielles *in vivo*. La télomérase est exprimée d'une manière constitutive chez la levure *S. cerevisiae*, bien que son expression dans les cellules humaines soit limitée aux cellules germinales, immunitaires et les tissus en haute prolifération

1.3.2.2 L'ARN *TLC1*, squelette et matrice de la télomérase:

L'ARN *TLC1* fait partie de la classe des ARN non codants, dont la seule fonction connue à ce jour est son implication dans la maintenance des télomères. La longueur de cet

ARN est de 1157 nucléotides, plus long que celui des mammifères (450 nt) et celui des ciliés (160 nt) (Singer & Gottschling, 1994). La réduction de la taille de l'ARN *TLC1* de 1157 à 384 a montré que cet ARN est toujours fonctionnel *in vivo* (Zappulla et al, 2005). Ces données suggèrent que l'ARN *TLC1* contient des régions essentielles et d'autres moins importantes, qui sont utilisées pour l'assemblage ou pour sa régulation fine. Cet ARN se structure en trois domaines ou "bras", et contient aussi en son centre un domaine pseudo-noeud qui est essentiel pour l'activité de la télomérase (Figure 1.8). Ce domaine contient la région de la matrice pour le rétro-transcription et il interagit avec la sous-unité catalytique Est2 (Dandjinou et al, 2004; Zappulla & Cech, 2004). Les trois bras de l'ARN *TLC1* agissent comme un squelette, lequel recrute les différentes protéines (Est1, yKu70/80 et le complexe protéique Sm). La protéine Est1 lie à l'ARN *TLC1* via une structure conservée formé par une tige-boucle de nucléotides 589 à 660 sur la tige IVc (Figure 1.8); cette liaison est essentielle pour l'activation et le recrutement de la télomérase *in vivo* (Seto et al, 1999). De la même manière, les 48 derniers nucléotides d'une tige boucle interagissent avec yKu, ce qui permet l'accumulation nucléaire de l'ARN *TLC1* et l'association de la télomérase aux télomères en phase G1 (Fisher et al, 2004; Gallardo et al, 2008). En effet, la délétion d'*YKU70* ou l'abolition de son interaction avec l'ARN *TLC1* dans le mutant *yku80-135i* ou *tlc1Δ48* entraîne une accumulation cytoplasmique de cette ARN et un raccourcissement des télomères (Gallardo et al, 2008; Williams et al, 2014a). Le troisième bras ou bras terminal de *TLC1* est lié par les protéines Sm, qui sont responsables de la maturation et de la protection des extrémités 3' des petits ARN nucléaire (snRNA) et nucléolaire (snoARN). La délétion de la région liant les protéines Sm sur l'ARN *TLC1* entraîne une baisse drastique du niveau d'ARN *TLC1* dans les cellules et un raccourcissement des télomères par rapport aux cellules sauvages, suggérant ainsi que l'association des protéines Sm à l'ARN *TLC1* est importante pour son accumulation (Seto et al, 1999).

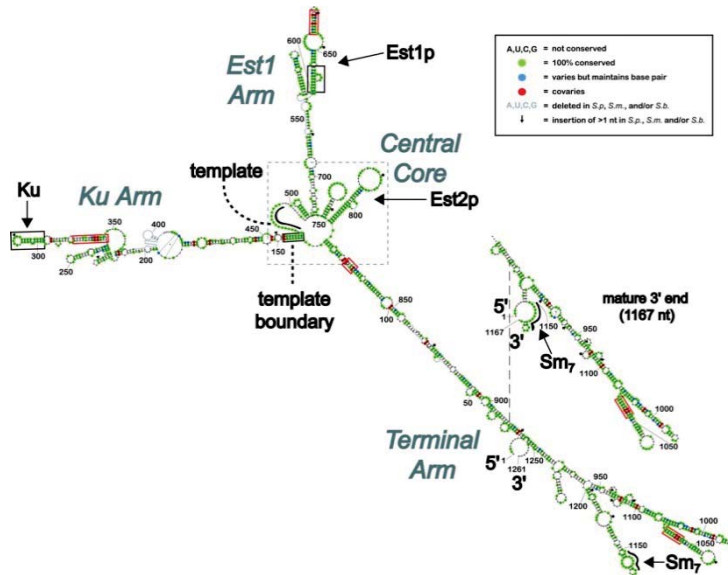


Figure 1.8: Structure secondaire de l'ARN *TLC1* mettant en évidence les sites de liaisons des protéines Est, du complexe yKu et les protéines Sm sur l'ARN *TLC1*. Les données phylogénétiques pour chaque nucléotide ont permis l'alignement de l'ARN *TLC1* pour différentes espèces de *Saccharomyces*. Les nucléotides marqués en vert montrent un fort taux de conservation (Zappulla & Cech, 2004).

À l'équilibre, il y a environ 30 molécules d'ARN *TLC1* par cellule, un composant qui est moins exprimé par rapport aux protéines Est1, Est2 et Est3, mettant en évidence que l'ARN *TLC1* est le facteur limitant pour la formation du complexe ribonucléoprotéique de la télomérase (Mozdy & Cech, 2006; Tuzon et al, 2011). Contrairement aux autres facteurs qui interagissent directement avec l'ARN *TLC1*, la liaison d'Est3 à l'ARN *TLC1* ne se fait pas d'une manière directe. En fait, il a été suggéré que l'association de Est3 à l'ARN *TLC1* dépend d'Est1 et Est2 (Osterhage et al, 2006). La purification d'Est1 et Est3 montre une interaction directe entre ces deux protéines à la fin de la phase S, ce qui pourrait expliquer le rôle activateur d'Est1. Cependant, l'interaction d'Est3 avec l'ARN *TLC1* en phase G1 est dépendante de la protéine Est2 (Tuzon et al, 2011). La fonction précise d'Est3 au télomère est inconnue, cependant, la présence d'un domaine *OB-fold* au niveau d'Est3 qu'est structurellement similaire au domaine *OB-fold* de la protéine TPP1 suggère un rôle similaire à TPP1. En effet, le complexe POT1-TPP1 joue le rôle d'un facteur de processivité de la télomérase au télomère (Wang et al, 2007).

1.3.2.3 La biogénèse de la télomérase :

Même si les facteurs associés à l'activité télomérasique et à sa régulation sont bien caractérisés, la biogénèse de cette enzyme reste mal connue. À cause du faible nombre de copies de l'ARN *TLC1*, les premières études cytologiques visant à détecter cet ARN *in situ* chez la levure n'ont été réalisées qu'en condition de surexpression, mais elles ont apporté des informations suggérant un trafic intracellulaire de cet ARN (Teixeira et al, 2002). Avec l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur la forme endogène de l'ARN *TLC1* de la levure *S. cerevisiae*, notre laboratoire et récemment l'équipe du Dr. Krebber ont pu étudier en détail son trafic et proposer un lien avec la biogénèse de la télomérase (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). L'ARN *TLC1* est transcrit en fin de la phase G1/début S par l'ARN polymérase II sous la forme d'un précurseur contenant une coiffe mono-méthyle guanosine et une queue poly A, comme un ARN messager (Chapon et al, 1997; Dionne et al, 2013) (Figure 1.9). L'ARN *TLC1* avec la queue poly A ne constitue que 5 à 10% de l'ARN *TLC1* total, alors que 90% à 95% de l'ARN *TLC1* total est dépourvue de poly A. La génération de la forme mature de l'ARN *TLC1*, laquelle est dépourvue de la queue poly A à partir du précurseur, nécessite l'intervention du complexe exosome. L'action de ce dernier est permis en présence d'un site de liaison intact des protéines Sm (Coy et al, 2013) (Figure 1.9). La maturation initiale de l'ARN *TLC1* se fait dans le nucléole. Dans ce compartiment, l'action de la méthyltransférase Tgs1 permet la formation d'une coiffe tri-méthyle guanosine (Franke et al, 2008). La délétion du gène *TGS1* résulte en une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1*, ce qui révèle qu'une étape de la maturation de l'ARN *TLC1* réside dans le nucléole (Gallardo et al, 2008; Seto et al, 1999). De la même façon, l'ARN *TLC1* s'accumule aussi dans le cytoplasme après délétion de l'une des protéines Est (Est1, Est2 ou Est3) ou d'un composant du complexe yKu (yKu70 ou yku80), ce qui suggère une phase cytoplasmique pour l'ARN *TLC1* durant la biogénèse de la télomérase (Gallardo et al, 2008).

L'export nucléaire de la forme mature de l'ARN *TLC1*, laquelle possède une coiffe tri-méthyle guanosine et qui est sans queue polyA, dépendent en partie de la voie Crm1/Xpo1, la voie principale d'export des ARN non codants chez la levure (Moy & Silver, 2002). En fait, il a été montré que l'utilisation d'un mutant thermosensible de Crm1 (*xpo1-1*) dans des cellules

qui contiennent la délétion de la sous-unité *YKU70* augmente fortement l'accumulation nucléaire de l'ARN *TLC1* comparativement à une accumulation cytoplasmique dans les cellules *yku70Δ* (Gallardo et al, 2008). Crm1/Xpo1 exporte la majorité des protéines nucléaires contenant une séquence NES (séquence d'export nucléaire), en général riche en Leucine et Valine, mettant alors en évidence que l'association de Crm1/Xpo1 à l'ARN *TLC1* se fait par l'intermédiaire d'un cofacteur, lequel contiendrait une séquence NES (Figure 1.9). Toutefois, aucun défaut du raccourcissement des télomères n'a été rapporté pour les mutants Crm1/Xpo1. Ce résultat suggère que l'export nucléaire de l'ARN *TLC1* par cette voie n'est pas la seule qui est impliquée dans le transport de cette ARN ou n'est pas essentielle à l'assemblage d'une télomérase fonctionnelle. Pour distinguer entre ces deux possibilités, Wu et al. (2014) ont montré qu'en plus de Crm1/Xpo1, la machinerie d'export d'ARNm intervient aussi dans l'export nucléaire de l'ARN *TLC1*.

En général, l'export nucléaire d'un ARNm est amorcé par le complexe hétérodimère Mex67-Mtr2 qui s'attache à l'ARNm et procède à son transport *via* le complexe du pore nucléaire (NPC) (Tieg & Krebber, 2013). Cette étude a montré que les deux voies (Crm1/Xpo1 et la machinerie d'export d'ARNm) interagissent par l'intermédiaire de l'ARN *TLC1* pour transporter cet ARN d'une manière coopérative. L'inhibition de l'une de ces deux voies n'entraîne aucun défaut dans la formation de la télomérase ni dans l'élongation des télomères. Par contre, l'inhibition de ces deux voies entraîne un blocage de l'export nucléaire de l'ARN *TLC1*, un défaut de la formation de la télomérase et en conséquence un raccourcissement des télomères (Wu et al, 2014). Après son export nucléaire, l'ARN *TLC1* s'associerai avec les différentes composantes (Est1, Est2, Est3 et yKu70/80) dans le cytoplasme, puis le complexe est réimporté au noyau par les importines Kap122 et Mtr10. Une fois dans le noyau, l'ARN *TLC1* se retrouvera associé avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire (Gallardo et al, 2008).

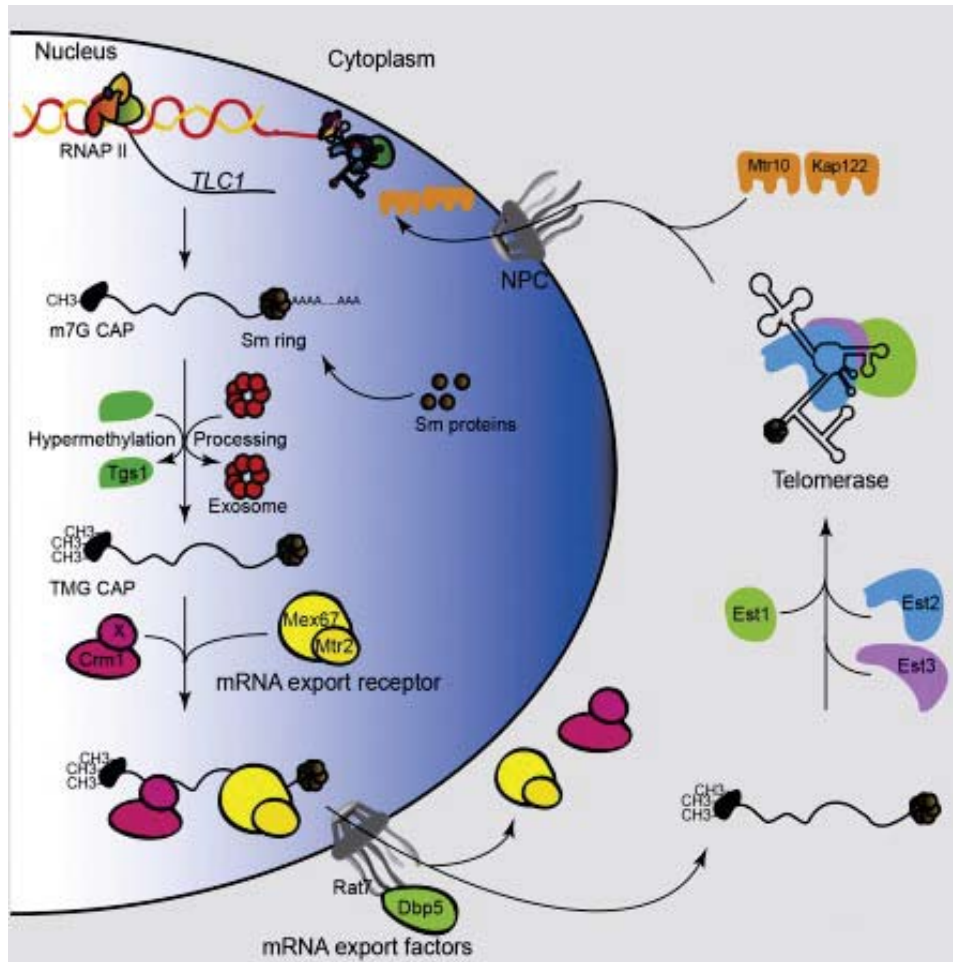


Figure 1.9: Modèle de la biogenèse de la télomérase. L'ARN *TLC1* est transcrit dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase II (RNAPII). Après son association avec les protéines Sm, le complexe nucléaire de l'exosome intervient pour enlever la queue polyA. L'ARN *TLC1* passe ensuite au nucléole, où se trouve la méthyltransférase Tgs1 pour générer la coiffe tri-méthyle guanosine. La forme mature de *TLC1* est ensuite exportée au cytoplasme *via* les NPC par l'intervention de l'exportine Crm1/Xpo1 et le complexe Mex67-Mtr2. L'association de Crm1 avec *TLC1* se fait *via* une protéine adaptatrice qui contient une séquence NES. Au niveau de la face cytoplasmique du NPC, l'action de l'hélicase Dbp5/Rat8 et l'hydrolyse du GTP par RanGAP déplacent respectivement le complexe Mex67-Mtr2 et Crm1 en relâchant l'ARN *TLC1* dans le cytoplasme. La maturation cytoplasmique de la télomérase requiert l'association de plusieurs protéines, incluant Est1, Est2, Est3 et yKu. La télomérase mature est réimportée au noyau par les importines Kap122 et Mtr10 (Wu et al, 2014).

1.3.3 Recrutement de la télomérase aux télomères court en fin de la phase S:

1.3.3.1 La reconnaissance d'un télomère court:

En 2004, le laboratoire du Dr. Lingner a montré que ce n'est pas la totalité des télomères qui étaient allongés dans un cycle cellulaire et que seulement 7 à 10 % de ceux-ci sont rallongés (Teixeira et al, 2004). Ce résultat a suggéré que ce n'est pas tous les télomères qui s'allongent dans chaque cycle cellulaire et que le recrutement de la télomérase se fait préférentiellement à certains télomères. D'autre part, des études génétiques ont montré un rôle centrale de Tel1 et du complexe MRX dans l'accessibilité de la télomérase aux télomères (Longhese et al, 2000; Ritchie et al, 1999). D'une manière similaire à la CDB, la présence d'une relation d'épistasie entre les mutants *tell1Δ* et *mrxΔ* a été démontré, indiquant que Tel1 et MRX participent à une même voie de régulation de la taille des télomères (Ritchie & Petes, 2000). L'association du complexe MRX se fait préférentiellement avec les télomères courts (Hirano et al, 2009; McGee et al, 2010a), et plusieurs groupes ont détecté aussi une association préférentielle de la télomérase et de la kinase Tel1 avec les télomères courts d'une façon dépendante de Xrs2 (Arneric & Lingner, 2007; Bianchi & Shore, 2007; Hector et al, 2007; Sabourin et al, 2007). Ainsi, des expériences de CHIP ont montré une augmentation du recrutement des protéines Est1 et Est2 à un télomère court à la fin de la phase S, bien que ce recrutement soit faible au télomère sauvage. Cette préférence de liaison d'Est1 et Est2 au télomère court est perdue dans un mutant *tell1Δ*. Cependant, l'association des facteurs Cdc13, yKu, Rif1 et Rif2 n'est pas augmentée à un télomère court comparativement à un télomère sauvage (Sabourin et al, 2007). D'autre part, Hirano et al, ont découvert la présence d'une compétition entre Rif2 et la kinase Tel1 pour la liaison à la région C-terminale de Xrs2. Les expériences de co-IP ont montré que la partie C-terminale de Xrs2 interagit avec la partie N-terminale de Rif2 (Hirano et al, 2009). De manière intéressante, l'interaction de Rif2 sur un télomère court diminue de moitié comparativement à un télomère sauvage (McGee et al. 2010), ce qui favoriserait l'accumulation de Tel1 et, par conséquent, le recrutement de la télomérase. Ces données suggèrent que d'une manière similaire à la CDB, un télomère court

est reconnu de façon précoce par la complexe MRX qui favorise ensuite le recrutement de la kinase Tel1 (McGee et al, 2010a) (Figure 1.10).

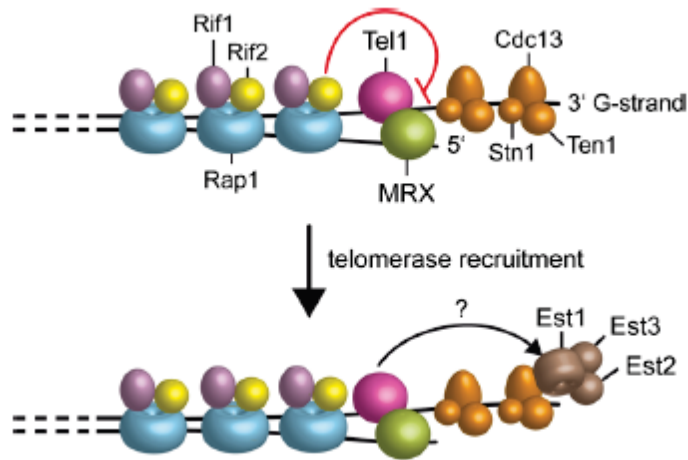


Figure 1.10: Illustration du recrutement de la télomérase au télomère.

Les télomères courts sont reconnus par le complexe MRX, qui favorise ensuite le recrutement de Tel1. Tel1 induit à son tour le recrutement de la télomérase au télomère possiblement à travers la phosphorylation d'un substrat qui n'est pas encore identifié. Cette étape se produit préférentiellement au télomère court. Au télomère long, Rif2 inhibe l'association de Tel1 avec le complexe MRX en compétitionnant sur la liaison de Tel1 avec Xrs2 (Bonetti et al, 2013).

1.3.3.2 L'interaction Cdc13-Est1 est essentielle pour le recrutement de la télomérase à un télomère court :

Des études génétiques, utilisant des expériences de fusion de protéines entre la protéine Cdc13 ou son domaine de liaison d'ADN (^{DBD}Cdc13) avec différentes protéines de la télomérase (Est1 ou Est2), ont pu montrer le rôle clé de la protéine Est1 dans le recrutement de la télomérase au télomère. En fait, la délétion d'*EST1* dans les cellules portant la fusion ^{DBD}Cdc13-Est2 produit une élévation des télomères et supprime la sénescence répliquative des cellules *est1Δ*, suggérant que la protéine Est1 est dispensable dans la

maintenance des télomères des cellules portant la fusion^{DBD}Cdc13-Est2 (Evans & Lundblad, 1999). D'autre part, la découverte d'une forme inactive de Cdc13, l'allèle *cdc13-2*, a permis de clarifier le rôle clé de Cdc13 dans la maintenance des télomères par la voie de la télomérase. Les cellules *cdc13-2* se caractérisent par un raccourcissement des télomères et un phénotype de sénescence répllicative *in vivo*. Ceci peut-être dû à l'absence du recrutement de la télomérase au télomère. Ainsi, des expériences de CHIP montrent que le recrutement d'Est2 est aboli dans les cellules *cdc13-2* (Taggart et al, 2002). De manière intéressante, la sénescence répllicative des cellules *cdc13-2* est supprimée par une mutation dans le gène *EST1* (*est1-60*), qui entraîne lui-même un phénotype de sénescence répllicative (Nugent et al, 1996; Pennock et al, 2001a). La suppression du phénotype du mutant *cdc13-2* par le mutant *est1-60* suggère une restauration de l'interaction directe entre ces deux protéines. En accord avec ces données *in vivo*, la purification de Cdc13 et Est1 a montré que les deux protéines forment un complexe de 1:1 *in vitro* suggérant une interaction directe entre ces deux protéines (Wu & Zakian, 2011). L'ensemble de ces données met en évidence un modèle du recrutement de la télomérase *via* l'interaction directe entre Cdc13 et Est1 (Figure 1.10).

Contrairement à Cdc13, la protéine CTC1 des cellules des mammifères ne joue pas de rôle dans le recrutement de la télomérase au télomère; cette fonction est assurée par le complexe TPP1-POT1, lequel recrute la télomérase *via* une interaction entre TPP1 et la sous-unité catalytique hTERT (Nandakumar et al, 2012).

1.3.3.3 Recrutement de la télomérase au télomère court se fait en fin de la phase S

Afin d'étudier la phase du cycle cellulaire dans laquelle la télomérase peut se recruter et allonger les télomères, le laboratoire du Dr Gottschling a développé un essai de formation de télomère *de novo*. Dans cet essai, un site HO a été introduit adjacent à 81 répétitions télomériques TG. Après expression de l'endonucléase HO, cette CDB ne peut pas être réparée par la voie de la RH puisque le gène *RAD52* est délété. En utilisant cet essai, le même laboratoire a observé que la télomérase est capable d'allonger les répétitions télomériques en

phase G2/M, mais non pas en phase G1 du cycle cellulaire (Diede & Gottschling, 1999). Des expériences de ChIP ont par la suite été utilisées pour déterminer la dépendance du cycle cellulaire pour le recrutement des différents facteurs qui sont essentiels à l'activité de la télomérase *in vivo* (Taggart et al, 2002). Dans cette étude, il a été montré que les deux facteurs Cdc13 et Est2 s'associent avec les télomères durant tout le cycle cellulaire, bien que leurs niveaux de recrutement au télomère augmente à la fin de la phase S proportionnellement à l'apparition d'une longue extension 3' riche en G. Chez la levure *S.cerevisiae*, l'extension 3' de l'ADN télomérique simple-brin est de 12 à 14 nucléotides durant tout le cycle cellulaire, bien que sa longueur augmente de 30 à 100 nucléotides à la fin de la phase S (Larrivee et al, 2004; Wellinger et al, 1993). La génération de cette extension en fin de la phase S est effectuée par les mêmes facteurs (MRX, Sae2, Exo1 et Sgs1-Dna2) qui assurent la résection de CDB (Bonetti et al, 2009).

À l'inverse de Cdc13 et Est2, les deux sous-unités Est1 et Est3 interagissent avec un télomère court seulement à la fin de la phase S. Ces résultats suggèrent la présence de deux voies où la télomérase est recrutée au télomère. Une voie en G1 *via* l'interaction entre le complexe yKu et l'ARN *TLC1* (yKu-ARN *TLC1*-Est2), puisque le recrutement de la sous unité catalytique Est2 au télomère est fortement réduit dans le mutant *yku70Δ* ou *tlc1-48Δ* (Fisher et al, 2004); une autre voie à la fin de la phase S, par l'intermédiaire de l'interaction entre Cdc13 et Est1 (Chan et al, 2008; Taggart et al, 2002). Toutefois, la raison pour laquelle la télomérase est présente au télomère en phase G1 alors qu'elle n'est pas active aux télomères dans cette phase du cycle cellulaire n'est pas claire.

1.3.3.4 Recrutement de la télomérase et les modifications post-traductionnelles

Comme nous avons décrit précédemment à propos des modifications post-traductionnelles qui régulent l'interaction RPA-Rad52 à la CDB, l'interaction Cdc13-Est1 est aussi sujette à ces modifications. En fait, il a été montré que la phosphorylation de Cdc13 sur le résidu thréonine 308 était dépendante de Cdk1 et jouait un rôle important dans

le recrutement de la télomérase aux télomères en fin de la phase S/début de phase G2 (Li et al, 2009) (Figure 1.11). Cette phosphorylation, laquelle se trouve dans le domaine du recrutement de la télomérase de Cdc13, favorise l'interaction entre Cdc13 et Est1 alors que son absence réduit cette interaction et augmente l'association de Cdc13 avec le complexe Stn1-Ten1. En revanche, la sumoylation de Cdc13 sur la lysine 909 par les SUMO E3 ligases Siz1 et Siz2 favorise l'interaction entre Cdc13 et le complexe Stn1-Ten1 en empêchant le recrutement de la télomérase au télomère au début de la phase S (Hang et al, 2011) (Figure 1.11). Cette étude a mis en évidence que la sumoylation de Cdc13 perturbe la phosphorylation de Cdc13 et empêche le recrutement de la télomérase avant que la réplication d'ADN ne soit complétée.

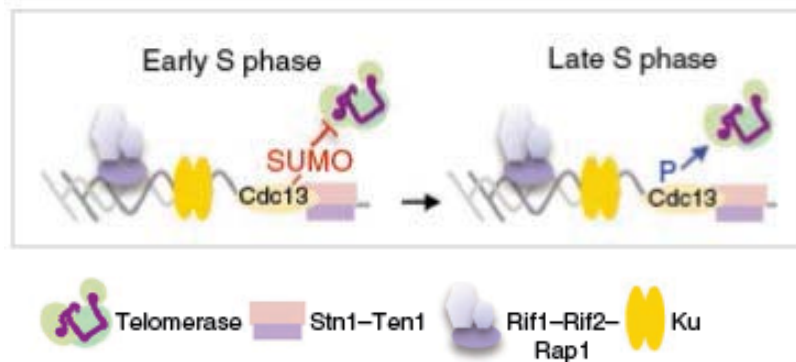


Figure 1.11 : illustration des modifications post-traductionnelles de Cdc13 participant à la régulation de la télomérase en fonction de la progression du cycle cellulaire (Hang et al, 2011)

1.3.4 La fin de l'élongation des télomères par la télomérase :

Après l'élongation des télomères courts, la télomérase est relâchée par l'intervention d'un régulateur négatif de son activité: l'hélicase Pif1 (Figure 1.12). Pif1 est une hélicase d'ADN qui fonctionne dans le sens 5' au 3' et appartient à une famille d'hélicases très conservée de la levure aux humains (Bochman et al, 2010). Pif1 pourrait dissocier les hybrides ADN/ADN, mais agit plus efficacement sur les hybrides ADN/ARN (Boule & Zakian, 2007). Il a été proposé que Pif1, à travers son activité hélicase, peut dissocier l'hybride formé entre

l'ARN *TLC1* et l'ADN télomérique simple-brin en prévenant l'action de la télomérase au télomère (Boule et al, 2005; Zhou et al, 2000) (Figure 1.12). En accord avec ces données, la délétion de *PIF1* entraîne une hyperélongation des télomères, et inversement, sa surexpression induit un phénotype du raccourcissement (Schulz & Zakian, 1994). Le mutant *pif1K264A*, n'ayant plus d'activité ATPase/hélicase, présente le même phénotype que le mutant *pif1Δ*, montrant que ce phénomène est bien dépendant de l'activité hélicase de Pif1. Il a été mis en évidence que l'allongement des télomères observé dans un mutant *pif1Δ* est dépendant de la télomérase. En effet, la délétion de *PIF1* dans un mutant *tlc1Δ* n'a aucun effet sur la longueur des télomères. En revanche, cet effet est indépendant du processus de recombinaison (Zhou et al, 2000). Pif1 est présent dans la cellule sous deux formes, une forme mitochondriale et une forme nucléaire. La réduction de la forme nucléaire de Pif1 *via* l'utilisation d'un mutant qui s'appelle *pif1-m2* entraîne un allongement des télomères alors qu'un mutant de la forme mitochondriale de Pif1, *pif1-m1*, est sans effet, suggérant alors que la forme nucléaire empêche l'élongation des télomères par la télomérase (Schulz & Zakian, 1994).

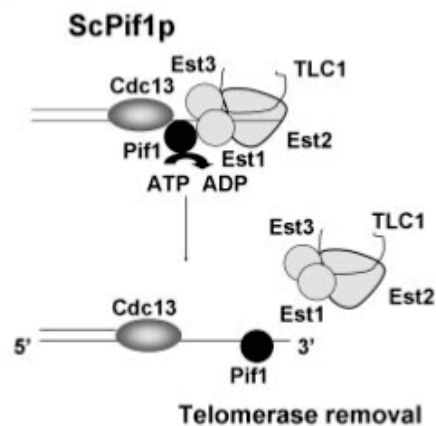


Figure 1.12: Illustration de l'action de l'hélicase Pif1 au télomère (Boule & Zakian, 2006).

1.4 L'ajout d'un nouveau télomère à une CDB

En plus des différentes voies de réparation des CDBs (NHEJ, HR et MMEJ), les CDBs peuvent aussi être réparées par l'action de la télomérase, un phénomène qui s'appelle «telomere healing» ou formation de télomères *de novo*. Ce phénomène conduit dans la plupart

du temps à la mort cellulaire chez les cellules haploïdes ou à la perte de l'hétérozygotie (LOH: perte de l'allèle secondaire du gène) dans les cellules diploïdes (Ribeyre & Shore, 2013b). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'absence des éléments X et Y' des régions sous-télomériques n'affecte pas la stabilité des chromosomes, ce qui suggère que la réparation de la CDB par la télomérase permet la stabilisation et la protection de la nouvelle extrémité du fragment chromosomique contenant le centromère et la délétion de la partie terminale. Cette délétion est due au fait que l'autre fragment non centromérique est souvent perdu ou recombiné dans le génome (Pennaneach et al, 2006).

La stabilisation des CDBs par la formation de télomères *de novo* a été observée dans plusieurs organismes, de la levure à l'humain, incluant la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*. Cette dernière est dépourvue de l'activité de la télomérase et maintient ses télomères par des transposons (Harrington & Greider, 1991; Kramer & Haber, 1993). Les premières études sur la formation de télomères *de novo* ont été effectuées dans la levure *S.cerevisiae* en utilisant l'essai de formation de télomères *de novo* (Diede & Gottschling, 1999; Kramer & Haber, 1993; Mangahas et al, 2001a; Schulz & Zakian, 1994). Dans ces études, il a été montré que dans approximativement 98% des cas, l'extrémité de la cassure qui ne contient pas de répétitions TG se répare par la voie de la RH, alors que la formation de télomères *de novo* ne présente qu'une petite portion des événements de réparation, et ce même en absence de *RAD52*. Cette conclusion a été confirmée par l'observation que la formation de télomères *de novo* est un événement rare dans les cellules haploïdes contenant une CDB (Myung & Kolodner, 2003).

Chez l'humain, la délétion de la partie terminale des chromosomes est souvent observée dans les cellules tumorales et elle a aussi été détectée dans approximativement 10% des maladies génétiques associées aux aberrations chromosomiques (Pennaneach et al, 2006). Par exemple, la délétion terminale du chromosome 16 est associée à un déficit de la chaîne de globine-alpha dans l'hémoglobine (les alpha thalassémies) et celle du chromosome 22, laquelle est observée chez les patients ayant un retard mental, a clairement montré que ces délétions sont formées par un ajout direct d'un télomère à des séquences non-télomériques (Flint et al, 1994; Varley et al, 2000; Wong et al, 1997). Chez ces patients, l'ajout des répétitions

TTAGGG se produit dans les cellules germinales, quand la télomérase est active. De la même façon, une étude récente chez *Drosophila melanogaster*, en utilisant le méganucléase I-SceI pour induire une CDB à proximité d'un télomère, a montré que la formation de télomères *de novo* est très efficace dans cet organisme (Beaucher et al, 2012).

1.4.1 Les sites préférentiels pour la formation de télomères *de novo* :

La formation de télomères *de novo* au niveau d'une CDB est un évènement non aléatoire. En effet, il a été observé que la réparation d'une CDB par l'ajout d'un télomère *de novo* est dépendante seulement de la présence d'une séquence télomérique (Kramer & Haber, 1993). L'utilisation de l'essai de GCR (Figure 1.13), lequel a été développé par le laboratoire du Dr. Kolodner, a pu identifier les séquences préférées pour la formation d'un télomère *de novo* (Chen & Kolodner, 1999). En effet, le séquençage de 534 points de jonction de type ajout de télomères *de novo* dans une région de 12 kb du chromosome V a mis en évidence une grande préférence de la télomérase pour les séquences riches en dinucléotides GT, TG ou GG, avec une longueur de 3 à 6 pb. Cette longueur est courte par rapport la taille de 11 nucléotides requise pour la liaison de Cdc13 à l'ADNsb *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la formation d'un télomère *de novo* se produit dans des régions qui possèdent des séquences avec une grande homologie à la séquence de la matrice de l'ARN *TLC1* (Chung et al, 2010; Kramer & Haber, 1993; Mangahas et al, 2001a; Putnam et al, 2004). Les premiers nucléotides ajoutées à ces points de jonctions sont toujours les mêmes et correspondent à une partie de la matrice de l'ARN *TLC1*. En plus, les analyses de séquences des points de jonction de l'ajout de télomères à la CDB ont démontré que l'élongation par la télomérase au niveau de ces sites de cassures se produit *via* des étapes successives d'hybridation/élongation/dissociation, révélant que l'hybridation de l'ARN *TLC1* est une étape essentielle pour la formation de télomères *de novo* à la CDB (Putnam et al, 2004).

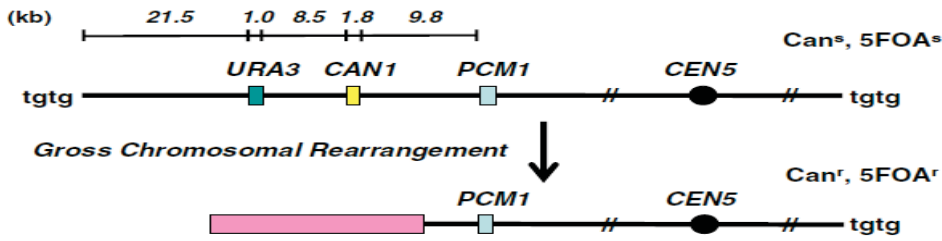
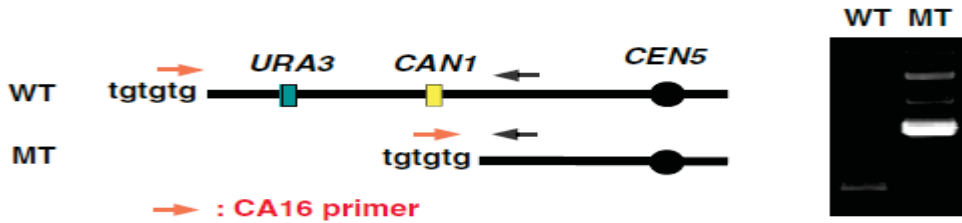
A**B**

Figure 1.13: Représentation schématique du bras gauche du chromosome V utilisé pour caractériser le taux de GCR de type ajout de télomères *de novo*. **A**- Le chromosome V contient deux marqueurs (*URA3* et *CAN1*) dont leur expression entraîne une sensibilité des cellules à l'action des analogues 5-FOA et L-Canavanine, respectivement. Les cellules qui perdent ces deux marqueurs deviennent résistantes à ces composés. Étant donné que la souche utilisée dans l'essai de GCR est haploïde, elle ne peut pas perdre tout le chromosome V qui contient des gènes essentiels. Par conséquent, l'analyse des points de jonction après la formation de GCR montre qu'ils se produisent toujours dans une région de 12kb qui correspond à la région entre le gène *CAN1* et le gène essentiel *PCM1*. La détermination de points de jonction s'effectue par PCR en utilisant 23 paires d'amorces couvrant toute la région entre *PCM1* et *CAN1*. **B**- Pour déterminer le type de GCR qui est responsable d'une délétion terminale suivie par la formation de télomères *de novo*, l'ADN chromosomique des cellules WT et mutées (MT) sont sujet à une PCR en utilisant un primer (CA_{16}) qui s'hybride avec les séquences télomériques et une autre amorce qui s'hybride avec une séquence dans la partie restante du chromosome V de clone GCR (MT). Le produit de PCR sera ensuite purifié, séquencé et comparé avec la séquence du bras gauche du chromosome V disponible sur le site de SGD (<http://www.yeastgenome.org>). Le point de jonction est défini comme étant la première région d'incompatibilité entre la séquence isolée et la séquence dans la base de données. adapté de (Motegi & Myung, 2007).

1.4.2 Recrutement de la télomérase sur une CDB:

Afin de déterminer si l'interaction Cdc13-Est1 joue un rôle dans le recrutement de la télomérase à une CDB, Bianchi et ses collègues ont ciblé les protéines Cdc13 et Est1 au niveau d'une CDB grâce à l'insertion d'une région comportant quatre séquences UAS (Upstream Activation Sequence, i.e séquences cibles de la protéine Gal4) adjacente à une CDB et à 13 kb du télomère du bras gauche du chromosome VII. Le domaine de fixation de la protéine Gal4 (GBD pour "Gal4 binding domain") a été fusionné à la protéine Cdc13 ou Est1 en région N- terminale, permettant le ciblage de Cdc13 ou Est1 au niveau des séquences UAS adjacentes à la CDB (Bianchi et al, 2004). Quoique l'ajout de télomères *de novo* soit un évènement rare chez la levure, l'attachement artificiel de Cdc13 ou Est1 au site de cassure augmente fortement la réparation par la formation d'un télomère *de novo*. À l'inverse des cellules sauvages, la télomérase n'était pas recrutée et était incapable de réparer ces cassures dans le mutant *cdc13-2* ou *est1-60*, suggérant que l'interaction Cdc13-Est1 est le facteur limitant pour la formation de télomères *de novo* (Bianchi et al, 2004).

1.4.3 Les mécanismes contrôlant la formation de télomères *de novo*:

Afin de limiter l'action de la télomérase au niveau d'une CDB, plusieurs mécanismes ont été mis en place pour empêcher la formation de télomères *de novo* et favoriser la réparation par les autres voies (NHEJ ou HR). Ces mécanismes sont dépendants respectivement de l'hélicase Pif1, la phosphorylation de Cdc13 par la protéine kinase Mec1 et la résection de la CDB (Figure 1.14).

1.4.3.1 L'hélicase Pif1:

En plus de sa fonction dans l'exclusion de la télomérase du télomère, Pif1 est aussi capable d'inhiber le recrutement de la télomérase à une CDB et prévenir la formation de télomères *de novo*. Ainsi, la délétion de *PIF1* augmente le taux de GCR de 1000 fois par

rapport aux cellules sauvages. Contrairement à la délétion d'autres gènes, laquelle conduit à différents types de réarrangements (délétion, translocation, duplication), l'absence de *PIF1* conduit seulement à une augmentation de la formation de télomères *de novo* (Myung et al, 2001). La délétion des gènes qui codent pour les composantes de la télomérase (*EST1*, *EST2*, *EST3*, *TLC1*) ou les gènes qui sont requis pour l'action normale de la télomérase (*CDC13*, *YKU70*, *YKU80*) réduit le taux de GCR des mutants *PIF1* au même niveau que celui des cellules sauvages, suggérant que l'ajout de télomères *de novo* dans un mutant *pif1Δ* nécessite la présence de la télomérase. En fait, le mutant *cdc13-2* diminue le taux de GCR d'un mutant *pif1-m2* à un taux similaire à celui des cellules sauvages (Myung et al, 2001). De la même façon, un mutant *yku80-135i* présente une grande réduction de formation de télomères *de novo* après induction de dommages à l'ADN par ajout de méthyl méthane sulphonate (MMS) (un agent de méthylation de l'ADN) (Stellwagen et al, 2003a).

De plus, une étude effectuée par le laboratoire du Dr. Elizabeth Blackburn a montré que la voie principale de la signalisation des dommages à l'ADN ATR/Mec1-Rad53-Dun1 régule l'action de la télomérase sur la CDB *via* la phosphorylation de Pif1 sur les résidus thréonine 763 et sérine 766. Ainsi, l'inactivation de cette signalisation dans certains mutants tels que *sml1Δ mec1Δ*, *rad53Δ* ou bien dans les mutants de phosphorylation *pif1-T763A/S766A* résulte en une augmentation de l'ajout de télomères *de novo* (Makovets & Blackburn, 2009). Cette phosphorylation de Pif1 ne conduit pas à son recrutement à la CDB, puisque la délétion de *RAD53* n'affecte pas le recrutement de Pif1 à la CDB, suggérant alors que le recrutement de Pif1 se fait d'une manière indépendante de la voie de signalisation des dommages à l'ADN. D'autre part, la phosphorylation de Pif1 n'a aucun effet sur la longueur des télomères puisque le mutant *pif1-T763A/S766A* possède la même longueur de télomères que les cellules *PIF1* sauvages.

1.4.3.2 La phosphorylation de Cdc13 par la kinase Mec1:

Dans le but d'identifier des gènes qui réduisent l'ajout de télomères *de novo* dans une souche *pif1Δ*, un criblage génétique a été effectué par le laboratoire du Dr. Daniel Durocher. Ce dernier a identifié *RRD1* (un homologue du gène PTPA humain), lequel joue le rôle

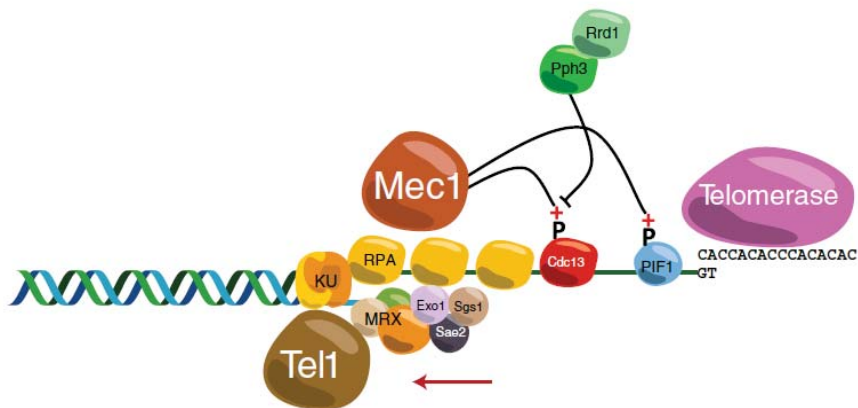


Figure 1.14: Illustration des mécanismes qui contrôlent la formation de télomères de *nov* chez la levure *S.cerevisiae* en absence de répétition TG adjacent à la CDB (Ribeyre & Shore, 2013b).

d'activateur de la protéine phosphatase 2A (PP2A), comme un régulateur potentiel de l'ajout de télomères à des CDBs (Zhang & Durocher, 2010). D'un point de vue mécanistique, Zhang et Durocher ont montré que dans le cas où une CDB est irréparable par les autres voies de réparation, la protéine Rrd1, *via* l'activation de la phosphatase Pph3, agit pour déphosphoryler la protéine Cdc13 sur le résidu Sérine 306 (Figure 1.14). Cette déphosphorylation se fait seulement au niveau d'une cassure dont la longueur de la séquence TG est inférieure à 11 nucléotides. Ainsi, l'accumulation de Pph3 au site de la CDB cible localement la protéine Cdc13, ce qui permet sa déphosphorylation, son accumulation à la CDB et par la suite, la formation de télomères *de novo*. Toutefois, dans le cas où la CDB peut se réparer par les autres voies, la phosphorylation de Cdc13 sur la S306 par la protéine kinase Mec1 antagonise la déphosphorylation effectuée par Rrd1/Pph3 en inhibant l'accumulation de Cdc13 au site de la CDB et par conséquent la formation de télomères *de novo*. De façon intéressante, cette étude a montré que l'hélicase Pif1 et la phosphorylation de Cdc13 par Mec1 sur le résidu S306 agissent en collaboration pour empêcher l'ajout d'un télomère de *nov*. L'ensemble de ces données met en évidence que Mec1 prévient ainsi le recrutement de la télomérase à une CDB

par deux mécanismes différents: l'inhibition de la liaison de Cdc13 et la stimulation de l'activité de Pif1.

1.4.3.3 La résection de la CDB:

Dernièrement, il a été montré que l'inhibition partielle de la résection d'une CDB par la double délétion des gènes *EXO1* et *SGS1* augmente la fréquence de l'ajout de télomères *de novo*, révélant ainsi que l'altération de la résection augmente la probabilité de la réparation des CDBs par la télomérase (Chung et al, 2010; Lydeard et al, 2010). Les résultats de ChIP montrent que la formation de télomères *de novo*, après induction de l'endonucléase HO dans le mutant *exo1Δ sgs1Δ*, est due à une augmentation du recrutement de Cdc13. Le séquençage des extrémités de la CDB dans le mutant *exo1Δ sgs1Δ* montre que la majorité des événements de formation de télomères *de novo* se produit dans une région de 1,5 kb après le site de cassure. Cependant, ces événements de formation de télomères *de novo* se produisent avant cette région dans un mutant *exo1Δ sgs1Δ pif1-m2*. Étant donné que la résection de la CDB dans le mutant *exo1Δ sgs1Δ pif1-m2* est la même par rapport au mutant *exo1Δ sgs1Δ*, ces résultats mettent en évidence que l'hélicase Pif1 et la résection peuvent agir par différents mécanismes pour empêcher l'ajout d'un télomère à la CDB (Chung et al, 2010).

1.5 Hypothèses et objectifs de la thèse :

Les résultats présentés dans cette thèse tenteront de répondre à deux questions différentes. La première concerne le rôle potentiel de la RH et plus particulièrement celui de son facteur clé, la protéine Rad52, dans la localisation et le recrutement de la télomérase à des CDBs et sera le point de focalisation de la thèse. La seconde question porte sur le rôle de Nsr1, un homologue de la nucléoline humaine, dans le trafic de l'ARN *TLC1* et la biogénèse de la télomérase.

Premièrement, l'ajout de télomères *de novo* est un phénomène qui n'est pas bien compris, surtout au niveau de son inhibition pour maintenir la stabilité génomique. La plupart des études sur la compréhension des mécanismes intervenant dans la régulation de ce processus ont été effectuées en utilisant des méthodes directes telles que le ChIP et Southern blot, à des sites de cassure définis. Ces techniques mesurent, respectivement, le recrutement des composantes de la télomérase (Est2 et/ou Est1) et l'ajout d'un télomère au niveau d'une CDB induite par l'endonucléase HO. Ces approches ont permis de découvrir les détails des différents mécanismes régulant l'ajout de télomères *de novo*, et ont montré que la position d'une CDB dans le chromosome et la présence des répétitions TG adjacentes à la CDB peuvent influencer l'efficacité du recrutement de la télomérase et la formation de télomères *de novo*. Par conséquent, d'autres techniques sont requises pour étudier le comportement, la dynamique et le recrutement de la télomérase à des CDBs qui sont aléatoires dans le génome.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, en plus de son rôle dans l'inhibition de l'activité de la télomérase au télomère, Pif1 joue un rôle important dans la stabilité du génome *via* l'inhibition de la formation de télomères *de novo*. En plus de Pif1, plusieurs évidences suggèrent un rôle clé de la machinerie de la RH et, plus particulièrement, de la protéine Rad52, dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*. Par exemple, la double délétion d'*EXO1* et *SGS1* affecte partiellement la réparation des CDBs par la voie de la RH, ce qui conduit à une augmentation de la fréquence de formation de télomères *de novo* (Chung et al, 2010). De même, la délétion de *RAD52* dans un fond génétique *pif1-m2* entraîne une forte

augmentation de la formation de télomères *de novo* par rapport au mutant *pif1Δ* ou *pif1-m2* (Myung et al, 2001). Par contre, un rôle direct de Rad52 dans le contrôle de l'ajout de télomères *de novo* n'a pas encore été démontré.

À mon arrivée au laboratoire, des études effectuées sur le trafic de l'ARN *TLC1* au cours du cycle cellulaire montraient un lien entre ce trafic et la réparation de CDB. L'utilisation de la technique de FISH a pu identifier la présence d'un trafic intranucléaire du facteur limitant de la télomérase, l'ARN *TLC1*. En effet, l'ARN *TLC1* adopte une localisation nucléoplasmique avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire, alors qu'il s'accumule au nucléole en phase G2/M. Étant donné que la RH est exclue du nucléole et se déroule uniquement dans le nucléoplasme (Torres-Rosell et al, 2007), notre hypothèse était que l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole en phase G2/M pourrait réduire la compétition entre la télomérase et la machinerie de la RH pour la réparation des CDBs. L'objectif de la première partie de ma thèse était de clarifier le rôle de ce trafic dans la régulation de l'activité de la télomérase à des CDBs et de caractériser le rôle de la machinerie de RH dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*.

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées au laboratoire afin de comprendre la biogénèse de la télomérase et identifier les facteurs qui sont impliqués dans ce processus. Nos travaux ont montré précédemment qu'une étape dans la maturation et la biogénèse de la télomérase implique le passage de l'ARN *TLC1* par le nucléole (Gallardo et al. Embo J, 2008). Cependant, le facteur impliqué dans le ciblage de l'ARN *TLC1* vers ou hors du nucléole reste inconnu. Un candidat potentiel serait la protéine Nsr1, un homologue de la nucléoline humaine, qui est une protéine nucléolaire impliquée dans la biogénèse des ribosomes et le trafic des snoARNs au nucléole. Elle possède deux domaines d'interaction avec l'ARN (RRM) et sa délétion engendre une élongation des télomères d'une manière dépendante de la télomérase (Gatbonton et al, 2006). Nous avons émis l'hypothèse que Nsr1 est impliqué dans le trafic de l'ARN *TLC1* et la biogénèse de la télomérase, ce qui expliquerait l'effet de sa délétion sur le maintien des télomères. L'objectif de la deuxième partie de ma thèse est de caractériser le rôle de Nsr1 dans le trafic de l'ARN *TLC1* et la maintenance des télomères.

Chapitre 2 : La protéine Rad52 contrôle la séparation spatiale de la télomérase aux sites de dommages à l'ADN

2.1 Présentation de l'article 1:

Ce premier article avait pour but de démontrer le rôle du trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* dans l'inhibition de la localisation et du recrutement de la télomérase à des CDBs. De même que le rôle de la machinerie de la RH, plus particulièrement de son facteur clé Rad52 dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*. Étant donné que l'hélicase Pif1 est impliquée dans la maintenance des télomères et l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*, nous avons d'abord vérifié quel était l'effet de la délétion du gène *PIF1* sur le trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire. Par la suite, nous avons étudié l'effet de l'absence de la réparation des CDBs par la voie de la RH (*via* la délétion du gène *RAD52*) sur la localisation et l'accumulation de l'ARN *TLC1* à des CDBs. Aussi, nous avons voulu voir quel serait l'effet des facteurs de la voie de dommages à l'ADN ainsi que ceux de la sumoylation sur la localisation de l'ARN *TLC1* à des CDBs dans les cellules *rad52Δ*. Enfin, nous avons effectué des études d'immunofluorescence et de la cinétique sur la protéine Cdc13 et l'ARN *TLC1* afin de vérifier si l'accumulation de Cdc13 à des CDBs serait responsable de la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme.

Ce premier manuscrit a été soumis à EMBO Journal et nous avons reçu les commentaires des examinateurs. Nous prévoyons le resoumettre après avoir ajouté les résultats des nouvelles expériences demandées.

Contribution des auteurs : pour cet article, j'ai effectué toutes les expériences de FISH, d'immunofluorescence et de colocalisation dans les cellules fixées et vivantes. J'ai analysé également toutes les données de la microscopie et j'ai préparé la majorité des souches. Concernant la rédaction, j'ai écrit le papier avec l'aide du Dr. Pascal Chartrand. Geneviève Morin, ma stagiaire d'été en 2011 a contribué à l'expérience de FISH de la figure 4. Maxime Lalonde a réalisé les essais de spot à la bléomycine de la figure 2.7B. Franck Gallardo, lequel a initié le projet, a contribué à l'expérience de la localisation de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire de la figure 2.1A.

2.2 Article 1

Rad52 controls the spatial segregation of telomerase from sites of DNA damage

Faissal Ouenzar, Geneviève Morin, Maxime Lalonde, Franck Gallardo, Pascal Chartrand*

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

Running title: *TLC1* RNA trafficking and DNA damage

2.2.1 Abstract

Telomerase can generate a novel telomere at a DNA break, with potentially lethal consequences for the cell. It remains unclear how the recruitment of telomerase at DNA double-strand breaks (DSBs) is suppressed. Here, we show that the budding yeast telomerase RNA (*TLC1* RNA) is spatially segregated to the nucleolus and excluded from sites of DNA repair by Rad52. During the cell cycle, *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G1/S, but localizes preferentially to the nucleolus in G2/M. In the presence of DNA damage, *TLC1* remains nucleolar in most G2/M cells. However, in *rad52Δ* cells, *TLC1* accumulates in the nucleoplasm and colocalizes with DSBs. The association of *TLC1* with DSBs depends on Cdc13, which rapidly accumulates at DNA damage sites. Rad52 suppresses this process by inhibiting Cdc13 accumulation at DSBs. Moreover, *TLC1* RNA trafficking is regulated by the SUMO ligase Siz1, which promotes *TLC1* RNA nucleoplasmic localization, but not Cdc13 accumulation at DSBs. This study reveals how the antagonist action of Rad52 on Cdc13 controls the spatial exclusion of telomerase from sites of DNA repair.

2.2.2 Introduction

DNA double-strand breaks (DSBs) are one of the most cytotoxic forms of DNA damage, and their repair is critical for maintenance of genome integrity and cell survival. Classically, two pathways of DSB repair have been defined: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). NHEJ, which occurs preferentially in G1, directly rejoins the DNA ends and often results in loss of genetic information at the break site (Moore & Haber, 1996; Takata et al, 1998). HR, which occurs during S and G2 phase, requires an homologous template for repair and generally preserves genetic information at the break site (Moore & Haber, 1996; Paques & Haber, 1999). The choice of DSB repair by the HR or NHEJ pathway is dictated in part by the presence or absence of 5'-to-3' resection, which generates 3' single-stranded DNA (ssDNA) tails at the DSB ends and commits DSB repair to HR.

In addition to HR and NHEJ, DSBs can be repaired by the action of telomerase at the break site, a phenomenon referred to as telomere healing or *de novo* telomere addition, which often leads to Gross Chromosomal Rearrangement (GCRs) (Kramer & Haber, 1993; Pennaneach et al, 2006). Telomere healing has been particularly well studied in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In yeast, telomerase is composed of an RNA moiety called *TLC1*, which contains the template sequence and acts as scaffold on which binds the catalytic reverse transcriptase Est2 and associated proteins (Est1, Est3, yKu70/80) (Counter et al, 1997; Lingner et al, 1997; Singer & Gottschling, 1994). Recruitment of telomerase to telomeres during S phase depends on the interaction between Est1 and the telomeric DNA single-strand binding protein Cdc13 (Bianchi et al, 2004; Bianchi & Shore, 2008; Pennock et al, 2001b).

Telomere healing events in yeast are suppressed by numerous mechanisms. One includes the 5'-3' DNA helicase Pif1 that acts as a potent inhibitor of telomere addition at telomeres and DSBs (Schulz & Zakian, 1994; Zhou et al, 2000). Pif1 deficient cells have over-elongated telomeres and a rate of telomere healing that is dramatically increased compared to wild-type cells (Myung et al, 2001). Pif1 is phosphorylated upon DNA damage in a Mec1-

dependent manner, and a phosphorylation-defective mutant of Pif1 (*pif1-4A*) displays an increased propensity to add telomeric repeats on an HO-induced DSB (Makovets & Blackburn, 2009). In addition to Pif1, the Mec1 kinase phosphorylates Cdc13 on its S306 residue, a phosphorylation event suggested to suppress Cdc13 recruitment to DSB ends that have little or no telomere-like sequences (Zhang & Durocher, 2010). However, recent evidence shows that these mechanisms are not sufficient to repress all Cdc13 and telomerase recruitment events at DSBs, since Cdc13 and telomerase subunits can be detected at a DSB by chromatin immunoprecipitation (ChIP), even if no telomere is added to the break (Chung et al, 2010; McGee et al, 2010b; Oza et al, 2009; Ribaud et al, 2012).

These results suggest a competition between *de novo* telomere addition and other repair pathways. Indeed, decreased resection by simultaneous deletion of *SGS1* and *EXO1* partially affects HR and increases *de novo* telomere formation via the recruitment of Cdc13 to the break site (Chung et al, 2010; Lydeard et al, 2010), suggesting that Cdc13 binding to DSB might be a limiting factor for telomere addition. In agreement with this, artificial binding of Cdc13 or Est1 subunit to an HO-induced DSB increases the repair of DSB by telomerase (Bianchi et al, 2004). Another factor involved in HR and which affects *de novo* telomere addition is Rad52, although its role in this process is controversial. Indeed, deletion of *RAD52* does not increase spontaneous telomere addition at HO-induced or spontaneous DSB in yeast (Kramer & Haber, 1993; Mangahas et al, 2001b; Myung et al, 2001). However, deletion of *RAD52* increases the frequency of telomere addition in subtelomeric regions (Ricchetti et al, 2003). Furthermore, the deletion of *RAD52* acts synergistically with a *pif1-m2* mutant to increase *de novo* telomere addition (Myung et al, 2001), suggesting a specific, but still unknown role for Rad52 in the suppression of telomere healing.

Previous studies on telomere healing were carried out using methods that measure telomerase recruitment or *de novo* telomere elongation at a single unrepaired endonuclease-induced DSB (Ribeyre & Shore, 2013a). While these approaches revealed extensive mechanistic details on this process, they also showed that sequences surrounding the DNA break and location of the break in the chromosome affect the efficacy by which telomerase recruitment and telomere healing can occur (Ribeyre & Shore, 2013a). However, novel

approaches are needed to study the behavior, dynamic and regulation of telomerase molecules in the presence of random breaks in the genome.

In this study, we address this question by visualizing the spatial distribution of telomerase molecules in the presence of random DSBs using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on endogenous *TLC1* RNA, the limiting component of telomerase in budding yeast. With this approach, we found that *TLC1* RNA is engaged in an intranuclear trafficking during the cell cycle, as it accumulates in the nucleoplasm in G1/S, while it localizes preferentially in the nucleolus in G2/M. This trafficking is linked to the presence of DNA damage, since treatment with the radiomimetic drug bleomycin increases the presence of *TLC1* RNA in the nucleoplasm in G2/M cells. Interestingly, this effect is dramatically increased in the absence of *RAD52*, as *TLC1* RNA is mostly excluded from the nucleolus and colocalizes with DSBs sites in the nucleoplasm of *rad52Δ* cells. We show that Rad52 suppresses the nucleoplasmic localization of *TLC1* RNA in G2/M by inhibiting Cdc13 accumulation at DSBs. In contrast, Rad51 positively influences *TLC1* RNA nucleoplasmic localization and Cdc13 accumulation at DSBs. Furthermore, we found that the SUMO E3 ligase Siz1, but not its homologue Siz2, regulates the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA without affecting Cdc13 accumulation at DSBs. Altogether, our data show that Rad52 acts antagonistically to Cdc13 to control the accumulation of Cdc13 at DSBs and spatially excludes telomerase from sites of DNA repair.

2.2.3 Results

***TLC1* RNA nuclear distribution varies during the cell cycle**

Previous studies used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to show that *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G1 and S phase, which is related to its function in telomere elongation (Gallardo et al, 2008; Teixeira et al, 2002). Since the telomerase RNA is the limiting component of the telomerase holoenzyme in yeast (Mozdy & Cech, 2006), its dynamics should reflect the dynamics of the active telomerase complex *in vivo* better than

other telomerase components. However, a systematic analysis of the distribution of *TLC1* RNA in each phase of the cell cycle has not yet been conducted. To do so, quantification of telomerase RNA in the nucleus of yeast cells at different phases of the cell cycle was performed using FISH on the endogenous *TLC1* RNA. Budding index was used to determine the cell-cycle phase of each cell. Beside *TLC1* RNA, the yeast nucleolus was detected using a probe against the *ITS1* ribosomal RNA spacer precursor, and the nucleoplasm was labeled using DAPI. While cells in G1 and S phase displayed a nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA foci, as previously reported (Gallardo et al, 2008), a predominantly nucleolar accumulation of *TLC1* RNA foci was observed in G2/M cells, as shown by colocalization with the *ITS1* ribosomal RNA precursor (Figure 2.1A-B).

To determine the factors required for intranuclear trafficking of *TLC1* RNA, we looked at the localization of *TLC1* RNA during the cell cycle in some mutant's background that are known to affect telomere length. One of these factors was Pif1, a 5'-3' helicase that act as a negative regulator of telomerase activity at telomeres and at DSB (Schulz & Zakian, 1994; Zhou et al, 2000). Deletion of *PIF1* leads to telomere elongation and de novo telomere addition. Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle in *pif1*Δ strain shows that deletion of *PIF1* prevents nucleolar accumulation of *TLC1* RNA at G2/M compared to WT cells (Figure 2.1B-C). In these cells, *TLC1* RNA still blocked in the nucleoplasm in all phases of the cell cycle (Figure 2.1C). This result suggests that Pif1 participates in the localization of *TLC1* RNA from nucleoplasm to nucleolus at G2/M.

Regulation of *TLC1* RNA nuclear trafficking by Rad52 after DNA damage

Given that *TLC1* RNA molecules accumulate preferentially in the nucleolus during G2/M, we hypothesized that the nucleolar localization of *TLC1* RNA could reduce the capacity of telomerase to interfere with HR to repair DSBs in G2/M (Diede & Gottschling, 1999). In the yeast *S. cerevisiae*, HR is mostly excluded from the nucleolus and DSBs in rDNA are repaired by HR outside of the nucleolus, suggesting that HR is exclusively nucleoplasmic (Lisby et al, 2003; Torres-Rosell et al, 2007). To test this hypothesis, the

distribution of *TLC1* RNA was determined by FISH after induction of DNA damage using bleomycin, a radiomimetic agent that preferentially generates DSBs (Chen & Stubbe, 2005). Yeast cells were exposed to 5 µg/ml of bleomycin for 180 min, conditions that cause 90% of the cells to have at least one DSB/cell (Supplementary Figure 2.1). Following treatment with bleomycin, FISH was performed to detect both *TLC1* and *ITS1* RNA. As shown in Figure 2.2A, *TLC1* RNA foci remained predominantly nucleolar in both bleomycin treated and untreated G2/M cells. However, quantification of the phenotypes revealed a small but significant accumulation of G2/M cells with *TLC1* RNA in the nucleoplasm in bleomycin treated cells (Figure 2.2B), suggesting that DNA damage modifies the intranuclear distribution of this RNA. To confirm the link between *TLC1* RNA accumulation in the nucleolus and repair of DSB in the nucleoplasm, HR was inhibited by deletion of *RAD52*. Surprisingly, the percentage of G2/M cells with nucleolar *TLC1* RNA foci decreased from 70% in wild type cells to 30% in *rad52Δ* cells treated with bleomycin, and most cells accumulated *TLC1* RNA foci predominantly in the nucleoplasm or in both compartments (Figure 2.2A-B).

To determine if the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in the presence of DSBs is due to its retention in the nucleoplasm or to its relocalization from the nucleolus to nucleoplasm, yeast cells were synchronized in G2 with nocodazole, followed by treatment with bleomycin. While nocodazole treated cells displayed *TLC1* RNA foci in the nucleolus, treatment with bleomycin still resulted in the redistribution of *TLC1* RNA foci toward the nucleoplasm in *rad52Δ* cells, suggesting a dynamic trafficking of this RNA between these two compartments (Figure 2.2C-D). Altogether, these results suggest that in cells containing DSBs, *TLC1* RNA can relocalize from the nucleolus to the nucleoplasm, and that its nucleolar retention depends on Rad52.

***TLC1* RNA colocalizes with DSB sites in the nucleoplasm**

To understand the significance of the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in DNA damaged cells devoid of Rad52, the colocalization between *TLC1* RNA and a cytological marker of DSBs was measured. Rfa1, the largest subunit of the heterotrimeric

complex RPA, was used as a marker, since it is recruited to DSBs and binds ssDNA generated by resection (Alani et al, 1992; Krogh & Symington, 2004). For this reason, Rfa1 is frequently used as a specific cytological marker for DNA end processing *in vivo* (Barlow et al, 2008; Gasior et al, 1998; Raderschall et al, 1999). Rfa1 was fused to GFP and, similarly to IR-induced DSBs, a single Rfa1-GFP focus was observed in cells treated with bleomycin, in both wild-type and *rad52Δ* cells (Figure 2.3A). FISH was performed on Rfa1-GFP *rad52Δ* cells to detect endogenous *TLC1* RNA after bleomycin treatment. In 70% of G2/M cells with nucleoplasmic *TLC1* RNA foci, none of the *TLC1* RNA foci colocalized with an Rfa1-GFP focus. In contrast, in 30% of the cells, one of the *TLC1* RNA foci colocalized with an Rfa1-GFP focus (Figure 2.3A). This percentage is higher than the colocalization of *TLC1* RNA foci with a random nuclear focus (corresponding to the *MDN1* transcription site), which occurs in only 9%±3 of the cells (data not shown).

It is possible that *TLC1* RNA nucleoplasmic foci that are not colocalized with a Rfa1-GFP focus could be associated with other DNA damage sites. To test this possibility, another cytological marker of DSB, γ -H2A, was combined with FISH on *TLC1* RNA. In contrast to Rfa1-GFP, γ -H2A form several foci in mammalian and yeast cells after DNA damage (Mazumder et al, 2013; Rogakou et al, 1999). In yeast, γ -H2A accumulation is a direct readout of Mec1 activity at a DSB (Ira et al, 2004). Simultaneous FISH against *TLC1* RNA and immunofluorescence with an antibody specific to γ -H2A was performed in cells treated or not with bleomycin. In these conditions, yeast cells exposed to 5 μ g/ml of bleomycin during 180 min contained between 2 and 4 γ -H2A foci per cell, while untreated cells did not contain any foci (Supplementary Figure 2.1 and Figure 2.3B). As observed with Rfa1-GFP, most *TLC1* RNA foci were in the nucleoplasm in *rad52Δ* cells treated with bleomycin, but only one *TLC1* RNA focus colocalized with one of the γ -H2A foci in 45% of the cells (Figure 2.3B). Altogether, these results show that *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm of bleomycin-treated *rad52Δ* cells, and only a fraction of *TLC1* molecules colocalize with a DSB in these cells.

***TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation after DNA damage depends on Cdc13 and the MRX complex, and is regulated by the DNA damage response pathway**

The observation that *TLC1* RNA molecules colocalize with only a fraction of the DSBs raises questions concerning the link between *TLC1* RNA trafficking and the DNA damage response. To confirm that *TLC1* RNA accumulation in the nucleoplasm depends on the DNA damage response, factors upstream of Rad52, like the MRX complex (Mre11 and Xrs2), the ATM-like kinase Tel1 and the ATR-like kinase Mec1 were deleted in *rad52Δ* background cells to test their ability to suppress the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA. As shown in Figure 2.4A, none of these deletions had any effect on the nucleolar distribution of *TLC1* RNA in G2/M cells in the absence of DSBs. After induction of DSBs, deletion of *MRE11* or *XRS2* completely suppressed the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells (Figure 2.4B). This result is consistent with a function of MRX complex in the processing of “dirty” DNA ends, such as those created after exposure to IR and bleomycin (Lobachev et al, 2002). However, deletion of either *TEL1* or *MEC1* only partially suppressed the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells, as this RNA accumulated in both nucleolus and nucleoplasm, with the deletion of *TEL1* showing a more pronounced effect (Figure 2.4B). These results suggest that Mec1 and Tel1 may have complementary roles in the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA upon DNA damage. Given the role of Tel1 in DNA resection, it is possible that Tel1 might regulate *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation by positively influencing the function of the MRX complex, as it was shown to do at telomeres (Martina et al, 2012). On the other hand, Mec1 may regulate *TLC1* RNA accumulation by decreasing Cdc13 binding and by phosphorylation of the telomerase inhibitor Pif1 at DSBs (Makovets & Blackburn, 2009; Zhang & Durocher, 2010).

The single-strand telomeric binding protein Cdc13 was previously shown to be essential for the recruitment of telomerase at DNA breaks (Bianchi et al, 2004). This was revealed by using the *cdc13-2* mutant, which disrupts the interaction between Cdc13 and the telomerase subunit Est1 (Nugent et al, 1996). We therefore tested the effect of the *cdc13-2* mutation on the distribution of *TLC1* RNA after DNA damage. In a wild-type *RAD52*

background, induction of DSBs in the *cdc13-2* strain reduced the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm compared to a wild-type strain (Supplementary Figure 2.2). This effect is even more striking in a *cdc13-2 rad52Δ* strain, as *TLC1* RNA did not accumulate in the nucleoplasm after exposure to bleomycin, showing that the *cdc13-2* mutation completely suppressed the *rad52Δ* phenotype (Figure 2.4B-C). This result suggests that the Cdc13-Est1 interaction is essential for nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage.

Cdc13 clusters increase after DNA damage and accumulate at DSB sites

The abovementioned results show that, in the absence of Rad52, Cdc13 plays a key role in the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after induction of DSBs. Recent work has shown that Cdc13 can be detected at a DSB by ChIP (Chung et al, 2010; McGee et al, 2010b; Oza et al, 2009; Ribaud et al, 2012). We therefore examined whether *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation is due to the accumulation of Cdc13 at DSBs in wild-type and *rad52Δ* cells. Endogenous Cdc13 was tagged with 13 myc epitopes, and immunofluorescence was performed to detect the distribution of myc-tagged Cdc13. In wild-type cells treated with bleomycin, Cdc13-13Myc accumulated as dim subnuclear foci in 20% of G2/M cells (Figure 2.5A-B). Surprisingly, deletion of *RAD52* increased the number of cells with Cdc13 foci to more than 85% (Figure 2.5B). These results were confirmed using a Cdc13-GFP fusion protein in living yeast cells, which revealed the presence of a Cdc13 focus in over 50% of *rad52Δ* cells after bleomycin treatment (Supplementary Figure 2.3). The Cdc13 foci formed in *rad52Δ* cells were 2- to 3-fold bigger and brighter compared to those observed in wild-type cells (Figure 2.5A and Supplementary Figure 2.4), likely reflecting an increased number of Cdc13 proteins associated with DSBs. To distinguish the larger Cdc13 foci observed in *rad52Δ* from the dimmer Cdc13 foci, we renamed the larger foci Cdc13 clusters. Notably, these clusters were only formed in *rad52Δ* cells in G2/M after DNA damage, with 65% of the cells containing one cluster and fewer cells containing 2 clusters (Figure 2.5D), suggesting that Rad52 inhibits Cdc13 clustering after induction of DSBs. However, we still detected Cdc13 foci in the same percentage of cells in both *rad52Δ* and wild-type cells (Figure 2.5C).

To determine if Cdc13 accumulates at DSBs after bleomycin addition, the DSB marker Rfa1 was used to investigate the colocalization between Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry in G2/M. Cdc13-GFP clusters colocalized with a Rfa1-mCherry focus in 70% of the cells (Figure 2.5E), indicating that Cdc13 accumulates at DSBs. To test if Cdc13 foci/clusters are also formed in the absence of another mediator of HR, such as Rad51, Cdc13 foci/cluster formation was measured in *rad51Δ* cells after bleomycin treatment. Indeed, a previous work had shown that Cdc13 recruitment to an irreparable HO-induced DSB is highly reduced in *rad51Δ* cells (Oza et al, 2009). Strikingly, both Cdc13 foci and clusters disappeared in *rad51Δ* cells (Figure 2.5B-C), while *TLC1* RNA accumulated in the nucleolus in those cells (Figure 2.5F), reflecting that Rad51 positively influences Cdc13 accumulation and *TLC1* RNA nucleoplasmic localization at DSBs. Altogether, these results show that nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA observed in *rad52Δ* cells is due to an increased accumulation of Cdc13 at DSBs, and that this accumulation of Cdc13 depends on the specific absence of Rad52.

Temporal analysis of Cdc13 foci formation and *TLC1* RNA localization at DNA damage sites

While the above data show that Cdc13 and *TLC1* RNA can accumulate at DSBs after induction of DNA damage, it is not clear if their association with DSBs is an early or late event during DNA repair. Indeed, a late recruitment of Cdc13 and *TLC1* RNA would probably suggest an indirect effect due to the absence of DNA repair at DSBs and the accumulation of longer strands of ssDNA. To answer this question, we measured the kinetics of accumulation of Cdc13 and *TLC1* RNA at DSBs in *rad52Δ* cells. Yeast cells were treated with bleomycin and culture samples were taken at different time points. Yeast cells were fixed with formaldehyde and processed for immunofluorescence and/or FISH. Immunofluorescence on Cdc13-myc showed that 50% of the cells already displayed a Cdc13 focus/cluster 30 minutes after induction of DNA damage (Figure 2.6A). The kinetics of Cdc13 foci/cluster formation were similar to the kinetics of accumulation of γ -H2A foci (Figure 2.6A), suggesting that

Cdc13 accumulated rapidly at DSB sites in the absence of Rad52. A refined analysis of Cdc13 accumulation at DSBs was performed by quantifying separately cells with Cdc13 foci or clusters over time. As shown in Figure 2.6B, the number of cells containing Cdc13 foci reached a peak at 30 minutes and stayed stable for the remaining of the treatment. Surprisingly, Cdc13 clusters also appeared in over 30% of the cells after 30 minutes of bleomycin treatment (Figure 2.6B). However, the number of cells containing a Cdc13 cluster still increased over time. These results show that Cdc13 clustering at DSBs is an early process after DNA damage in the absence of Rad52.

A similar kinetic analysis was performed on *TLC1* RNA using FISH, in which the nucleoplasmic/nucleolar distribution of this RNA was quantified at different time points after induction of DNA damage. Unlike γ -H2A foci, which accumulated rapidly after DNA damage (Figure 6A), the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA started later, between 30 and 60 minutes after bleomycin treatment, and reached a plateau after 120 minutes (Figure 2.6C). We do not think that the difference in the kinetics of *TLC1* RNA versus γ -H2A is due to the lower sensitivity of the FISH assay versus immunofluorescence, since single RNA molecules can be detected with this assay (Zenklusen et al, 2008). Interestingly, 30 minutes after induction of DNA damage, *TLC1* RNA remained in the nucleolus even if 50% of the cells contain Cdc13 foci/clusters (Figure 2.6A-C), indicating that the association of Cdc13 with the DNA break sites is not the limiting step for the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA.

These results show that nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA proceeds more slowly than the formation of Cdc13 foci/clusters. However, it is possible that a small number of *TLC1* RNA molecules may associate rapidly with a DSB, while the majority of *TLC1* RNA molecules still remain in the nucleolus. To test this possibility, colocalization of *TLC1* RNA with Rfa1-GFP was measured in *rad52 Δ* cells during a time course treatment with bleomycin. Surprisingly, early colocalization of a single *TLC1* RNA focus with the Rfa1-GFP focus was detected in 27 % of the cells 30 minutes after initiation of DNA damage (Figure 2.6D). At this time point, most *TLC1* RNA molecules remained outside of the DAPI-stained nucleoplasm (presumably in the nucleolus) in these cells. The colocalization between *TLC1* RNA and Rfa1-

GFP increased to nearly 40% of the cells after 60 minutes of bleomycin treatment, and remained stable afterward (Figure 2.6E). Altogether, these results suggest the presence of two steps in the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm after DNA damage. One early step, which leads to the accumulation of a small number of *TLC1* RNA molecules at a DSB, and a late step, which favors the global redistribution of *TLC1* RNA from the nucleolus to the nucleoplasm.

The E3 SUMO ligase Siz1 regulates the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage

The observation that *TLC1* RNA is excluded from the nucleolus and can accumulate at DSBs in the absence of Rad52 suggests a specific regulation of this trafficking during DNA damage. In order to identify regulators of the intranuclear trafficking of *TLC1* RNA, we focused on factors involved in sumoylation, a post-translational modification that regulates DNA damage repair. Indeed, mutation or depletion of sumoylation enzymes in yeast and human cells notably results in defects in DNA repair, including recombination abnormalities and impaired DSB repair (Branzei et al, 2006; Maeda et al, 2004). Furthermore, sumoylation is known to regulate Rad52 and DSBs nuclear distribution in yeast (Torres-Rosell et al, 2007). In budding yeast, three mitotic SUMO E3 ligases have been identified, including two homologous Siz proteins (Siz1 and Siz2) and the Mms21 subunit of the essential Smc5/6 complex (Johnson & Gupta, 2001; Zhao & Blobel, 2005). Several factors involved in telomere maintenance are known to be sumoylated, including Cdc13, which is a substrate of both Siz1 and Siz2 (Hang et al, 2011b). Interestingly, Cdc13 sumoylation increases after DNA damage, suggesting that Cdc13 activity may be regulated by SUMO during DNA damage (Hang et al, 2011b).

To determine if sumoylation regulates the spatial distribution of telomerase after DNA damage, *TLC1* RNA localization was determined in single mutant of two SUMO E3 ligases; *siz1Δ* and *siz2Δ*, in a *rad52Δ* background after treatment with bleomycin. In the absence of DNA damage, deletion of either *SIZ1* or *SIZ2* had no effect on the localization of *TLC1* RNA

to the nucleolus in G2/M (Figure 2.7A), suggesting that these SUMO E3 ligases do not regulate the cell-cycle dependent trafficking of *TLC1* RNA. Interestingly, during bleomycin-induced DNA damage, the deletion of *SIZ1*, but not *SIZ2*, completely suppressed the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA in a *rad52Δ* strain (Figure 2.7A). These results show that Siz1, but not Siz2, controls the spatial distribution of *TLC1* RNA after DNA damage.

To confirm the specificity of Siz1 over Siz2 in the response to bleomycin treatment, serial dilutions of *siz1Δ*, *siz2Δ* and *rad52Δ* strains were spotted on plates containing different concentrations of bleomycin. As shown in Figure 2.7B, deletion of *SIZ1*, but not *SIZ2*, increased the sensitivity of yeasts to bleomycin, although to a lesser extent than a *RAD52* deletion. To determine if *SIZ1* is in the same epistatic group as *RAD52*, the same experiment was repeated with serial dilutions of *siz1Δrad52Δ*, *siz2Δrad52Δ* and *rad52Δ* strains. The *siz1Δrad52Δ* strain showed the same sensitivity to bleomycin as a *rad52Δ* strain (Figure 2.7B), demonstrating that Rad52 is epistatic to Siz1.

Since Siz1 is known to promote Cdc13 sumoylation after DNA damage (Hang et al, 2011b), it may regulate Cdc13 clustering at DSBs and subsequent *TLC1* RNA trafficking during DNA damage. To test this hypothesis, immunofluorescence on Cdc13-myc was performed in *siz1Δrad52Δ* and *rad52Δ* strains after bleomycin treatment. Cdc13 clusters and foci still formed in the *siz1Δ rad52Δ* strain as in *rad52Δ* cells (Figure 2.7C and Supplementary Figure 2.5), suggesting that Siz1 is not involved in Cdc13 accumulation at DSB sites, but instead acts downstream of this process.

2.2.4 Discussion

In this study, we used a cytological approach to study *TLC1* RNA trafficking during the cell cycle and after induction of DNA damage. Our results demonstrate that *TLC1* RNA, the limiting component of telomerase, is engaged in an intranuclear trafficking during the cell cycle. In G1/S, *TLC1* RNA molecules are present in the nucleoplasm, while in G2/M they

accumulate predominantly in the nucleolus. We also show that this trafficking is linked to the presence of DNA damage, and that the key recombination protein Rad52 strongly controls this trafficking in the presence of DNA damage. Indeed, Rad52 specifically suppresses the accumulation of *TLC1* RNA molecules in the nucleoplasm and at DSBs generated by bleomycin by antagonizing the accumulation of Cdc13 at DNA breaks.

Deletion of *PIF1* gene leads to the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA at G2/M. The helicase Pif1 is known to remove telomerase from telomeres and DSB (Schulz & Zakian, 1994; Zhou et al, 2000). Impaired *TLC1* RNA intranuclear trafficking observed in *pif1* Δ cells could explain why *de novo* telomere addition and telomere elongation increased in those cells. Combining the *pif1-m2* mutation with a *rad52* mutation results in a synergistic increase in *de novo* telomere addition, with telomere addition in *pif1-m2 rad52* Δ strain approximately 13 times more frequent than in a *pif1-m2* strain (Myung et al, 2001). This finding indicates that Pif1 and Rad52 act independently to suppress telomere addition or telomerase recruitment at DSBs. In contrast to Pif1, the specific role of Rad52 in suppressing telomere healing is still unclear. Our work provides insights into this question as we show that in response to DNA damage, Rad52 inhibits the accumulation of Cdc13 at DSBs, which is essential for the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm and for its action in telomere healing (Myung et al, 2001). Cdc13 binds to TG-rich single-strand DNA, which is present at the ends of telomeres, but can also appear during the resection of DSBs (Chung et al, 2010). In the presence of Rad52, dim Cdc13 foci are visible in a small number of cells treated with bleomycin, and few G2/M cells display an accumulation of *TLC1* RNA in their nucleoplasm in these conditions. However, in the absence of Rad52, Cdc13 foci are bigger, more frequent in the yeast population, and these foci colocalize with DSBs. Since in these conditions, the Cdc13-Est1 interaction is essential for the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm (as revealed by the *cdc13-2* mutant), these results suggest that multiple Cdc13 molecules must be recruited at DSBs in order to recruit telomerase, which is in agreement with previous studies (Bianchi et al, 2004; Hirano & Sugimoto, 2007b).

This evidence suggests that Rad52 is the key factor of the HR pathway that suppresses Cdc13 accumulation at DSBs. Consistent with this, our data show that the heterotrimeric complex RPA, which also binds ssDNA and is more abundant than Cdc13, does not suppress Cdc13 accumulation at resected DSBs since Cdc13-GFP is not excluded from Rfa1-mCherry foci, which are formed at resected DSBs. Furthermore, the effect of a *RAD52* deletion on the accumulation of Cdc13 at DSBs is not simply due to the accumulation of longer resected DNA in this mutant since the kinetics of Cdc13 foci/clusters formation are identical to the kinetics of γ -H2A foci accumulation. If longer resected DSBs were required for Cdc13 binding, this would have resulted in slower kinetics of Cdc13 foci/clusters formation as compared to γ -H2A foci. Moreover, the deletion of *RAD51*, which also produces long ssDNA at DSBs (Sugawara et al, 1995; Zhu et al, 2008), completely abolishes the formation of Cdc13 foci. This result supports a previous observation that Rad51 is required for the recruitment of Cdc13 and Est2 to a non-repairable DSB (Oza et al, 2009). Why the deletion of *RAD51* has such a drastic effect on the formation of Cdc13 foci is still unclear. One possibility is that, in the absence of Rad51, Rad52 accumulates at resected DSBs and inhibits the binding of Cdc13. Indeed, Rad52-GFP foci are more persistent in a *rad51 Δ* strain, suggesting an accumulation of Rad52 at DNA breaks (Alvaro et al, 2007).

We also observed that 70% of Cdc13 foci/clusters colocalize with an Rfa1 focus after treatment with bleomycin. Since bleomycin cleaves DNA preferentially at 5'-GT-3' dinucleotide sequences (Chen & Stubbe, 2005), it may bias the formation of DNA breaks at TG-rich sequences, which constitute favorable Cdc13-binding sites. However, the majority of *TLC1* RNA foci in *rad52 Δ* cells do not colocalize with cytological markers of DSBs. These results suggest that not all DSBs are accessible to *TLC1* RNA, even if Cdc13 is present at these breaks. Why *TLC1* RNA associates with only a small number of DSBs is still not understood. One possibility is that it might be due to Pif1 helicase activity, which is recruited to most DSBs and removes telomerase from these sites (Schulz & Zakian, 1994; Wagner et al, 2006). Some DSBs may be less amenable to Pif1 activity, and therefore more accessible to telomerase. For instance, deletion of *RAD52* in yeast increases the frequency of *de novo* telomere addition in subtelomeric regions (Ricchetti et al, 2003). On the other hand, the DSBs associated with *TLC1* RNA in G2/M are possibly not at telomeres, since the presence of *TLC1*

RNA at these breaks depends on the absence of *RAD52*, which is not involved in telomere elongation by telomerase (Le et al, 1999). In addition, Cdc13 foci formation and recruitment at DSBs depends on Rad51 (Oza et al, 2009), which is not involved in telomere maintenance by telomerase (Le et al, 1999). These results suggest that *TLC1* RNA associates with DSBs outside of telomeric repeats.

If Rad52 has such a dramatic effect in suppressing Cdc13 and telomerase association with DSBs, then why is telomere healing not increased in *rad52Δ* cells? Most studies so far have focused on telomere healing at a single DNA break, using cell-based assays that measure cell survival (Kramer & Haber, 1993; Mangahas et al, 2001b; Myung et al, 2001). In our study, we focus on earlier steps, minutes after induction of multiple DNA damage events. To what extent the presence of telomerase at DSBs in *rad52Δ* cells results in *de novo* telomere addition remains unclear. For instance, Cdc13 and telomerase may be bound too far from the 3' end of a DNA break to efficiently add telomeric repeats. At productive templates close to the 3' end, the Pif1 helicase would strongly inhibit telomerase action (Myung et al, 2001; Schulz & Zakian, 1994). Evidence from other studies has shown that telomerase can be detected by CHIP a few hours after generation of a DSB, without resulting in *de novo* telomere addition (Oza et al, 2009; Ribaud et al, 2012). On the other hand, genetic evidence suggests that the action of telomerase at DSBs generated by bleomycin may promote cell survival in the absence of *RAD52*. Indeed, cells harboring a *yku80-135i* mutation, which maintains the functions of yKu80 in NHEJ and telomeric end protection, but specifically disrupts the capacity of yKu70/80 to localize the *TLC1* RNA in the nucleus (Stellwagen et al, 2003b; Williams et al, 2014b), display a dramatically increased sensitivity of a *rad52Δ* strain to bleomycin (Tam et al, 2007b). This result suggests that in the absence of *RAD52*, the presence of *TLC1* RNA in the nucleoplasm may be important for the repair of some DSBs generated by bleomycin and cell survival.

In addition, we demonstrate that the E3 SUMO ligase Siz1 regulates the spatial distribution of *TLC1* RNA after DNA damage without affecting Cdc13 accumulation at DSBs. DNA damage is known to trigger a wave of sumoylation leading to simultaneous multisite modifications of several DNA repair proteins of the HR pathway in yeast (Psakhye & Jentsch,

2012). However, these sumoylation events depend on the Siz2 SUMO ligase and not on Siz1, suggesting that the effect of Siz1 on *TLC1* RNA localization is independent of the main role of SUMO in the modulation of the HR pathway. Furthermore, our observation that *RAD52* is epistatic to *SIZ1* in sensitivity to bleomycin shows that Siz1 acts downstream of Rad52. While the effect of a *SIZ1* deletion on *TLC1* RNA trafficking might be explained by the Siz1-dependent sumoylation of Cdc13 (Hang et al, 2011b), this sumoylation event was shown to inhibit telomerase binding to Cdc13. Therefore, other targets of Siz1 may be involved in this process.

In line with the observation that DNA repair is excluded from the nucleolus (Dion et al, 2013), our study reveals how the spatial segregation of telomerase and HR activities restricts telomerase access to DSBs. This process is not specific to budding yeast telomerase since the catalytic subunit of human telomerase (hTERT) was also shown to accumulate in the nucleolus after IR-induced DSBs (Wong et al, 2002), indicating that nucleolar localization of telomerase after DNA damage may be a conserved process during evolution.

2.2.5 Materials and Methods

Constructs and strains

See Supplementary Information Table 1 for strain genotypes. Yeast strains were generated by disrupting the *RAD52*, *RAD51*, *SIZ1*, *SIZ2*, *MRE11*, *XRS2*, *TEL1* or *MEC1* genes in *W303* strain by a one-step PCR disruption method using KAN marker (Wach et al, 1994). The *mec1* Δ strains were kept viable by deletion of the *SML1* gene (Zhao et al, 1998). In this strain, the KAN marker was removed by transforming cells with pSH47 expressed Cre recombinase. The *cdc13-2* strain transformed with the plasmid pVL438 *CDC13* (Ycp33 CEN, URA3, *CDC13*) (Chandra et al, 2001) was obtained from Raymund Wellinger's lab. Deletion of *RAD52* was followed by the eli

mination of the pVL438 *CDC13* plasmid using 5-FOA. Strains carrying Rfa1-GFP, Rfa1-mCherry, Cdc13-GFP and Cdc13-13Myc allele at the *RFA1* and *CDC13* chromosomal locus

were generated by a PCR one-step tagging method using plasmids pFA6A-GFP-KANMX4, pFA6A-mCherry-Kan or pFA6A-13Myc-KANMX4 (Knop et al, 1999). Verification of these strains was performed by PCR, microscopy and/or western blot. For Cdc13-GFP and Cdc13-13Myc strains, senescence experiments were conducted by repeatedly streaking strains. For all these strains, the *RAD52* gene disruptions were obtained by using *TRP1*, *KAN* or Hygro markers. *RAD51* deletion was also obtained by using *TRP1* marker.

Cell-cycle dependent localization of *TLC1* RNA and induction of DSB

Asynchronously growing wild type yeast cells (W303) were grown in YEPD (yeast extract –peptone-dextrose) until $OD_{600} \approx 0,3-0,4$, fixed with paraformaldehyde and processed for FISH analysis to detect *TLC1* RNA and *ITS1* pre-rRNA. The cell cycle stage of the cells was estimated by measuring the bud-to-mother size ratio (budding index): G1 (cells without bud), S phase (cells with small to mid-size bud) and G2/M (cells with large bud or sharing the nucleus between mother and daughter). For induction of DSBs, haploid wild-type and *rad52* Δ strains were grown in YEPD medium (at $OD_{600} \sim 0,2$) and exposed to 5 μ g/ml of bleomycin (Bioshop, BLE011.10) during 180 min. In these conditions, 90% of the cells have at least one DNA damage after 180 minutes (see Supplementary Figure 2.1). The presence and number of DNA damage per cell after bleomycin treatment was quantified using the number of γ -H2A foci, which correlates with the number of DSBs per cell (Sedelnikova et al, 2002). For nocodazole treatment, wild-type and *rad52* Δ cells were grown in YEPD medium to $O.D_{600} \sim 0,2$ before addition of 15 μ g/ml of nocodazole during 90 min. Bleomycin (5 μ g/ml) was then added and cells were incubated for another 180 min

Fluorescent in situ hybridization (FISH) and immunofluorescence (IF)

Yeast fixation protocol and fluorescent *in situ* hybridization to detect endogenous *TLC1* RNA have been described previously (Pfungsten et al, 2012). Five Cy3-labelled 50 nucleotides probes were used to detect the endogenous *TLC1* RNA, and one Cy5-labelled 50

nucleotides probe was used to detect the *ITS1* pre-rRNA. Dual FISH-IF, or IF only protocols were conducted as described previously (Gallardo & Chartrand, 2011). Briefly, following last wash of 1xSSC of the FISH protocol, spheroplasts were incubated in 1xPBS 0,1%BSA, 1xPBS 0,1%BSA 0.1%NP40 and 1xPBS 0,1%BSA for 2 min each at room temperature. The primary antibodies used to detect γ -H2A (ab 18255, Abcam) or myc epitope (9E10, Roche) were diluted to 1/5000 and 1/400, respectively, in 1xPBS containing 0,1% BSA, 20mM VRC and 120 U/ml RNA Guard and incubated 2h at 37°C. Spheroplasts were washed with 1xPBS 0,1%BSA, 1xPBS 0,1%BSA 0.1%NP-40 and 1xPBS 0,1%BSA for 2 min each at room temperature. The secondary antibody (Alexa Fluor® 488 Conjugate) was diluted to 1/1000 in 1xPBS containing 0,1% BSA, 20mM VRC and 120 U/ml RNA Guard, and incubated 1h in the dark at room temperature. Finally the cells were washed in 1xPBS 0,1%BSA, 1xPBS 0,1%BSA 0.1%NP-40 and 1xPBS 0,1%BSA for 1min each at room temperature. The coverslip were incubated in 1xPBS containing DAPI before mounting on slides.

Image acquisition, deconvolution and processing

All images were acquired using an Axio Imager 2 Carl Zeiss epifluorescence upright microscope equipped with a 100×DIC H (1.4 NA) objective and a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera. Endogenous *TLC1* RNA foci were detected using Cy3.0 filter, *ITS1* RNA was detected using Cy5.0 filter and Rfa1-GFP or γ -H2A were detected using a FITC filter. Image acquisition times for DIC, DAPI, *TLC1* RNA and *ITS1* RNA were 40, 20, 1600, and 800 ms, respectively. Images were acquired and processed with Zeiss software or deconvolved by Autoquant X3 software using a theoretical PSF algorithm and analyzed using the Methamorph software. One hundred fields of yeast cells were acquired as Z stacks of 14 planes minimum, with 0.5 μ m between planes in the Z axis. Maximal projection of Z stacks was performed, and merged with DAPI and *ITS1* signals for quantification of localization. For each yeast strain, a total of 300 G2/M cells were randomly scored in 3 biologically independent experiments. Numbers are expressed as percent of cells with *TLC1* RNA mainly located in the nucleoplasm, nucleolus or distributed between both compartments. Simultaneous FISH on *TLC1*, *MDN1*

and *ITS1* RNA was performed to determine the percentage of colocalization of *TLC1* RNA foci with a random nuclear focus, represented by the *MDN1* transcription site.

Live cell Imaging

Cells expressing fusion protein Cdc13-GFP, or Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry in *rad52Δ* genetic background were incubated overnight at 25°C in 2 ml of SC-TRP, then diluted to O.D₆₀₀ ~ 0.2 and grown for one cell cycle. Cdc13-GFP foci and colocalization between Cdc13-GFP and Rfa1-mCherry were induced by 5µg/ml of bleomycin for 3 hours. Cells were collected by centrifugation at 2000g, mounted on standard glass slides and covered with a coverslip appropriate to the optics of the microscope. All the images were acquired using an Axio Imager 2- Carl Zeiss epifluorescence upright microscope equipped with a 100× DIC H (1.4 NA) objective and with an Evolve fx EM-CCD camera or Microscope Zeiss AXIO OBSERVER Z1 confocal spinning disk equipped with the same objective and camera. For each field of cells, 11 fluorescent images at each of the relevant wavelengths were obtained at 0, 4 µm intervals along the Z-axis to allow inspection of all focal planes of each cell. Image acquisition times for DIC, brightfield, GFP, and mCherry were 40, 40, 900, and 60 ms respectively.

Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters

Determination of Cdc13 focus and cluster diameter and maximal fluorescence intensity was calculated as described previously (Gallardo et al, 2011).

2.2.6 Acknowledgements

The authors thank R. Wellinger (Université de Sherbrooke) for strain DVL162; J. Cobb (University of Calgary) for the strains JC1322 and JC1323; D. Zenklusen (Université de Montréal) for the *ITS1* and *MDN1* FISH probes. We also thank R. Wellinger, L. Harrington and E. Querido for critical reading of the manuscript. This project was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) MOP-89768. ML was supported by a

fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT). FG was supported by a doctoral fellowship from the Terry Fox foundation. GM was supported by an undergraduate CDMC-CREATE fellowship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). PC is a Senior fellow of the Fonds de Recherche Santé-Québec (FRQS).

2.2.7 Authors contributions

FO and PC designed the experiments and wrote the paper. FO performed FISH and IF experiments, analyzing microscopy data and preparing strains. GM helped in performing FISH experiments of Figure 2.4. ML performed yeast spot assays. FG started the project.

2.2.8 References

- Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of molecular biology* **227**: 54-71
- Alvaro D, Lisby M, Rothstein R (2007) Genome-Wide Analysis of Rad52 Foci Reveals Diverse Mechanisms Impacting Recombination. *PLoS Genet* **3**: e228
- Barlow JH, Lisby M, Rothstein R (2008) Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular cell* **30**: 73-85
- Bianchi A, Negrini S, Shore D (2004) Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Molecular cell* **16**: 139-146
- Bianchi A, Shore D (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Molecular cell* **31**: 153-165
- Branzei D, Sollier J, Liberi G, Zhao X, Maeda D, Seki M, Enomoto T, Ohta K, Foiani M (2006) Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* **127**: 509-522
- Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & Development* **15**: 404-414
- Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* **5**: 102-112
- Chung WH, Zhu Z, Papusha A, Malkova A, Ira G (2010) Defective resection at DNA double-strand breaks leads to de novo telomere formation and enhances gene targeting. *PLoS Genet* **6**: e1000948

- Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9202-9207
- Diede SJ, Gottschling DE (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**: 723-733
- Gallardo F, Chartrand P (2011) Visualizing mRNAs in fixed and living yeast cells. *Methods Mol Biol* **714**: 203-219
- Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, Chartrand P (2011) Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Molecular cell* **44**: 819-827
- Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P (2008) TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *The EMBO journal* **27**: 748-757
- Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes & development* **12**: 2208-2221
- Hang LE, Liu X, Cheung I, Yang Y, Zhao X (2011) SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 920-926
- Hirano Y, Sugimoto K (2007) Cdc13 Telomere Capping Decreases Mec1 Association but Does Not Affect Tel1 Association with DNA Ends. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 2026-2036
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**: 1011-1017

- Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**: 735-744
- Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972
- Kramer KM, Haber JE (1993) New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes & development* **7**: 2345-2356
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annual review of genetics* **38**: 233-271
- Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-152
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**: 561-567
- Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**: 572-577
- Lobachev KS, Gordenin DA, Resnick MA (2002) The Mre11 complex is required for repair of hairpin-capped double-strand breaks and prevention of chromosome rearrangements. *Cell* **108**: 183-193
- Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Jain S, Eapen VV, Haber JE (2010) Sgs1 and exo1 redundantly inhibit break-induced replication and de novo telomere addition at broken chromosome ends. *PLoS Genet* **6**: e1000973
- Maeda D, Seki M, Onoda F, Branzei D, Kawabe Y, Enomoto T (2004) Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 335-341

- Makovets S, Blackburn EH (2009) DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol* **11**: 1383-1386
- Mangahas JL, Alexander MK, Sandell LL, Zakian VA (2001) Repair of Chromosome Ends after Telomere Loss in *Saccharomyces*. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 4078-4089
- Martina M, Clerici M, Baldo V, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP (2012) A balance between Tel1 and Rif2 activities regulates nucleolytic processing and elongation at telomeres. *Molecular and cellular biology* **32**: 1604-1617
- Mazumder A, Tummler K, Bathe M, Samson LD (2013) Single-cell analysis of ribonucleotide reductase transcriptional and translational response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* **33**: 635-642
- McGee JS, Phillips JA, Chan A, Sabourin M, Paeschke K, Zakian VA (2010) Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1438-1445
- Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 2164-2173
- Mozdy AD, Cech TR (2006) Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* **12**: 1721-1737
- Myung K, Chen C, Kolodner RD (2001) Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **411**: 1073-1076
- Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**: 249-252
- Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL (2009) Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes & development* **23**: 912-927

- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404
- Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD (2006) Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **59**: 1357-1368
- Pennock E, Buckley K, Lundblad V (2001) Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell* **104**: 387-396
- Pfingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, Ouenzar F, Chartrand P, Cech TR (2012) Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* **148**: 922-932
- Psakhye I, Jentsch S (2012) Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**: 807-820
- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1921-1926
- Ribaud V, Ribeyre C, Damay P, Shore D (2012) DNA-end capping by the budding yeast transcription factor and subtelomeric binding protein Tbf1. *The EMBO journal* **31**: 138-149
- Ribeyre C, Shore D (2013) Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. *Chromosoma* **122**: 159-173
- Ricchetti M, Dujon B, Fairhead C (2003) Distance from the chromosome end determines the efficiency of double strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *Journal of molecular biology* **328**: 847-862
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-916
- Schulz VP, Zakian VA (1994) The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**: 145-155

- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**: 486-492
- Singer MS, Gottschling DE (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404-409
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* **129**: 13-31
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & Development* **17**: 2384-2395
- Sugawara N, Ivanov EL, Fishman-Lobell J, Ray BL, Wu X, Haber JE (1995) DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature* **373**: 84-86
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* **17**: 5497-5508
- Tam ATY, Pike BL, Hammet A, Heierhorst J (2007) Telomere-related functions of yeast KU in the repair of bleomycin-induced DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**: 800-803
- Teixeira MT, Förstemann K, Gasser SM, Lingner J (2002) Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO reports* **3**: 652-659
- Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, Jentsch S, Rothstein R, Aragon L, Lisby M (2007) The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* **9**: 923-931

- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808
- Wagner M, Price G, Rothstein R (2006) The absence of Top3 reveals an interaction between the Sgs1 and Pif1 DNA helicases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**: 555-573
- Williams JM, Ouenzar F, Lemon LD, Chartrand P, Bertuch AA (2014) The Principal Role of Ku in Telomere Length Maintenance Is Promotion of Est1 Association with Telomeres. *Genetics*
- Zenklusen D, Larson DR, Singer RH (2008) Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1263-1271
- Zhang W, Durocher D (2010) De novo telomere formation is suppressed by the Mec1-dependent inhibition of Cdc13 accumulation at DNA breaks. *Genes & development* **24**: 502-515
- Zhao X, Blobel G (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4777-4782
- Zhao X, Muller EG, Rothstein R (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular cell* **2**: 329-340
- Zhou J, Monson EK, Teng SC, Schulz VP, Zakian VA (2000) Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* **289**: 771-774
- Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**: 981-994

2.2.10 Figures and legends

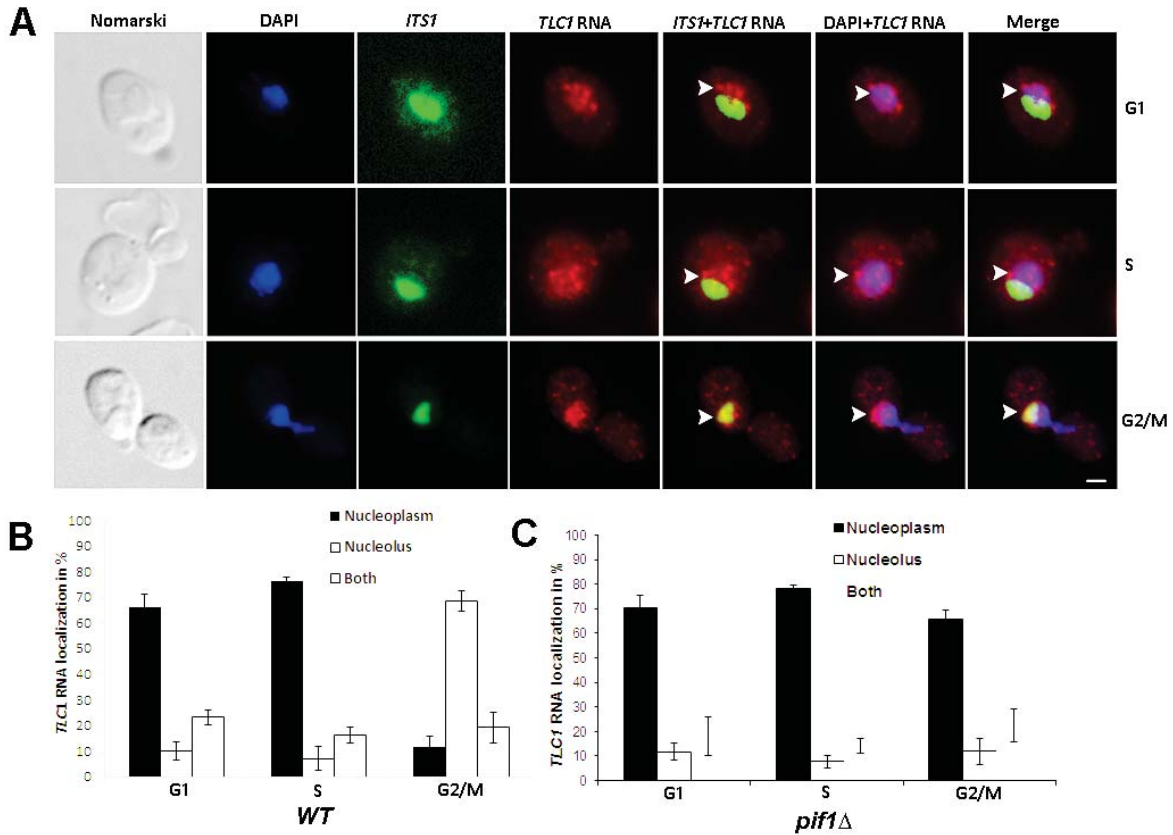


Figure 2.1: Intranuclear distribution of *TLC1* RNA during the cell cycle in WT and *pif1Δ* strains. **A)** Monitoring *TLC1* RNA localization during the cell cycle in WT cells by FISH. The nucleolus was stained with a probe against the *ITS1* spacer of the rRNA precursor (labeled with Cy5). Arrowheads mark the position of the *TLC1* RNA in selected cells. DAPI: DNA staining. Scale bar = 1 μ m. **B)** Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle in WT cells. Error bars represent \pm one standard deviation. **C)** Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle in *pif1Δ* cells.

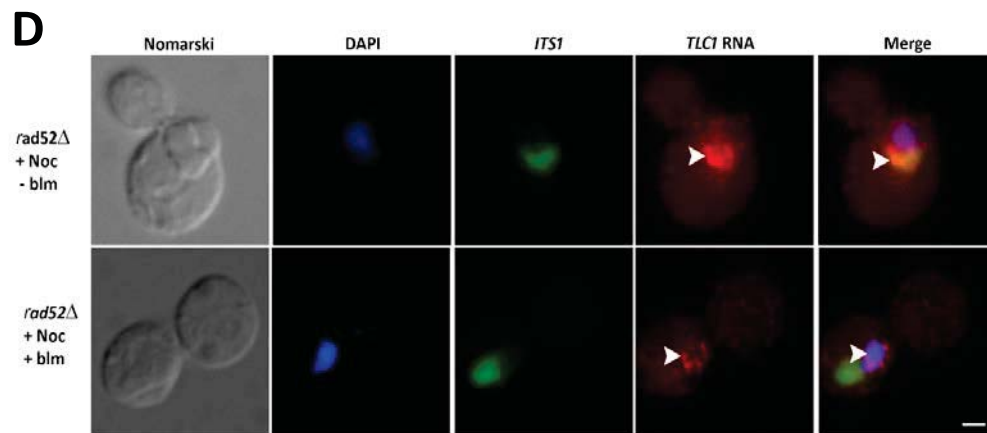
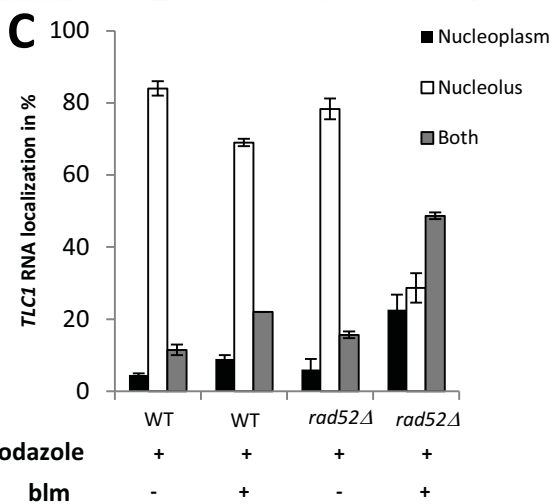
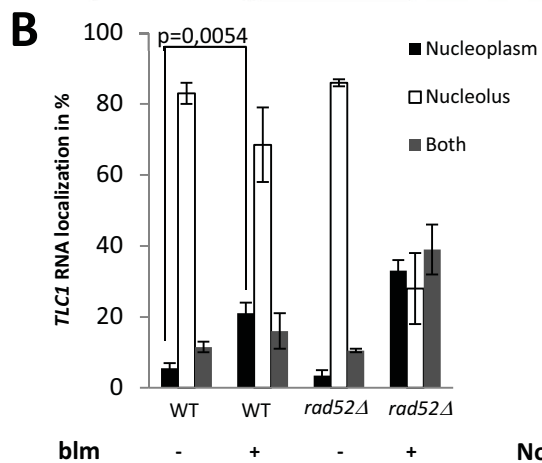
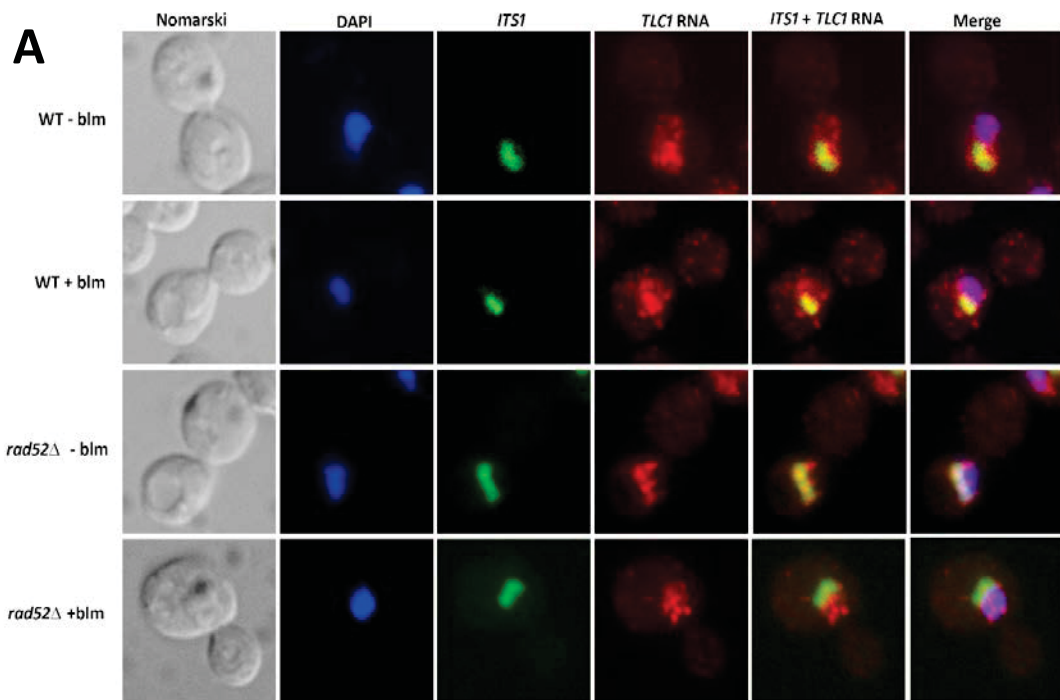


Figure 2.2: *TLC1* RNA accumulates in the nucleoplasm in G2/M in *rad52Δ* cells after DNA damage.

A) FISH on *TLC1* RNA in wild type (WT) or *rad52Δ* cells treated or not with bleomycin (blm). Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in cells. **B)** Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in wild-type (WT) or *rad52Δ* cells after treatment with bleomycin (blm). **C)** *TLC1* RNA can relocalize to the nucleoplasm from the nucleolus in *rad52Δ* cells treated with bleomycin. Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in wild-type (WT) or *rad52Δ* cells synchronized with nocodazole (Noc), followed by treatment with bleomycin (blm). **D)** FISH on *TLC1* RNA in *rad52Δ* cells synchronized with nocodazole (Noc) and treated or not with bleomycin (blm). Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in cells. Scale bar = 1 μ m. Error bars represent \pm one standard deviation

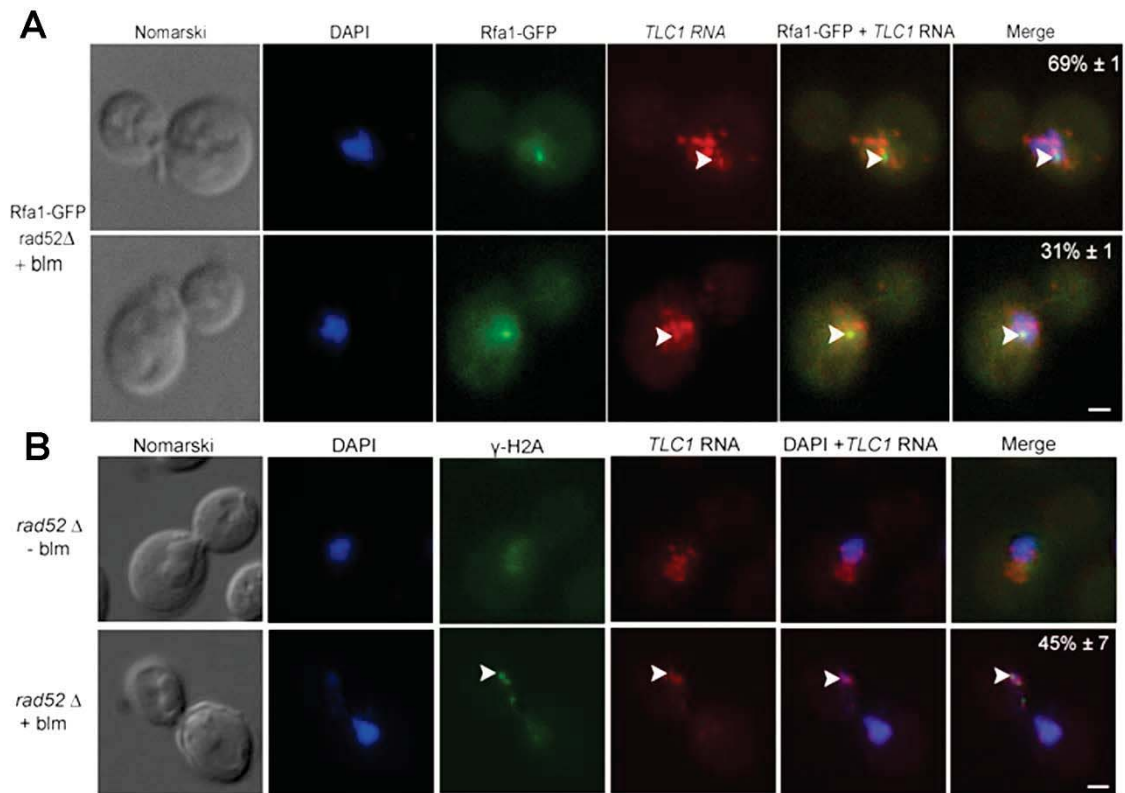


Figure 2.3: *TLC1* RNA partially colocalizes with DSB sites in *rad52*Δ cells.

A) FISH against *TLC1* RNA in *rad52*Δ cells expressing Rfa1-GFP and treated with bleomycin (blm). Numbers in percentage represent the percentage of cells with the following phenotypes: no-colocalization between a *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP focus (top panels) or colocalization between a *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP foci (bottom panels). Scale bar=1μm. **B)** Dual FISH against *TLC1* RNA and immunofluorescence on γ-H2A protein in *rad52*Δ cells after exposure or not to bleomycin (blm). Colocalization (indicated with arrowhead) was detected in 45% ±7 of the cells. Scale bar = 1μm.

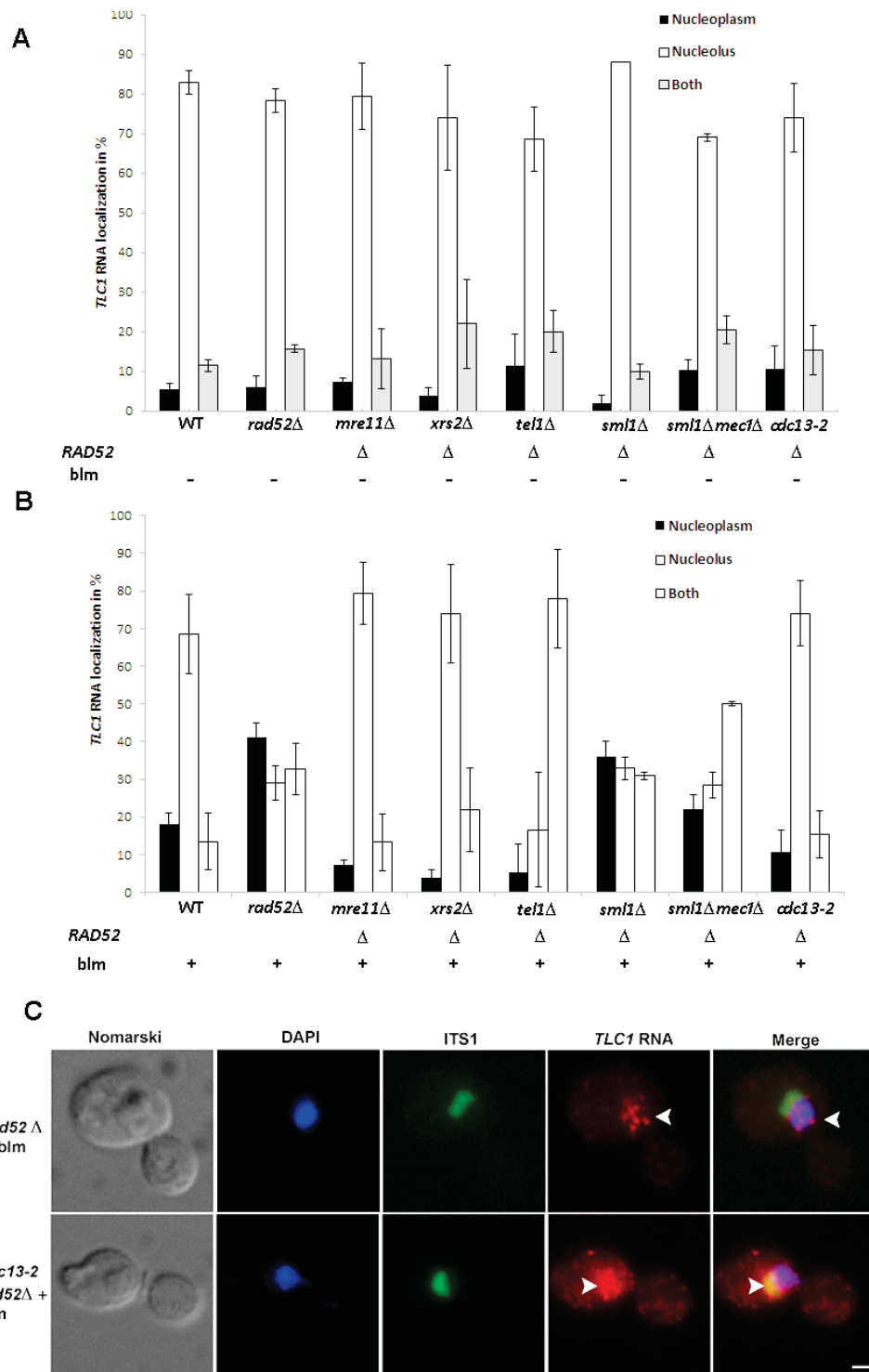


Figure 2.4: Genetic requirements for nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA after DNA damage in *rad52*Δ cells.

A)-*TLC1* RNA does not accumulate in the nucleoplasm in G2/M in the absence of DNA damage in *rad52Δ*, *mre11Δ rad52Δ*; *xrs2Δ rad52Δ*; *tel1Δ rad52Δ*; *sml1Δ rad52Δ*; *sml1Δ mec1Δ rad52Δ* and *cdc13-2 rad52Δ* cells. Wild type, *rad52Δ* and *sml1Δrad52Δ* are used as control strains. **B)** *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation after induction of DNA damage requires Mre11 and Xrs2 of the MRX complex, Cdc13 and is regulated by Tel1 and Mec1 checkpoint proteins. Error bars represent \pm one standard deviation. **C)** FISH on *TLC1* RNA in *cdc13-2 rad52Δ* cells treated or not with bleomycin. Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in cells. Scale bar = 1 μ m.

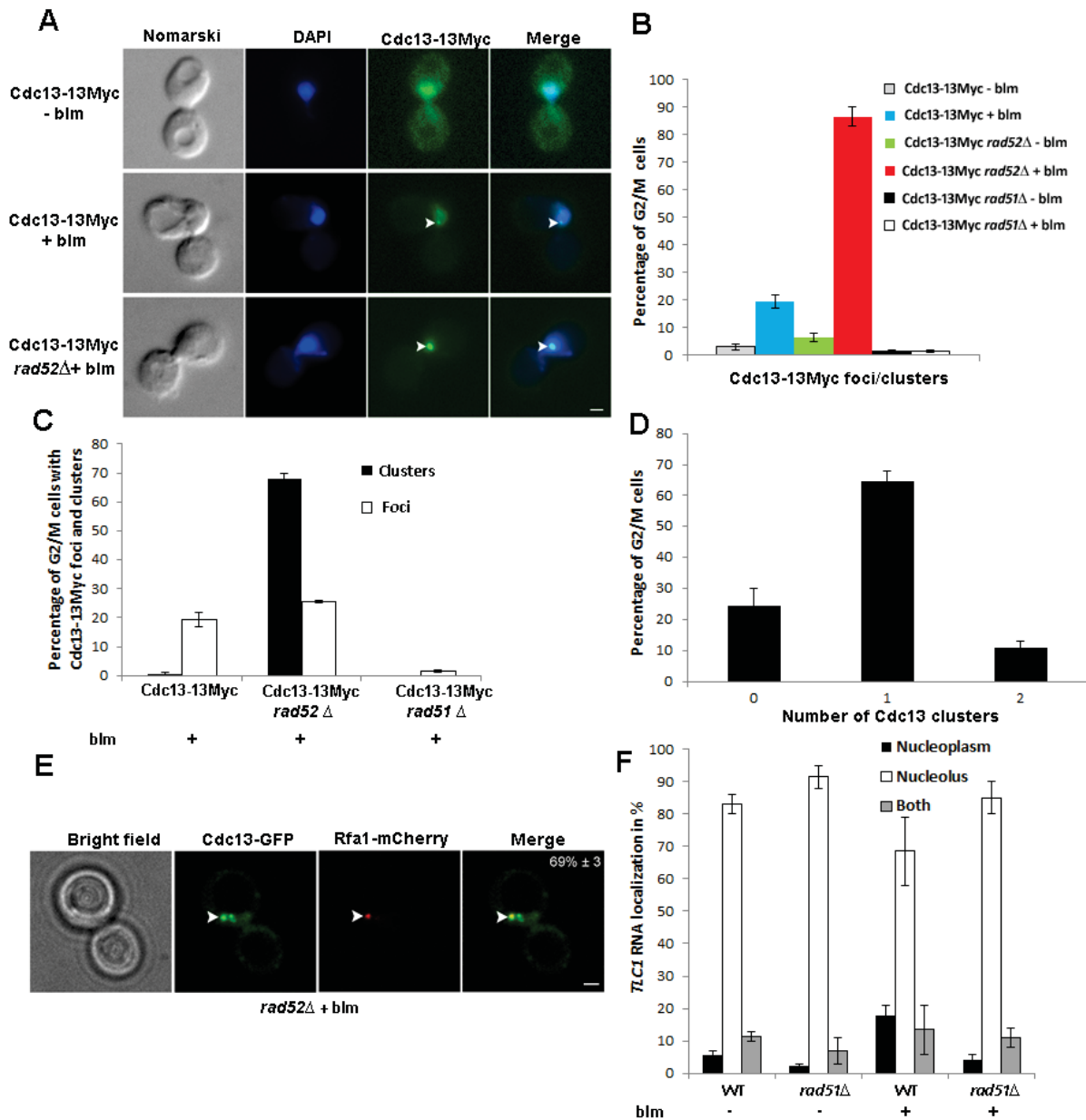


Figure 2.5: Cdc13 accumulates at sites of DNA break in *rad52Δ*, but not in *rad51Δ* cells

A) Cdc13 foci appear in wild-type and *rad52Δ* cells after DNA damage. Immunofluorescence (IF) analysis of Cdc13-myc was conducted in wild-type and *rad52Δ* cells, with or without bleomycin (blm) treatment. Arrowheads mark the position of Cdc13 foci. Scale bar = 1μm. **B)** Rad52 and Rad51 have opposite effect on Cdc13 foci formation. Quantification of Cdc13 foci/clusters formation in wild-type, *rad52Δ* and *rad51Δ* strains, with or without bleomycin (blm) treatment. **C)** Analysis of Cdc13 clusters and foci formation in wild-type, *rad52Δ* and

rad51Δ strains in DNA damaged cells. **D)** Quantification of the number of Cdc13 cluster per G2/M damaged cells. **E)** Colocalization of Cdc13-GFP cluster and Rfa1-mCherry focus in *rad52Δ* cell exposed to bleomycin. Percentage of G2/M cells showing this phenotype is indicated in the last panel. **F)** Quantification of *TLC1* RNA distribution in the nucleus in wild-type (WT) or *rad51Δ* cells after treatment with bleomycin.

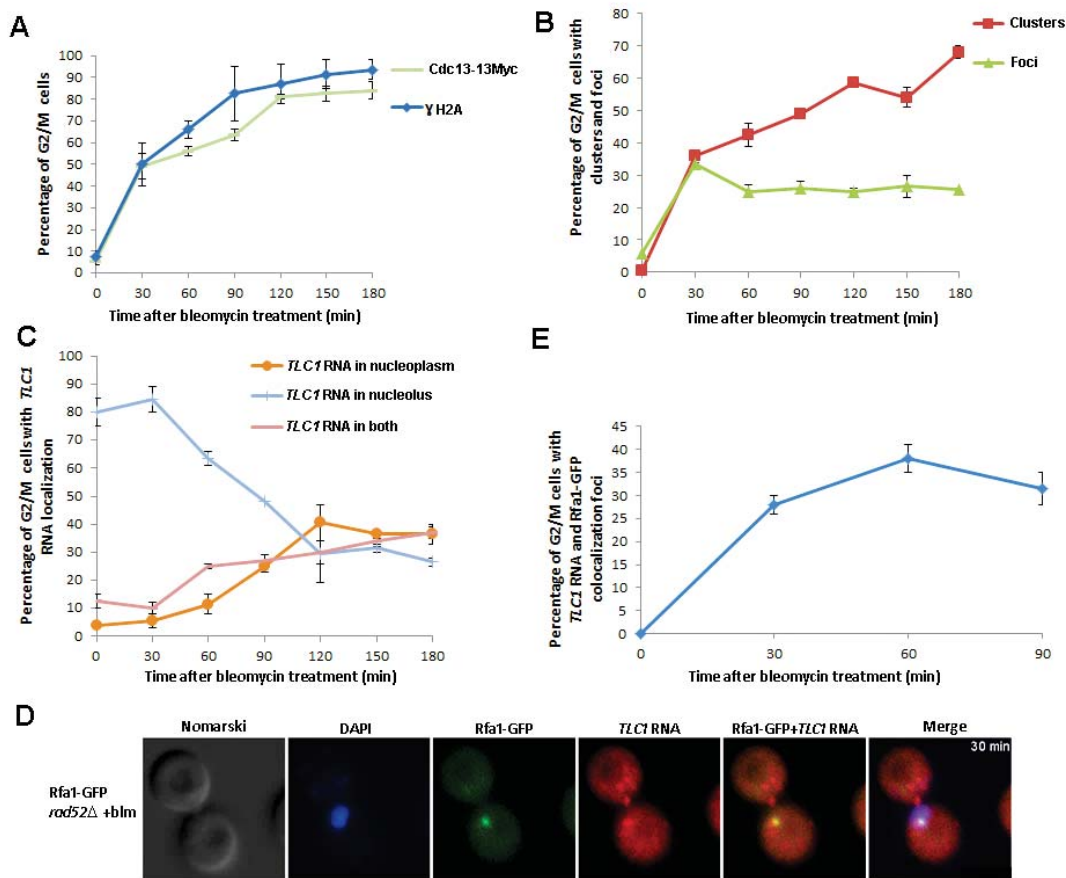


Figure 2.6: Kinetics of accumulation of Cdc13 and *TLC1* RNA at sites of DNA damage in *rad52* Δ cells

A) Kinetics of γ -H2A and Cdc13 foci formation in G2/M cells after exposure to bleomycin. **B)** Time course of Cdc13 foci and cluster formation in G2/M cells after exposure to bleomycin. **C)** Kinetics of *TLC1* RNA nucleoplasmic accumulation in G2/M cells after exposure to bleomycin. **D)** Colocalization between *TLC1* RNA focus and Rfa1-GFP focus in G2/M cells after 30 min of bleomycin exposure. **E)** Kinetics of colocalization between a *TLC1* RNA focus and a Rfa1-GFP focus in G2/M cells after exposure to bleomycin. Scale bar = 1 μ m. Error bars represent \pm one standard deviation.

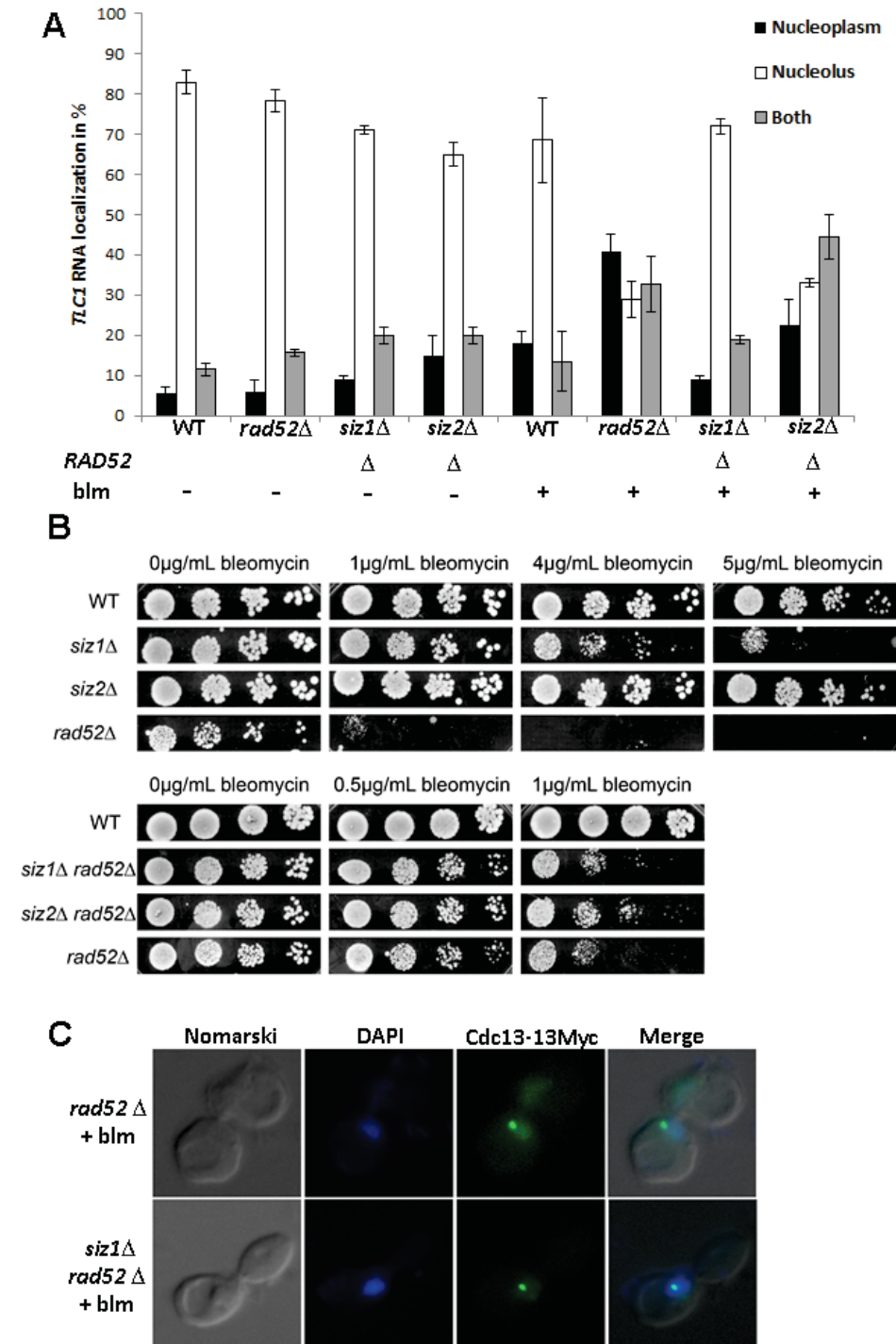
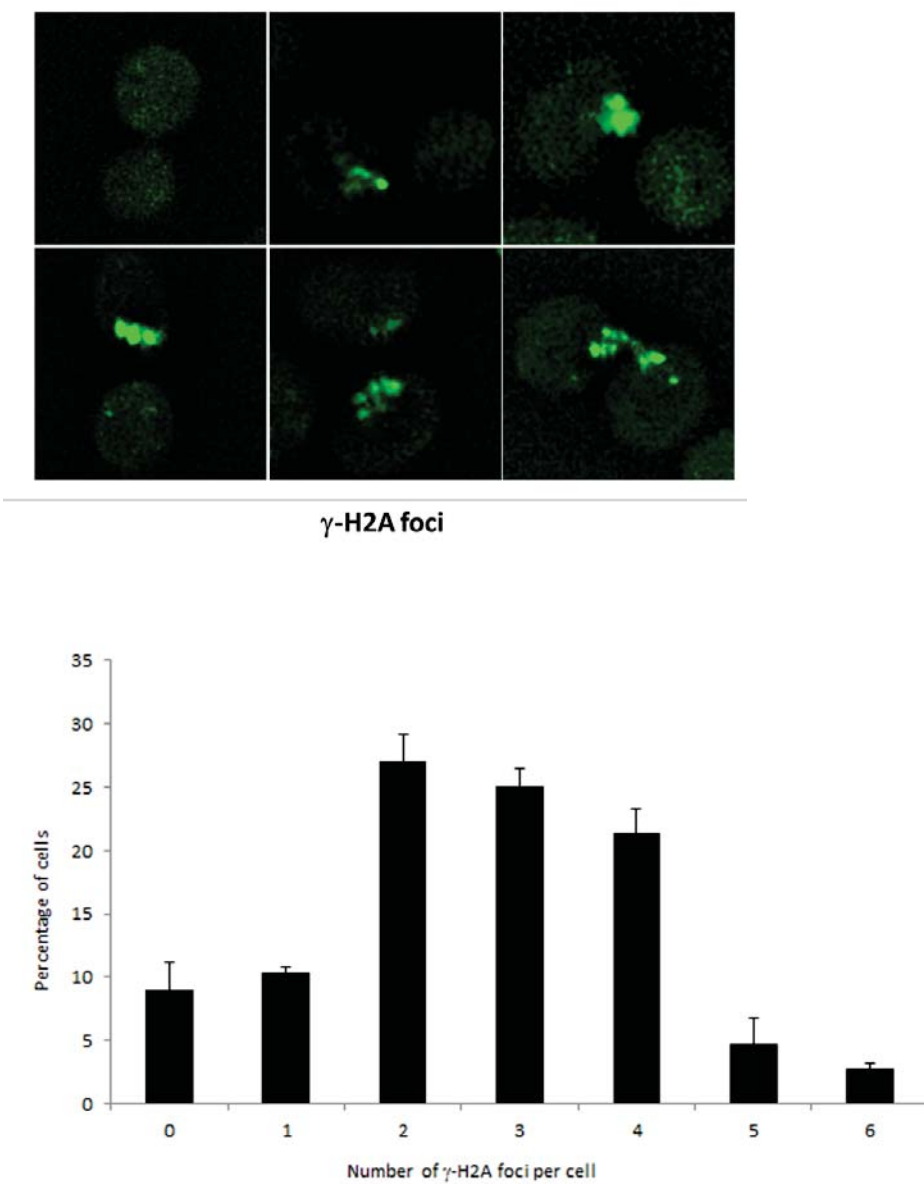


Figure 2.7: The E3 SUMO ligase Siz1 is required for the accumulation of *TLC1* RNA in the nucleoplasm of *rad52Δ* cells after DNA damage

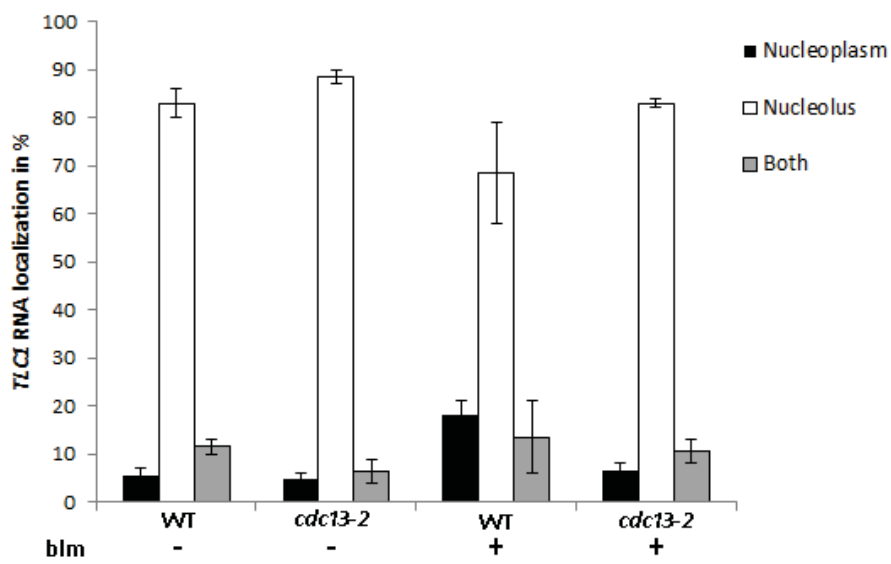
A) Nuclear distribution of *TLC1* RNA in various single mutants of the E3 SUMO ligases (*siz1Δ* or *siz2Δ*) in *rad52Δ* genetic background with (+) or without (-) exposure to bleomycin

(blm). **B)** Growth assay of *siz1Δ*, *siz2Δ* or *rad52Δ* cells on plates containing various concentrations of bleomycin. Fivefold serial dilutions were spotted on each plate, from 5×10^{-4} to 1×10^{-5} cells. Growth assay of *siz1Δ rad52Δ*, *siz2Δ rad52Δ* or *rad52Δ* cells on plates containing various concentrations of bleomycin. Fivefold serial dilutions were spotted on each plate, from 5×10^{-3} to 1×10^{-4} cells. These images are representative of at least four independent experiments. **C)** Cdc13 clusters are still formed in *siz1Δ rad52Δ* strain after DNA damage. Immunofluorescence (IF) analysis of Cdc13-myc was conducted in *rad52Δ* and *siz1Δ rad52Δ* cells after bleomycin (blm) treatment.

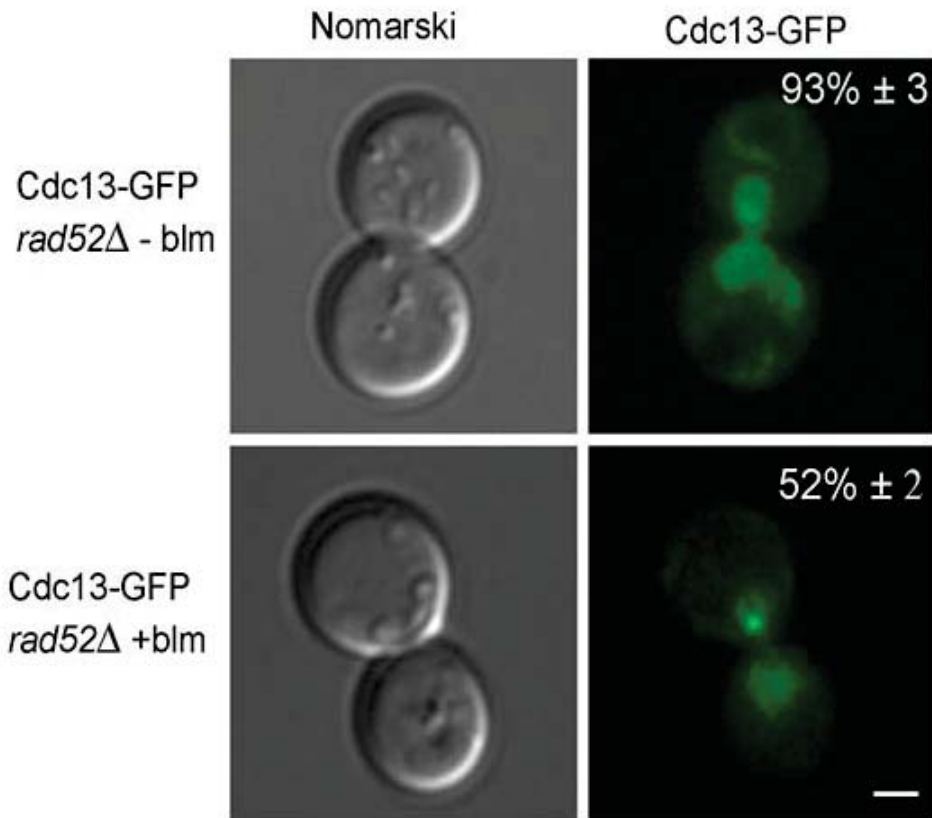
2.1 Supplementary Data



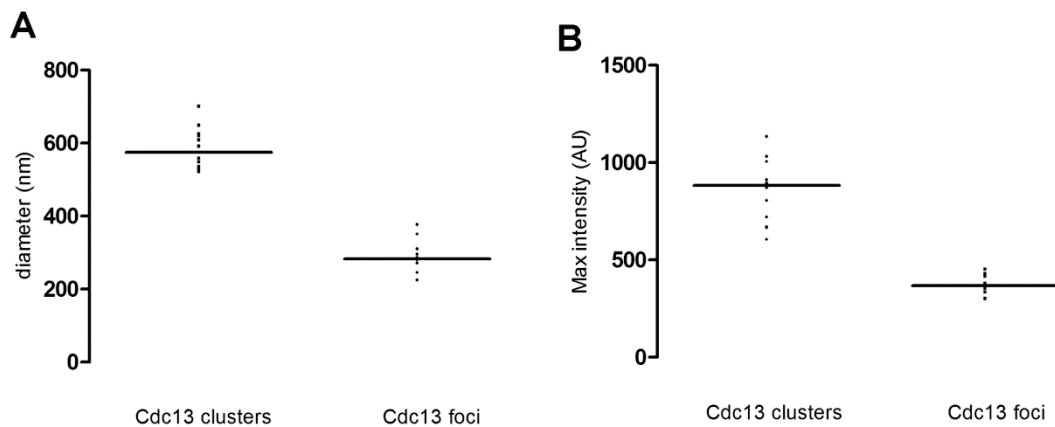
Supplementary Figure 2.1: γ -H2A foci formation in the yeast population after treatment with bleomycin (top). Quantification of the number of γ -H2A foci per cell (bottom).



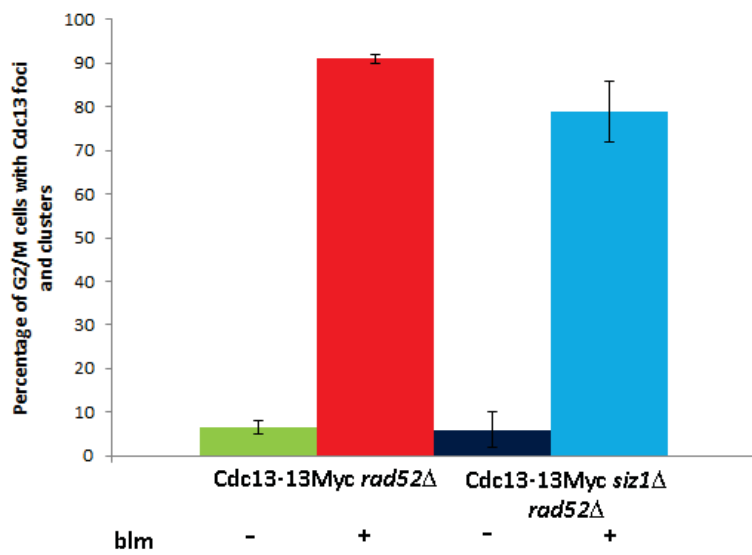
Supplementary Figure 2.2: *TLC1* RNA localization in WT and *cdc13-2* strains before and after bleomycin treatment.



Supplementary Figure 2.3: Formation of Cdc13-GFP foci in living yeast cells with DNA damage. Cdc13-GFP *rad52Δ* cells were treated or not with bleomycin. Quantification of each phenotype in the yeast cell population is indicated in both panels on the right. Scale bar = 1 μm.



Supplementary Figure 2.4: Quantitative analysis of Cdc13 foci and clusters after induction of DNA damage. **A)** Mean diameter of Cdc13 foci and clusters. The dot plot shows the distribution of the diameter of 10 Cdc13 foci and 13 Cdc13 clusters. Cdc13 foci have a mean diameter of 283 nm, while Cdc13 clusters have a mean diameter of 575 nm. **B)** Mean maximal fluorescence intensities of Cdc13 foci and clusters. The dot plot shows the distribution of the maximal fluorescence intensities of 10 Cdc13 foci and 13 Cdc13 clusters. Cdc13 foci have a mean maximal fluorescence intensity of 355,33AU, while clusters have a mean maximal fluorescence intensity of 883 AU. AU: arbitrary fluorescence unit.



Supplementary Figure 2.5: Quantification of *TLC1* RNA localization in Cdc13-13Myc background *rad52*Δ and *siz1*Δ *rad52*Δ strains with and without bleomycin.

Supplementary Table 2.1 :Yeast strains used in this study

Strains	Genotype	Source
W303	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	
<i>rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, RAD52::TRP1</i>	this study
Rfa1-GFP <i>rad52Δ</i>	<i>Mata, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, Rfa1-GFP::KAN, RAD52::TRP1</i>	this study
Cdc13-GFP <i>rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-GFP::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
Cdc13-GFP Rfa1-mCherry <i>rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-GFP::KAN Rfa1-mCherry::TRP1 RAD52::hygro</i>	this study
<i>mre11Δ rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, MRE11::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
<i>xrs2Δ rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, XRS2::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
<i>tel1Δ rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, TEL1::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
<i>sml1Δ rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, SML1::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
<i>sml1Δ rad52Δ mec1Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, sml1 MEC1::KAN RAD52::TRP1</i>	this study
Cdc13-myc <i>rad52Δ rad51Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-13Myc RAD52:: TRP1</i>	this study
Cdc13-myc <i>rad51Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, RAD51::TRP1</i>	this study
Cdc13-myc <i>rad51Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, CDC13-13Myc RAD51:: TRP1</i>	this study
DVL162	<i>MAT a ura3-52 ade2-101, trp1Δ-1, his3-Δ200 leu2-Δ1cdc13-Δ::LYS2CF-SUP11-TRP1/pVL 438)</i>	V. Lundblad
DVL162 <i>rad52Δ</i>	<i>MAT a ura3-52 ade2-101, trp1Δ-1, his3-Δ200 leu2-Δ1cdc13-Δ::LYS2CF- SUP11-TRP1 RAD52::KAN</i>	this study
JC1323	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz1::TRP1; can1-100;</i>	J. Cobb
JC1323 <i>rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz1::TRP1; can1-100; RAD52::hygro</i>	this study
JC1322	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz2::HIS3; can1-100;</i>	J. Cobb
JC1322 <i>rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3 leu2-112 Rad5+, his3-11 his3-15, trp1-1, ade2-, siz2::HIS3; can1-100; RAD52::hygro</i>	this study
Cdc13-myc <i>siz1Δ rad52Δ</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, siz1::TRP1, CDC13-13Myc::KAN RAD52:: hygro</i>	this study

Supplementary Table 2.2 :Yeast strains used in this study

Plasmid name	Source
pFA6A-TRP1	P.Chartrand
pFA6A-KAN	P.Chartrand
pFA6A-hygro	P.Chartrand
pUG6-lox-p-Kan	P.Chartrand
pSH47-Gal1-Cre	P.Chartrand
pFA6A-GFP-KANMX4	P.Chartrand
PFA6A-mCherry-TRP1	This study

Chapitre 3: Trafic nucléaire de l'ARN de la télomérase et le facteur nucléolaire Nsr1

3.1 Présentation de l'article 2:

Le deuxième article de cette thèse a pour objectif de caractériser le rôle de la protéine Nsr1 dans le trafic nucléaire de l'ARN *TLC1* et la maintenance des télomères. Comme nous l'avons vu au chapitre 2, le premier article de cette thèse a mis en évidence la présence d'un trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire. En plus du trafic intranucléaire, l'ARN *TLC1* fait la navette entre le noyau et le cytoplasme au cours de la biogénèse de la télomérase. Comme les snoARNs, l'ARN *TLC1* passe par le nucléole pour la modification de sa coiffe 5' par la méthyltransférase Tgs1. Un facteur connu pour contrôler le trafic nucléolaire des snoARNs est la protéine Nsr1, une protéine liant l'ARN et elle est l'homologue de la nucléoline humaine. Nous avons émis l'hypothèse que Nsr1 pourrait aussi jouer un rôle dans le trafic de l'ARN *TLC1*. Avec notre technique d'hybridation *in situ* en fluorescence, nous avons voulu savoir si la localisation de l'ARN *TLC1* est affectée en absence du gène *NSR1*. Par la suite, nous avons examiné si la protéine Nsr1 fait partie de la voie de la biogénèse de la télomérase ou de la localisation de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire. Aussi, nous avons testé si la maturation de l'ARN *TLC1* au nucléole par la méthyltransférase Tgs1 dépend de Nsr1. Enfin, nous avons effectué une étude d'interaction entre Nsr1 et l'ARN *TLC1* afin de vérifier si Nsr1 exerce son effet dans le trafic de l'ARN *TLC1* grâce à son interaction avec cet ARN.

Ce deuxième article est en fait un manuscrit en préparation. Il n'a encore jamais été soumis, mais nous prévoyons le soumettre au début de l'année 2016. Plusieurs expériences restent à faire, dont celle de l'épistasie entre les facteurs de voies d'export nucléaire de l'ARN *TLC1* et Nsr1. Pour cet article, je suis le seul, avec mon directeur de recherche, à avoir contribué. Par conséquent, j'ai réalisé la totalité des expériences qui y sont présentées et j'ai écrit le manuscrit avec l'aide du Dr. Pascal Chartrand.

3.2 Article 2

Nuclear trafficking of *TLC1* RNA and nucleolar factor

Nsr1

Faissal Ouenzar and Pascal Chartrand

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

3.2.1 Abstract

Telomerase in *Saccharomyces cerevisiae* consists of several protein subunits and an RNA moiety called *TLC1*, which together ensure the complete replication of chromosome ends. The *TLC1* RNA undergoes several maturation steps before its export to the cytoplasm, where it recruits the Est and yKu proteins for complete assembly of the telomerase holoenzyme. The various factors involved in the complex trafficking of *TLC1* RNA are still unknown. Here, we report that the yeast Nucleolin homologue Nsr1 is involved in the maturation steps of *TLC1* RNA in the nucleolus. Indeed, deletion of *NSR1* results in the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in all the phases of the cell cycle. We found that Nsr1 acts downstream of the nucleolar methyltransferase Tgs1, which is involved in the hypermethylation of *TLC1* 5' guanosine cap in the nucleolus. Moreover, Nsr1 physically interacts with *TLC1* RNA *in vivo* and acts upstream of the yKu and Pif1 pathways. We propose that Nsr1 is directly involved in the telomerase biogenesis pathway.

3.2.2 Introduction

Telomerase is required for complete replication of chromosomal ends and for genome stability (Blackburn, 2000). Without telomerase, loss of telomeric sequence due to incomplete DNA replication and nuclease action leads to telomere shortening and eventual cellular senescence. The core telomerase enzyme is minimally composed of two subunits: the reverse transcriptase protein TERT (Est2 in *S. cerevisiae*) and the template-containing RNA component hTR (*TLC1* RNA in *S. cerevisiae*), which provides a scaffold for the assembly of the proteins components (Greider & Blackburn, 1989; Zappulla & Cech, 2004). These two components can reconstitute telomerase enzymatic activity *in vitro* in various organisms (Beattie et al, 1998; Licht & Collins, 1999; Weinrich et al, 1997). *In vivo* telomerase activity requires other essential factors (Est1, Est3, Sm proteins, yKu70/80) and the single strand telomeric binding protein Cdc13 (Evans & Lundblad, 1999; Gallardo et al, 2008; Lendvay et al, 1996; Seto et al, 1999).

The yKu70/80 heterodimer, a DNA end-binding complex, positively regulates telomere length in a telomerase-dependent manner. YKu binds the telomerase RNA subunit *TLC1*, and this association is required for *TLC1* RNA nuclear accumulation. Indeed, deletion of the subunit *YKU70* or *YKU80* leads to cytoplasmic accumulation of *TLC1* RNA (Gallardo et al, 2008; Pflingsten et al, 2012; Williams et al, 2014a). Budding yeast strains lacking yKu have short but stable telomeres (Boulton & Jackson, 1996; Porter et al, 1996), suggesting that normal nuclear accumulation of *TLC1* RNA is important for telomere maintenance. The association of Est proteins has also been suggested to occur in the cytoplasm (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). This assembly step of telomerase requires *TLC1* RNA export into cytoplasm, which depends on the exportin Xpo1/Crm1 and the mRNA export machinery (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). Mutations in both export pathways leads to telomerase formation defects and consequently telomere shortening (Wu et al, 2014). After its assembly in the cytoplasm, telomerase nuclear import requires the importins Mtr10 and Kap122 (Ferrezuelo et al, 2002; Gallardo et al, 2008). In the nucleoplasm, *TLC1* RNA associates with telomeres for their elongation in the end of S phase (Diede & Gottschling, 1999; Taggart et al,

2002). After elongation, a negative regulator of telomerase complex, the helicase Pif1 removes telomerase from telomeres (Schulz & Zakian, 1994). This action of Pif1 leads to *TLC1* RNA accumulation in the nucleolus in G2/M (Ouenzar et al, submitted).

Transcription of *TLC1* by RNA polymerase II generates two populations, a slightly longer polyadenylated form (5-10% of total) and a polyA minus form (>90%), i.e the form present in active telomerase. Maturation of *TLC1* requires nuclear exosome-mediated processing of polyadenylated precursors to generate a mature form, which is dependent on its Sm binding site (Coy et al, 2013; Seto et al, 1999). Furthermore, maturation of the *TLC1* RNA requires its passage to nucleolus, where the trimethylguanosine (m³G) cap structure is incorporated by the methyltransferase Tgs1. Deletion of *TGS1* leads to the nucleolar accumulation of monomethylguanosine capped *TLC1* RNA and increased telomeres length (Franke et al, 2008; Gallardo et al, 2008). After these modifications, the mature *TLC1* RNA is exported to the cytoplasm.

Two systematic screens of the deletion collection of nonessential genes in yeast have shown that a large number of genes affect telomere length, including genes involved in DNA replication, recombination, intra S checkpoint, protein and RNA synthesis pathways (Askree et al, 2004; Gatbonton et al, 2006). However, it is not yet clear if these genes affect telomere length via telomerase-dependent or telomerase-independent manner. For example, deletion of the budding yeast homologue of nucleolin, called *NSR1*, leads to slightly longer telomeres in a telomerase-dependent manner (Gatbonton et al, 2006). Nucleolin/Nsr1 is an abundant, ubiquitously expressed RNA-binding protein, which is involved in ribosome biogenesis (Mongelard & Bouvet, 2007). Nucleolin/Nsr1 possesses three well-defined domains: the N-terminal domain with alternating acid and basic stretches is involved in rDNA transcription by interacting with rDNA repeats and histone H1, as well as in nuclear localization. The central portion is the RNA-binding domain carrying RRM (RNA recognition motif) repeats, which was suggested to interact with RNA motifs in mRNA sequences. Finally, the C-terminal region contains the glycine–arginine-rich (GAR) domain (Tuteja & Tuteja, 1998). In budding yeast, Nsr1 is involved in the trafficking of snoRNAs from the nuclear body (NB) (which

shares similarities with vertebrate Cajal body) to the nucleolus. Deletion of *NSR1* increases the accumulation of snoRNAs in the NB and delays the association of snoRNPs with the pre-rRNA (Verheggen et al, 2001).

Since both snoRNAs and *TLC1* RNA undergo a similar 5' cap modification in the nucleolus, we hypothesized that Nsr1 may also be involved in *TLC1* RNA trafficking. Using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on endogenous *TLC1* RNA, we found that Nsr1 is involved in the trafficking of *TLC1* RNA inside of the nucleolus, as its deletion leads to the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in all phases of the cell cycle. Interestingly, we found that Nsr1 interacts specifically with *TLC1* RNA *in vivo* and this interaction takes place after m3G cap formation by Tgs1. Importantly, we demonstrate that Nsr1 acts upstream of both yKu70/80 complex and the helicase Pif1 and plays a role in telomerase biogenesis pathway, suggesting that Nsr1 is epistatic to these factors and affects telomere length in a telomerase-dependent manner.

3.2.3 Results

Nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in the absence of Nsr1

In the budding yeast, Nsr1 is involved in the trafficking of snoRNAs inside the nucleolus and deletion of *NSR1* gene leads to telomere elongation (Gatbonton et al, 2006; Verheggen et al, 2001). To characterize how Nsr1 affects telomere length, we tested the possibility that Nsr1 could be involved in the trafficking of *TLC1* RNA. Localization of *TLC1* RNA during the cell cycle in *nsr1Δ* strain was investigated by using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on endogenous *TLC1* RNA. DAPI was used to stain the nucleoplasm and Nop1-GFP the nucleolus. Budding index was used to determine the cell-cycle phases. Our previous study revealed that *TLC1* RNA undergoes a cell-cycle dependent trafficking from the nucleoplasm in G1/S to the nucleolus in G2/M (Ouenzar et al., submitted). Surprisingly, unlike wild-type cells, *TLC1* RNA accumulates in the nucleolus in G1 and S phases of the cell cycle in a *nsr1Δ* strain (Figure 3.1A). Quantification of *TLC1* RNA localization in various

phases of the cell cycle revealed that *TLC1* RNA is mostly nucleolar in G1, S and G2/M in *nsr1Δ* cells (Figure 3.1B), suggesting that Nsr1 is required for proper *TLC1* RNA nuclear trafficking during the cell cycle.

Nsr1 acts upstream of the helicase Pif1

The helicase Pif1 is required to release telomerase from telomeres at the end of S phase and promotes nucleolar accumulation of *TLC1* RNA at G2/M (Ouenzar et al, submitted). Indeed, deletion of *PIF1* results in the nucleoplasmic accumulation of *TLC1* RNA at all phases of the cell cycle (Ouenzar et al, submitted). To determine if *NSR1* acts in the same epistatic group as *PIF1*, FISH experiments were repeated on *TLC1* RNA in a *pif1Δ nsr1Δ* strain (figure 3.2A). As controls, we used *pif1Δ* and *nsr1Δ* strains, which lead to nucleoplasmic and nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in G1, respectively. In contrast to a *pif1Δ* strain, *pif1Δ nsr1Δ* cells displayed nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in G1, similar to those observed in a *nsr1Δ* strain (Figure 3.2A-B), suggesting that *NSR1* is epistatic to *PIF1*.

Cytoplasmic accumulation of *TLC1* RNA is inhibited in the absence of *NSR1*.

After transcription, the *TLC1* RNA is targeted to the nucleolus for the hypermethylation of its 5' guanosine cap, followed by its export to the cytoplasm for its subsequent association with the yKu complex and Est proteins (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). To investigate the possibility that Nsr1 plays a role in telomerase biogenesis, we performed FISH on *TLC1* RNA in *yku80Δ nsr1Δ* cells. As controls, we used single mutants *yku80Δ* and *nsr1Δ*, which lead to cytoplasmic and nucleolar accumulation, respectively. Our results show that *TLC1* RNA accumulates in the nucleolus in the *yku80Δ nsr1Δ* double mutant, suggesting that *NSR1* is epistatic to *YKU80* (Figure 3.3). Since yKu promotes the nuclear accumulation of *TLC1* RNA after telomerase assembly (Gallardo et al., 2008), these

results suggest that Nsr1 acts prior to this step and possibly before transport of newly synthesized *TLC1* RNA to the cytoplasm.

Trimethylguanosine cap formation of *TLC1* RNA occurs independently of Nsr1

TLC1 RNA transcription by RNA pol II takes place in the nucleoplasm and is followed by the hypermethylation of its 5' guanosine cap by the methyltransferase Tgs1 in the nucleolus. Similar to the deletion of *NSR1*, the absence of Tgs1 results in the nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in G1 (Gallardo et al, 2008). To better characterize the role of Nsr1 in telomerase biogenesis, we tested if Nsr1 role in *TLC1* RNA trafficking takes place before or after m3G cap formation. For this purpose, an immunoprecipitation experiment was performed in wild-type and *nsr1* Δ strains using an anti-trimethylguanosine cap antibody (Franke et al, 2008; Gallardo et al, 2008). Our results show that the hypermethylated form of *TLC1* RNA can be immunoprecipitated normally in both wild-type and *nsr1* Δ strains (Figure 3.4), indicating that Nsr1 acts on *TLC1* RNA after m3G cap formation.

Nsr1 physically interacts with *TLC1* RNA *in vivo*

Since Nsr1 is an RNA-binding protein (Figure 3.5A), we explored the possibility that it may physically interact with the *TLC1* RNA. For this reason, a co-immunoprecipitation experiment was performed using a TAP-tagged Nsr1 yeast strain. After immunoprecipitation, RNA was purified, reverse transcribed and PCR amplification was performed to detect *TLC1* RNA or *ACT1* mRNA (as control) in the pellet. Our results reveal a specific interaction between Nsr1-TAP and the *TLC1* RNA, but not with *ACT1* mRNA (Figure 3.5B). This interaction was not detected in the absence of reverse transcriptase.

To eliminate the possibility of a post-lysis association between Nsr1-TAP and *TLC1* RNA, yeasts were formaldehyde cross-linked prior immunoprecipitation using anti-TAP antibody.

Furthermore, a non-tagged Nsr1 strain was used as control. Again, our results show that Nsr1-TAP interacts physically with *TLC1* RNA *in vivo* even after cross-linking (Figure 3.5C). On the other hand, *TLC1* RNA was not immunoprecipitated in the untagged Nsr1 strain. While these data suggest a direct role for Nsr1 in *TLC1* RNA trafficking, these data do not confirm a direct interaction between Nsr1 and *TLC1* RNA, even if Nsr1 binds directly to specific RNA motifs (Riordan et al, 2011).

3.2.4 Discussion

This study provides evidence for a role for Nsr1/nucleolin in telomere maintenance by controlling *TLC1* RNA trafficking. Our results show that Nsr1 interacts with *TLC1* RNA *in vivo* and acts prior the export of *TLC1* RNA into the cytoplasm. Indeed, deletion of *NSR1* leads to nucleolar accumulation of *TLC1* RNA in all the phases of the cell cycle. Moreover, *NSR1* is epistatic to both *PIF1* and *YKU80*, which suggests a role for *NSR1* in telomerase biogenesis, prior to nuclear import and cell-cycle dependent trafficking of *TLC1* RNA mediated by yKu and Pif1, respectively (Gallardo et al, 2008; Ouenzar et al., submitted). Previous work has showed that deletion of the methyltransferase Tgs1 leads to a similar constitutive accumulation of *TLC1* RNA in the nucleolus (Gallardo et al, 2008). While Tgs1 converts the m7G cap of several snRNAs and snoRNAs to m3G structure in the nucleolus, Nsr1 is involved in the trafficking of these snoRNAs in the nucleolus (Mouaikel et al, 2002; Verheggen et al, 2001). Given that the hypermethylation of the m7G cap of *TLC1* RNA still occurs in the absence of *NSR1*, it is possible that Nsr1 plays a role in the trafficking of the trimethylguanosine form of *TLC1* RNA in the nucleolus or from the nucleolus to the nucleoplasm. Indeed, nuclear export of mature *TLC1* RNA requires both the Ran GTPase-dependent karyopherin Crm1/Xpo1 and the Mex67 mRNA export machinery (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). In *xpo1* or *mex67* mutant strains, *TLC1* RNA molecules accumulate in the nucleoplasm and not in the nucleolus, suggesting that binding of export factors occurs in the nucleoplasm (Wu et al, 2014). An epistatic analysis of *NSR1*, *XPO1* and *MEX67* genes will be required in order to confirm their order in the telomerase biogenesis pathway.

Interestingly, telomeres are elongated by 50bp in a *nsr1Δ* strain compared to an isogenic wild-type strain (Gatbonton et al, 2006). This phenotype is *TLC1*-dependent, suggesting a deregulation of telomerase activity in this mutant. A similar telomere elongation phenotype has been reported in a *tgs1Δ* strain, which also accumulates *TLC1* RNA in the nucleolus (Franke et al, 2008; Gallardo et al, 2008). In this mutant, accumulation of single-stranded telomeric DNA was observed, which lead to the suggestion that *tgs1Δ* disrupts the coupling between telomerase and the DNA replication machinery (Franke et al, 2008). It will be important to determine if *nsr1Δ* cells also display a similar accumulation of single-stranded telomeric DNA. This phenotype is different from the one observed in the double mutant *xpo1-1 mex67-5*, which inhibits nuclear export of mature *TLC1* RNA but displays shorter telomeres (Wu et al, 2014). Altogether, these results suggest that depending where in its maturation pathway *TLC1* RNA is blocked or accumulate this would result in different effect on telomerase activity or regulation.

3.2.5 Materials and Methods:

Fluorescence in situ hybridization

Yeast fixation and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect endogenous *TLC1* RNA was performed as described (Pfungsten et al. 2012).

Image acquisition, deconvolution, and processing

All images were acquired using an Axio Imager 2-Carl Zeiss epifluorescence upright microscope equipped with a 100× DIC H (1.4 N.A.) objective and with a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera. Images were acquired with metamorphe software and processed with Photoshop. One hundred fields of yeast cells were acquired as z stacks of 12 planes minimum, with 0.5 μm between planes in the z axis. Maximal projection of z stacks was performed and merged with a DAPI and Nop1-GFP signals for quantification of localization. For each yeast strain, a total of 200 unbudded cells were randomly scored in three independent experiments, and numbers are expressed as a percentage of cells with *TLC1* located mainly in

the nucleoplasm, nucleolus, cytoplasm, or distributed between nucleolus and cytoplasm or nucleolus and nucleoplasm.

Immunoprecipitation:

Fifty milliliters of yeast cells were grown to early log phase ($OD_{600} \sim 0,5$) at 30°C in the appropriate medium. Formaldehyde was added to a final concentration of 1%, and cells were incubated at room temperature (RT) for 20 min. Glycine was added to a final concentration of 300 mM. Cells were washed twice in 1× PBS, harvested by centrifugation, and resuspended at an OD_{600} of 100 in the extraction buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.1% IGEPALCA-630, 1 mM dithiothreitol, 87.5 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 µg/ml pepstatin, 0.5 µg/ml leupeptin, 0.5 µg/ml aprotinin, and 23 U/ml RNAGuard). The cells were broken with glass beads, vortexed five times for 30 s, on ice with a 1-min pause between each vortex. The supernatant was used for immunoprecipitation. For immunoprecipitation of tandem affinity purification (TAP)-tagged Nsr1 and untagged wild-type strain, 50 µl of IgG-agarose beads was added to 500 µl of supernatant. The beads were washed four times for 3 min at 4°C with a wash buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, and 2 mM $MgCl_2$). The RNA was eluted from the beads with 200 µl of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, and 1% SDS by incubating 10 min at 65°C, followed by a phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. For the reverse transcription, 2 µl of RNA was incubated at 70°C for 5 min in the presence of 0.5 µg of pd(N)6 and quickly chilled on ice. The reverse transcription reaction was performed according to indications in a 1× buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, and 10 mM dithiothreitol) containing 10 mM dNTPs and 20 U of RNAGuard, with 100 U reverse transcriptase for 1 h at 42°C. The cDNAs were then amplified by PCR using primers in the *TLC1* or *ACT1* sequence.

3.2.6 References:

- Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8658-8663
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Current biology : CB* **8**: 177-180
- Blackburn EH (2000) Telomeres and telomerase. *The Keio journal of medicine* **49**: 59-65
- Boulton SJ, Jackson SP (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic acids research* **24**: 4639-4648
- Coy S, Volanakis A, Shah S, Vasiljeva L (2013) The Sm complex is required for the processing of non-coding RNAs by the exosome. *PloS one* **8**: e65606
- Diede SJ, Gottschling DE (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**: 723-733
- Evans SK, Lundblad V (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**: 117-120
- Ferrezuelo F, Steiner B, Aldea M, Futcher B (2002) Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Molecular and cellular biology* **22**: 6046-6055
- Franke J, Gehlen J, Ehrenhofer-Murray AE (2008) Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1. *Journal of cell science* **121**: 3553-3560
- Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P (2008) TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *The EMBO journal* **27**: 748-757

Gatbonton T, Imbesi M, Nelson M, Akey JM, Ruderfer DM, Kruglyak L, Simon JA, Bedalov A (2006) Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS genetics* **2**: e35

Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**: 331-337

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

Licht JD, Collins K (1999) Telomerase RNA function in recombinant Tetrahymena telomerase. *Genes & development* **13**: 1116-1125

Mongelard F, Bouvet P (2007) Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology* **17**: 80-86

Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Molecular cell* **9**: 891-901

Ouenzar F, Morin M, Lalonde M, Gallardo F, Chartrand P. Rad52 controls the spatial segregation of telomerase from sites of DNA damage. Submitted

Pfingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, Ouenzar F, Chartrand P, Cech TR (2012) Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* **148**: 922-932

Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, Petes TD (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **24**: 582-585

Riordan DP, Herschlag D, Brown PO (2011) Identification of RNA recognition elements in the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome. *Nucleic acids research* **39**: 1501-1509

Schulz VP, Zakian VA (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**: 145-155

Seto AG, Zaug AJ, Sobel SG, Wolin SL, Cech TR (1999) Saccharomyces cerevisiae telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**: 177-180

Taggart AK, Teng SC, Zakian VA (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**: 1023-1026

Tuteja R, Tuteja N (1998) Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **33**: 407-436

Verheggen C, Mouaikel J, Thiry M, Blanchard JM, Tollervey D, Bordonne R, Lafontaine DL, Bertrand E (2001) Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *The EMBO journal* **20**: 5480-5490

Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nature genetics* **17**: 498-502

Williams JM, Ouenzar F, Lemon LD, Chartrand P, Bertuch AA (2014) The principal role of Ku in telomere length maintenance is promotion of Est1 association with telomeres. *Genetics* **197**: 1123-1136

Wu H, Becker D, Krebber H (2014) Telomerase RNA TLC1 shuttling to the cytoplasm requires mRNA export factors and is important for telomere maintenance. *Cell reports* **8**: 1630-1638

Zappulla DC, Cech TR (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10024-10029

3.10 Figures and legends:

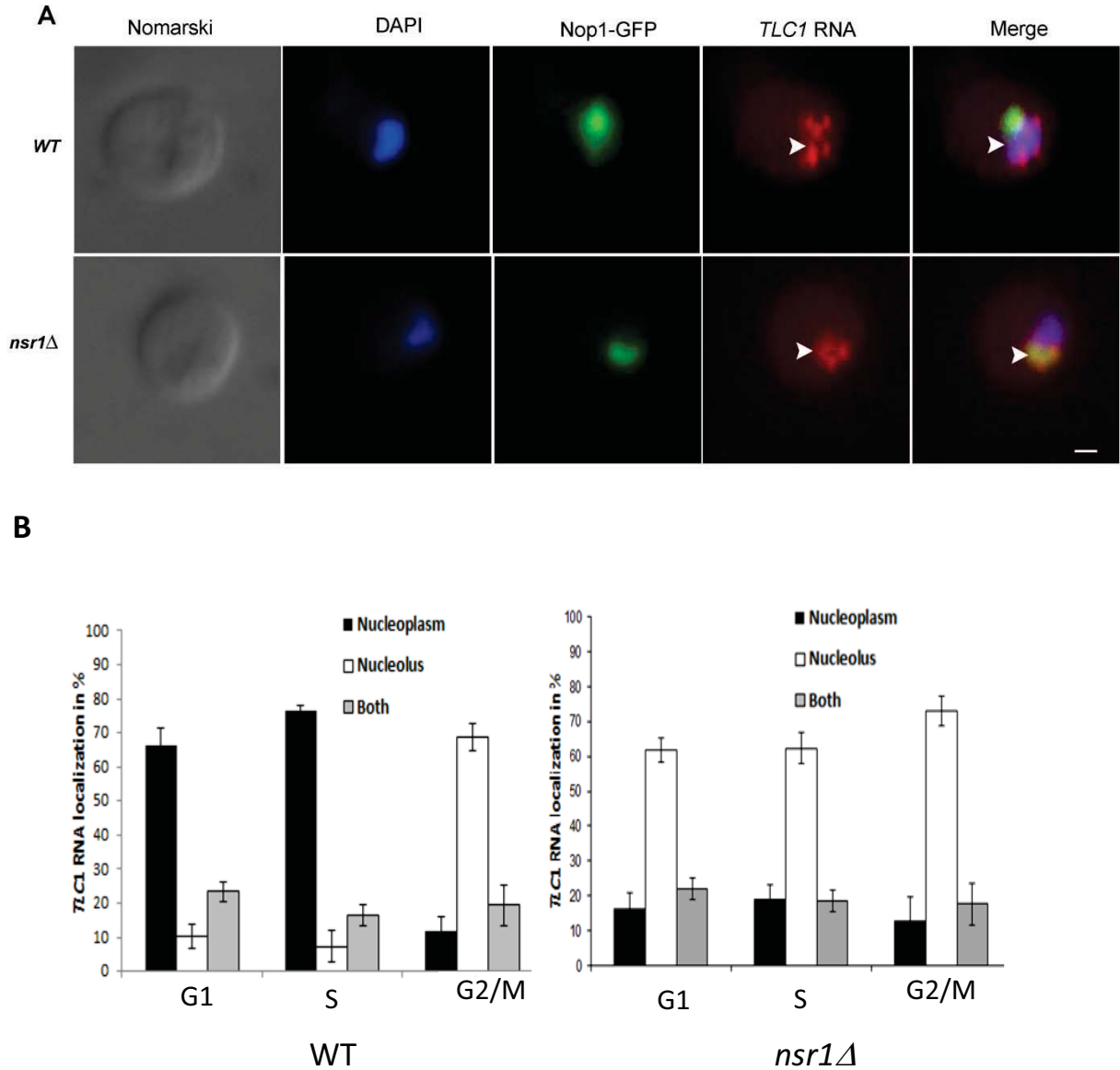


Figure 3.1: *TLC1* RNA accumulates in the nucleolus in G1/S in *nsr1Δ* cell. **A)** FISH on *TLC1* RNA in WT and *nsr1Δ* strains. The nucleolus was stained with the nucleolar protein Nop1-GFP. Arrowheads mark the position of the *TLC1* RNA in selected cells. DAPI: DNA staining. Scale bar = 1 μ m. **B)** Quantification of *TLC1* RNA localization during the cell cycle in WT and *nsr1Δ* cells. Error bars represent \pm one standard deviation.

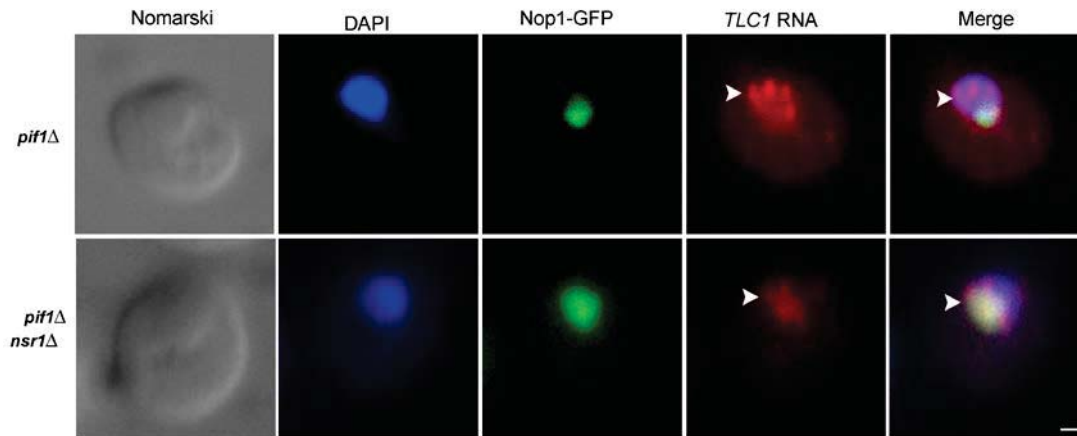
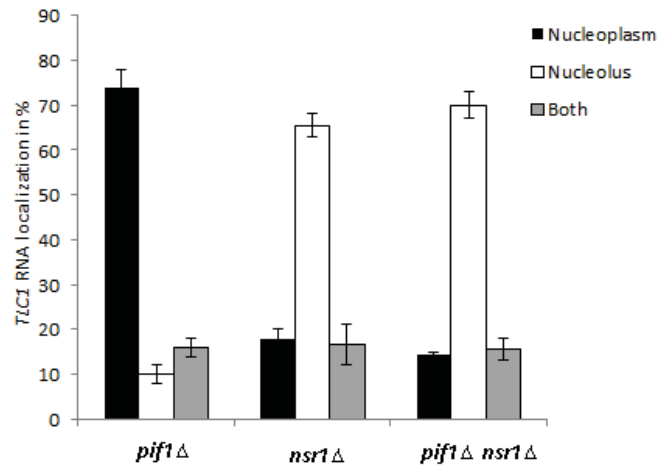
A**B**

Figure 3.2: NSR1 is epistatic to PIF1. A) FISH on *TLC1* RNA in *pif1Δ* and *pif1Δ nsr1Δ* strains. Arrowheads indicate position of *TLC1* RNA foci in cells. Scale bar = 1 μ m

B) Quantification of *TLC1* RNA localization in *pif1Δ*, *nsr1Δ* and *pif1Δ nsr1Δ* strains.

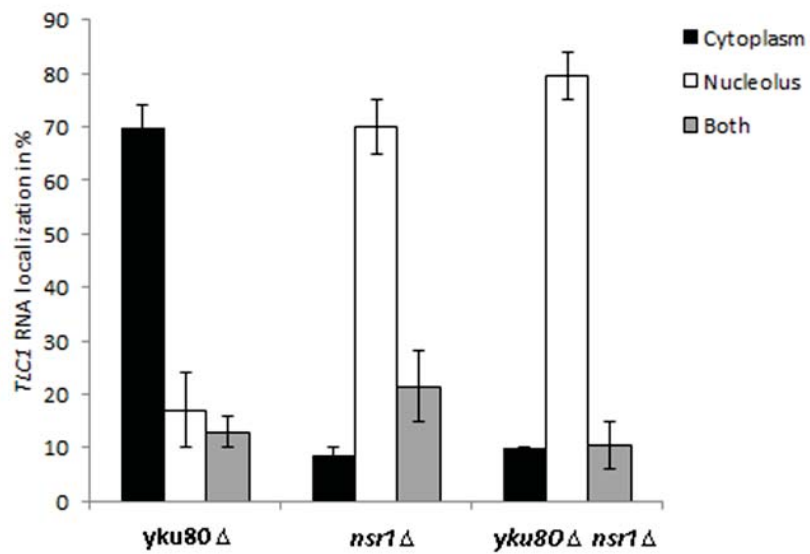


Figure 3.3: Nsr1 acts upstream of the yKu70/80 complex. Quantification of *TLC1* RNA localization in *yku80*Δ, *nsr1*Δ and *yku80*Δ *nsr1*Δ strains.

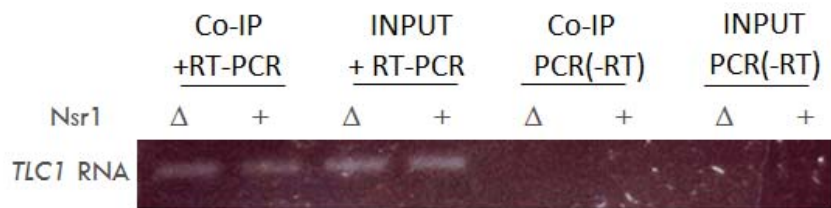


Figure 3.4: NSR1 is not required for TLC1 RNA 5' cap hypermethylation by Tgs1. Immunoprecipitation of trimethylguanosine (TMG) capped *TLC1* RNA in WT and *nsr1Δ* strains using an anti-TMG antibody followed by RT-PCR (+RT-PCR) or not (-RT-PCR).

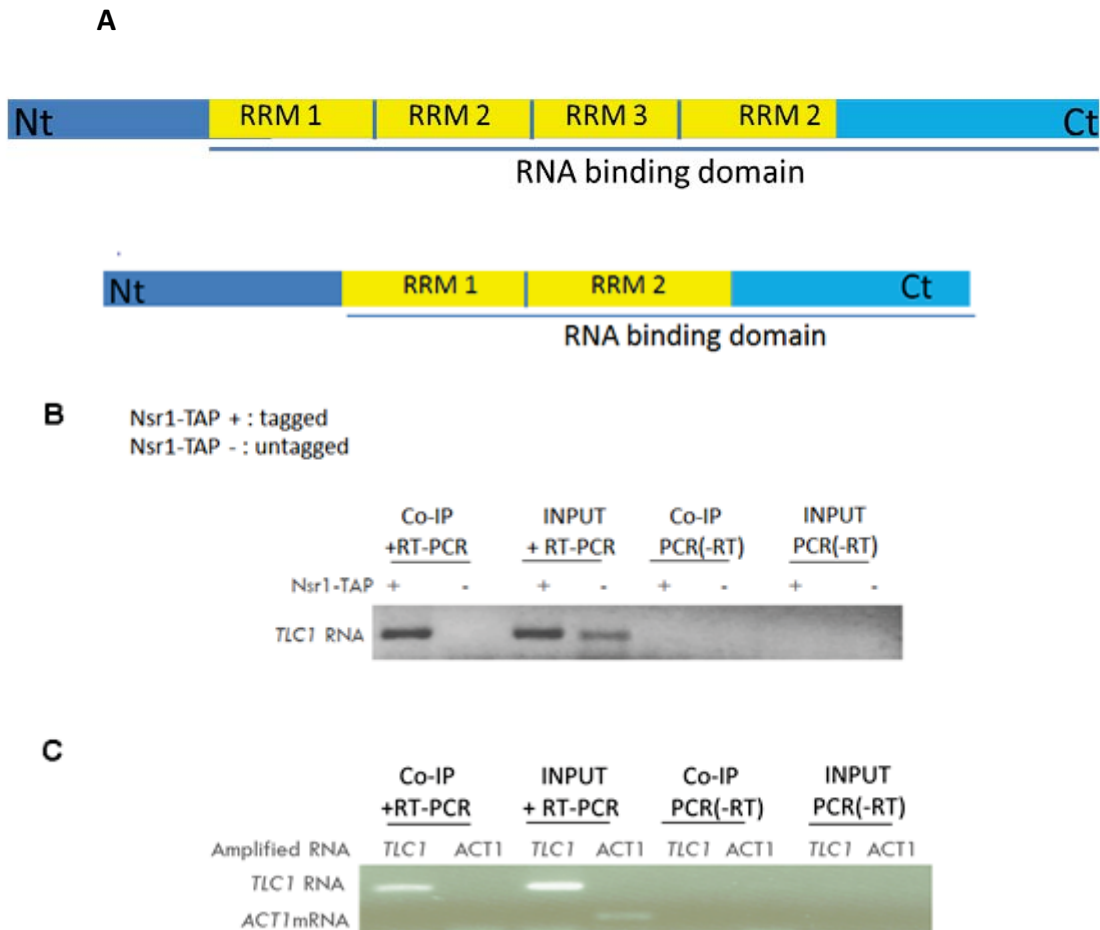


Figure 3.5: Nsr1 interacts with *TLC1* RNA *in vivo*. **A)** Schematic representation of the Nucleolin (Top) and Nsr1 (bottom) structure. RRM: RNA recognition motif. **B)** Detection of *TLC1* RNA from immunoprecipitated Nsr1-TAP. Input: *TLC1* RNA and *ACT1* mRNA from total yeast extract; Co-IP: *TLC1* RNA and *ACT1* mRNA were PCR amplified from reverse-transcribed (RT+PCR) or without reverse transcription (-RT-PCR). These results are representative of two independent experiments. **C)** Nsr1 interacts with *TLC1* RNA after cross-linking. Immunoprecipitation of Nsr1 from strains expressing either Nsr1-TAP (tagged) or Nsr1 without tag (untagged), followed by RNA purification and RT-PCR amplification of *TLC1* RNA. Input: *TLC1* RNA from total yeast extract; Co-IP: *TLC1* RNA from immunoprecipitate was amplified by PCR after reverse-transcription (+RT) or not (-RT).

Chapitre 4: Discussion

L'ajout de télomères *de novo* est un évènement qui met en danger la stabilité génomique puisqu'il entraîne, dans la plupart des cas, une perte du bras chromosomique. En conséquence, il conduit soit à une perte de l'hétérozygotie (LOH) dans les cellules diploïdes, soit à la mort cellulaire dans les cellules haploïdes. La LOH correspond à une perte de l'allèle secondaire du gène, ce qui engendre une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur; un élément qui peut conduire à la tumorigenèse. De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'ajout de télomères *de novo* sera un atout puissant pour lutter contre le développement et la progression des tumeurs. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans le contrôle de cette inhibition, incluant l'hélicase Pif1, la kinase Mec1/ATR et la résection des CDBs. Toutefois, les détails des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces processus ne sont pas bien compris.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la voie de la RH dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*, nous avons utilisé la levure *S. cerevisiae* comme modèle d'étude afin de suivre le composant limitant de la télomérase, en localisant son composant ARN. Ce chapitre de la discussion portera sur l'analyse des résultats présentés dans le premier article. Pour la première fois, nous proposons que le trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* joue un rôle important dans la stabilité génomique en contrôlant la localisation et le recrutement de la télomérase aux CDBs. Par notre étude, la localisation de l'ARN *TLC1* aux CDBs en cellules fixées a été visualisée pour la première fois. Par conséquent, l'accent sera mis ici sur la localisation de l'ARN *TLC1* en réponse aux dommages à l'ADN et sur le rôle spécifique du facteur clé de la machinerie de la RH, Rad52 dans l'inhibition de l'ajout de télomère *de novo*.

4.1 Trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire

Nous avons pu étudier la localisation endogène de l'ARN *TLC1 in situ* durant le cycle cellulaire dans les cellules sauvages. Cet ARN s'accumule dans le nucléoplasme en phase G1/S pour y allonger les télomères, mais s'accumule dans le nucléole en phase G2/M (Gallardo et al, 2008) (Figure 2.1A-B). La télomérase joue un rôle essentiel dans l'élongation

des télomères et dans la réparation des CDBs, particulièrement, lorsque les autres voies de réparation sont absentes. En fait, la RH assure la réparation des CDBs pendant les phases S et G2 et elle se déroule uniquement dans le nucléoplasme. De même, la télomérase est active à la fin de la phase S et elle pourrait interférer avec la RH pour la réparation de CDBs.

Deux possibilités peuvent expliquer la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* en phase G2/M. La première suggère que cette localisation empêche son activité dans la réparation des CDBs au nucléoplasme, alors que la deuxième implique la présence d'une activité de la télomérase au nucléole. Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de l'interaction Cdc13-Est1 dans l'activité de la télomérase aux télomères et à une CDB induite par l'endonucléase HO (Bianchi et al, 2004; Zhang & Durocher, 2010). Donc, si la télomérase est active au nucléole, il faudrait avoir une localisation nucléolaire de Cdc13. Notre observation que Cdc13 ne se localise pas au nucléole avant et après traitement des cellules sauvages par la bléomycine, suggère que la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* en phase G2/M n'est pas liée à une activité de la télomérase dans le nucléole (non-montrée).

4.2 L'hélicase Pif1 contrôle la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléole en phase G2/M

En plus de son rôle dans la régulation de la taille des télomères, l'hélicase Pif1 inhibe l'ajout de télomères *de novo* aux CDBs. En effet, la délétion de *PIF1* entraîne une élongation des télomères et une augmentation du taux de GCR qui, pour la majorité, correspond à l'ajout de télomères *de novo* (Schulz & Zakian, 1994). D'une manière intéressante, nos résultats montrent que la délétion de *PIF1* entraîne un défaut du trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* puisque cet ARN reste bloqué dans le nucléoplasme durant toutes les phases du cycle cellulaire (comparer la figure 2.1B et C). Ce blocage de l'ARN *TLC1* dans le nucléoplasme pourrait expliquer, en partie, l'augmentation du taux d'ajout de télomères *de novo* détectée

dans les cellules *pif1Δ*. En conséquence, la localisation nucléolaire de l'ARN *TLC1* en phase G2/M pourrait prévenir l'instabilité génomique par l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*.

De la même façon, nous avons trouvé que l'accumulation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* dans les cellules *pif1-m2* est réduite de 2 fois et demi comparativement aux cellules *pif1Δ* (comparer la figure 4.1 et 2.1 C). Cette réduction de l'accumulation de l'ARN *TLC1* dans le nucléoplasme comparativement aux cellules *pif1Δ* serait peut-être responsable de la réduction du taux de l'ajout de télomères *de novo* observée dans le mutant *pif1-m2*. En effet, le taux de GCR passe de 1000 dans les cellules *pif1Δ* à 240 dans les cellules *pif1-m2* (Myung et al, 2001). Ces résultats suggèrent que peut-être, l'accumulation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* en phase G2/M serait proportionnelle à l'augmentation du taux de l'ajout de télomère *de novo*.

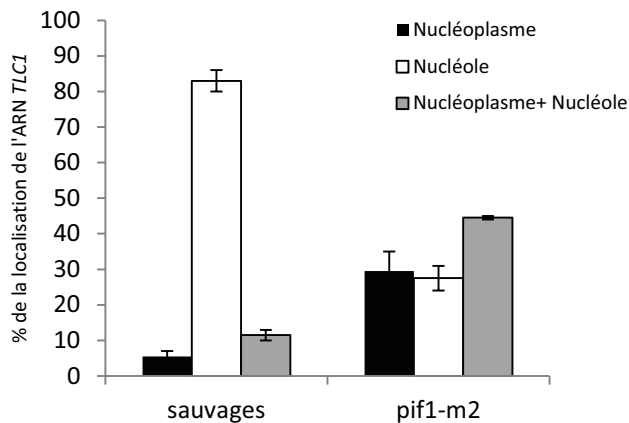


Figure 4.1 : la localisation de l'ARN *TLC1* dans les cellules sauvages et mutantes *pif1-m2*

4.3 Rad52 inhibe l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN *TLC1* aux CDBs.

Plusieurs études ont montré que l'hélicase Pif1 agit spécifiquement sur la liaison de la télomérase aux télomères et à la CDB induite par l'endonucléase HO mais sans affecter l'accumulation de Cdc13 à ces régions (Phillips et al, 2015; Zhou et al, 2000). L'utilisation de la technique de ChIP montre que la liaison d'Est1 et surtout d'Est2 à une CDB induite, augmente dans le mutant *pif1-m2* par rapport aux cellules sauvages. Toutefois, l'association de Cdc13 à la CDB reste intacte dans les cellules sauvages et chez le mutant *pif1-m2* (Phillips et al, 2015). En plus de l'activité de l'hélicase Pif1, l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 à une CDB induite empêche la formation de télomères *de novo* (Chung et al, 2010; Zhang & Durocher, 2010), suggérant que l'activité de l'hélicase Pif1 est insuffisante pour inhiber l'ajout de télomères *de novo*. Comme nous avons mentionné dans l'introduction, la résection et la kinase Mec1 *via* la phosphorylation de Cdc13 au résidu S306 inhibe l'accumulation de Cdc13 à une CDB induite (Zhang & Durocher, 2010). Cependant, d'autres évidences montrent que ces deux mécanismes ne sont pas suffisants pour éliminer totalement l'accumulation de Cdc13 et le recrutement de la télomérase à une CDB induite, puisque l'accumulation de Cdc13 et le recrutement de la télomérase peuvent être détectés même en absence de l'ajout de télomères *de novo* (Oza et al, 2009; Ribaud et al, 2012). Ceci suggère que l'inhibition totale de l'accumulation de Cdc13 à la CDB requiert d'autres facteurs qui agissent probablement en collaboration avec la résection et la kinase Mec1 pour empêcher l'accumulation de Cdc13 et le recrutement de la télomérase aux CDBs.

Par ailleurs, la présence d'une relation de synergie entre l'hélicase Pif1 et la protéine Rad52 dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo* reflète un rôle spécifique de Rad52 dans cet événement (Myung et al, 2001). L'hélicase Pif1 inhibe l'association de la télomérase aux CDBs bien que le rôle spécifique de Rad52 dans cet événement reste inconnu. Nos résultats montrent un rôle potentiel de Rad52 dans l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN *TLC1* aux CDBs. Dans les cellules sauvages, nous avons observé que

Cdc13 forme des foci dans un petit nombre de cellules après traitement par la bléomycine alors que l'ARN *TLC1* s'accumule, mais faiblement dans le nucléoplasme de certaines cellules en phase G2/M (Figure 2.5 A-B). Ceci indique que la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme est liée à la présence des dommages à l'ADN et l'accumulation de Cdc13 aux CDBs. En revanche, la délétion de *RAD52* montre qu'en plus de la formation des foci de Cdc13, la plupart des cellules forment des *clusters* de Cdc13, dont la majorité colocalise avec les sites de CDBs (Figure 2.5C-E).

Une hypothèse pour expliquer cette accumulation de Cdc13 aux CDBs serait que la délétion de *RAD52* empêcherait la réparation des CDBs par la voie de la RH, ce qui favoriserait la déphosphorylation de Cdc13 au résidu S306 par la voie de phosphatase Rrd1/Pph3 et permettrait son accumulation aux sites de cassures. En fait, si cette proposition est vraie, l'accumulation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* après traitement du mutant *rad52Δ* par la bléomycine devrait être la même ou similaire à son accumulation dans le mutant *sml1Δ mec1Δ rad52Δ*, puisque dans un mutant *sml1Δ mec1Δ*, Cdc13 ne sera pas phosphorylée. Néanmoins, nos résultats de localisation de l'ARN *TLC1* après la génération de CDBs montrent que l'accumulation nucléoplasmique de cet ARN dans les cellules *rad52Δ* est à peu près deux fois plus élevée comparativement aux cellules *sml1Δ mec1Δ rad52Δ* (Figure 2.4B). Ceci suggère que l'effet de Rad52 dans l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN *TLC1* aux CDBs est indépendant du rôle de la kinase Mec1. De même, la délétion de *RAD52* ne réduit pas la génération d'ADNsb comme dans le double mutant *exo1Δ sgs1Δ* (Chung et al, 2010), mettant en évidence que l'accumulation de Cdc13 aux CDBs observée dans les cellules *rad52Δ* n'est pas liée à un défaut de la résection.

Est-ce que la formation des foci de Cdc13 et l'accumulation de l'ARN *TLC1* dans le nucléoplasme de certaines cellules sauvages peut conduire à des événements de formation de télomères *de novo*?

Dans les cellules sauvages, le recrutement de Cdc13 et de la sous unité Est2 ou Est1 à une CDB induite n'engendre pas la formation d'un télomère *de novo* à cette cassure (Oza et al, 2009; Ribaud et al, 2012). Cet évènement semble être supprimé par la formation du nucléofilament puisque l'analyse de plus de 800 points de jonction a montré une absence d'insertion de répétitions TG aux CDBs qui sont réparables par la voie de la RH (Putnam et al, 2004). Cela suggère qu'une fois le nucléofilament formé, il ne peut pas y avoir de transfert vers la réparation de la CDB par l'ajout de télomères *de novo*, et vice versa (Putnam et al, 2004). En revanche, plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de l'accumulation de Cdc13 dans le recrutement de la télomérase à une CDB induite et l'ajout de télomères *de novo* (Bianchi et al, 2004; Hirano & Sugimoto, 2007a). En conséquence, l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme par Rad52 réduit fortement le recrutement de la télomérase aux CDBs et l'ajout de télomères *de novo*.

D'autre part, en se basant sur son abondance et sa capacité à lier l'ADNsb, le complexe RPA a été qualifié comme étant le facteur clé de la voie de la RH qui inhibe l'accumulation de Cdc13 aux CDBs. Cependant, nos résultats montrent que Cdc13 peut s'associer avec les CDBs dans le mutant *rad52Δ*, qui exprime toujours le complexe RPA (Figure 2.5C), ce qui met en évidence que le complexe RPA ne joue pas un rôle direct dans l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 aux CDBs. D'une manière similaire, l'association simultanée du complexe RPA et de la protéine Cdc13 aux télomères peut-être détectée durant leur réplication, ce qui indique que la présence de ces deux complexes est conservée entre les télomères et les CDBs. En effet, l'utilisation de la technique de la Co-IP a montré la présence d'une interaction entre le complexe RPA et Cdc13 au niveau du télomère à la fin de la phase S, le temps où les télomères sont y allongés par la télomérase (Luciano et al, 2012). Néanmoins, l'absence de la détection du recrutement du complexe RPA au télomère par microscopie en fluorescence suggère que son accumulation est très faible (Khadaroo et al, 2009).

Contrairement à l'effet de Rad52, nous avons trouvé que la délétion de *RAD51* inhibe totalement l'accumulation de Cdc13 et la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme (Figure 2.5B-F). Ces données confirment l'observation que Rad51 est requise pour le

recrutement de Cdc13 et de la sous-unité catalytique Est2 à une CDB non-réparable (Oza et al, 2009). Cet effet opposé entre Rad52 et Rad51 sur l'accumulation de Cdc13 et le recrutement de la télomérase aux CDBs semble conservé. En effet, la délétion de *RAD22*, un homologue de Rad52 chez *S.pombe*, résulte en un niveau plus élevé d'évènement de la formation de télomères *de novo*. En revanche, la délétion de *RHP51*, l'homologue de Rad51 chez cette levure, réduit fortement cet évènement (Cullen et al, 2007). Nous ne pouvons pas expliquer clairement comment la délétion de *RAD51* réduit l'accumulation de Cdc13 aux CDBs et la formation de télomères *de novo*. Une possibilité serait qu'en absence de Rad51, l'assemblage de Rad52 *via* son interaction avec le complexe RPA persisterait aux CDBs, ce qui empêcherait l'accumulation de Cdc13. Ceci est en accord avec la persistance des foci de Rad52-GFP dans les cellules *rad51Δ* (Alvaro et al, 2007).

Une autre question importante reste en suspens: comment Rad52 inhibe-t-elle l'accumulation de Cdc13 aux CDBs ?

Pour répondre à cette question, nous proposons trois possibilités :

1- La protéine Cdc13 lie l'ADN télomérique simple-brin ainsi que le brin d'ADNsb qui se génère par la résection des CDBs et qui contient des répétitions TG (Chung et al, 2010). Contrairement aux cellules sauvage, en absence d'une séquence donneuse à la séquence endommagée ou de Rad51, la résection peut dégrader des milliers de nucléotides et peut générer un brin d'ADNsb de plus grande longueur (jusqu'à 50kb) (Sugawara et al, 1995; Zhu et al, 2008). Donc, l'accumulation de Cdc13 observée dans les cellules *rad52Δ* pourrait être due à la génération d'un brin d'ADNsb plus long, lequel aurait plus de chance de contenir des séquences riche en TG comparativement aux cellules sauvages. De même, la génération d'une CDB engendre une phosphorylation rapide de l'histone H2A (γ -H2A) dans une région d'ADNdb d'approximativement 100 kb autour du site de clivage HO chez la levure et à plusieurs centaines de kb chez les mammifères (Shroff et al, 2004). Par conséquent, si la présence d'un long brin d'ADNsb est requise pour l'accumulation de Cdc13, la cinétique d'accumulation de Cdc13 sur l'ADNsb devrait être plus lente par rapport la cinétique de phosphorylation de l'histone H2A sur l'ADNdb. Nos résultats indiquent cependant que la

cinétique de l'accumulation de Cdc13 aux CDBs est identique à la cinétique de la phosphorylation de l'histone H2A (Figure 2.6A). En accord avec ceci, la délétion du gène *RAD51* forme aussi un long brin d'ADNsb, bien que l'accumulation de Cdc13 aux CDBs soit totalement inhibée dans ce mutant (Figure 2.5B). Ces données suggèrent que l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 à l'ADNsb par Rad52 s'effectue peut-être *via* un mécanisme direct, indépendant de la génération d'un long brin d'ADNsb.

2- Afin de comprendre la dynamique des interactions protéine-acide nucléique *in vitro*, l'équipe du Dr. Eric C. Greene a développé une nouvelle approche appelée « *curtains* d'ADNsb ». Le principe de cet essai est d'attacher des milliers de molécules individuelles d'ADNsb sur une surface recouverte d'une bicouche lipidique, ce qui permet la visualisation directe de centaines, voire de milliers de molécules individuelles d'ADNsb ainsi que la dynamique de toutes les protéines qui sont liées par microscopie en fluorescence (Collins et al, 2014). En utilisant cette technique, cette équipe a pu visualiser en temps réel le comportement de la liaison du complexe RPA à l'ADNsb et la relation spatio-temporelle entre RPA, Rad52 et Rad51 durant l'assemblage du complexe présynaptique (Gibb et al, 2014a; Gibb et al, 2014b). Une de ces études a mis en évidence que, malgré l'absence de Rad52, la liaison de la fusion Rfa1-GFP à l'ADNsb reste stable plusieurs heures en absence de molécules libres de RPA dans la solution. Néanmoins, la présence de molécules libres de RPA entraîne un échange rapide entre la forme liée à l'ADNsb et la forme libre du complexe RPA, alors que l'interaction Rad52-RPA stabilise la liaison du complexe RPA à l'ADNsb, en supprimant son échange (Gibb et al, 2014a; Gibb et al, 2014b). Ces données mettent en évidence qu'en plus de son rôle dans le recrutement de Rad51 à la CDB, la protéine Rad52 stabilise l'accumulation du complexe RPA à l'ADNsb. Par conséquent, Rad52 pourrait empêcher l'échange dépendant de la concentration du complexe RPA par une protéine qu'est capable de lier l'ADNsb mais qui ne fait pas partie de la machinerie de la RH, notamment la protéine Cdc13. Donc, en absence de Rad52, il serait possible que la concentration élevée du complexe RPA aux sites de CDBs, favorise l'échange rapide entre la forme liée à l'ADNsb et la forme en solution, ce qui permettrait, la liaison de Cdc13 aux CDBs, notamment au niveau de régions riches en TG.

3- Finalement, notre observation que les foci de Cdc13 se forment dans les cellules sauvages ainsi que dans les cellules *rad52Δ*, alors que l'accumulation plus large de Cdc13 sous forme de *clusters* se produit seulement dans les cellules *rad52Δ* en phase G2/M suppose que cette accumulation de Cdc13 à l'ADNsb pourrait se faire selon deux modes différents. Une accumulation directe qui apparaît sous forme de foci, et une seconde, indirecte, *via* une interaction protéine-protéine (entre Cdc13 et une autre protéine qui lie la CDB) et qui prend la forme des *clusters*. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le complexe RPA est impliqué dans le recrutement de plusieurs facteurs aux CDBs tels que le complexe Mec1-Ddc2, le complexe 9-1-1 ainsi que la protéine Rad52, qui possède deux domaines de liaison à l'ADN aux parties N et C terminales et qui peuvent se lier respectivement à l'ADNsb et double-brin. Malgré la présence de ces deux domaines, le recrutement de Rad52 à la CDB s'effectue *via* son interaction avec le complexe RPA. De même, la protéine Cdc13 possède un domaine *OB-fold* central qui lie à l'ADNsb riche en TG. Malgré la présence de ce domaine, il serait possible qu'en absence de Rad52, la protéine Cdc13 soit recrutée aux CDBs *via* son interaction avec un autre facteur qui lie à l'ADNsb. Un candidat potentiel serait le complexe RPA, alors que la présence de Rad52 empêcherait l'interaction Cdc13-RPA. En accord avec cette proposition, la phosphorylation de Cdc13 au résidu Sérine 306 par la kinase Mec1 empêche son accumulation à la CDB. Cette phosphorylation s'effectue dans le domaine du recrutement (RD) qui est un domaine important pour les interactions protéine-protéine (Pennock et al, 2001a; Petreaca et al, 2007). Toutefois, la phosphorylation de Cdc13 n'affecte pas son interaction avec la sous-unité Est1 (l'interaction Cdc13-Est1), parce que d'une part, la délétion d'*EST1* n'a aucun impact sur l'accumulation de Cdc13 à la CDB induite et, d'autre part, l'accumulation de la sous-unité Est1 à la CDB est maintenue dans le mutant *cdc13-S306A*, ce qui suggère que la phosphorylation de Cdc13 au résidu S306 affecte son interaction avec une protéine autre que Est1 (Zhang & Durocher, 2010). Il serait intéressant de tester par Co-IP si Cdc13 interagit *in vivo* avec le complexe RPA en présence et en absence de dommages à l'ADN. Il faudrait aussi voir si cette interaction est ADN-dépendante. De plus, il serait important de tester l'effet de deux mutants de la grande sous-unité Rfa1 de l'hétérotrimère RPA (*rfa1-D288Y* et *rfa1-t11*) sur l'accumulation de Cdc13 aux CDBs et la formation de *clusters*. L'allèle *rfa1-D288Y* lie moins bien l'ADNsb, alors que l'allèle *rfa1-t11*

se caractérise par une mutation dans le domaine d'interaction protéine- protéine et montre un défaut du recrutement du complexe Mec1-Ddc2 aux CDBs (Smith & Rothstein, 1995; Zou & Elledge, 2003).

4.4 L'ARN *TLC1* colocalise partiellement avec les sites de CDBs en absence de Rad52.

Il est envisageable que l'accumulation de Cdc13 aux CDBs et la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme des cellules *rad52Δ* résulteraient d'une forte colocalisation entre l'ARN *TLC1* et les sites de CDBs. Néanmoins, ce n'est pas ce que nous avons observé lors des études de colocalisation entre l'ARN *TLC1* et les marqueurs cytologiques des CDBs (la fusion Rfa1-GFP et γ -H2A) (Figure 2.3A-B). En effet, nous avons observé que la majorité des foci d'ARN *TLC1* dans les cellules *rad52Δ* sont dans le nucléoplasme, mais seulement dans 30% des cellules, nous avons noté une colocalisation avec la fusion Rfa1-GFP (Figure 2.3A). Ceci suggère que malgré l'accumulation de Cdc13 à la majorité des CDBs, ce n'est pas toutes les cassures qui sont accessibles à la télomérase. Cette inhibition de l'association de la télomérase à la majorité des CDBs est peut-être due à l'activité de l'hélicase Pif1. En accord avec ceci, l'utilisation d'imagerie en cellules vivantes montre que les foci de la protéine de fusion Pif1-YFP augmentent après induction de CDBs par les RIs, alors que la majorité colocalise avec les foci Rad52-CFP en phase G2/M. Toutefois, la délétion de *RAD52* n'entraîne pas un arrêt de la formation des foci de la fusion Pif1-YFP (Wagner et al, 2006).

En revanche, la colocalisation de l'ARN *TLC1* avec quelques CDBs suggère que ces cassures sont moins sensibles à l'activité de Pif1 et donc, plus accessibles à la télomérase. La construction de souches avec 5, 11, 17 et 81 répétitions TG adjacentes à une CDB montre que la formation de télomères *de novo* à cette CDB se produit seulement en présence de 81 TG, suggérant un recrutement robuste de la télomérase. Cependant, dans un fond génétique *pif1-m2*, les répétitions TG5, 11 et 17 permettent maintenant la formation de télomères *de novo* (Zhang & Durocher, 2010). Ces données suggèrent que l'hélicase Pif1 est régulée

différemment en présence de différentes répétitions TG. D'autres données suggèrent que la présence de 22 répétitions TG adjacentes à une CDB est suffisante pour favoriser la formation de télomères *de novo*, même en présence de Pif1 (Hirano & Sugimoto, 2007a). Il est donc possible que la colocalisation entre l'ARN *TLC1* et les CDBs se produise dans des régions qui soient riches en répétitions TG (pourvues de 22 répétitions TG ou plus). Cependant, la présence de répétitions TG d'une longueur de 17 répétitions ou plus est très rare dans les régions non-téломériques du génome de la levure (Mangahas et al, 2001a).

Une autre possibilité serait que l'ARN *TLC1* colocalise avec des CDBs aux télomères. Toutefois, nos résultats indiquent que l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme dépend de Rad51, une protéine qui ne joue aucun rôle dans l'élongation des télomères par la télomérase (Le et al, 1999). De plus, l'association de l'ARN *TLC1* avec les CDBs dépend de l'absence de Rad52, une protéine qui n'est pas impliquée dans la maintenance des télomères par la télomérase (Le et al, 1999). En revanche, une étude effectuée chez la levure, en générant une CDB par le méganucléase I-SceI dans différentes régions d'un chromosome, Ricchetti et ses collègues ont pu montrer que la délétion de *RAD52* augmente la fréquence de l'ajout de télomères *de novo* particulièrement dans la région sous-téломérique (Ricchetti et al, 2003). D'une manière similaire à la levure, l'ajout de télomères *de novo* aux CDBs dans des cellules souches embryonnaires de souris n'a pas été observé dans les régions intra-chromosomiques alors que c'est un évènement fréquent dans les régions sous-téломériques et constituerait approximativement un tiers des réarrangements chromosomiques (Gao et al, 2008). Une possibilité serait que l'ajout de télomères *de novo* dans les régions sous-téломériques serait dû à l'inhibition de la voie du NHEJ par l'effet local des composantes de la shelterine (Murnane, 2012). Ceci suggère que la voie de la RH et la télomérase peuvent compétitionner pour la réparation de CDBs dans la région sous-téломérique, alors que la délétion de *RAD52* favorise plutôt la réparation par la voie de l'ajout de télomères *de novo*.

4.5 L'ajout de télomères *de novo* en absence de Rad52

Une autre question est soulevée par nos résultats : si la protéine Rad52 supprime l'accumulation de Cdc13, la localisation et le recrutement de la télomérase aux CDBs, est-ce que la délétion de *RAD52* résulte en une augmentation de l'ajout de télomères *de novo*?

Une étude génétique testant la sensibilité des délétions des gènes *RAD52*, *YKU70* et de double mutant *RAD52 YKU70* à différentes concentrations de bléomycine montre la présence d'une relation de synergie entre Rad52 et yKu pour la réparation des CDBs induites par la bléomycine. En fait, le double mutant *rad52Δ ku70Δ* est plus sensible à la bléomycine par rapport au double mutant *rad52Δ dln4Δ*, suggérant que le rôle de Ku dans la réparation des CDBs induites par la bléomycine est indépendant de sa fonction dans la voie de NHEJ. D'une manière intéressante, la combinaison de la mutation *yku80-135i* avec la délétion de *RAD52* engendre une sensibilité très proche à celle du double mutant *rad52Δ yku80Δ*. L'allèle *yku80-135i* n'interagit plus avec l'ARN *TLC1* ce qui engendre une accumulation cytoplasmique de cet ARN, mais sans perturbe la fonction du complexe yKu dans la réparation de CDBs par la voie de NHEJ et la protection des télomères en phase G1 (Stellwagen et al, 2003b; Williams et al, 2014b). Cela suggère que la sensibilité accrue du mutant *yku80-135i rad52Δ* par rapport au mutant *rad52Δ* est peut-être due à la diminution de l'équilibre d'ARN *TLC1* au noyau et, par conséquent, en une diminution de la réparation par la télomérase de certaines CDBs induites par la bléomycine (Tam et al, 2007a).

Contrairement à notre travail, plusieurs études ont montré que la délétion de *RAD52* n'aboutit pas à l'ajout de télomères *de novo* au niveau des CDBs spontanées ou d'une CDB induite par l'endonucléase HO dans la région intrachromosomique (Kramer & Haber, 1993; Mangahas et al, 2001a; Myung et al, 2001). La délétion du gène *RAD52* engendre une augmentation du taux de GCR dont la majorité correspond à des translocations, alors que le taux de l'ajout de télomères *de novo* est très faible. Toutefois, l'effet de la délétion de *RAD52* sur la formation de télomères *de novo* apparaît seulement en absence de l'activité de l'hélicase Pif1, notamment dans un mutant *pif1-m2 rad52Δ* (Myung et al, 2001). Ces données suggèrent

que l'effet de Rad52 dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo* est supprimé par l'activité de l'hélicase Pif1 chez la levure *S.cerevisae*. Nous ne savons pas pourquoi la télomérase serait impliquée dans la réparation de certaines CDBs induites par la bléomycine alors qu'elle est inhibée en présence d'une seule CDB dans la région intra-chromosomique. Une possibilité serait due au fait que le traitement par la bléomycine génère une ou des CDBs au niveau des régions sous-télomériques, qui sont plus sensibles à la génération de CDBs par rapport aux régions intra-chromosomiques. En effet, la génération d'une CDB dans la région sous-télomérique par l'expression de la méganucléase I-SceI montre une augmentation de la formation du taux de GCR par rapport la région intra-chromosomique (Ricchetti et al, 2003). Cette sensibilité de la région sous-télomérique à la formation de CDBs a aussi été observée dans les cellules des mammifères (O. Zschenker et al, 2009).

Par ailleurs, si l'hélicase Pif1 joue un rôle principal dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo*, pourquoi la cellule a-t-elle besoin de Rad52 pour inhiber l'accumulation de Cdc13, la localisation et le recrutement de la télomérase aux CDBs?

Comme nous avons décrit dans l'introduction, l'ajout de télomères *de novo* a été observé dans plusieurs organismes, incluant les cellules humaines. Chez *S. cerevisae*, la formation de télomères *de novo* requiert la présence d'au moins trois étapes, soit la localisation de la télomérase au nucléoplasme, son recrutement aux CDBs et l'élongation de la CDB par la télomérase pour former un télomère *de novo*. Il semble que la protéine Rad52 agit principalement au niveau des deux premières étapes alors que l'hélicase Pif1 agit au niveau de la dernière étape. Pour cette raison, l'action de l'hélicase Pif1 domine celle de Rad52 dans l'inhibition de la formation de télomères *de novo*. Par conséquent, l'intervention de l'hélicase Pif1 et Rad52 ferait en sorte que le taux d'ajout de télomères *de novo* ne dépasse pas 0,1% dans les cellules sauvages de la levure et augmente à 1% dans les cellules *rad52Δ* (Kramer & Haber, 1993).

Néanmoins, l'activité de l'hélicase Pif1 dans l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo* n'est pas conservée au cours de l'évolution. Donc, il est possible que l'inhibition de la

localisation et du recrutement de la télomérase aux CDBs par des homologues de Rad52 dans d'autres organismes soit utilisée comme la voie essentielle pour empêcher l'ajout de télomères *de novo*. Par exemple, l'hélicase Pfh1+, un homologue de Pif1 chez *S.pombe*, joue le rôle d'un régulateur positif de l'élongation de télomères au lieu du rôle négatif de Pif1 chez *S. cerevisiae* (Zhou et al, 2002). Chez cette levure, l'inhibition de la voie de la RH après induction d'une CDB par l'endonucléase HO conduit à la formation de télomères *de novo*. Particulièrement, la délétion de *RAD22*, l'homologue de *RAD52* engendre le taux le plus élevé de la formation de télomères *de novo* (Cullen et al, 2007). De la même façon, une étude récente chez la levure diploïde *Candida albicans* a montré que la délétion du gène *RAD52* conduit aussi à un taux élevé de LOH dû à l'ajout de télomères *de novo* (Andaluz et al, 2011). Bien que, la réinsertion de *RAD52* entraîne le rétablissement de la stabilité génomique par l'inhibition de la formation de télomères *de novo*.

Chez les mammifères, le rôle de l'homologue de l'hélicase Pif1 dans la maintenance des télomères et la stabilité génomique par l'inhibition de l'ajout de télomères *de novo* font l'objet d'un grand débat. En effet, malgré le fait que l'homologue de Pif1 chez la souris interagit *in vitro* avec la sous-unité catalytique mTERT, la délétion de *PIF1* dans cet organisme n'affecte ni la taille des télomères *in vivo*, ni l'instabilité chromosomique par la formation de télomères *de novo* (Reynolds et al, 2011; Snow et al, 2007). Néanmoins, l'expression de la télomérase dans des fibroblastes embryonnaires de souris traités par les RIs, n'engendre pas une augmentation du taux de l'ajout de télomères *de novo* suggérant une inhibition de cet événement dans la majorité des CDBs générée par les RIs (Latre et al, 2004). Ceci reflète que, d'une manière similaire à la levure, la formation de télomères *de novo* est hautement régulée dans les cellules de mammifères. Cependant, cette inhibition est indépendante de l'hélicase Pif1 est peut-être due à la présence d'un trafic intranucléaire de la télomérase et de la voie de la RH qui serait ainsi conservée au cours de l'évolution.

L'hélicase Pif1 humaine, de la même manière que son homologue de la levure, inhibe l'activité de la télomérase au télomère (Zhang et al, 2006). Toutefois, le rôle de cette protéine dans l'instabilité génomique par l'ajout de télomères *de novo* n'a pas encore été étudié. Il est possible que l'hélicase Pif1 humaine joue un rôle central dans l'inhibition de la formation de

télomères *de novo* alors que le trafic intranucléaire de la télomérase humaine joue un rôle secondaire (apparaît seulement en absence de l'activité de Pif1 humaine). En revanche, si l'activité de Pif1 est controversée, le trafic intranucléaire de la télomérase humaine pourrait être la voie principale qui inhibe ce processus. Dans les deux cas, la présence de ce trafic chez les cellules humaines serait une évidence directe de l'intervention de la voie de la RH dans l'inhibition de la formation de télomères *de novo*. Effectivement, une étude effectuée dans les cellules tumorales humaines exprimant la sous-unité catalytique hTERT fusionnée à la GFP a montré que le traitement de ces cellules par les RIs entraîne une translocation de la fusion hTERT-GFP du nucléoplasme vers le nucléole. Cette étude suggère que le trafic intranucléaire de la télomérase est aussi conservé au cours de l'évolution (Wong et al, 2002).

4.6 La SUMO E3 ligase, Siz1 contrôle la localisation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme, indépendamment de l'accumulation de Cdc13 aux CDBs.

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que la relocalisation de l'ARN *TLC1* du nucléole au nucléoplasme permettrait à la télomérase d'agir comme une voie alternative à la RH pour la réparation des CDBs. Une étude précédente a montré que la sumoylation de Rad52 est responsable de son exclusion du nucléole et que la réparation des CDBs par la voie de la RH s'effectue uniquement dans le nucléoplasme (Torres-Rosell et al, 2007). De la même façon, nous avons observé une exclusion de l'ARN *TLC1* du nucléole en absence de Rad52 après génération des CDBs, ce qui suggérerait une régulation de ce trafic par des modifications post-traductionnelles, notamment par la sumoylation. Contrairement au cas de Rad52 qu'est sumoylée par la SUMO E3 ligase Siz2, nous avons trouvé que la SUMO E3 ligase Siz1 favoriserait l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme sans réguler l'accumulation de Cdc13 aux CDBs. En effet, la délétion de *SIZ1* dans un fond génétique *rad52Δ* entraîne une rétention de l'ARN *TLC1* au nucléole en phase G2/M (Figure 2.7A). Toutefois, l'accumulation de Cdc13 aux CDBs dans les cellules *siz1Δ rad52Δ* s'effectue de la

même manière que dans les cellules *rad52Δ* traitées à la bléomycine (Figure 2.7C-Supplementary Figure 2.5).

Comment la SUMO E3 ligase Siz1 contrôle-t-elle l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléoplasme sans affecter l'accumulation de Cdc13 aux CDBs?

Dans une étude récente, le laboratoire du Dr. Stefan Jentsch a pu montrer que la sumoylation agit d'une manière différente des autres modifications post-traductionnelles et qu'elle peut cibler un groupe de protéines au lieu d'une protéine individuelle. Par exemple, dans le cas de la voie de la RH, plusieurs protéines de la réparation (Rfa1, Rad52) sont modifiées par la sumoylation au niveau de multiples sites, ce qui permet de renforcer les interactions protéine-protéine et d'accélérer la réparation des CDBs par la voie de la RH (Psakhye & Jentsch, 2012). Cette étude a aussi montré que la sumoylation des protéines de la RH dépend de la SUMO E3 ligase Siz2 et non Siz1. En effet, la spécificité de Siz2 pour la sumoylation des protéines de la RH exige la présence d'un ADNsb, lequel constitue une plateforme pour l'accumulation de Siz2 (*via* son domaine de liaison à l'ADN, domaine SAP) et des différentes protéines substrats de la machinerie de la RH.

De la même façon que Siz2, il est possible que Siz1, qui possède aussi un domaine SAP, affecte la localisation nucléoplasmique de l'ARN *TLC1* en absence de Rad52 *via* la sumoylation de plusieurs facteurs présents sur l'ADNsb. En accord avec ceci, il a été montré que Cdc13 est une cible de Siz1 et de Siz2. Cependant, la sumoylation de Cdc13 par Siz1/Siz2 serait nécessaire pour empêcher le recrutement de la télomérase aux télomères en début de la phase S (Hang et al, 2011). Nous avons montré que Siz2 n'est pas impliquée dans la régulation du trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1*. Quoique nous ne pouvons pas éliminer la possibilité d'une sumoylation de Cdc13 par Siz1 qui favoriserait son interaction avec la télomérase *via* l'interaction Cdc13-Est1 Il est possible aussi qu'en plus de Cdc13, Siz1 pourrait sumoyler d'autres facteurs, incluant les protéines composantes de la télomérase. Cela permettrait de favoriser la réparation des CDBs par l'ajout de télomères *de novo*, si la réparation par la voie de la RH est non fonctionnelle.

4.7 Modèle du trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* au cours du cycle cellulaire et en réponse aux dommages à l'ADN.

En prenant en compte tous nos résultats, nous proposons un modèle du trafic intranucléaire de l'ARN *TLC1* durant le cycle cellulaire et en réponse à des dommages à l'ADN chez la levure *S.cerevisiae*. Nous proposons que le trafic intranucléaire de la télomérase assure la stabilité génomique *via* l'inhibition de la localisation et du recrutement de la télomérase aux CDBs (Figures 4.2 et 4.3).

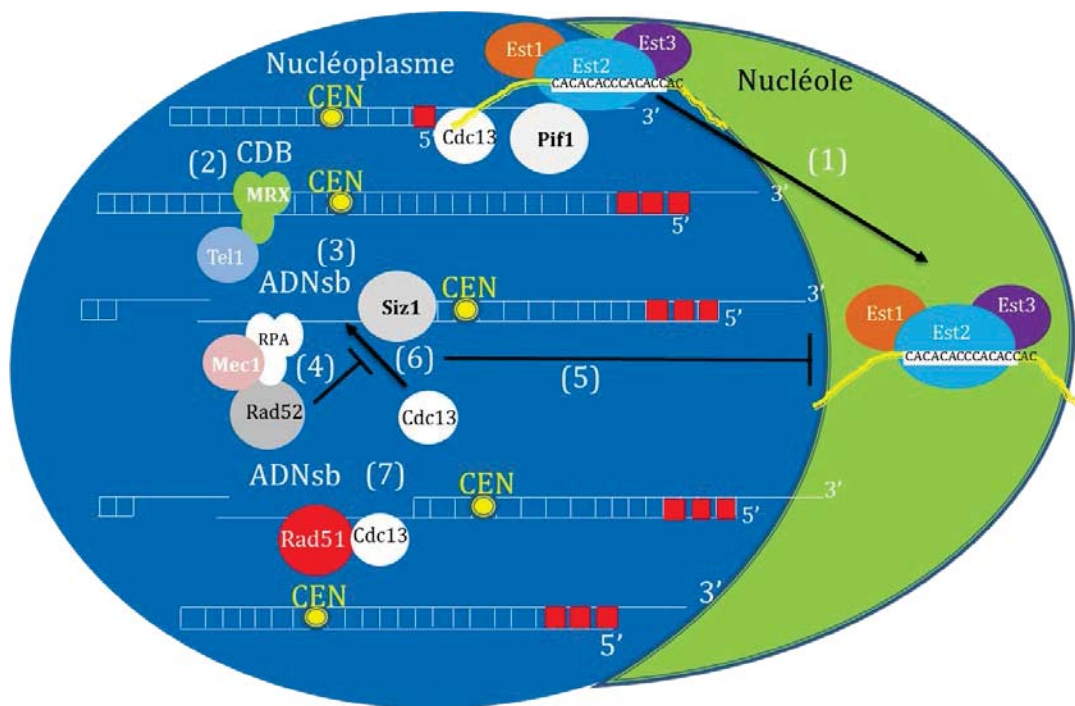


Figure 4.2: Modèle proposé du trafic intranucléaire de la télomérase durant le cycle cellulaire et en réponse à des dommages à l'ADN dans les cellules sauvages. Les chiffres sur la figure indiquent les différentes étapes du trafic, la résection, et l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 et la localisation de la télomérase aux CDBs par la protéine Rad52.

Dans ce modèle, une fois que les télomères (carrés rouges) sont allongés par la télomérase dans le nucléoplasme, l'action de l'hélicase Pif1 permet la relâche de la télomérase aux télomères en entraînant sa relocalisation au nucléole (1). La génération de CDBs est suivie par le recrutement du complexe MRX qui recrute à son tour la kinase Tel1(2). Le complexe MRX en collaboration avec d'autres nucléases, génère un ADNsb qui sera recouvert par le complexe RPA. Ce dernier recrute plusieurs facteurs, entre autre la protéine Rad52 et la kinase Mec1/ATR (3). Le recrutement de Rad52 inhibe l'accumulation de Cdc13 au site de CDB suivant un mécanisme inconnu (4) et, en même temps, empêche la relocalisation de la télomérase du nucléole au nucléoplasme (5). L'absence de l'accumulation de Cdc13 sur l'ADNsb empêcherait sa sumoylation par Siz1(6). Ensuite, Rad52, *via* son interaction avec Rad51, déplace le complexe RPA de l'ADNsb. Ceci conduit à la formation du nucléofilament et la réparation des CDBs par la voie de la RH (7). Finalement, la protéine Rad51 influence positivement l'accumulation de Cdc13 à l'ADNsb selon un mécanisme inconnu.

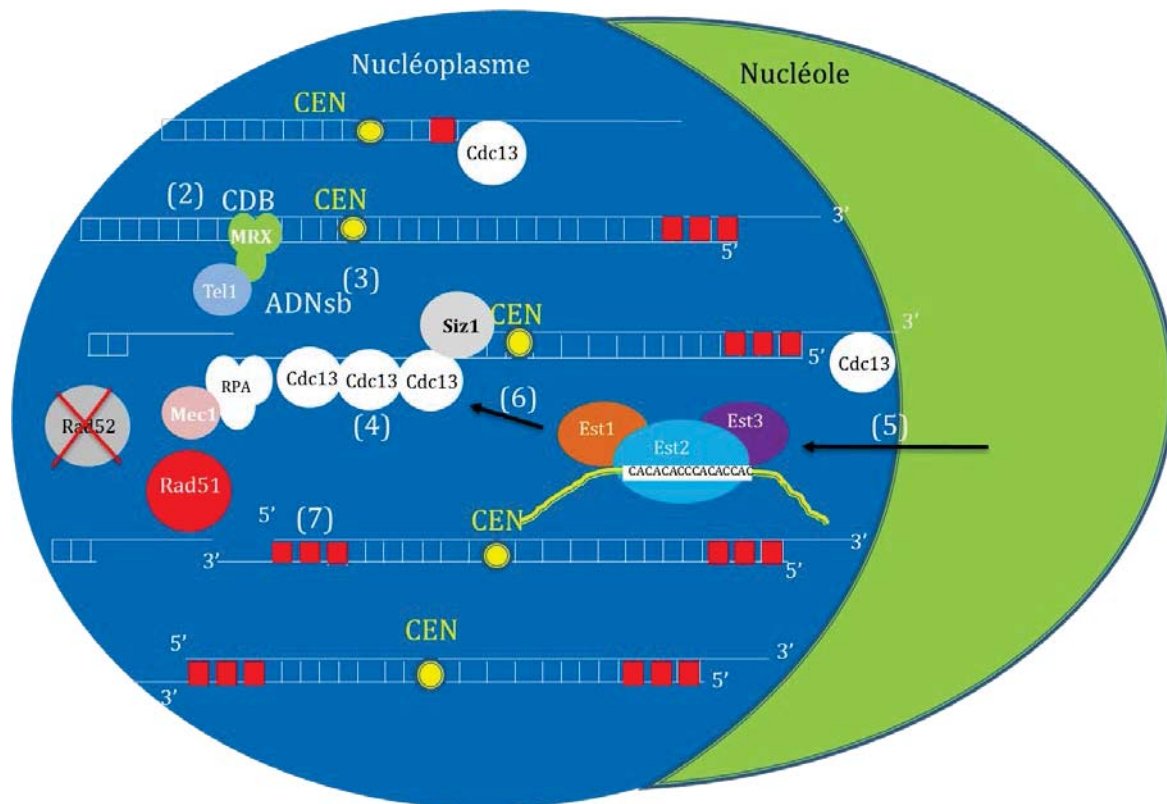


Figure 4.3 : Modèle proposé du trafic intranucléaire de la télomérase en réponse à des dommages à l'ADN dans les cellules déficientes de la voie de la RH. Les chiffres indiquent les différentes étapes de l'accumulation de Cdc13, la localisation et du recrutement de la télomérase aux CDBs ainsi que la formation de télomères *de novo*.

En absence de Rad52, où les CDBs sont irréparables par la voie de la RH, la protéine Cdc13 s'accumule aux sites de CDBs (4). La SUMO E3 ligase Siz1 favoriserait le trafic de l'ARN *TLC1* vers le nucléoplasme (5), peut-être *via* la sumoylation de Cdc13 sur l'ADNsb (6), une modification qui serait possiblement nécessaire pour l'interaction Cdc13-Est1(7). Le recrutement de la télomérase pourrait conduire à la formation de l'ajout de télomères *de novo* (8). Le déterminant du trafic de *TLC1* du nucléoplasme vers le nucléole est encore inconnu.

Le mécanisme par lequel la télomérase s'accumule dans le nucléoplasme après la génération des CDBs n'est pas clair. Le modèle le plus simple propose que la télomérase fait la navette entre le nucléoplasme et le nucléole en phase G2/M. La génération et la résection des CDBs s'accompagneraient par l'accumulation successive de Cdc13 et de la télomérase *via* l'interaction Cdc13-Est1, ce qui permettrait de déplacer l'équilibre de l'accumulation de la télomérase du nucléole envers le nucléoplasme. Toutefois, nos données sur la cinétique de l'ARN *TLC1* et de Cdc13 ne supportent pas ce modèle, puisque l'accumulation de Cdc13 à des CDBs n'est pas directement suivie par l'accumulation de l'ARN *TLC1*. En effet, après 30 minutes du traitement des cellules *rad52Δ* avec la bléomycine, 50% des cellules montrent une accumulation de Cdc13 à des CDBs bien que la majorité des foci de l'ARN *TLC1* reste accumulée dans le nucléole (voir Figure 2.6A -C et D à t=30min).

Dans une étude antérieure, il a été proposé que le nucléole constitue un lieu de rétention ou de séquestration des molécules qui sont normalement actives en dehors de ce compartiment (Sirri et al, 2008). Le deuxième modèle propose que la télomérase soit séquestrée dans le nucléole par une ou plusieurs protéines nucléolaires en phase G2/M, le temps où les CDBs sont réparées par la voie de la RH. Mais si les CDBs sont irréparables par la voie de la RH, la persistance du signal de CDBs entraîne peut-être un relâchement de la télomérase du nucléole et son accumulation dans le nucléoplasme. En accord avec ce modèle,

une étude effectuée par le laboratoire du Dr. Elizabeth Blackburn a montré que la protéine nucléolaire Pinx1 de la levure, qui est impliquée dans la maturation des snoARNs et de l'ARN ribosomal, peut compétitionner avec l'ARN *TLC1* pour lier la sous-unité catalytique Est2 dans le nucléole (Lin & Blackburn, 2004). La liaison de Pinx1 à Est2 forme un complexe inactif dépourvu de l'ARN *TLC1*, ce qui entraîne une inhibition de l'activité de la télomérase *in vivo*. Cependant, l'induction de dommages à l'ADN engendre une diminution de l'expression d'ARNm de la protéine Pinx1 (Gasch et al, 2001; Gasch et al, 2000), ce qui permettrait une dissociation d'Est2 du complexe Pinx1-Est2 et sa réassociation ensuite avec l'ARN *TLC1*. Un candidat potentiel pour la séquestration de la télomérase dans le nucléole au cours de la réparation des CDBs par la RH serait donc la protéine Pinx1. En conséquence, il serait intéressant de tester l'effet d'un mutant conditionnel de Pinx1 sur la localisation de l'ARN *TLC1* en réponse à des dommages à l'ADN dans un contexte *rad52Δ*.

4.8 Nsr1/Nucléoline : un nouvel acteur de la biogénèse de la télomérase

Les résultats du deuxième manuscrit montrent pour la première fois que la protéine Nsr1 contrôle le maintien des télomères *via* son intervention dans le trafic nucléaire de l'ARN *TLC1*. Nous avons observé que Nsr1 interagit avec l'ARN *TLC1 in vivo* (Figure 3.5) et qu'elle agit en amont des facteurs d'export nucléo-cytoplasmique de cet ARN. En effet, la délétion de *NSR1* résulte en une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1* durant toutes les phases du cycle cellulaire (Figure 3.1). D'une manière intéressante, nous avons mis en évidence que Nsr1 agit en amont de l'hélicase Pif1 et du complexe yKu70/80, les deux facteurs qui contrôlent respectivement le trafic de l'ARN *TLC1* du nucléoplasme au nucléole en phase G2 et l'accumulation de l'ARN *TLC1* au noyau après la biogénèse de la télomérase (Figure 3.2-3.3).

D'une manière similaire à la délétion de *NSR1*, la délétion de la méthyltransférase *TGS1* résulte en une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1* (Gallardo et al, 2008). En fait,

la méthyltransférase Tgs1 est impliquée dans l'hyperméthylation de la coiffe mono-méthyle guanosine des snARNs et snoARNs dans le nucléole, alors que Nsr1 intervient dans le trafic des snoARNs au nucléole (Mouaikel et al, 2002; Verheggen et al, 2001). Nous avons trouvé que la délétion de *NSR1* n'empêche pas la méthylation de la coiffe mono-méthyl guanosine de l'ARN *TLC1* en tri-méthyl guanosine par Tgs1 au nucléole (Figure 3.4), suggérant que le trafic de l'ARN *TLC1* depuis son site de transcription jusqu'à sa localisation au nucléole est indépendante de Nsr1. Ces données mettent en évidence que Nsr1 est impliquée dans le trafic de la forme mature de l'ARN *TLC1* après sa localisation au nucléole. D'autre part, la liaison de l'hétérodimère Mex67-Mtr2 et l'exportine Crm1/Xpo1 à la forme mature triméthyl-guanosine de l'ARN *TLC1* se fait dans le nucléoplasme (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). Ceci suggère que la forme mature de l'ARN *TLC1* passe du nucléole au nucléoplasme avant son export au cytoplasme. Il est donc possible que Nsr1 agisse principalement dans le transport de l'ARN *TLC1* du nucléole au nucléoplasme (Gallardo et al, 2008; Wu et al, 2014). En accord avec ceci, il a été montré que la polyphosphorylation de Nsr1 sur des résidus lysine (K) du domaine (PASK) de sa région N-terminale entraîne sa localisation au nucléoplasme alors qu'une absence ou une polyphosphorylation minimale de Nsr1 entraîne son accumulation au nucléole (Azevedo et al, 2015). En conséquence, il est possible que l'intervention de Nsr1 dans le trafic de l'ARN *TLC1* nécessite sa polyphosphorylation au domaine PASK. Effectivement, des données préliminaires du laboratoire montrent que la délétion des facteurs impliqués dans la phosphorylation de Nsr1 entraîne l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole (non-montrées).

En plus de cette polyphosphorylation, Nsr1 est modifiée par la méthyltransférase Htm1, qui assure la méthylation des groupements RGG de la région C-terminale de Nsr1 (Xu et al, 2003). En général, la méthylation des protéines par Htm1 favorise leur trafic nucléocytoplasmique (Green et al, 2002). Cependant, la méthylation de Nsr1 par Htm1 n'agit pas sur sa localisation car la délétion de *HTMI* n'affecte pas la localisation nucléolaire de Nsr1. Ceci suggère que la modification de Nsr1 par Htm1 affecte une autre fonction de Nsr1 au nucléole. Étant donné que la liaison de Nsr1 à l'ARN *TLC1* s'effectue dans le nucléole, il serait possible que l'interaction entre Nsr1 et l'ARN *TLC1* soit régulée par Htm1. Il serait intéressant de tester l'effet de l'absence de Htm1 sur l'interaction entre l'ARN *TLC1* et Nsr1.

La délétion de *NSR1* résulte en une courte élévation des télomères de manière dépendante de la télomérase comparativement aux cellules sauvages (Gatbonton et al, 2006). Ainsi, comment l'accumulation de l'ARN *TLC1* au nucléole dans ce mutant pourrait produire une élévation des télomères? Bien que l'ARN *TLC1* s'accumule dans le nucléole à l'équilibre dans les cellules *nsr1Δ*, il se peut que la télomérase fasse rapidement la navette entre le nucléole et le nucléoplasme et puisse ainsi agir sur les télomères en phase S. Une étude avec des cellules vivantes exprimant un ARN *TLC1-MS2* couplé à la GFP serait nécessaire pour explorer cette question (Gallardo et al, 2011). Fait intéressant, ce phénotype est similaire à celui observé lors de, la délétion de *TGSI*, qui résulte aussi en une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1* et une courte (50pb) élévation des télomères (Franke et al, 2008; Gallardo et al, 2008). L'élévation des télomères dans ce mutant serait due à la génération d'ADN télomérique simple-brin plus long et refléterait la présence d'un défaut dans le couplage entre l'élévation des télomères par la télomérase et la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase α (Franke et al, 2008). Il serait aussi possible que l'élévation des télomères dans les cellules *nsr1Δ* serait due à la génération d'un ADN télomérique simple-brin plus long.

4.9 Le complexe yKu70/80 et le recrutement de la télomérase au télomère en phase G1.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'observation d'une association de la télomérase au télomère en phase G1 par CHIP a soulevé la question sur la fonction de cette interaction en G1 alors que l'élévation des télomères s'effectue seulement à la fin de la phase S. Plusieurs études ont proposé que le recrutement de la télomérase au télomère en phase G1 se fasse *via* l'interaction simultanée du complexe yKu à l'ARN *TLC1* et à l'ADN télomérique double-brin (Bertuch & Lundblad, 2003; Fisher et al, 2004). Ces résultats ont mené au modèle que la télomérase est recrutée au télomère sous une forme inactive en phase G1 par l'intermédiaire du complexe yKu, et que son activation s'effectue seulement au niveau d'un

télomère court à la fin de la phase S *via* le recrutement des protéines Est1 et Est3 au complexe *TLC1*-Est2 associé au télomère et l'interaction Cdc13-Est1 (Hug and Lingner, 2006; Shore and Bianchi, 2009).

Afin de mieux comprendre le rôle du complexe yKu dans le recrutement de la télomérase aux télomères en phase G1, le laboratoire du Dr. Tom Cech, en collaboration avec notre laboratoire, avons clarifié ce point. Dans cette étude, nous avons montré que la liaison du complexe yKu à l'ADN télomérique double-brin et à l'ARN *TLC1* est mutuellement exclusive (Pfungsten JS et al, 2012) (Annexe 1). En effet, des expériences de liaison montrent que le complexe qui contient l'ARN *TLC1*, l'ADN télomérique double-brin et yKu ne peut pas se former *in vitro*, bien que yKu forme un complexe soit avec l'ARN *TLC1* ou avec l'ADN télomérique double-brin. D'une manière intéressante, l'affinité d'yKu à l'ADN télomérique double-brin est plus élevée comparativement à son affinité pour l'ARN *TLC1*. Ces données ont mené à un nouveau modèle du recrutement de la télomérase aux télomères. Après la liaison du complexe yKu à l'ARN *TLC1* au cytoplasme, ce complexe favorise l'import nucléaire de la télomérase. Dans le nucléoplasme, le complexe yKu retient l'ARN *TLC1* dans ce compartiment, mais une fois qu'il rentre en contact avec l'ADN télomérique double brin, yKu relâche son interaction avec l'ARN *TLC1* et il se lie avec une grande affinité à cet ADN. Cet échange d'yKu entre l'ARN *TLC1* et l'ADN télomérique pourrait expliquer l'interaction entre la télomérase et les télomères mesurée par CHIP en phase G1 et qu'est dépendante d'yKu (Fisher et al, 2004). Ce modèle suggère que l'hétérodimère yKu pourrait cibler la télomérase au télomère, mais ne il reste pas attacher à la télomérase. En conséquence, le recrutement de la télomérase aux télomères *in vivo* s'effectue seulement à la fin de la phase S *via* l'interaction Cdc13-Est1.

4.10 Conclusion

Pour maintenir la stabilité du génome, il est très important que les extrémités des chromosomes ne soient pas reconnues comme des CDBs et, inversement, les CDBs ne soient pas l'objet de l'action de la télomérase. À première vue, les télomères sont différents de CDBs : ils ont une séquence et une structure unique, ils se localisent à un endroit spécifique du noyau et se lient par un groupe particulier de protéines. Toutefois, les protéines qui sont impliquées dans la signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN peuvent aussi s'associer avec les télomères et jouent un rôle important dans leur maintenance, ce qui suggère que la différenciation entre les télomères et les CDBs est un processus très complexe.

Dans cette étude, nous avons identifié chez la levure un nouveau trafic de l'ARN *TLC1* entre le nucléoplasme et le nucléole dépendant du cycle cellulaire. Nous avons aussi montré que ce trafic est lié au processus de réparation des CDBs et que la voie de la RH, particulièrement la protéine Rad52, contrôle la localisation et le recrutement de la télomérase à des CDBs dans le nucléoplasme. Le rôle de Rad52 dans cet événement s'effectue *via* l'inhibition de l'accumulation de Cdc13 à des sites de cassures. Il reste maintenant à préciser de quelle façon Rad52 inhibe l'accumulation de Cdc13 aux CDBs. L'impact du recrutement de Rad52 à des CDBs et son inhibition de l'ajout de télomères *de novo* permet de clarifier, au moins en partie, de quelle façon la cellule prend la décision de la réparation des CDBs par la RH *versus* l'ajout de télomères *de novo*. En effet, les facteurs qui inhibent l'ajout de télomères *de novo*, incluant l'hélicase Pif1, la kinase Mec1/ATR et les nucléases de la résection peuvent s'associer ensemble aux télomères et aux CDBs. En revanche la protéine Rad52, se recrute uniquement à des CDBs et par conséquent elle peut participer au processus de différenciation entre les CDBs et télomères en marquant spécifiquement les CDBs.

De la même façon, nous avons mis en évidence pour la première fois que la SUMO E3 ligase Siz1 joue un rôle spécifique dans la voie de formation de télomères *de novo*. Il sera

maintenant intéressant de déterminer de quelle façon Siz1 est impliquée dans la réparation de CDBs par la télomérase en absence d'une voie fonctionnelle de la RH.

Finalement, Nous avons aussi montré que la protéine nucléolaire Nsr1 est impliquée dans la maintenance des télomères *via* le trafic nucléaire de l'ARN *TLC1*. Particulièrement, nous avons mis en évidence que Nsr1 agit dans la voie de la biogenèse de la télomérase. Il reste maintenant à préciser de quelle façon les télomères sont allongés dans un mutant *nsr1Δ*.

Bibliographie

Agarwal R, Tang Z, Yu H, Cohen-Fix O (2003) Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **278**: 45027-45033

Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of molecular biology* **227**: 54-71

Altmannova V, Eckert-Boulet N, Arneric M, Kolesar P, Chaloupkova R, Damborsky J, Sung P, Zhao X, Lisby M, Krejci L (2010) Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Res* **38**: 4708-4721

Alvaro D, Lisby M, Rothstein R (2007) Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS genetics* **3**: e228

Anbalagan S, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP (2011) Rif1 supports the function of the CST complex in yeast telomere capping. *PLoS genetics* **7**: e1002024

Andaluz E, Bellido A, Gomez-Raja J, Selmecki A, Bouchonville K, Calderone R, Berman J, Larriba G (2011) Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **79**: 1462-1482

Arneric M, Lingner J (2007) Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO reports* **8**: 1080-1085

Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8658-8663

Azevedo C, Livermore T, Saiardi A (2015) Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. *Molecular cell* **58**: 71-82

Barlow JH, Lisby M, Rothstein R (2008) Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular cell* **30**: 73-85

Barlow JH, Rothstein R (2009) Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase. *The EMBO journal* **28**: 1121-1130

Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Current biology : CB* **8**: 177-180

- Beaucher M, Zheng XF, Amarieli F, Rong YS (2012) Multiple pathways suppress telomere addition to DNA breaks in the *Drosophila* germline. *Genetics* **191**: 407-417
- Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics* **4**: e1000110
- Bennardo N, Gunn A, Cheng A, Hasty P, Stark JM (2009) Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS genetics* **5**: e1000683
- Bertuch AA, Lundblad V (2003) The Ku heterodimer performs separable activities at double-strand breaks and chromosome termini. *Molecular and cellular biology* **23**: 8202-8215
- Bianchi A, Negrini S, Shore D (2004) Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Molecular cell* **16**: 139-146
- Bianchi A, Shore D (2007) Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes & development* **21**: 1726-1730
- Bianchi A, Shore D (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Molecular cell* **31**: 153-165
- Blackburn EH (2000) Telomeres and telomerase. *The Keio journal of medicine* **49**: 59-65
- Bochman ML, Sabouri N, Zakian VA (2010) Unwinding the functions of the Pif1 family helicases. *DNA repair* **9**: 237-249
- Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP (2009) Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Molecular cell* **35**: 70-81
- Bonetti D, Martina M, Falcettoni M, Longhese MP (2013) Telomere-end processing: mechanisms and regulation. *Chromosoma*
- Botstein D, Fink GR (2011) Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**: 695-704
- Boule JB, Vega LR, Zakian VA (2005) The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* **438**: 57-61
- Boule JB, Zakian VA (2006) Roles of Pif1-like helicases in the maintenance of genomic stability. *Nucleic acids research* **34**: 4147-4153
- Boule JB, Zakian VA (2007) The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA DNA substrates. *Nucleic acids research* **35**: 5809-5818

- Boulton SJ, Jackson SP (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic acids research* **24**: 4639-4648
- Branzei D, Sollier J, Liberi G, Zhao X, Maeda D, Seki M, Enomoto T, Ohta K, Foiani M (2006) Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* **127**: 509-522
- Chan A, Boule JB, Zakian VA (2008) Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS genetics* **4**: e1000236
- Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & Development* **15**: 404-414
- Chapon C, Cech TR, Zaug AJ (1997) Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* **3**: 1337-1351
- Chen C, Kolodner RD (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature genetics* **23**: 81-85
- Chen H, Lisby M, Symington LS (2013) RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Molecular cell* **50**: 589-600
- Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* **5**: 102-112
- Cheng L, Hunke L, Hardy CF (1998) Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p. *Molecular and cellular biology* **18**: 7360-7370
- Chung WH, Zhu Z, Papusha A, Malkova A, Ira G (2010) Defective resection at DNA double-strand breaks leads to de novo telomere formation and enhances gene targeting. *PLoS Genet* **6**: e1000948
- Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* **40**: 179-204
- Cimprich KA, Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 616-627
- Cohen-Fix O, Koshland D (1997) The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14361-14366
- Collins BE, Ye LF, Duzdevich D, Greene EC (2014) DNA curtains: novel tools for imaging protein-nucleic acid interactions at the single-molecule level. *Methods in cell biology* **123**: 217-234

Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9202-9207

Coy S, Volanakis A, Shah S, Vasiljeva L (2013) The Sm complex is required for the processing of non-coding RNAs by the exosome. *PloS one* **8**: e65606

Cremona CA, Sarangi P, Yang Y, Hang LE, Rahman S, Zhao X (2012a) Extensive DNA damage-induced sumoylation contributes to replication and repair and acts in addition to the *mec1* checkpoint. *Molecular cell* **45**: 422-432

Cremona CA, Sarangi P, Zhao X (2012b) Sumoylation and the DNA damage response. *Biomolecules* **2**: 376-388

Cullen JK, Hussey SP, Walker C, Prudden J, Wee BY, Dave A, Findlay JS, Savory AP, Humphrey TC (2007) Break-induced loss of heterozygosity in fission yeast: dual roles for homologous recombination in promoting translocations and preventing de novo telomere addition. *Molecular and cellular biology* **27**: 7745-7757

d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes & development* **18**: 1781-1799

Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annual review of genetics* **39**: 431-451

Dandjinou AT, Levesque N, Larose S, Lucier JF, Abou Elela S, Wellinger RJ (2004) A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Current biology : CB* **14**: 1148-1158

de Bettignies G, Johnston LH (2003) The mitotic exit network. *Current biology : CB* **13**: R301

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

Deng SK, Gibb B, de Almeida MJ, Greene EC, Symington LS (2014) RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nature structural & molecular biology* **21**: 405-412

Diede SJ, Gottschling DE (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**: 723-733

Dion V, Kalck V, Seeber A, Schleker T, Gasser SM (2013) Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci. *Embo Reports* **14**: 984-991

Dionne I, Larose S, Dandjinou AT, Abou Elela S, Wellinger RJ (2013) Cell cycle-dependent transcription factors control the expression of yeast telomerase RNA. *Rna* **19**: 992-1002

- Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB (2000) The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular cell* **6**: 1169-1182
- Evans SK, Lundblad V (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**: 117-120
- Ferrezuelo F, Steiner B, Aldea M, Futcher B (2002) Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Molecular and cellular biology* **22**: 6046-6055
- Fisher TS, Taggart AK, Zakian VA (2004) Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1198-1205
- Fishman-Lobell J, Rudin N, Haber JE (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Molecular and cellular biology* **12**: 1292-1303
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, Cao A, Wood WG, Ayyub H, Higgs DR (1994) Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *American journal of human genetics* **55**: 505-512
- Franke J, Gehlen J, Ehrenhofer-Murray AE (2008) Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1. *Journal of cell science* **121**: 3553-3560
- Fujimori A, Tachiiri S, Sonoda E, Thompson LH, Dhar PK, Hiraoka M, Takeda S, Zhang Y, Reth M, Takata M (2001) Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* **20**: 5513-5520
- Gallardo F, Chartrand P (2011) Visualizing mRNAs in fixed and living yeast cells. *Methods Mol Biol* **714**: 203-219
- Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, Chartrand P (2011) Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Molecular cell* **44**: 819-827
- Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P (2008) TLC1 RNA nucleocytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *The EMBO journal* **27**: 748-757
- Game JC, Mortimer RK (1974) A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation research* **24**: 281-292

- Gao Q, Reynolds GE, Wilcox A, Miller D, Cheung P, Artandi SE, Murnane JP (2008) Telomerase-dependent and -independent chromosome healing in mouse embryonic stem cells. *DNA repair* **7**: 1233-1249
- Gardner R, Putnam CW, Weinert T (1999) RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *The EMBO journal* **18**: 3173-3185
- Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular and cellular biology* **15**: 6128-6138
- Gasch AP, Huang M, Metzner S, Botstein D, Elledge SJ, Brown PO (2001) Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* **12**: 2987-3003
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257
- Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes & development* **12**: 2208-2221
- Gatbonton T, Imbesi M, Nelson M, Akey JM, Ruderfer DM, Kruglyak L, Simon JA, Bedalov A (2006) Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS genetics* **2**: e35
- Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 947-956
- Gibb B, Ye LF, Gergoudis SC, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC (2014a) Concentration-dependent exchange of replication protein A on single-stranded DNA revealed by single-molecule imaging. *PloS one* **9**: e87922
- Gibb B, Ye LF, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC (2014b) Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nature structural & molecular biology* **21**: 893-900
- Gilbert I, Johnson ES, Szenczy C (2001) Road map for the development of an e-healthcare strategy. *Journal of healthcare information management : JHIM* **15**: 51-59
- Graham IR, Haw RA, Spink KG, Halden KA, Chambers A (1999) In vivo analysis of functional regions within yeast Rap1p. *Molecular and cellular biology* **19**: 7481-7490
- Granata M, Lazzaro F, Novarina D, Panigada D, Puddu F, Abreu CM, Kumar R, Grenon M, Lowndes NF, Plevani P, Muzi-Falconi M (2010) Dynamics of Rad9 chromatin binding and

checkpoint function are mediated by its dimerization and are cell cycle-regulated by CDK1 activity. *PLoS genetics* **6**

Grandin N, Damon C, Charbonneau M (2000) Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment. *Molecular and cellular biology* **20**: 8397-8408

Green DM, Marfatia KA, Crafton EB, Zhang X, Cheng X, Corbett AH (2002) Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *The Journal of biological chemistry* **277**: 7752-7760

Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**: 331-337

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

Haber JE (2012) Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33-64

Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP (2007) Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO reports* **8**: 851-857

Hang LE, Liu X, Cheung I, Yang Y, Zhao X (2011) SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 920-926

Harrington LA, Greider CW (1991) Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* **353**: 451-454

Harrison JC, Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual review of genetics* **40**: 209-235

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**: 46-51

Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. *Molecular cell* **18**: 1-12

Hector RE, Shtofman RL, Ray A, Chen BR, Nyun T, Berkner KL, Runge KW (2007) Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Molecular cell* **27**: 851-858

Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli SV, White O, Botstein D, Dolinski K (2007) The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PloS one* **2**: e766

- Hirano Y, Fukunaga K, Sugimoto K (2009) Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Molecular cell* **33**: 312-322
- Hirano Y, Sugimoto K (2007a) Cdc13 telomere capping decreases Mec1 association but does not affect Tel1 association with DNA ends. *Molecular biology of the cell* **18**: 2026-2036
- Hirano Y, Sugimoto K (2007b) Cdc13 Telomere Capping Decreases Mec1 Association but Does Not Affect Tel1 Association with DNA Ends. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 2026-2036
- Hughes TR, Weilbaecher RG, Walterscheid M, Lundblad V (2000) Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6457-6462
- Iqbal ZM, Kohn KW, Ewig RA, Fornace AJ, Jr. (1976) Single-strand scission and repair of DNA in mammalian cells by bleomycin. *Cancer research* **36**: 3834-3838
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**: 1011-1017
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**: 1071-1078
- Jensen RE, Herskowitz I (1984) Directionality and regulation of cassette substitution in yeast. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **49**: 97-104
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry* **73**: 355-382
- Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**: 735-744
- Keeney S, Neale MJ (2006) Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society transactions* **34**: 523-525
- Khadaroo B, Teixeira MT, Luciano P, Eckert-Boulet N, Germann SM, Simon MN, Gallina I, Abdallah P, Gilson E, Geli V, Lisby M (2009) The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol* **11**: 980-987
- Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972

- Kolodner RD, Putnam CD, Myung K (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552-557
- Konig P, Giraldo R, Chapman L, Rhodes D (1996) The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* **85**: 125-136
- Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **58**: 401-465
- Kramer KM, Haber JE (1993) New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes & development* **7**: 2345-2356
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annual review of genetics* **38**: 233-271
- Kupiec M (2014) Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *FEMS microbiology reviews* **38**: 144-171
- Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, Gasser SM (1998) Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Current biology* : **CB 8**: 653-656
- Larrivee M, LeBel C, Wellinger RJ (2004) The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes & development* **18**: 1391-1396
- Latre L, Genesca A, Martin M, Ribas M, Egozcue J, Blasco MA, Tusell L (2004) Repair of DNA broken ends is similar in embryonic fibroblasts with and without telomerase. *Radiation research* **162**: 136-142
- Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-152
- Lee-Theilen M, Matthews AJ, Kelly D, Zheng S, Chaudhuri J (2011) CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nature structural & molecular biology* **18**: 75-79
- Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezumi K, Kolodner RD, Haber JE (1998) *Saccharomyces cerevisiae* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**: 399-409
- Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**: 1399-1412

- Li S, Makovets S, Matsuguchi T, Blethrow JD, Shokat KM, Blackburn EH (2009) Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression. *Cell* **136**: 50-61
- Li TK, Liu LF (2001) Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**: 53-77
- Licht JD, Collins K (1999) Telomerase RNA function in recombinant Tetrahymena telomerase. *Genes & development* **13**: 1116-1125
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* **79**: 181-211
- Lim DS, Hasty P (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Molecular and cellular biology* **16**: 7133-7143
- Lin J, Blackburn EH (2004) Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes & development* **18**: 387-396
- Lin JJ, Zakian VA (1996) The Saccharomyces CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13760-13765
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**: 561-567
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**: 699-713
- Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**: 572-577
- Lobachev K, Vitriol E, Stemple J, Resnick MA, Bloom K (2004) Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. *Current biology : CB* **14**: 2107-2112
- Lobachev KS, Gordenin DA, Resnick MA (2002) The Mre11 complex is required for repair of hairpin-capped double-strand breaks and prevention of chromosome rearrangements. *Cell* **108**: 183-193
- Longhese MP, Paciotti V, Neecke H, Lucchini G (2000) Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. *Genetics* **155**: 1577-1591

- Luciano P, Coulon S, Faure V, Corda Y, Bos J, Brill SJ, Gilson E, Simon MN, Geli V (2012) RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. *The EMBO journal* **31**: 2034-2046
- Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633-643
- Lustig AJ, Petes TD (1986) Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 1398-1402
- Lydall D (2009) Taming the tiger by the tail: modulation of DNA damage responses by telomeres. *The EMBO journal* **28**: 2174-2187
- Lydall D, Weinert T (1995) Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**: 1488-1491
- Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Jain S, Eapen VV, Haber JE (2010) Sgs1 and exo1 redundantly inhibit break-induced replication and de novo telomere addition at broken chromosome ends. *PLoS Genet* **6**: e1000973
- Maeda D, Seki M, Onoda F, Branzei D, Kawabe Y, Enomoto T (2004) Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 335-341
- Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal* **417**: 639-650
- Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annual review of genetics* **39**: 23-46
- Majka J, Binz SK, Wold MS, Burgers PM (2006) Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *The Journal of biological chemistry* **281**: 27855-27861
- Makovets S, Blackburn EH (2009) DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol* **11**: 1383-1386
- Mallory JC, Petes TD (2000) Protein kinase activity of Tel1p and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13749-13754
- Mangahas JL, Alexander MK, Sandell LL, Zakian VA (2001a) Repair of chromosome ends after telomere loss in *Saccharomyces*. *Molecular biology of the cell* **12**: 4078-4089
- Mangahas JL, Alexander MK, Sandell LL, Zakian VA (2001b) Repair of Chromosome Ends after Telomere Loss in *Saccharomyces*. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 4078-4089

- Marcand S, Brevet V, Gilson E (1999) Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *The EMBO journal* **18**: 3509-3519
- Maringele L, Lydall D (2002) EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes & development* **16**: 1919-1933
- Martina M, Clerici M, Baldo V, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP (2012) A balance between Tell and Rif2 activities regulates nucleolytic processing and elongation at telomeres. *Molecular and cellular biology* **32**: 1604-1617
- Mazumder A, Tummler K, Bathe M, Samson LD (2013) Single-cell analysis of ribonucleotide reductase transcriptional and translational response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* **33**: 635-642
- McGee JS, Phillips JA, Chan A, Sabourin M, Paeschke K, Zakian VA (2010) Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1438-1445
- McVey M, Lee SE (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in genetics : TIG* **24**: 529-538
- Milne GT, Jin S, Shannon KB, Weaver DT (1996) Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 4189-4198
- Mimitou EP, Symington LS (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**: 770-774
- Mimitou EP, Symington LS (2011) DNA end resection--unraveling the tail. *DNA Repair (Amst)* **10**: 344-348
- Mitton-Fry RM, Anderson EM, Theobald DL, Glustrom LW, Wuttke DS (2004) Structural basis for telomeric single-stranded DNA recognition by yeast Cdc13. *Journal of molecular biology* **338**: 241-255
- Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, Ishikawa F (2009) RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Molecular cell* **36**: 193-206
- Mongelard F, Bouvet P (2007) Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology* **17**: 80-86

- Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 2164-2173
- Motegi A, Myung K (2007) Measuring the rate of gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*: A practical approach to study genomic rearrangements observed in cancer. *Methods* **41**: 168-176
- Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Molecular cell* **9**: 891-901
- Moy TI, Silver PA (2002) Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *Journal of cell science* **115**: 2985-2995
- Mozdy AD, Cech TR (2006) Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* **12**: 1721-1737
- Murnane JP (2012) Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation research* **730**: 28-36
- Myung K, Chen C, Kolodner RD (2001) Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **411**: 1073-1076
- Myung K, Kolodner RD (2003) Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* **2**: 243-258
- Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR (2012) The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* **492**: 285-289
- Navadgi-Patil VM, Burgers PM (2009) The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms. *Molecular cell* **36**: 743-753
- Negrini S, Ribaud V, Bianchi A, Shore D (2007) DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes & development* **21**: 292-302
- Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* **290**: 138-141
- Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**: 249-252

- Osterhage JL, Talley JM, Friedman KL (2006) Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature structural & molecular biology* **13**: 720-728
- Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL (2009) Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes & development* **23**: 912-927
- Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* **75**: 543-555
- Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics* **42**: 301-334
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404
- Pardo B, Marcand S (2005) Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *The EMBO journal* **24**: 3117-3127
- Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD (2006) Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **59**: 1357-1368
- Pennock E, Buckley K, Lundblad V (2001a) Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**: 387-396
- Pennock E, Buckley K, Lundblad V (2001b) Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell* **104**: 387-396
- Petreaca RC, Chiu HC, Nugent CI (2007) The role of Stn1p in *Saccharomyces cerevisiae* telomere capping can be separated from its interaction with Cdc13p. *Genetics* **177**: 1459-1474
- Pfingsten JS, Goodrich KJ, Taabazuing C, Ouenzar F, Chartrand P, Cech TR (2012) Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* **148**: 922-932
- Phillips JA, Chan A, Paeschke K, Zakian VA (2015) The pif1 helicase, a negative regulator of telomerase, acts preferentially at long telomeres. *PLoS genetics* **11**: e1005186
- Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, Petes TD (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **24**: 582-585
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation research* **355**: 71-89

- Psakhye I, Jentsch S (2012) Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**: 807-820
- Putnam CD, Jaehnig EJ, Kolodner RD (2009) Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* **8**: 974-982
- Putnam CD, Pennaneach V, Kolodner RD (2004) Chromosome healing through terminal deletions generated by de novo telomere additions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13262-13267
- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1921-1926
- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P, Lopez BS (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* **16**: 819-824
- Reynolds GE, Gao Q, Miller D, Snow BE, Harrington LA, Murnane JP (2011) PIF1 disruption or NBS1 hypomorphism does not affect chromosome healing or fusion resulting from double-strand breaks near telomeres in murine embryonic stem cells. *DNA repair* **10**: 1164-1173
- Ribaud V, Ribeyre C, Damay P, Shore D (2012) DNA-end capping by the budding yeast transcription factor and subtelomeric binding protein Tbf1. *The EMBO journal* **31**: 138-149
- Ribeyre C, Shore D (2012) Anticheckpoint pathways at telomeres in yeast. *Nature structural & molecular biology* **19**: 307-313
- Ribeyre C, Shore D (2013a) Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. *Chromosoma* **122**: 159-173
- Ribeyre C, Shore D (2013b) Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. *Chromosoma* **122**: 159-173
- Ricchetti M, Dujon B, Fairhead C (2003) Distance from the chromosome end determines the efficiency of double strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *Journal of molecular biology* **328**: 847-862
- Richardson C, Jasin M (2000) Recombination between two chromosomes: implications for genomic integrity in mammalian cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **65**: 553-560
- Riordan DP, Herschlag D, Brown PO (2011) Identification of RNA recognition elements in the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome. *Nucleic acids research* **39**: 1501-1509

- Ritchie KB, Mallory JC, Petes TD (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**: 6065-6075
- Ritchie KB, Petes TD (2000) The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**: 475-479
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-916
- Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA (2007) Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Molecular cell* **27**: 550-561
- Sacher M, Pfander B, Hoegge C, Jentsch S (2006) Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nature cell biology* **8**: 1284-1290
- Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ (1999) Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* **286**: 1166-1171
- Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**: 357-360
- Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729-739
- Schulz VP, Zakian VA (1994) The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**: 145-155
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**: 486-492
- Seto AG, Zaug AJ, Sobel SG, Wolin SL, Cech TR (1999) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**: 177-180
- Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M (2004) Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Current biology* : *CB* **14**: 1703-1711
- Singer MS, Gottschling DE (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404-409
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* **129**: 13-31

Smith GC, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development* **13**: 916-934

Smith J, Rothstein R (1995) A mutation in the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA-binding protein Rfa1 stimulates a RAD52-independent pathway for direct-repeat recombination. *Molecular and cellular biology* **15**: 1632-1641

Snow BE, Mateyak M, Paderova J, Wakeham A, Iorio C, Zakian V, Squire J, Harrington L (2007) Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in vivo. *Molecular and cellular biology* **27**: 1017-1026

Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003a) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & development* **17**: 2384-2395

Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003b) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & Development* **17**: 2384-2395

Stracker TH, Petrini JH (2011) The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 90-103

Sugawara N, Ivanov EL, Fishman-Lobell J, Ray BL, Wu X, Haber JE (1995) DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature* **373**: 84-86

Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *The Journal of biological chemistry* **272**: 7940-7945

Sung P (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* **265**: 1241-1243

Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **66**: 630-670, table of contents

Symington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics* **45**: 247-271

Taggart AK, Teng SC, Zakian VA (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**: 1023-1026

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining

pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* **17**: 5497-5508

Tam AT, Pike BL, Hammet A, Heierhorst J (2007a) Telomere-related functions of yeast KU in the repair of bleomycin-induced DNA damage. *Biochemical and biophysical research communications* **357**: 800-803

Tam ATY, Pike BL, Hammet A, Heierhorst J (2007b) Telomere-related functions of yeast KU in the repair of bleomycin-induced DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**: 800-803

Teixeira MT (2013) Saccharomyces cerevisiae as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening. *Frontiers in oncology* **3**: 101

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

Teixeira MT, Forstemann K, Gasser SM, Lingner J (2002) Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO reports* **3**: 652-659

Teo SH, Jackson SP (1997) Identification of Saccharomyces cerevisiae DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *The EMBO journal* **16**: 4788-4795

Tieg B, Krebber H (2013) Dbp5 - from nuclear export to translation. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 791-798

Tolle-Sander S, Lentz KA, Maeda DY, Coop A, Polli JE (2004) Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate. *Mol Pharm* **1**: 40-48

Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, Jentsch S, Rothstein R, Aragon L, Lisby M (2007) The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* **9**: 923-931

Tuteja R, Tuteja N (1998) Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **33**: 407-436

Tuzon CT, Wu Y, Chan A, Zakian VA (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 genetics* **7**: e1002060

van der Linden E, Sanchez H, Kinoshita E, Kanaar R, Wyman C (2009) RAD50 and NBS1 form a stable complex functional in DNA binding and tethering. *Nucleic acids research* **37**: 1580-1588

- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews Genetics* **2**: 196-206
- Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM (1999) Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* **94**: 3997-4010
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ (2000) Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by De novo telomere addition. *American journal of human genetics* **67**: 610-622
- Verheggen C, Mouaikel J, Thiry M, Blanchard JM, Tollervey D, Bordonne R, Lafontaine DL, Bertrand E (2001) Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *The EMBO journal* **20**: 5480-5490
- Vodenicharov MD, Wellinger RJ (2006) DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/C1b) cell-cycle kinase. *Molecular cell* **24**: 127-137
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808
- Wagner M, Price G, Rothstein R (2006) The absence of Top3 reveals an interaction between the Sgs1 and Pif1 DNA helicases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**: 555-573
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciú P, Cech TR, Lei M (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445**: 506-510
- Wang L, Eastmond DA (2002) Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187. *Environmental and molecular mutagenesis* **39**: 348-356
- Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **35**: 95-125
- Weinert TA, Hartwell LH (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**: 317-322
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nature genetics* **17**: 498-502
- Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA (1993) *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60

- Williams GJ, Lees-Miller SP, Tainer JA (2010) Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA repair* **9**: 1299-1306
- Williams JM, Ouenzar F, Lemon LD, Chartrand P, Bertuch AA (2014a) The principal role of Ku in telomere length maintenance is promotion of Est1 association with telomeres. *Genetics* **197**: 1123-1136
- Williams JM, Ouenzar F, Lemon LD, Chartrand P, Bertuch AA (2014b) The Principal Role of Ku in Telomere Length Maintenance Is Promotion of Est1 Association with Telomeres. *Genetics*
- Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE (1997) Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *American journal of human genetics* **60**: 113-120
- Wong JM, Kusdra L, Collins K (2002) Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* **4**: 731-736
- Wotton D, Shore D (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **11**: 748-760
- Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA (1992) *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes & development* **6**: 197-210
- Wu D, Topper LM, Wilson TE (2008) Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 1237-1249
- Wu H, Becker D, Krebber H (2014) Telomerase RNA TLC1 shuttling to the cytoplasm requires mRNA export factors and is important for telomere maintenance. *Cell reports* **8**: 1630-1638
- Wu Y, Zakian VA (2011) The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 20362-20369
- Xu C, Henry PA, Setya A, Henry MF (2003) In vivo analysis of nucleolar proteins modified by the yeast arginine methyltransferase Hmt1/Rmt1p. *Rna* **9**: 746-759
- Zakian VA (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**: 1601-1607
- Zappulla DC, Cech TR (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10024-10029

- Zappulla DC, Goodrich K, Cech TR (2005) A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nature structural & molecular biology* **12**: 1072-1077
- Zenklusen D, Larson DR, Singer RH (2008) Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1263-1271
- Zhang DH, Zhou B, Huang Y, Xu LX, Zhou JQ (2006) The human Pif1 helicase, a potential Escherichia coli RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic acids research* **34**: 1393-1404
- Zhang W, Durocher D (2010) De novo telomere formation is suppressed by the Mec1-dependent inhibition of Cdc13 accumulation at DNA breaks. *Genes & development* **24**: 502-515
- Zhang W, Durocher D (2012) Analysis of Telomere Healing of DNA Double-Strand Breaks. Thesis submitted to university of Toronto.
- Zhang Y, Gostissa M, Hildebrand DG, Becker MS, Boboila C, Chiarle R, Lewis S, Alt FW (2010) The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Advances in immunology* **106**: 93-133
- Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE, Tomkinson AE (2007) Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* **14**: 639-646
- Zhang Y, Jasin M (2011) An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nature structural & molecular biology* **18**: 80-84
- Zhao X, Blobel G (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4777-4782
- Zhao X, Muller EG, Rothstein R (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular cell* **2**: 329-340
- Zhou J, Monson EK, Teng SC, Schulz VP, Zakian VA (2000) Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* **289**: 771-774
- Zhou JQ, Qi H, Schulz VP, Mateyak MK, Monson EK, Zakian VA (2002) Schizosaccharomyces pombe pfh1+ encodes an essential 5' to 3' DNA helicase that is a member of the PIF1 subfamily of DNA helicases. *Molecular biology of the cell* **13**: 2180-2191
- Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**: 981-994

Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**: 1542-1548

Annexe 1

Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model

Jennifer S. Pfingsten^{1,3}, Karen J. Goodrich¹, Cornelius Taabazuing^{1,4}, Faissal Ouenzar² Pascal
Chartrand² and Thomas R. Cech^{1*}

¹ HHMI, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado Biofrontiers
Institute, Boulder, CO, 80309-0215 USA

³Present address: SomaLogic, Inc., Boulder, CO 80301 USA

⁴Present address: Department of Chemistry, University of Massachusetts, Amherst, MA,
01003 USA

² Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Qc, H3C 3J7 Canada.

Ma contribution à ce papier : Pour ce papier, j'ai effectué les expériences de FISH et de quantification de la figure 4B-C. J'ai écrit la partie de la microscopie dans la section matériel et méthodes, j'ai participé également dans la lecture critique du papier et la discussion des résultats.



Mutually Exclusive Binding of Telomerase RNA and DNA by Ku Alters Telomerase Recruitment Model

Jennifer S. Pflingsten,^{1,3} Karen J. Goodrich,¹ Cornelius Taabazuing,^{1,4} Faissal Ouenzar,² Pascal Chartrand,² and Thomas R. Cech^{1,*}

¹Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado Biofrontiers Institute, Boulder, CO, 80309-0215, USA

²Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada

³Present address: SomaLogic, Inc., Boulder, CO 80301, USA

⁴Present address: Department of Chemistry, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

DOI 10.1016/j.cell.2012.01.033

SUMMARY

In *Saccharomyces cerevisiae*, the Ku heterodimer contributes to telomere maintenance as a component of telomeric chromatin and as an accessory subunit of telomerase. How Ku binding to double-stranded DNA (dsDNA) and to telomerase RNA (TLC1) promotes Ku's telomeric functions is incompletely understood. We demonstrate that deletions designed to constrict the DNA-binding ring of Ku80 disrupt nonhomologous end-joining (NHEJ), telomeric gene silencing, and telomere length maintenance, suggesting that these functions require Ku's DNA end-binding activity. Contrary to the current model, a mutant Ku with low affinity for dsDNA also loses affinity for TLC1 both in vitro and in vivo. Competition experiments reveal that wild-type Ku binds dsDNA and TLC1 mutually exclusively. Cells expressing the mutant Ku are deficient in nuclear accumulation of TLC1, as expected from the RNA-binding defect. These findings force reconsideration of the mechanisms by which Ku assists in recruiting telomerase to natural telomeres and broken chromosome ends.

INTRODUCTION

Telomeres provide a shield at chromosome ends to maintain the integrity of the cell's genome (reviewed in Jain and Cooper, 2010). Telomeric DNA consists of multiple repeats of a short sequence; it is mainly double-stranded DNA (dsDNA) but terminates in a single-stranded 3' overhang. The telomeric repeats are synthesized by the ribonucleoprotein enzyme telomerase (Greider and Blackburn, 1989). In *S. cerevisiae*, the telomerase reverse transcriptase (Est2 or TERT) and the RNA component (TLC1) are necessary and sufficient for enzyme catalysis (Lingner et al., 1997; Singer and Gottschling, 1994; Zappulla et al., 2005).

In addition to providing the template for telomeric DNA synthesis, the 1.2 kb TLC1 RNA acts as a scaffold to provide binding sites for the accessory proteins Est1, the Sm complex, and Ku (Zappulla and Cech, 2004).

Ku is best known for its essential role in DNA break repair via nonhomologous end-joining (NHEJ) (Boulton and Jackson, 1996; Milne et al., 1996). The Ku heterodimer is composed of Ku70 and Ku80 (70.6 kDa and 71.2 kDa, respectively, in yeast). It binds dsDNA in a nonspecific manner through a preformed ring, which limits Ku to sliding onto DNA from DNA breaks or termini (Walker et al., 2001). The Ku-DNA interaction is dynamic in vivo unless Ku is bound to other proteins, as observed in NHEJ studies (Chen and Tomkinson, 2011; Zhang et al., 2007). In the two-face model, the Ku80 side of the yeast heterodimer is responsible for Ku's telomeric functions, and the Ku70 side is responsible for Ku's role in NHEJ (Ribes-Zamora et al., 2007).

In *S. cerevisiae*, Ku also contributes to telomerase function. If Ku is absent or unable to interact with telomerase, the native telomeres shorten; also, Ku-depleted cells have reduced capabilities in de novo telomere addition at broken chromosome ends, resulting in a lower frequency of gross chromosomal rearrangements (Boulton and Jackson, 1996; Gravel et al., 1998; Myung et al., 2001; Nugent et al., 1998; Polotnianka et al., 1998; Porter et al., 1996; Stellwagen et al., 2003). When binding between Ku and the TLC1 RNA is disrupted, nuclear localization and retention of the holoenzyme are impaired (Gallardo et al., 2008), and the steady-state level of TLC1 RNA decreases (Mozdy et al., 2008; Zappulla et al., 2011). Ku also contributes to telomeric chromatin structure through its interaction with proteins such as Sir4 (Roy et al., 2004; Ribes-Zamora et al., 2007). This interaction facilitates the formation of a cap that not only protects the yeast telomeres from DNA break repair machinery but also silences the expression of genes located near the telomere (Gottschling et al., 1990; Mishra and Shore, 1999).

In genetic screens for loss of this telomere silencing, Ku was found to interact with a 48 nucleotide stem loop of TLC1 (Peterson et al., 2001). This region is strongly conserved among several budding yeast species, suggesting a sequence-specific

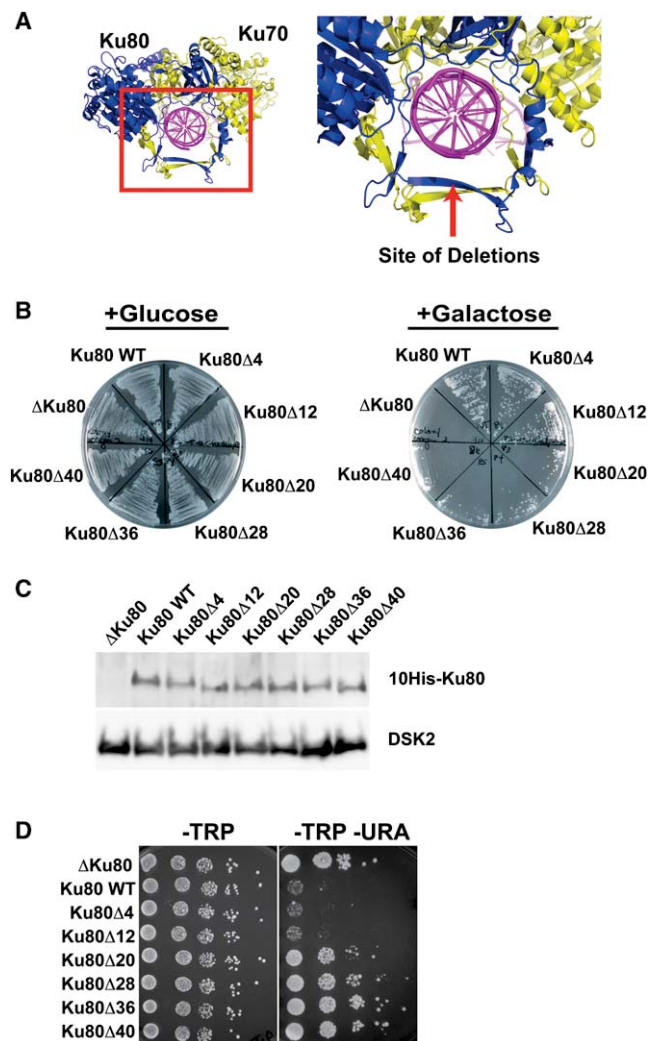


Figure 1. Truncations within the Ring of Ku80 Impair NHEJ and Gene Silencing via Telomere Position Effect

(A) Internal deletions within the loop that slides over the dsDNA were designed on the basis of the crystal structure of human Ku (Walker et al., 2001).

(B) Using a strain with an engineered HO endonuclease cut-site, the Ku mutants, along with the WT strain and $\Delta ku80$, were streaked onto plates containing either glucose or galactose. Galactose induces the production of HO endonuclease, triggering dsDNA break repair in cells containing functional Ku. The cells were plated at 100 generations.

(C) Western blot of the mutant yeast protein content after 20 generations. The loading control is DSK2, an endogenous protein. The Ku80 mutant to WT protein ratios ($n = 4$) were as follows: Ku80 Δ 4 0.9 ± 0.1 ; Ku80 Δ 12 0.7 ± 0.3 ; Ku80 Δ 20 0.8 ± 0.3 ; Ku80 Δ 28 1.2 ± 0.6 ; Ku80 Δ 36 1.0 ± 0.3 ; Ku80 Δ 40 1.3 ± 0.4 .

(D) Silencing assay for the *URA3* gene at 20 generations. This strain is described in Experimental Procedures.

See also Figure S1.

interaction between Ku and the RNA (Dandjinou et al., 2004; Zappulla and Cech, 2004). In vitro binding experiments revealed that mutating three nucleotides was enough to disrupt this interaction, which indicates that a specific RNA structure is required for Ku to bind (Peterson et al., 2001; Stellwagen et al., 2003). Mutagenesis screening of Ku subunits indicated that the RNA

interaction is disrupted in the *yku80-135i* allele (Stellwagen et al., 2003), but because this 5 amino acid insertion is in the hydrophobic core of the Ku80 subunit, its effect on RNA binding is likely to be indirect.

How does telomerase use the interaction between its RNA component and Ku to contribute to the synthesis of telomeric DNA? Because it has been thought that Ku can simultaneously bind dsDNA and the TLC1 RNA, Ku was postulated to tether the telomere and TLC1 during the recruitment of telomerase to natural telomeres or broken chromosomal ends (Bertuch and Lundblad, 2003; Fisher et al., 2004; Fisher and Zakian, 2005; Pennaneach et al., 2006; Peterson et al., 2001). More specifically, it has been proposed that Ku helps recruit telomerase to telomeres in G1 phase, before telomerase is active, and then promotes telomerase action in late S phase (Fisher et al., 2004).

To test the importance of DNA binding to Ku's involvement in telomerase recruitment to telomeres and in other processes, we designed a series of deletion mutations to inhibit DNA binding. We found that a mutant with reduced DNA affinity was defective in NHEJ, telomeric gene silencing, and telomere length maintenance. In contrast to expectation, the mutant that was defective in DNA binding was also defective in TLC1 RNA binding. Using competition experiments, we discovered that the binding of wild-type (WT) Ku to TLC1 RNA and to dsDNA is mutually exclusive. These findings contradict the recruitment model of Ku binding both DNA and RNA simultaneously and lead to a new model for the mechanism by which Ku's interaction with TLC1 RNA contributes to telomerase recruitment.

RESULTS

Deletions within Ku's DNA-Binding Loop Decrease NHEJ and Silencing

In an attempt to engineer separation-of-function mutants of Ku that would still bind TLC1 RNA but not DNA, a series of internal deletions was made in the primary DNA-binding site of Ku80 (Figure 1A). Larger deletions should prevent dsDNA from sliding through the ring of the heterodimer. As yeast Ku binds dsDNA and recruits the repair machinery to DNA breaks (reviewed in Daley et al., 2005; Riha et al., 2006), an in vivo NHEJ assay was utilized to screen for defective Ku mutants that may have lost the ability to bind DNA. In this assay, an engineered HO endonuclease cut-site is cleaved by the HO endonuclease whose expression is under the control of a galactose promoter, and cell viability is monitored (Lee et al., 1999; Ribes-Zamora et al., 2007). It was observed that the DNA-binding loop of Ku80 could be truncated by 12 amino acids and still function like WT (Figure 1B and Figure S1A available online). Deletions of 20 amino acids or more largely prevented the repair of the cleaved chromosome; these deletion mutants were almost as defective as $\Delta ku80$ (the vector control strain). The NHEJ defect was not due to instability of the Ku mutant proteins because protein levels for all mutants were similar to those of WT (Figure 1C); furthermore, heterodimerization was preserved (see below).

Ku contributes to subnuclear localization of telomeres and to higher-order chromatin structure, causing transcriptional silencing of genes near the telomere (Gottschling et al., 1990; Laroche et al., 1998; Mishra and Shore, 1999). In a yeast strain

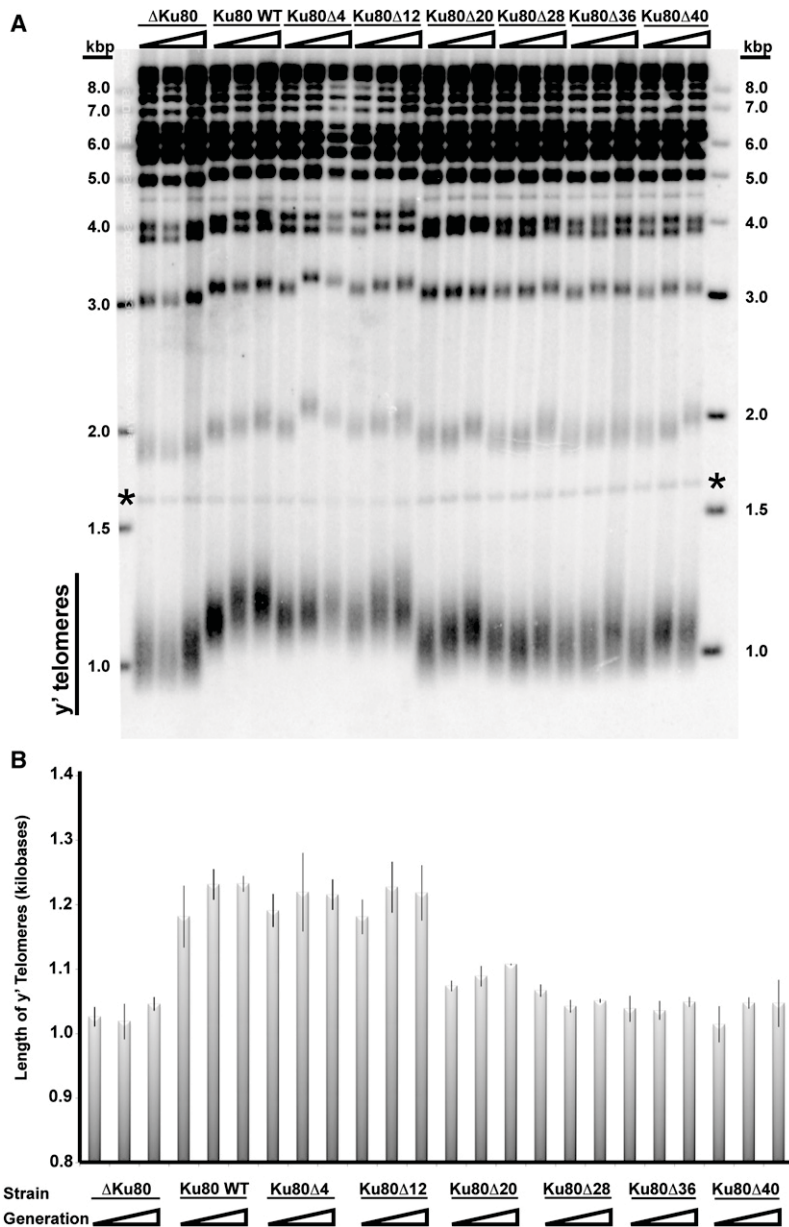


Figure 2. Mutations within Ku's DNA-Binding Loop Reduce Telomere Length

(A) Southern blot of Xho1-linearized yeast genomic DNA shows the length of Y' telomeres (heterogeneous distribution) and non-Y' telomeres (discrete bands at 2 kbp and above) over the course of generations 20, 100, and 200. The * symbols denote the loading control, which is a restriction fragment of chromosome IV.

(B) Measurement of average telomere length \pm standard deviation ($n = 3$). The triangles represent 20, 100, and 200 generations.

See also Figure S2.

between 20 or 40, 100, and 200 generations (Figures 1B, 1D, and S1), and the yeast did not senesce.

Deletions within the Ku-DNA-Binding Loop Decrease Telomere Length

The Ku deletion mutants were assayed for telomere length maintenance. In Figure 2A, Southern blots demonstrate that the mutants with deletions of up to 12 amino acids remained capable of maintaining telomeres at WT length. Deletion of 20 or more amino acids resulted in shorter telomeres similar to the $\Delta ku80$ control. This is the same trend observed in the NHEJ and silencing assays.

The telomere length of the mutants was monitored over time up to generation 200. In the experiment shown in Figure 2A, it appeared that telomere length increased in WT and $ku80\Delta20$ cells between 20 and 100 generations. However, measurements in independent experiments showed no convincing evidence of time-dependent telomere length change (Figure 2B). The main conclusion is that Ku80 can tolerate the removal of several amino acids from the ring and still maintain WT telomeric length, whereas deletions of 20 amino acids or more are defective.

with a telomere-proximal *URA3* gene (Ribes-Zamora et al., 2007), Ku mutants with deletions of up to 12 amino acids within the DNA-binding loop behaved like WT and were unable to express the *URA3* gene (Figures 1D and S1B). Deletions of 20 amino acids or greater allowed *URA3* expression, like the $\Delta ku80$ control. In a strain with a telomere-proximal *ADE2* gene, the WT strain and *ku* mutants with deletions of 12 amino acids or less were not able to express *ADE2* and thus appeared red in color (Figure S1C). The vector control and mutants with deletions of 20 amino acids or more were able to express *ADE2* and appeared white in color (Figure S1C). These results are in agreement with the silencing results seen for *URA3*.

Both the NHEJ assay and the silencing assays were carried out over multiple generations. No differences were observed

One explanation for the decrease in telomere length for the defective Ku mutants could be decreased levels of telomerase, as Ku has been implicated in the cellular abundance of TLC1 RNA (Mozdy et al., 2008; Zappulla et al., 2011). When analyzed by northern hybridization, the TLC1 RNAs in the mutant strains all had the correct size (Figure S2). Although we did detect with quantitative real-time RT-PCR a modest decrease in the TLC1 RNA levels for $\Delta ku80$, the other mutant strains all showed TLC1 RNA levels similar to those of WT (Figure S2). The variability in TLC1 RNA levels between experiments, presumably due to variability in level of the plasmid expressing TLC1, precluded the observation of any small changes in TLC1 abundance due to Ku80 mutations. These data did not support the idea that lower telomerase levels could explain the shorter telomeres.

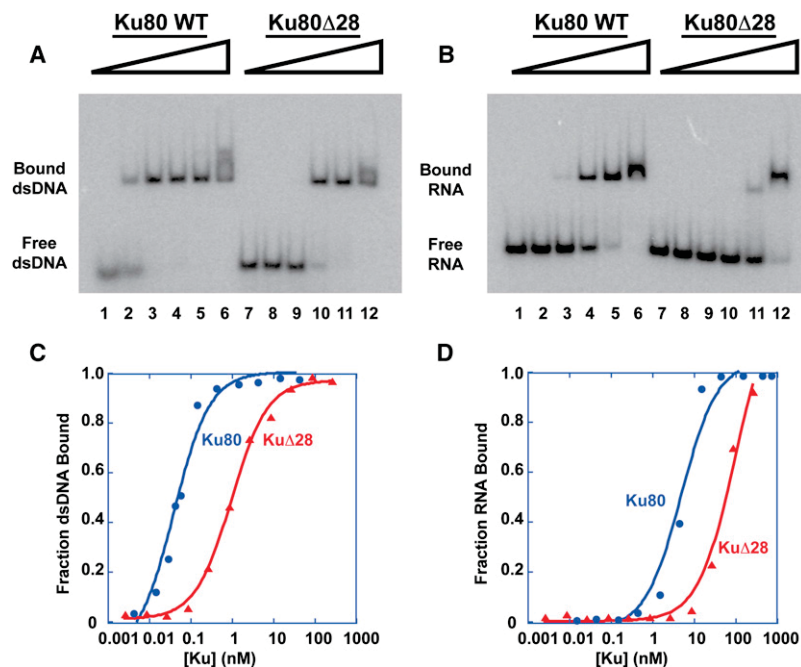


Figure 3. Ku80Δ28 Protein Loses Affinity for Both dsDNA and TLC1-KBS RNA

(A) Binding of 22 bp dsDNA with a 14 nt telomeric 3' overhang by purified WT Ku and Ku80Δ28 proteins assayed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). (Throughout this paper, Ku80Δ28 protein refers to a heterodimer of Ku70 and Ku80Δ28.) Lanes 1–6 contain the following amounts of active WT Ku protein: 0; 0.02 nM; 0.2 nM; 1.7 nM; 17.2 nM; 172 nM. Lanes 7–12 contain active Ku80Δ28 protein in the same amounts as in lanes 1–6.

(B) Binding of TLC1-KBS RNA to WT Ku and Ku80Δ28 assayed via EMSA. The amounts of active protein are the same as in (A).

(C) Graphical representation of the DNA binding seen in (A). The active K_D for WT Ku is 0.08 nM. The active K_D for Ku80Δ28 is 0.78 nM.

(D) Graphical representation of (B). The fitted data yielded active $K_D = 4.9$ nM for WT Ku and active $K_D = 87.1$ nM for Ku80Δ28 binding to TLC1-KBS RNA.

See also Figure S3.

Ku Mutant Defective in DNA Binding Is Defective in Binding RNA

To confirm that the defect in Ku function for the truncated mutants was due to decreased DNA binding, the Ku80Δ28 heterodimer was purified to homogeneity from yeast and tested for DNA binding (Figure S3A). Because our measurements showed a very slow off-rate of DNA from Ku, overnight incubations were required to reach equilibrium (see Extended Experimental Procedures). The dsDNA contained a telomeric 3' overhang (Figure S3B); a double-stranded region of 22 base pairs was chosen because it was long enough to permit the binding of one Ku per DNA (Ma and Lieber, 2001). Figures 3A and 3C demonstrate that Ku80Δ28 protein has an affinity for the DNA (active $K_D = 0.78$ nM; active K_D refers to the equilibrium dissociation constant corrected with respect to amount of active protein) that is about 10-fold weaker than that of WT (active $K_D = 0.08$ nM); this correlates with Ku80Δ28 being defective in vivo. At sufficiently high concentrations of WT Ku, a second shifted band of dsDNA can be seen, which presumably corresponds to two Ku per DNA molecule.

The binding of Ku80Δ28 and WT Ku to a 95 nt RNA comprising the Ku-binding site (KBS) of TLC1 RNA was also measured (Figures S3C, 3B, and 3D). Ku80Δ28 had a greatly diminished affinity for the RNA (active $K_D = 87.1$ nM) compared to WT (active $K_D = 4.9$ nM). This finding was unexpected; we had hypothesized that a smaller ring would inhibit DNA binding but not affect TLC1 RNA binding, based on data suggesting that RNA binding occurred at a different site on Ku80 (Stellwagen et al., 2003).

Mutation of the Ku Ring Inhibits TLC1 RNA Binding In Vivo

Because of the profound effect of the Ku80Δ28 mutation on TLC1 RNA binding in vitro, it seemed likely that this mutant Ku

would also be defective in TLC1 RNA binding in vivo. This was tested by a coimmunoprecipitation (coIP) experiment.

Yeast were formaldehyde crosslinked, Myc-tagged Ku was IP'd on beads coated with anti-Myc antibodies, and the coIP'd TLC1 RNA was quantified by real-time RT-PCR. The data showed substantial and specific association of TLC1 RNA with Ku in the WT strain but about 75% reduced binding in the *ku80Δ28* mutant strain (Figure 4A). Control experiments showed that the coIP was dependent on anti-Myc antibody, was eliminated in the $\Delta ku80$ strain, and was specific due to the lack of substantial pull-down of ACT1 RNA (Figure 4A). The yeast strains contained similar amounts of WT and Ku80Δ28 protein prior to the IP (Figure 1C), and the amount of Myc-tagged protein recovered by IP was similar for WT Ku and Ku80Δ28 proteins as assessed by western blot (Figure S4). Thus, our experiments provide no evidence that other factors in vivo are able to compensate for the loss of the primary binding interaction between Ku and TLC1 RNA; the greatly reduced RNA binding by the mutant Ku in vivo correlates with the substantial destabilization of mutant Ku-RNA interaction measured in vitro.

Mutation of the Ku Ring Reduces Nuclear Localization of TLC1 RNA

Telomerase RNA biogenesis involves export of the TLC1 RNA to the cytoplasm and subsequent importation (Teixeira et al., 2002; Gallardo et al., 2008). Previous work showed that Ku70 is important for the nuclear retention of TLC1 RNA (Gallardo et al., 2008). Although the mutations studied here are in the Ku80 subunit, Ku functions primarily as a heterodimer, so we expected that an RNA-binding-defective Ku80 would also be defective in nuclear retention of TLC1 RNA. Reduced nuclear retention of telomerase would in turn help explain the observed short-telomere phenotype.

The cellular localization of endogenous TLC1 RNA in the *ku80Δ28* strain was analyzed by fluorescent in situ hybridization. In contrast to the strain containing WT Ku, where TLC1 RNA was

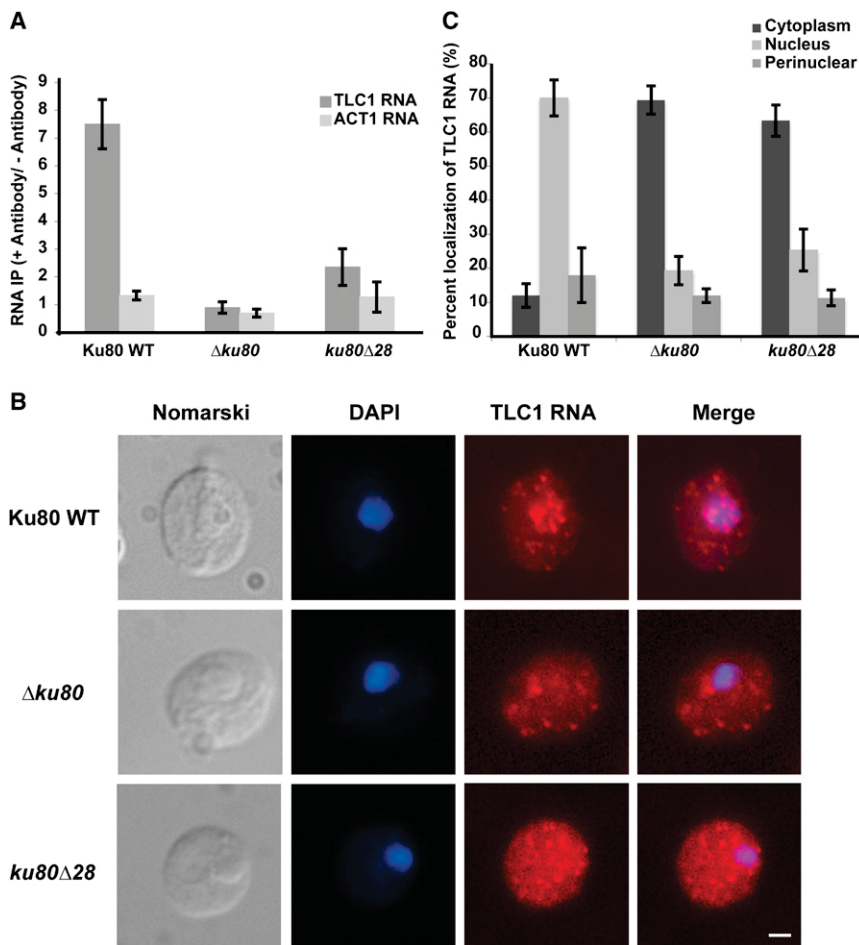


Figure 4. Ku80 Δ 28 Loses Association with TLC1 RNA In Vivo, and the RNA Accumulates in the Cytoplasm

(A) TLC1 RNA immunoprecipitation with Myc-tagged Ku proteins analyzed by real-time RT-PCR. Cells were subjected to formaldehyde crosslinking to preserve RNA-protein interactions prior to immunoprecipitation on anti-Myc beads. The highest levels of pull-down (around 15-fold enrichment) corresponded to 2% of the input TLC1 RNA. ACT1 mRNA, which is not known to associate with Ku, served as a control for nonspecific binding. Bars indicate average of five biologic replicates performed on four different weeks, and error bars represent standard deviation ($n = 5$).

(B) Localization of endogenous TLC1 RNA in WT, $\Delta ku80$, and $ku80\Delta28$ strains was detected with fluorescent in situ hybridization. DAPI: DNA staining. Scale bar: 1 μm .

(C) Quantification of TLC1 RNA distribution in WT, $\Delta ku80$, and $ku80\Delta28$ strains. For each strain, a total of 300 cells were randomly scored in three independent experiments; error bars give standard deviation.

See also Figure S4.

predominantly nuclear, the $ku80\Delta28$ strain showed most of the TLC1 RNA in the cytoplasm (Figure 4B). The redistribution to the cytoplasm was not as complete as observed with the Ku80 knockout strain (Figure 4C). This result was in complete accord with the in vivo Ku-TLC1 RNA-binding experiments (Figure 4A), which showed that the mutant Ku retained $\sim 25\%$ RNA-binding function.

Binding of Ku to RNA or DNA Is Mutually Exclusive

Because the Ku80 mutation interfered with both TLC1 RNA and DNA binding, we hypothesized that WT Ku would not be able to bind dsDNA and TLC1 RNA simultaneously. Three different forms of dsDNA were tested: DNA with blunt ends, a 3' overhang with a random sequence, and a 3' overhang with a telomere-like sequence (Figure S3B). Mammalian Ku binds all of these forms of DNA (Bianchi and de Lange, 1999; Dynan and Yoo, 1998). Similarly, we found that all three dsDNA forms were able to bind yeast WT Ku (Figure 5A). The shifted DNA-Ku band migrated slightly faster than the Ku-bound TLC1-KBS RNA. In the lanes containing equal amounts of both dsDNA and RNA, the resulting shifted band migrated as the Ku-DNA complex. The amount of radiolabeled free RNA in lanes 5, 9, and 14 provides independent evidence that very little if any RNA was present in the shifted

band. Under no circumstances did we detect a shifted band that could correspond to both DNA and RNA being simultaneously bound. Because of Ku's higher affinity for DNA than for RNA, the DNA-Ku complex dominates. Thus, we conclude either that RNA and DNA bind to the same site on Ku or that mutually exclusive binding sites for RNA and DNA

exist on Ku. The DNA 3' end does not affect the preference of Ku to bind only to dsDNA versus forming the complex containing Ku, DNA, and RNA.

Because the ability of DNA to inhibit the Ku-RNA interaction was contrary to expectation, we conducted additional tests. To ensure that equilibrium was being achieved in our studies, the off-rates were measured for all dsDNAs and TLC1-KBS RNA (Figure S5). We observed that the RNA had a faster off-rate than the dsDNA (Table 1). For example, the blunt dsDNA had a $k_{\text{off}} = 0.007 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ and $t_{1/2} = 99 \text{ min}$, which was a substantially longer half-life than that reported for human Ku (Ma and Lieber, 2001). As a consequence of the slow off-rate, the incubation times for the binding experiments went overnight to ensure that equilibrium was achieved.

In an independent test for mutually exclusive binding, increasing amounts of TLC1-KBS RNA were able to prevent dsDNA from binding Ku (Figures 5B and S6A). The inhibition was specific: 3xmutTLC1-KBS RNA and *Tetrahymena* P4P6 RNA did not hinder DNA binding even at 1 μM (Figures S6B and S6C). TLC1-KBS RNA prevented the three different DNAs from interacting with Ku but at different concentrations (Figure 5B and Table 1), which reflect the differences in the affinity of Ku for these DNAs (Table 1). The K_i (inhibition constant) of TLC1-KBS RNA was calculated for each DNA tested using equations for

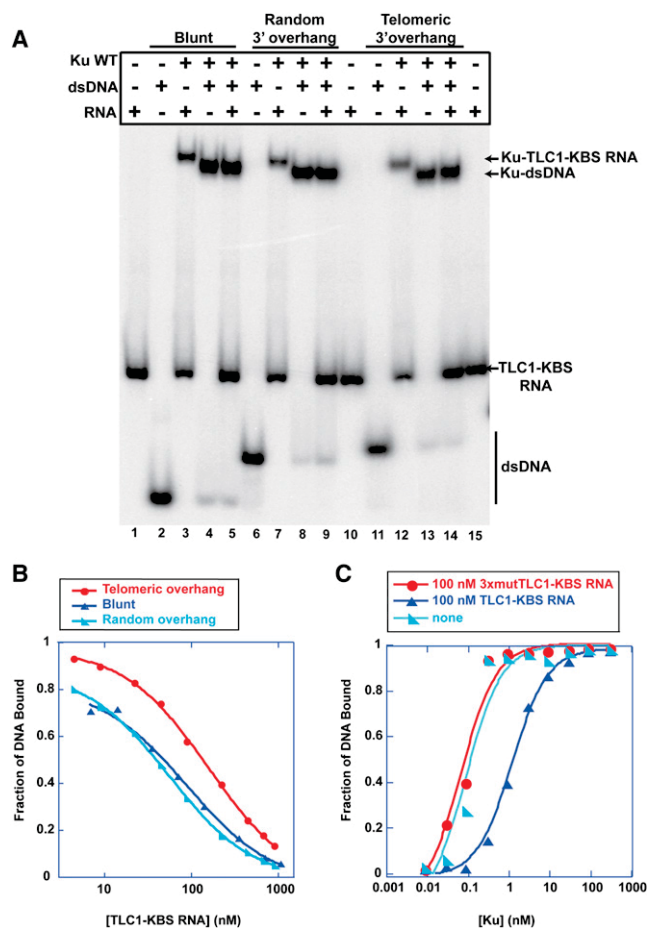


Figure 5. Mutually Exclusive Binding of RNA and DNA to WT Ku

(A) A mixing experiment shows the complexes that Ku forms with dsDNA containing different 3' overhangs and with TLC1-KBS RNA. Each arrow denotes the position in the gel for a particular complex.

(B) TLC1-KBS RNA and DNA compete against one another to bind Ku. Increasing amounts of TLC1-KBS RNA were added to samples containing Ku and radiolabeled dsDNA with different 3' overhangs. The fraction bound of each sample was calculated and fitted to a single binding site competition formula to calculate the K_i of the RNA.

(C) One hundred nanomoles of TLC1-KBS RNA and 3xmutTLC1-KBS RNA were added in equilibrium binding experiments to ascertain their effects on Ku's affinity for radiolabeled dsDNA with telomere-like 3' overhang. The fraction bound of the DNA was calculated and fitted to the Langmuir isotherm. See also Figures S5 and S6.

a single-site binding model (Table 1). The calculated K_i 's are equal within experimental error to the K_D of the TLC1-KBS RNA, as expected. The 22 bp blunt-ended DNA bound to yeast Ku with an apparent K_D of 180 pM, similar to the K_D of 160 pM reported for human Ku (Ma and Lieber, 2001), 340 pM reported for human Ku (Roberts and Ramsden, 2007), and 300 pM reported for yeast Ku using a 600 bp blunt-ended DNA (Chen and Tomkinson, 2011).

The reverse experiment was performed to determine whether dsDNA could inhibit TLC1-KBS RNA from binding Ku (Figures S6D and S6E). All three forms of DNA tested hindered the

RNA-Ku interaction equally well with similar IC_{50} values of approximately 40 nM (Table 1). Because these experiments were conducted at Ku and DNA concentrations far above K_D , they exhibit titration behavior (Shoichet, 2006); i.e., the binding of RNA is limited by the amount of free (non-DNA-bound) protein rather than the binding constant. The titration behavior is also reflected in the steepness of the curves. Thus, IC_{50} is not expected to equal the K_D for DNA binding.

RNA Competitively Inhibits DNA Binding to Ku

To determine whether the inhibition was competitive or noncompetitive, an experiment was performed to see how the RNA affected the K_D of Ku binding to the dsDNA with the telomere-like sequence. In Figure 5C, the presence of 100 nM RNA shifted the curve to the right, an increase of the apparent K_D of DNA binding to Ku by 17-fold, but did not change the maximum of the fraction bound. In parallel to enzyme kinetics, this behavior is indicative of a competitive inhibitor.

To confirm that the competitive inhibition observed was a direct result of Ku binding to the RNA and not just a result of RNA being present, we performed the same experiment using an RNA nearly defective in Ku binding, 3xmutTLC1-KBS, which contains the three point mutations described previously (Peterson et al., 2001). We confirmed that the affinity of this mutant was substantially weaker than that of the WT RNA (Table 1); due to the ability to obtain more Ku with our modified protein purification protocol, we were able to use higher Ku concentrations to observe this weak binding. Even though the 3xmutTLC1-KBS RNA had a weak affinity for Ku, it was not able to competitively inhibit the DNA binding at 100 nM (Figure 5C).

Ku70 Separation-of-Function Mutants Bind DNA and TLC1 RNA Normally

The inability of Ku to bind both DNA and TLC1 RNA simultaneously eliminates the current tethering model for Ku recruitment of telomerase (Figure 6A) but leaves open a revised model in which telomere-bound Ku would bind to telomerase-bound Ku (Figure 6B). This "synapse model" invokes the same Ku-Ku interactions that are thought to occur between Ku-bound DNA ends during NHEJ. Importantly, Ribes-Zamora et al. (2007) reported separation-of-function alleles of *ku70* with mutations distant from the DNA-binding ring that were defective in NHEJ but retained full telomeric functions. This observation would seem to provide a strong argument against Ku-Ku synapse formation being involved in telomerase recruitment, assuming that these mutant Ku70 proteins in fact retained full DNA end-binding and TLC1 RNA-binding activities.

Therefore, we used site-specific mutagenesis to introduce the D195A and D195R mutations into Ku70, purified the proteins, and performed quantitative dsDNA-binding and TLC1-KBS RNA-binding gel-shift experiments. As shown in Figure S7, both mutant proteins bound both nucleic acids with essentially WT affinity. Thus, we concur with the conclusion of Ribes-Zamora et al. (2007) that these are true separation-of-function mutants. The mutations do not perturb DNA or RNA binding, so they presumably interfere with protein-protein interactions required for NHEJ but not for telomerase function.

Table 1. Summary of Binding and Competition Data

	3xmutTLC1-KBS RNA	TLC1-KBS RNA	Telomeric 3' Overhang	Random 3' Overhang	Blunt End
Apparent K_D [nM]	353 ± 49	10.5 ± 0.7	0.17 ± 0.10	0.30 ± 0.22	0.18 ± 0.06
k_{off} [min^{-1}]		2.6 ± 1.2	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.007 ± 0.005
$t_{1/2}$ [min]		0.27	140	63	99
k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]		3.4×10^6	4.8×10^5	5.9×10^5	6.3×10^5
K_i for TLC1-KBS RNA [nM]			51 ± 32	13 ± 5	19.5 ± 8.3
IC_{50} for DNA [nM]			40 ± 3	42 ± 9	38 ± 6

Average ± standard deviation of 3–8 measurements.

DISCUSSION

The prevailing paradigm in the telomerase field has been that Ku can bind DNA termini and TLC1 RNA independently, which led to a simple and elegant model by which Ku could help recruit telomerase to chromosome ends. Based on this paradigm, we set out to engineer separation-of-function alleles of yeast Ku that lost DNA end binding and retained TLC1 RNA binding. Instead, our DNA-binding mutants of Ku showed substantially reduced binding to TLC1 RNA both in vitro and in vivo. Although this genetic evidence was dramatic, it is important to remember that mutant phenotypes provide information about the mutant, from which the behavior of the WT is inferred. We therefore studied the binding of mixtures of TLC1 RNA and DNA to purified WT Ku protein, and we were able to confirm that Ku cannot bind both nucleic acids simultaneously. This finding leads to a new model of how Ku contributes to recruitment of telomerase to telomeres. In addition, the Ku mutants with reduced DNA binding are defective in NHEJ and telomeric gene silencing, providing direct evidence for the importance of DNA end binding in these Ku functions.

Mutually Exclusive Binding of Ku to RNA and DNA

Our in vitro binding experiments showed that the binding of telomerase RNA or DNA to Ku is mutually exclusive. The TLC1-KBS RNA was able to competitively inhibit Ku from binding dsDNA and vice versa. The mixing experiment showed that a complex containing both TLC1-KBS RNA and dsDNA could not be formed, which further supports the conclusion that Ku will bind to either dsDNA or TLC1-KBS RNA but not to both simultaneously. Finally, mutational analysis provided independent evidence for mutually exclusive binding, as the deletion designed to close the DNA-binding ring also inhibited RNA binding to a similar extent. The simplest way to achieve mutually exclusive binding is if RNA and DNA both bind to the ring of Ku or if the RNA-binding site physically overlaps with the DNA-binding site. The more accurate term “mutually exclusive binding” covers these possibilities and also the additional possibility of two nonoverlapping binding sites where occupancy of either site causes a conformational change that precludes availability of the other site.

Competition between TLC1 and chromosome ends for yeast Ku has been observed in vivo. In silencing experiments, a plasmid was engineered to express an RNA containing three TLC1-Ku-binding sites in tandem and transformed into yeast.

This RNA and similar constructs disrupted silencing (Peterson et al., 2001; Zappulla et al., 2011). These data are consistent with our in vitro observations that TLC1-KBS RNA and dsDNA compete against one another for Ku, although in vivo it is difficult to ascertain whether the Ku is bound to the very end of the chromosome through its DNA-binding ring or is bound at more internal telomeric sites.

Aptamer RNAs that bind human Ku have been identified by in vitro selection, and they were found to compete with dsDNA for Ku binding (Yoo and Dynan, 1998). These observations are very reminiscent of our findings for yeast Ku and TLC1-KBS. An intriguing possibility is that both TLC1-KBS and the aptamer RNAs are binding to the ring of Ku by mimicking the structure of B-form DNA, a known property of some RNAs (Bullock et al., 2010; Reiter et al., 2008). If the RNA were mimicking DNA structure, then the two substrates would naturally compete for the same binding site on Ku. The mutations in the 3x mutant RNA could then be disrupting its B-like helical structure, which might prevent the wider A-form RNA helix from even entering the Ku ring. One implication of this model is that there might be as-yet-unidentified Ku-binding RNA stem loops that are completely unrelated in nucleotide sequence but share a B-DNA-like helical structure.

Models for Yeast Telomerase Recruitment

The currently accepted model is that telomerase recruitment occurs via Ku simultaneously interacting with both dsDNA (telomeric DNA) and TLC1 RNA. Thus, Ku acts as a tether: Ku bound to telomerase could at the same time recognize and bind to telomeric DNA or to broken chromosome ends (Bertuch and Lundblad, 2003; Fisher et al., 2004; Fisher and Zakian, 2005; Pennaneach et al., 2006; Peterson et al., 2001). The present study challenges this model of Ku's contribution to telomerase recruitment, as we have demonstrated that DNA and RNA competitively bind Ku. Because Ku cannot bind DNA and RNA simultaneously, it cannot tether telomerase to the telomere or to a broken chromosome end (Figure 6A).

A second “synapsis” model is based on the idea that Ku binds to another Ku to promote the bridging of two DNA ends in NHEJ. In the nucleus, when the Ku-telomerase complex encounters a chromosome end, the Ku from the Ku-telomerase complex might bind to the Ku from the Ku-telomere complex in order to tether the telomere to telomerase (Figure 6B). A Ku-Ku joining event to facilitate the end-joining of DNA has been observed via atomic force microscopy with yeast Ku, although the authors

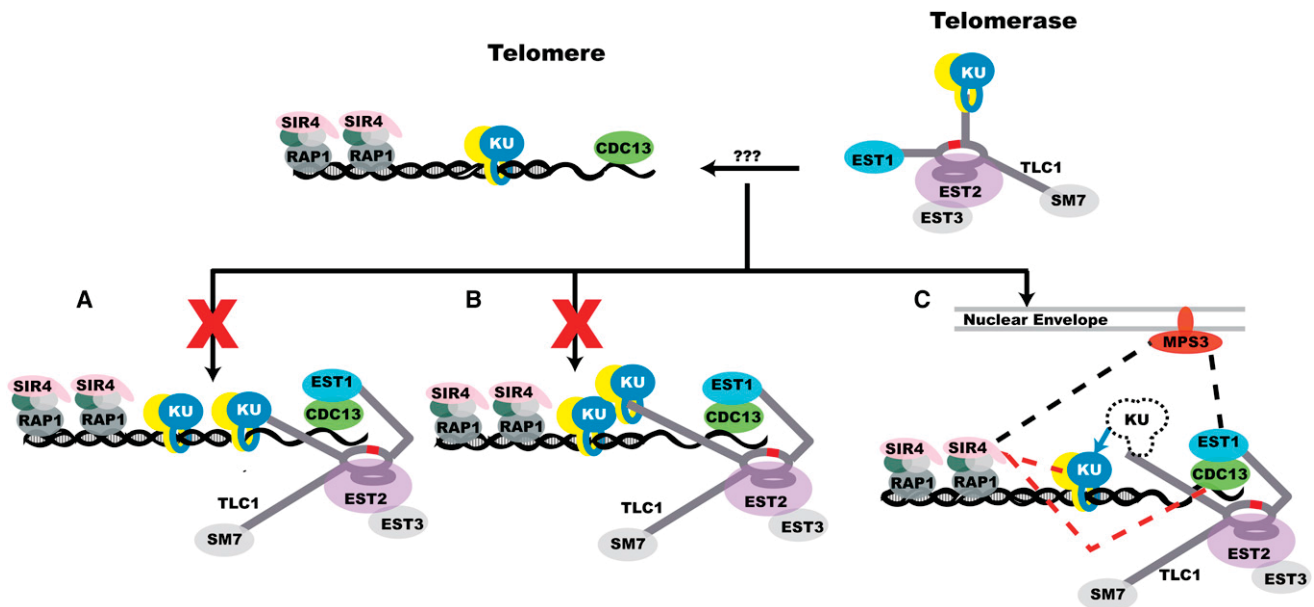


Figure 6. Models of Ku's Role in Telomerase Recruitment

(A) Published model shows Ku binding simultaneously to TLC1 RNA and the dsDNA while recruiting telomerase to the chromosome end, which is not possible according to our work.

(B) Based on the action of Ku during NHEJ, telomere-bound Ku might bind to a telomerase-bound Ku to recruit telomerase to telomeres. However, the Ku70 separation-of-function mutants described by Ribes-Zamora et al. (2007) and data presented herein cause us to discount this model.

(C) In the new model, Ku recruitment of telomerase begins with its key role in nuclear import and retention. When telomerase-bound Ku encounters telomeric DNA, Ku may be handed off from TLC1 to the DNA (blue line). This hand-off may be necessary to prevent telomerase from being sequestered in telomeric heterochromatin by Ku-Sir4 binding. The Est1-Cdc13 protein-protein interaction then secures telomerase to the telomere. Other reported interactions include Est1 and Sir4 binding to the nuclear envelope protein Mps3 (black dashes) and Ku and Cdc13 binding to Sir4 (red dashes).

See also Figure S7.

of the paper noted that the end-bridging event happened less frequently than the one mediated by the Mre11/Rad50/Xrs2 complex (Chen et al., 2001). However, the Bertuch separation-of-function Ku70 mutants were defective in NHEJ (which is thought to require Ku-Ku interaction) but retained telomeric functions (Ribes-Zamora et al., 2007), and these mutants retain WT DNA binding and TLC1 RNA binding (Figure S7). This argues against the Ku-Ku synapse formation that mediates NHEJ being important for telomerase recruitment, causing us to disfavor the model of Figure 6B.

Our preferred model for Ku's role in telomerase recruitment, which integrates the results from this and other studies, is shown in Figure 6C. A primary function of Ku binding to telomerase is to promote its nuclear accumulation (Gallardo et al., 2008; this study). The mutually exclusive binding of Ku to dsDNA and TLC1 RNA shown here is proposed to contribute to telomerase recruitment along with Cdc13-Est1 and nuclear envelope interactions. When telomerase encounters a dsDNA end, Ku is expected to become unbound from TLC1 RNA and engage the DNA, as it has higher affinity for DNA than for TLC1-KBS. This exchange of Ku between TLC1 and telomeric DNA could explain the Ku-dependent interaction between telomerase and telomeres observed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) in the G1 phase of the cell cycle, prior to telomerase elongation of telomeres (Fisher et al., 2004). In late S phase, telomerase then binds to the DNA end through two already well-established interactions:

the base-pairing of the TLC1 template with the single-stranded DNA at the chromosome end, and the interaction of the Est1 subunit of telomerase with telomere-bound Cdc13 (Evans and Lundblad, 1999; Qi and Zakian, 2000; Chan et al., 2008).

Also during the S phase of the cell cycle, when telomeres are being elongated, the telomeres localize to the nuclear periphery via interactions between Sir4 and the nuclear envelope protein Mps3 (Bupp et al., 2007). Concurrently, Ku-bound telomerase is found to be associated with Mps3, which is dependent on Mps3 binding Est1 (Antoniacci et al., 2007; Schober et al., 2009). The interactions of telomerase-bound proteins, telomere-bound proteins, and Mps3 may be important for preventing telomerase dissociation and fully elongating short telomeres (Teixeira et al., 2004; Chang et al., 2007), with regulation via Siz2 sumoylation of Sir4 and Ku (Ferreira et al., 2011).

DNA Binding Is Necessary for Ku's Telomeric and DNA Repair Functions

The crystal structure of human Ku bound to dsDNA (Walker et al., 2001) revealed a preformed dsDNA-binding ring, providing a structural basis for understanding how Ku could recognize dsDNA breaks and facilitate repair via NHEJ. We found that the larger deletions in the DNA-binding beta strand of yeast Ku80 inhibited NHEJ, in agreement with our expectation. Our quantitative measurements of DNA binding by the Ku80 Δ 28 mutant protein indicate that a 10-fold reduction in DNA affinity

is sufficient for inhibition, although it is possible that this mutation could also interfere with protein-protein interactions required for NHEJ.

Our data on telomeric silencing show that the DNA-binding ring of Ku is also required for telomeric heterochromatin formation. Telomeric silencing relies on the interaction between Ku and Sir4 (Roy et al., 2004; see also Hediger et al., 2002), and Ku's functions at double-strand breaks and at telomeres have been separated by mutations that target potential protein-binding sites on Ku (Bertuch and Lundblad, 2003; Ribes-Zamora et al., 2007). Our mutations in the ring of Ku are not near the 80 α 5 helix, so Ku's ability to bind Sir4 should not be affected (Ribes-Zamora et al., 2007). It is worth noting that the yKu80-135i mutant protein, a mutant defective in RNA binding, still retained an affinity for DNA, but it was reduced compared to WT (Stellwagen et al., 2003). The reduced DNA affinity, however, was still strong enough to allow for a physiologically relevant interaction between the protein and dsDNA to permit the silencing of the reporter genes (Stellwagen et al., 2003). Because our DNA-binding-defective Ku mutant did not facilitate the silencing of either the *ADE2* gene or the *URA3* gene, we propose that Ku must bind to dsDNA for its gene-silencing function.

Shortening of telomeres is a more complex phenotype, in that inhibition of either Ku-TLC1 RNA interactions or Ku-telomeric DNA interactions could potentially contribute. Previous work with mutations or deletions in TLC1 RNA that prevent Ku binding showed redistribution of TLC1 from nucleus to cytoplasm, establishing one contribution of the Ku-RNA interaction to telomere length maintenance (Gallardo et al., 2008). The large reduction in nuclear localization of TLC1 RNA in the *ku80 Δ 28* strain certainly contributes to the failure to maintain telomere length. Ku must also retain its ability to bind dsDNA in order to protect telomeres from nucleolytic degradation and recombination (Gravel et al., 1998; Polotnianka et al., 1998).

While this paper was under review, a publication by Lopez et al. (2011) appeared that concluded that Ku must load directly onto chromosome ends to accomplish its telomeric functions. Our conclusion about the importance of Ku's DNA-binding activity for silencing of telomeric gene expression is consistent with that of Lopez et al., and the similar phenotypes observed with two very different sets of alleles make this conclusion even more robust. Concerning Ku's role in NHEJ, the different alleles in the two studies both reduced Ku's interaction with DNA but had opposite effects on NHEJ, so it appears that the two sets of mutations must perturb different properties of Ku as it engages the DNA breaks to facilitate repair. Finally, we remain circumspect regarding the conclusion that Ku's DNA-binding activity is required for telomerase function. The DNA-binding-defective Ku alleles described by Lopez et al. (2011) did show some reduction of TLC1 RNA binding in vivo, and it would seem important to know whether TLC1 is still in the nucleus in these mutant Ku strains. Thus, although it remains entirely plausible that in the case of WT Ku and WT TLC1 RNA, Ku uses its ability to bind dsDNA to partake in the regulation of telomerase recruitment, our new findings that TLC1 RNA and dsDNA appear to bind in the same site on Ku make it challenging to use Ku mutants to distinguish between its telomerase-binding and DNA-binding functions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Strains

See Tables S1 and S2.

NHEJ Assay

Assays used the YVL2236 (*yku80 Δ = Δ ku80*) strain containing a galactose-inducible HO endonuclease and an engineered HO cut-site (Ribes-Zamora et al., 2007). After transformation with the plasmid carrying a Ku80 construct and *TRP* gene, cells from generations 40, 100, and 200 were streaked onto –Trp –Ura plates containing either glucose or 2% galactose and grown at 30°C for 2–3 days.

Silencing Assays

Assays (Ribes-Zamora et al., 2007) used the YVL885 (*Δ ku80*) strain engineered to contain *ADE2* and *URA3* genes located near telomeres V-R and VII-L, respectively. Yeast were transformed with the plasmids carrying a Ku80 construct and *TRP* gene and streaked on plates. Cells from generations 20, 40, 100, or 200 were grown overnight. An equal number of cells for each construct was 5-fold serially diluted onto –Trp, –Trp –Ura, or –Trp –Ade plates. The yeast grew at 30°C for 2–3 days. To enhance the red pigmentation of cells grown on the –Trp –Ade plates, the cells were placed at 4°C for 4–7 days and then placed at 26°C for approximately 10–16 days or until a dark red pigment became apparent.

Western Blots

The protocol followed that of Knop et al. (1999) with adjustments (see Extended Experimental Procedures). The membrane was cut below the 62 kDa SeeBlue Plus2 Prestained standard (Invitrogen LC5925). The blot portion containing the Ku mutants and other higher-molecular-weight proteins was probed either with anti-His HRP conjugate (QIAGEN 34460) following the manufacturer's protocol or 6X His tag from Abcam (ab9108). The other portion of the blot was probed with Dsk2 (Abcam ab4119). The blots that were probed with unconjugated antibodies went through a second blocking procedure using a goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz SC-2054) secondary antibody. The proteins were then detected using Amersham ECL Plus Western Blotting Reagents (GE Healthcare RPN2132). Phosphorimager intensities of the DSK2 bands were measured using Imagequant, and normalization factors were generated and applied to the quantified Ku bands. The ratios of the Ku mutants to WT were calculated.

Southern and Northern Blots

20–50 ml cultures were grown in –Trp –Ura media until they reached an optical density (OD)₆₀₀ of 0.75–1.0. The cells were then harvested, washed twice with sterile H₂O, and split in half after the second wash, and the pellets were harvested. Northern and Southern Blots were carried out as described previously (Zappulla et al., 2005), except that the genomic DNA was isolated using the Genra Puregene Yeast/Bact. Kit from QIAGEN, and the total RNA was probed for TLC1 and U1 RNAs.

Real-Time PCR

TLC1 and ACT1 RNA levels were quantified using RT-PCR (Mozdy and Cech, 2006) as detailed in the Extended Experimental Procedures.

RNA Preparation

TLC1-KBS and 3xmutTLC1-KBS were transcribed from PCR-amplified DNA that contained a 3'OMe on the last nucleotide and a T7 promoter. The transcribed RNA was purified as previously described (Kieft et al., 1999), but a 10% acrylamide gel was used. Contaminating DNA was removed using RQ1 DNase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The purified RNA was dephosphorylated using calf intestinal phosphatase (Roche) and 5'-end-labeled as previously described (Kieft et al., 1999).

Ku Expression and Purification

Yeast strain BJ2168 was cotransformed with the plasmid combinations pJP16 and pJP14 or pJP16 and pJP15. The plasmid pRS425TEF-YKU70 (Peterson et al., 2001) contained a point mutation or polymorphism (D473G), which

was corrected. The transformed yeast were grown in $-Trp -Leu$ media to an OD_{600} of 1.2. The cells were harvested, resuspended in lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), and stored at $-80^\circ C$. Thawed cells were treated with zymolase before being sonicated and spun at 12,000 rpm for 80 min. The resulting lysate was passed over nickel resin (QIAGEN). The resin was washed with 5 column volumes (CV) of lysis buffer with 20 mM imidazole, 2.5 CV of lysis buffer with 50 mM imidazole, and 0.5 CV of lysis buffer with 250 mM imidazole. Ku eluted with lysis buffer containing 250 mM imidazole was concentrated and dialyzed in buffer A (50 mM Tris, pH 8, 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA). The protein was passed over a mono q column using buffer A and buffer B (50 mM Tris, pH 8, 2 M NaCl, 1 mM EDTA). The fractions containing Ku were concentrated and passed over a Sup 200 column in buffer C (50 mM Tris, pH 8, 500 mM NaCl, 2 mM DT, 1 mM EDTA). The fractions containing Ku were concentrated, dialyzed in storage buffer (25 mM Tris, pH 8, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM DTT), flash frozen, and stored at $-80^\circ C$. The percent active protein was measured using titration experiments and DNA as the substrate. The protein was consistently about 47% active, which is greater than the 15% reported for human Ku (Blier et al., 1993). For Figure 3, the K_D based on active protein concentration is reported, but in all other instances, the apparent K_D is used.

Kinetics and Thermodynamics of Ku-RNA and Ku-DNA Interactions

Assays are described in detail in the Extended Experimental Procedures. A typical binding buffer was 21 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 11% glycerol, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 25 $\mu g/ml$ tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT.

Immunoprecipitation of TLC1-Ku Complexes

As detailed in the Extended Experimental Procedures, yeast expressing myc-tagged Ku were treated with formaldehyde (1% final) and sonicated. Anti-myc antibody (Sigma M4439) was added to half of each sample. The other half comprised the "minus antibody" control. Complexes were pulled down on protein G plus/protein A agarose (Calbiochem) beads and RNA was purified.

Fluorescent In Situ Hybridization

Yeast fixation and fluorescent in situ hybridization to detect endogenous TLC1 RNA were as described (Gallardo et al., 2008), except treatment with oxalyticase was between 15 and 23 min at $30^\circ C$. Hybridization with TLC1-specific probes was performed in 45% formamide.

Image Acquisition and Processing

All images were acquired using a Nikon Eclipse E800 epifluorescence upright microscope equipped with a $100\times$ DIC H (1.4 NA) objective and with a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera; 100 fields of yeast cells were acquired as z stacks of 20 planes, with 0.5 μm between planes in the z axis. Maximal projection of z stacks was performed and merged with DAPI signal for quantification of localization. Images were acquired and processed with MetaMorph software.

Other Methods

See Extended Experimental Procedures.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cell.2012.01.033.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alison Bertuch (Baylor College of Medicine) and Vicki Lundblad (Salk Institute) for generous gifts of yeast strains, Dan Gottschling (Fred Hutchinson Cancer Center) for providing plasmids and discussion, and Titia de Lange (Rockefeller University) for helpful ideas. We thank David B. McKay and Robert Batey (both University of Colorado-Boulder) for assisting in the computational analysis of the competition data and Jacob Schwartz for help with the analysis

of real-time RT-PCR data. We also thank Robert Batey, Jeffrey Kieft, Jaya-krishnan Nandakumar, Jacob Schwartz, and Andrea Berman for comments on the manuscript. C.T. was an EXROP student of the Howard Hughes Medical Institute. This work was funded in part by Canadian Institutes of Health Research grant MOP89768 to P.C. J.S.P. and T.R.C. designed the experiments and wrote the paper with input from all authors. J.S.P. performed in vivo-based plating assays and northern blots, purified yeast Ku, and executed all in vitro-based assays. K.J.G. carried out Southern blots, northern blots, westerns, plating assays, and quantitative RT-PCR. C.T. performed initial plating and Southern and northern experiments. F.O. and P.C. designed and performed cytolocalization of TLC1.

Received: June 10, 2011

Revised: November 1, 2011

Accepted: January 4, 2012

Published online: February 23, 2012

REFERENCES

- Antoniaci, L.M., Kenna, M.A., and Skibbens, R.V. (2007). The nuclear envelope and spindle pole body-associated Mps3 protein bind telomere regulators and function in telomere clustering. *Cell Cycle* 6, 75–79.
- Bertuch, A.A., and Lundblad, V. (2003). The Ku heterodimer performs separable activities at double-strand breaks and chromosome termini. *Mol. Cell Biol.* 23, 8202–8215.
- Bianchi, A., and de Lange, T. (1999). Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 21223–21227.
- Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J., and Hardin, J.A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J. Biol. Chem.* 268, 7594–7601.
- Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 24, 4639–4648.
- Bullock, S.L., Ringel, I., Ish-Horowicz, D., and Lukavsky, P.J. (2010). A'-form RNA helices are required for cytoplasmic mRNA transport in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 703–709.
- Bupp, J.M., Martin, A.E., Stensrud, E.S., and Jaspersen, S.L. (2007). Telomere anchoring at the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3. *J. Cell Biol.* 179, 845–854.
- Chan, A., Boulé, J.B., and Zakian, V.A. (2008). Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet.* 4, e1000236.
- Chang, M., Americ, M., and Lingner, J. (2007). Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 21, 2485–2494.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001). Promotion of DnI4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell* 8, 1105–1115.
- Chen, X., and Tomkinson, A.E. (2011). Yeast Nej1 is a key participant in the initial end binding and final ligation steps of nonhomologous end joining. *J. Biol. Chem.* 286, 4931–4940.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D., and Wilson, T.E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39, 431–451.
- Dandjino, A.T., Lévesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Abou Elela, S., and Wellinger, R.J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr. Biol.* 14, 1148–1158.
- Dynan, W.S., and Yoo, S. (1998). Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 26, 1551–1559.
- Evans, S.K., and Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117–120.
- Ferreira, H.C., Luke, B., Schober, H., Kalck, V., Lingner, J., and Gasser, S.M. (2011). The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nat. Cell Biol.* 13, 867–874.

- Fisher, T.S., and Zakian, V.A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst.)* 4, 1215–1226.
- Fisher, T.S., Taggart, A.K., and Zakian, V.A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1198–1205.
- 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.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751–762.
- Gravel, S., Larrivée, M., Labrecque, P., and Wellinger, R.J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741–744.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331–337.
- Hediger, F., Neumann, F.R., Van Houwe, G., Dubrana, K., and Gasser, S.M. (2002). Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr. Biol.* 12, 2076–2089.
- Jain, D., and Cooper, J.P. (2010). Telomeric strategies: means to an end. *Annu. Rev. Genet.* 44, 243–269.
- Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M.G., Lau, J.Y., and Doudna, J.A. (1999). The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J. Mol. Biol.* 292, 513–529.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15 (10B), 963–972.
- Laroche, T., Martin, S.G., Gotta, M., Gorham, H.C., Pryde, F.E., Louis, E.J., and Gasser, S.M. (1998). Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr. Biol.* 8, 653–656.
- Lee, S.E., Pâques, F., Sylvan, J., and Haber, J.E. (1999). Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Curr. Biol.* 9, 767–770.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561–567.
- Lopez, C.R., Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S.M., Williams, C.L., Haricharan, S., and Bertuch, A.A. (2011). Ku must load directly onto the chromosome end in order to mediate its telomeric functions. *PLoS Genet.* 7, e1002233.
- Ma, Y., and Lieber, M.R. (2001). DNA length-dependent cooperative interactions in the binding of Ku to DNA. *Biochemistry* 40, 9638–9646.
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B., and Weaver, D.T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4189–4198.
- Mishra, K., and Shore, D. (1999). Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr. Biol.* 9, 1123–1126.
- Mozdy, A.D., and Cech, T.R. (2006). Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* 12, 1721–1737.
- Mozdy, A.D., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2008). Multiple yeast genes, including Paf1 complex genes, affect telomere length via telomerase RNA abundance. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4152–4161.
- Myung, K., Chen, C., and Kolodner, R.D. (2001). Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 411, 1073–1076.
- Nugent, C.I., Bosco, G., Ross, L.O., Evans, S.K., Salinger, A.P., Moore, J.K., Haber, J.E., and Lundblad, V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 8, 657–660.
- Pennaneach, V., Putnam, C.D., and Kolodner, R.D. (2006). Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 59, 1357–1368.
- Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., and Gottschling, D.E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat. Genet.* 27, 64–67.
- Polotnianka, R.M., Li, J., and Lustig, A.J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr. Biol.* 8, 831–834.
- Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B., and Petes, T.D. (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24, 582–585.
- Qi, H., and Zakian, V.A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev.* 14, 1777–1788.
- Reiter, N.J., Maher, L.J., 3rd, and Butcher, S.E. (2008). DNA mimicry by a high-affinity anti-NF-kappaB RNA aptamer. *Nucleic Acids Res.* 36, 1227–1236.
- Ribes-Zamora, A., Mihalek, I., Lichtarge, O., and Bertuch, A.A. (2007). Distinct faces of the Ku heterodimer mediate DNA repair and telomeric functions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 301–307.
- Riha, K., Heacock, M.L., and Shippen, D.E. (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu. Rev. Genet.* 40, 237–277.
- Roberts, S.A., and Ramsden, D.A. (2007). Loading of the nonhomologous end joining factor, Ku, on protein-occluded DNA ends. *J. Biol. Chem.* 282, 10605–10613.
- Roy, R., Meier, B., McAinsh, A.D., Feldmann, H.M., and Jackson, S.P. (2004). Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J. Biol. Chem.* 279, 86–94.
- Schober, H., Ferreira, H., Kalck, V., Gehlen, L.R., and Gasser, S.M. (2009). Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev.* 23, 928–938.
- Shoichet, B.K. (2006). Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery. *J. Med. Chem.* 49, 7274–7277.
- Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404–409.
- Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 17, 2384–2395.
- Teixeira, M.T., Forstemann, K., Gasser, S.M., and Lingner, J. (2002). Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* 3, 652–659.
- 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.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607–614.
- Yoo, S., and Dynan, W.S. (1998). Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. *Biochemistry* 37, 1336–1343.
- Zappulla, D.C., and Cech, T.R. (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10024–10029.
- Zappulla, D.C., Goodrich, K., and Cech, T.R. (2005). A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1072–1077.
- Zappulla, D.C., Goodrich, K.J., Arthur, J.R., Gurski, L.A., Denham, E.M., Stellwagen, A.E., and Cech, T.R. (2011). Ku can contribute to telomere lengthening in yeast at multiple positions in the telomerase RNP. *RNA* 17, 298–311.
- Zhang, Y., Hefferin, M.L., Chen, L., Shim, E.Y., Tseng, H.M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S.E., and Tomkinson, A.E. (2007). Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 639–646.

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Western Blots

Liquid cultures grew overnight at 30°C in the appropriate drop-out liquid media. An OD₆₀₀ was taken for each culture and the cell concentration was calculated. Appropriate amounts of the liquid cultures were taken to ensure that at all the samples contained equal numbers of cells in the volume of 800 µl of liquid culture. The protocol followed that of Knop et al. (1999) except that the cells were in media, not water; volumes were adjusted for 800 µl; TCA was 50% and made fresh; incubations were for 10 min and samples were pelleted for 3 min, washed with 1 ml of cold acetone and pelleted again. After the lysis of the cells, the resulting pellets were resuspended in 4x NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen NP0008) with 4% BME. After heating at 85°C for a few minutes, the samples were then loaded onto a NuPAGE 4%–12% Bis Tris Gel. After electrophoresis, the proteins were transferred to Amersham Hybond ECL(GE RPN78D) membrane using western transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol) for 45 min at 0.5 Amps in a Bio-Rad Mini Trans-Blot apparatus.

Real-Time PCR

Using the total RNA samples prepared for northern blots, the levels of TLC1 and ACT1 were measured via real-time RT-PCR. Preparation of the standard RNAs was performed as described in Mozdy and Cech (2006). The primers used were based on those from Mozdy and Cech (2006); TLC1 template: 38&39 ccatgggaagcctaccat, tttagcaaagttgacgagttc (IDT) and ACT1 exon: 32&33 ctggtatgtgtaaagccggt, tgggtcaaaaagactcctactgt (IDT). cDNAs were synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #4368813), following the manufacturer's protocol and using 1 µg of total RNA in 10 µl of water. The reactions incubated for 2 hr at 37°C and were then heat inactivated at 75°C for 10 min. The samples were then diluted 2-fold and used in real-time PCR reactions using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad#170-8882). Reaction set up was: 10 µl of the Supermix, 1 µl of 2 µM primer stock containing both forward and reverse primers, 2 µl of the cDNA, and 7 µl of water for a total of 20 µl. In the same 96-well plate, duplicates were performed for each sample. Three replicates were performed for each biological sample for a n = 18. A LightCycler 480 (Roche) was used to perform the RT-PCR. The run primer efficiencies were calculated as described in (Pfaffl, 2001) using the standard RNAs. The primer efficiencies were used to calculate the ratio of TLC1 to ACT1. The ratios were normalized to WT.

Determination of Off-Rates

To determine the off-rate for dsDNA, 2 nM Ku was incubated with 1 nM end-labeled dsDNA in the buffer (21 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 11% glycerol, 5 mM MgCl₂, 25 µg/ml tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT) for about 1 hr. Then cold dsDNA in 10 mM Tris (pH 8), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA was added to the final concentration of 1 µM and samples of the reaction were loaded onto a running native 5% acrylamide gel and onto a running native 4%–20% acrylamide gel (Invitrogen) at varying time points. A premix control was included in which the Ku had equal opportunity to interact with the cold and labeled dsDNA. The gels were dried and exposed to phosphorimager screens. After the scanning, the bands were measured using Imagequant TL. The fraction bound was fitted to an exponential dissociation equation to yield the k_{off} .

For the determination of the RNA off-rate, a protocol similar to that described above was used, but with a few adjustments. 143 nM Ku was incubated with 20 nM TLC1-KBS RNA, which contained trace amounts of radiolabeled RNA. To fold the RNA, the RNA was diluted into storage buffer (25 mM Tris, pH 8, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 2 mM DTT, and 1 mM EDTA), heated to 85°C for 60 s, and snap cooled on ice for 15 min. After the RNA and Ku incubated for an hour, the cold TLC1-KBS RNA was added. From this point, the samples were treated the same as the dsDNA samples.

Mixing Assay

To assay for Ku's ability to bind both dsDNA and RNA concurrently, a mixing assay was employed. 144 nM Ku had equal opportunity to interact with 50 nM dsDNA and 50 nM TLC1-KBS RNA in the reaction buffer (21 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 16% glycerol, 7 mM Tris, pH 8, 0.77 mM EDTA, 25 µg/ml tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1.4 mM DTT). The RNA was folded as previously mentioned. The RNA and dsDNA samples were spiked with end-labeled versions. Samples of just dsDNA, RNA, dsDNA plus Ku, and RNA and Ku were included to compare migrations and amount of substrate bound by Ku. The samples were allowed to incubate for a period of time that was at least five times greater than the slowest half-life of the DNA-Ku interaction, which would be enough time for the samples to come to equilibrium. In this case, the samples incubated for 15–16 hr at room temperature. The samples were run on a native 5% acrylamide TBE gel, which ran at 12 W at 4°C. The gel was dried and processed as described above.

Competition Assay

To assay the TLC1-KBS RNA's ability to compete off dsDNA from Ku, 1 nM end-labeled dsDNA was incubated with 2 nM Ku in the buffer (21 mM HEPES, pH 7.5, 6.5 mM TRIS, pH 8, 150 mM NaCl, 16% glycerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 25 µg/ml tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT). Increasing amounts of TLC1-KBS RNA, 3xmutTLC1-KBS RNA, or P4P6 were added to the dsDNA plus Ku samples. To fold the RNA, the RNA was diluted into storage buffer (25 mM Tris, pH 8, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 2 mM DTT, and 1 mM EDTA), heated to 85°C for 60 s, and snap cooled on ice for 15 min. The RNA was folded at a 1 µM concentration and concentrated to ~10 µM using a 10,000 MWCO Amicon Ultra. The samples were incubated at room temperature for 15–16 hr, which was enough time for the

samples to come to equilibrium. This statement is based on comparisons with samples containing the maximum amount of RNA and the pre-mix controls, which contained both DNA and the maximum amount of RNA prior to the addition of Ku. The fraction bound was similar to one another in these samples, which indicates equilibrium being reached. The samples were run on a native 4%–20% acrylamide gel (Invitrogen). The gels were processed as described above. The calculated fraction bound was fitted to the Linn and Riggs equation to ascertain the K_i for the RNA.

To assay the ability of dsDNA to compete off TLC1-KBS RNA, 143 μ M Ku was combined with 20 μ M TLC1-KBS RNA, which contained trace amount of end-labeled RNA. The RNA was folded as previously described. Increasing amounts of dsDNA were added to the samples. The samples incubated for approximately 15 to 16 hr at room temperature in the following buffer (21 mM HEPES, pH 7.5, 2.5 mM TRIS, pH 8, 150 mM NaCl, 11% glycerol, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 25 μ g/ml tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT). The samples were processed and analyzed as previously described.

Determination of Equilibrium Constants and Type of Inhibition

For the determination of the equilibrium dissociation constant, trace levels of end-labeled TLC1-KBS RNA (pre-folded as described above) or dsDNA were incubated with increasing amounts of Ku at room temperature for 15–16 hr. The buffer used for binding was (21 mM HEPES, pH 7.5, 6 mM TRIS, pH 8, 150 mM NaCl, 16% glycerol, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 25 μ g/ml tRNA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT). The samples were run on a native 4%–20% acrylamide TBE gel (Invitrogen). The gels were processed as described above. The calculated fraction bound was fitted to the Langmuir isotherm to acquire K_D .

The preceding protocol was also used for determining the type of inhibition, except either 100 nM TLC1-KBS RNA or 3xmutTLC1-KBS RNA was included in the samples. The radiolabeled telomeric 3' overhang dsDNA served as the substrate.

Immunoprecipitation of TLC1-Ku Complexes

Protocol incorporated methods from Fisher et al. (2004) and Lopez et al. (2011). Yeast expressing myc-tagged Ku (100 ml) were treated with formaldehyde (1% final). Cells were washed, treated with zymolyase, and protease inhibitors (Roche, Complete EDTA free) added. After sonication (Bioruptor UCD-200, Diagenode), insoluble debris was removed by centrifugation. After adding Rnasin (Promega), SuperRnasin (Ambion) and Tween-20 to 0.5%, anti-myc antibody (Sigma M4439) was added to half of each sample. The other half comprised the “minus antibody” control. Following nutation at 4°C overnight, complexes were pulled down on protein G plus/protein A agarose (Calbiochem) beads, then treated with proteinase K, chloroform extraction, and RNeasy (QIAGEN) RNA purification followed by real-time RT-PCR.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Fisher, T.S., Taggart, A.K., and Zakian, V.A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1198–1205.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15 (10B), 963–972.
- Lopez, C.R., Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S.M., Williams, C.L., Haricharan, S., and Bertuch, A.A. (2011). Ku must load directly onto the chromosome end in order to mediate its telomeric functions. *PLoS Genet.* 7, e1002233.
- Mozdy, A.D., and Cech, T.R. (2006). Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* 12, 1721–1737.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

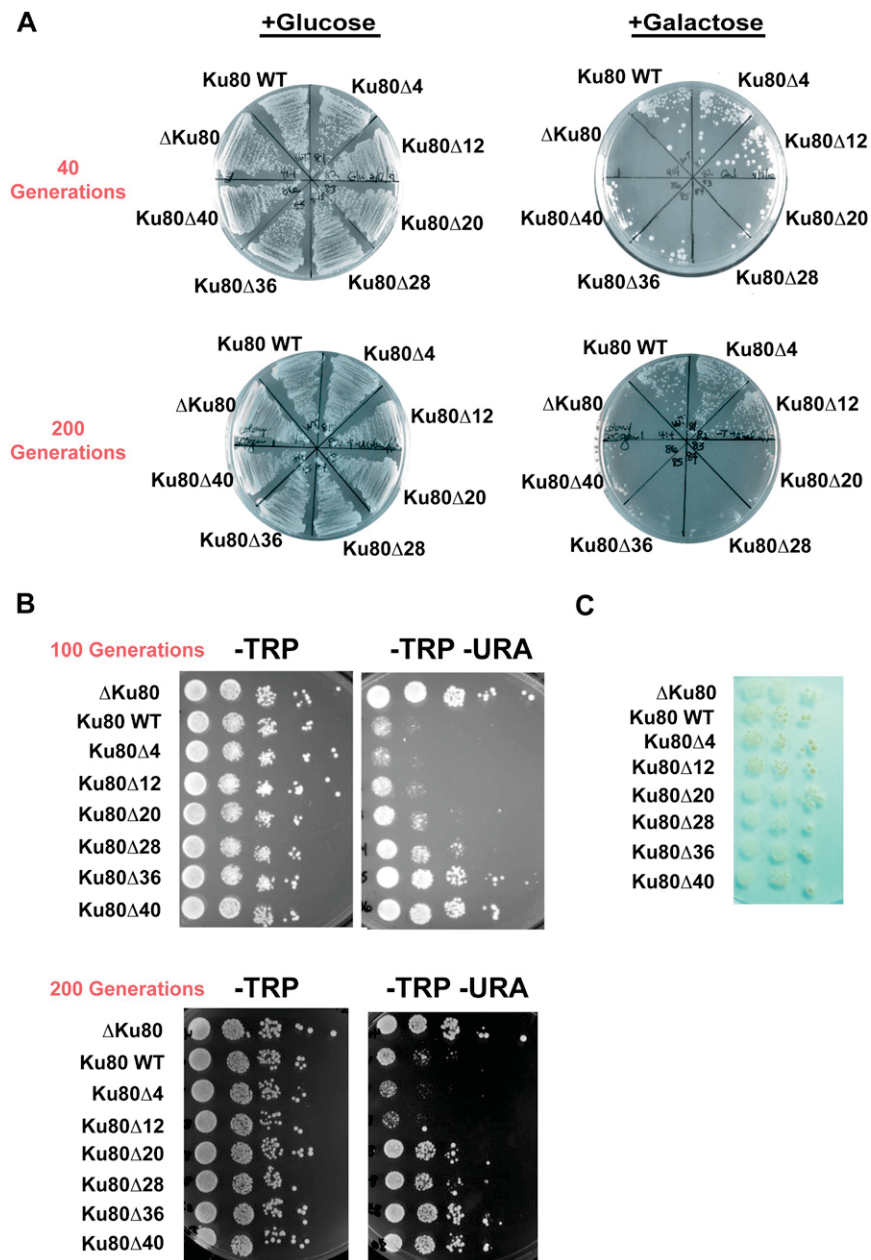


Figure S1. Truncations within the Ring of Ku80 Impair Ku's Ability to Repair DNA Breaks and Gene Silencing via Telomere Position Effect, Related to Figure 1

(A) Using a strain with an engineered HO endonuclease cut-site, the Ku mutants, along with Ku80WT and Δ Ku80, were streaked onto plates containing either glucose or galactose. Galactose induces the production of HO endonuclease, triggering dsDNA break repair in cells containing functional Ku. The cells were plated at generations 40 and 200.

(B) Generations 100 and 200 were analyzed for the yeast's ability to silence *URA* gene expression.

(C) Generation 20 was analyzed for *ADE* gene expression.

Different yeast strains were used in (A), (B), and (C), as described in Experimental Procedures.

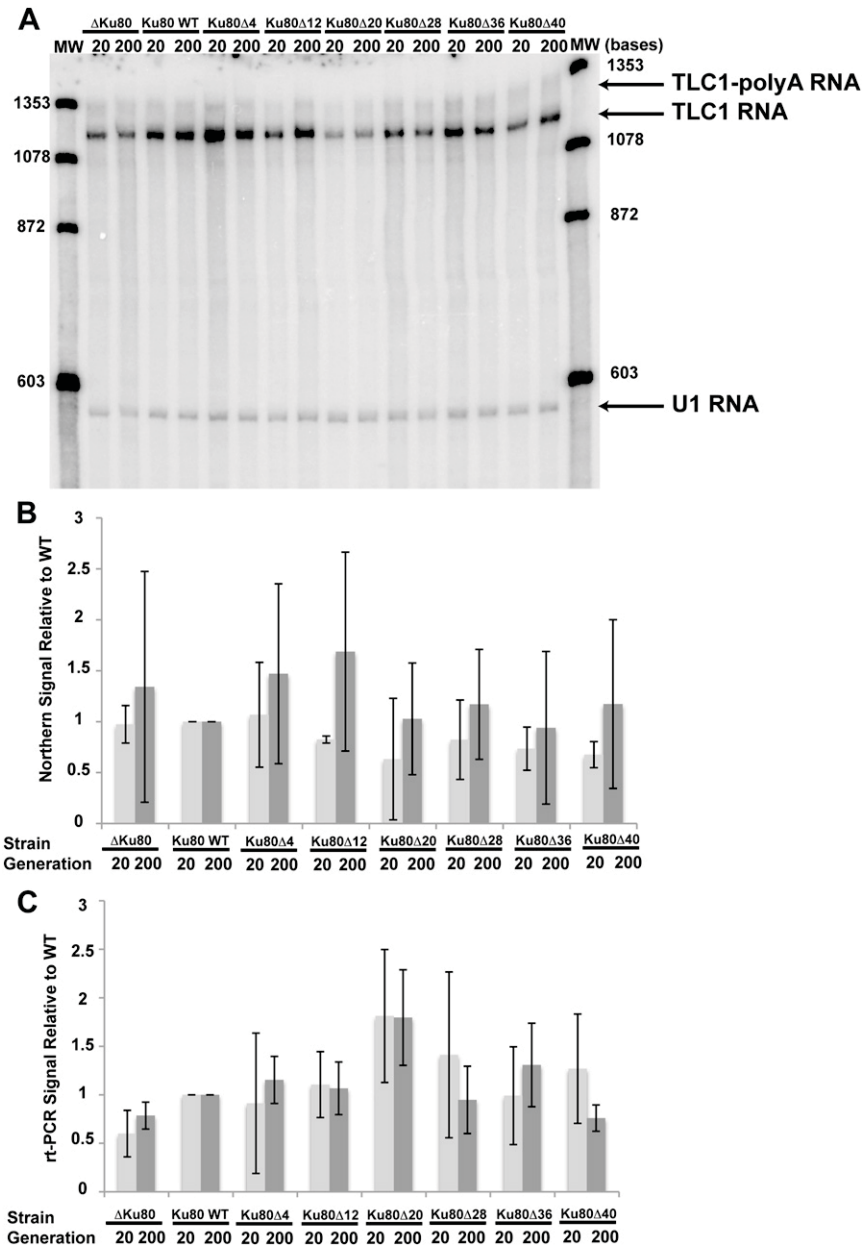


Figure S2. Truncations within the Ring of Ku80 Do Not Impair TLC1 RNA Levels, Related to Figure 2

(A) Representative northern blot showing RNA isolated from generations 20 and 200 probed for TLC1 RNA and U1 snRNA.

(B) Quantification of northern data depicting the normalized total TLC1 RNA levels (TLC1 + TLC1-polyA) relative to WT (n = 5).

(C) Quantification of RT-PCR data showing the normalized TLC1 RNA levels relative to WT for generations 20 and 200 (n = 18). No substantial effect of Ku80 deletions on TLC1 RNA levels is apparent.

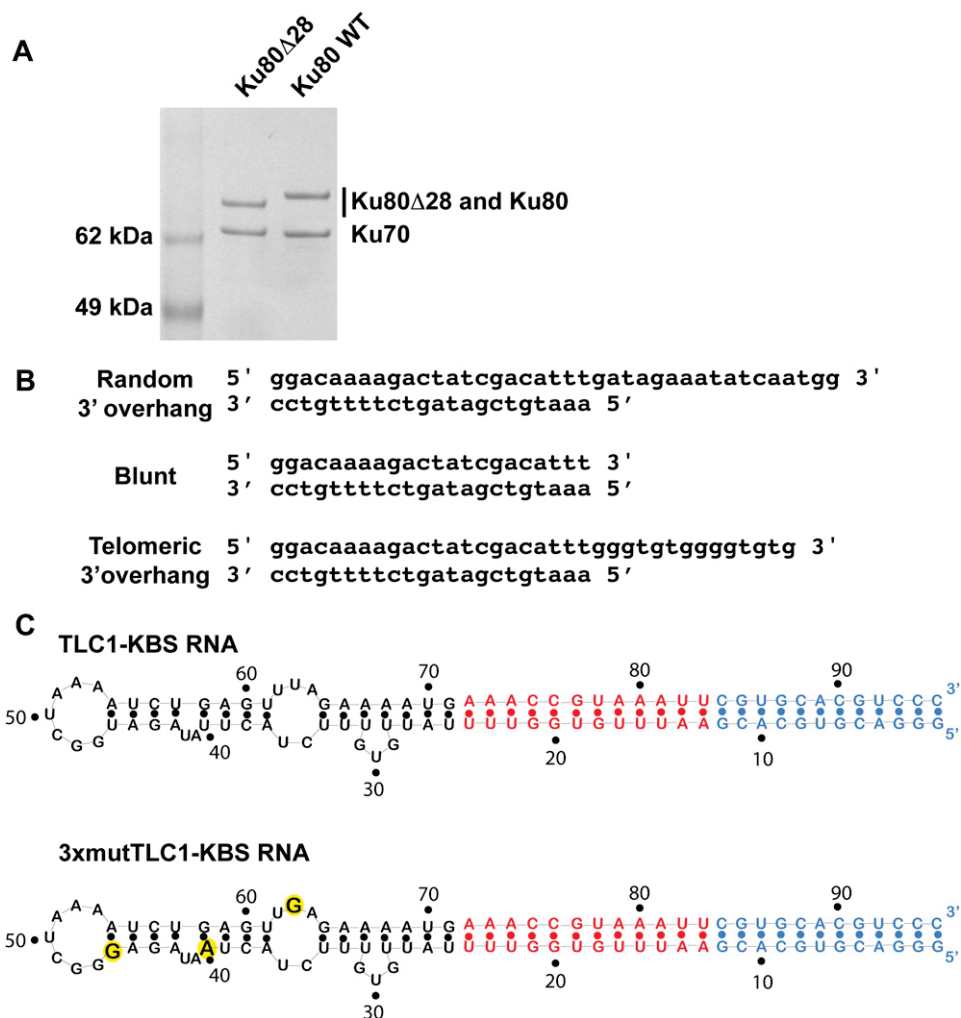


Figure S3. Protein and Nucleic Acid Substrates Used for Biochemical Studies, Related to Figures 3, 5, S5, S6, and S7

(A) Ku and Ku80 Δ 28 proteins were purified to homogeneity, analyzed by SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. A similar amount of the Ku70 subunit copurified with the His10-tagged Ku80 Δ 28 protein, indicating that the mutant subunit continued to form a Ku heterodimer.

(B and C) dsDNA substrates (B) and RNA substrates (C) used in binding studies. For the TLC1-KBS RNA construct, nucleotides 286 to 332 of TLC1 (black) had additional dsRNA added to promote proper RNA folding; these sequences consisted of a region from TLC1's Ku Arm (red) and random-sequence dsRNA (blue). The 3xmutTLC1-KBS RNA mutations are highlighted in yellow.

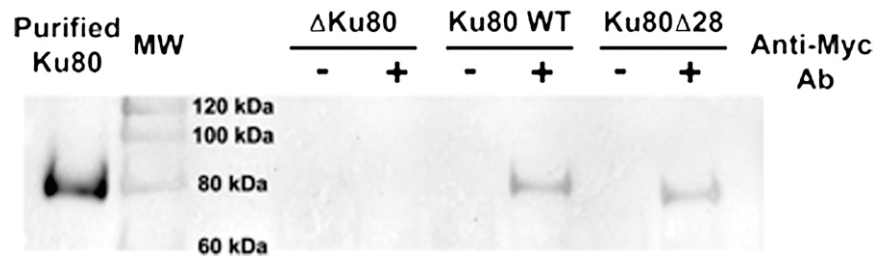


Figure S4. Western Blot of Myc-Tagged Ku80 Shows Equivalent Amounts of Protein Being Pulled down for Both WT Ku and Ku80 Δ 28 in Immunoprecipitation Experiments, Related to Figure 4

Because crosslinked Ku appeared as a smear on a gel, an uncrosslinked version of the experiment was performed to compare the pulled-down protein levels via western blot. First lane contains purified Ku and second lane contains molecular weight markers (MW).

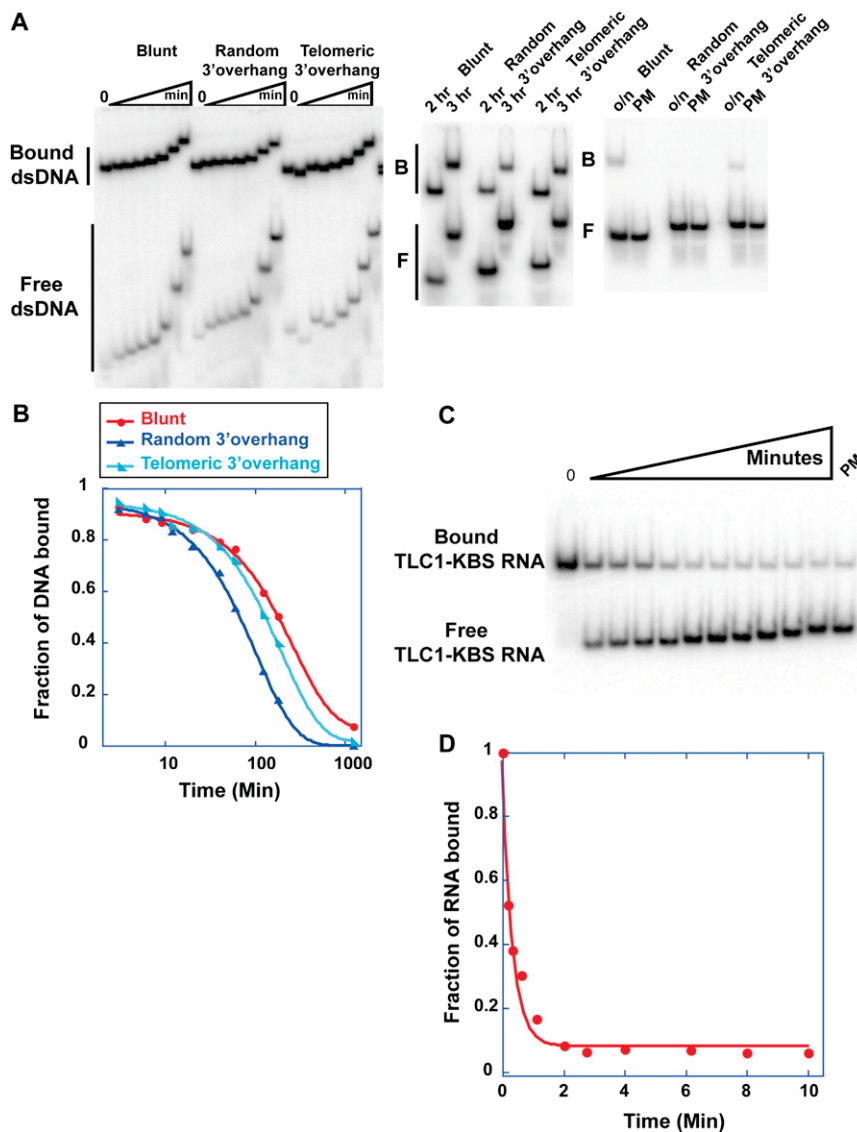


Figure S5. Off-Rate Determination, Related to Figures 3 and 5

(A) Set of gels used to measure the off-rate of Ku for different dsDNAs. In the left panel, the curvature of the bands is due to the gel being loaded at various time points while running, and the wedge represents increasing time from 0 to 1000 min. Similarly in the center panel, the off-set of bands between 2 and 3 hr is due to the gel continuing to run while the incubation was progressing. PM denotes pre-mix control (radiolabeled DNA and unlabeled chase DNA were premixed prior to adding Ku). o/n stands for overnight time point. B represents the bound dsDNA. F denotes free dsDNA.

(B) The fraction bound was quantified and fitted to an exponential dissociation equation to obtain the dissociation rate constant.

(C) The off-rate for TLC1-KBS RNA was determined in a similar fashion as the dsDNA. In the sample gel shown, the wedge represents increasing time from 0 to 10 min.

(D) Quantification of TLC1-KBS RNA dissociation.

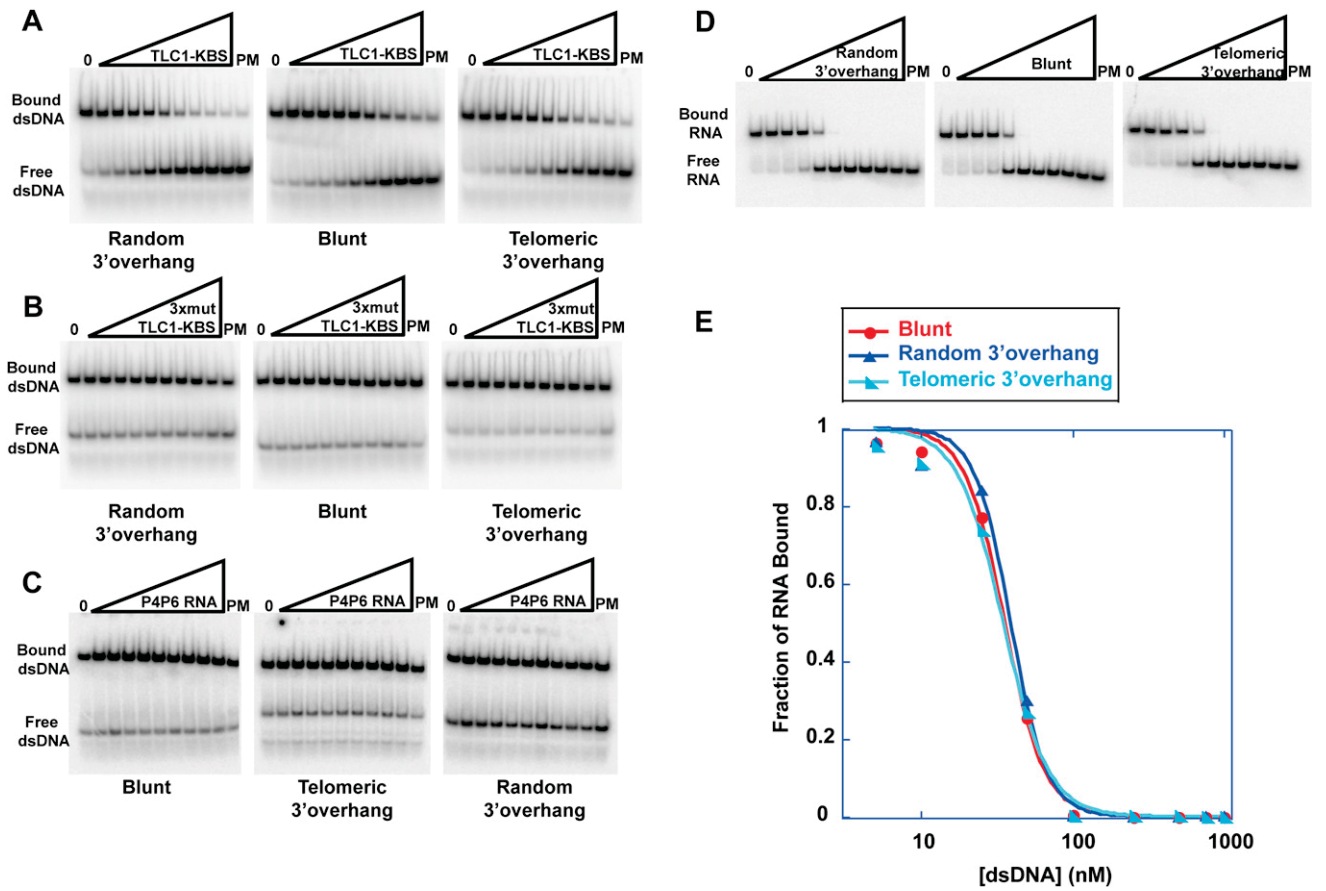


Figure S6. TLC1 RNA Competes against DNA to Bind Ku, Related to Figure 5

(A) Sample set of gels used in the competition experiment with TLC1-KBS RNA competing against dsDNA for an interaction with Ku.

(B) and (C) depict similar competition experiments, but 3xmutTLC1-KBS RNA and the unrelated *Tetrahymena* P4P6 RNA, respectively, are used instead of TLC1-KBS RNA. The (PM) symbol denotes the pre-mix control. The wedges represent increasing RNA concentrations from 0 to 1 mM.

(D) Sample set of gels used in the competition experiment with TLC1-KBS RNA competing against dsDNA for an interaction with Ku. The (PM) symbol denotes the pre-mix control. Wedge represents increasing DNA concentrations from 0 to 1 mM.

(E) Sample quantification of data.

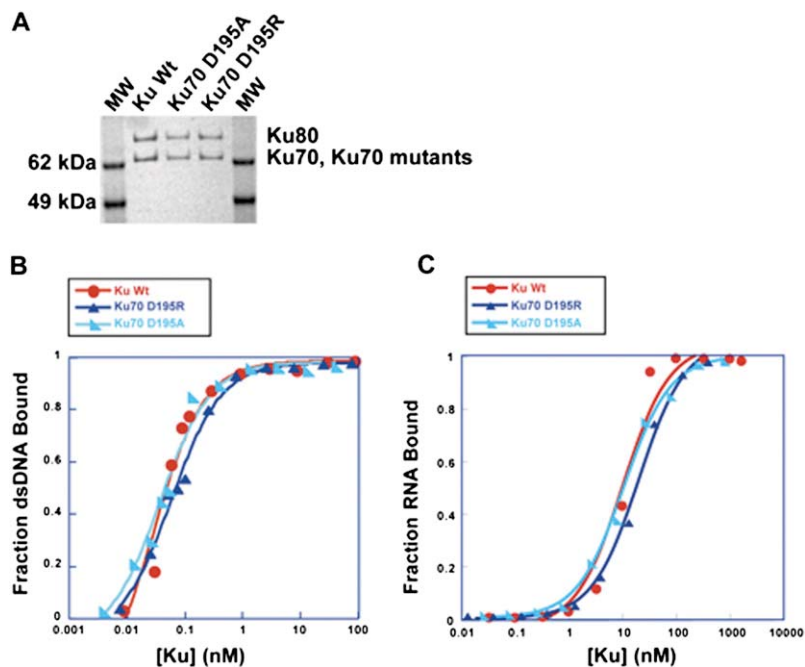


Figure S7. Separation-of-Function Ku70 Mutants Still Retain WT Affinity for DNA and RNA, Related to Figure 6

(A) Ku70 D195R and Ku70 D195A proteins were purified to homogeneity, analyzed by SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. Similar amounts of the 2MYC-10His tagged Ku80 subunit copurified with the WT and Ku70 mutant proteins, indicating that the mutant subunits continued to form Ku heterodimers. (B and C) Affinity binding measurements reveal that the Ku70 D195R and Ku70 D195A mutations do not affect Ku's affinity for either (B) DNA (telomere 3' overhang dsDNA) or (C) RNA (TLC1-KBS RNA). The K_D for Ku70 D195R binding to DNA is 0.17 ± 0.15 nM and 14.4 ± 4.9 nM for RNA. The K_D for Ku70 D195A for DNA is 0.07 ± 0.04 nM and 20.2 ± 0.8 nM for RNA.

Annexe 2

The principal role of Ku in telomere length maintenance is promotion of Est1 association with telomeres

Jaime Williams^{*}, Faissal Ouenzar⁺, Laramie D. Lemon⁺⁺, Pascal Chartrand⁺ and Alison A. Bertuch^{*,++,\$,1}

^{*}Department of Molecular and Human Genetics, ⁺⁺Integrative Molecular and Biomedical Sciences Graduate Program, and ^{\$}Departments of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, and ⁺Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada

¹Corresponding author: Alison A. Bertuch, MD, PhD
Texas Children's Hospital
6621 Fannin St.
Houston, Texas 77030
Tel: 832-824-4579

Ma contribution à ce papier : j'ai effectué les expériences de FISH et de quantification de la figure 2B et 4A. J'ai participé également dans la correction du manuscrit et la discussion des résultats.

The Principal Role of Ku in Telomere Length Maintenance Is Promotion of Est1 Association with Telomeres

Jaime M. Williams,* Faissal Ouenzar,† Laramie D. Lemon,‡ Pascal Chartrand,† and Alison A. Bertuch*,§,1

*Department of Molecular and Human Genetics, †Integrative Molecular and Biomedical Sciences Graduate Program, and ‡Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, and †Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

ABSTRACT Telomere length is tightly regulated in cells that express telomerase. The *Saccharomyces cerevisiae* Ku heterodimer, a DNA end-binding complex, positively regulates telomere length in a telomerase-dependent manner. Ku associates with the telomerase RNA subunit TLC1, and this association is required for TLC1 nuclear retention. Ku–TLC1 interaction also impacts the cell-cycle-regulated association of the telomerase catalytic subunit Est2 to telomeres. The promotion of TLC1 nuclear localization and Est2 recruitment have been proposed to be the principal role of Ku in telomere length maintenance, but neither model has been directly tested. Here we study the impact of forced recruitment of Est2 to telomeres on telomere length in the absence of Ku's ability to bind TLC1 or DNA ends. We show that tethering Est2 to telomeres does not promote efficient telomere elongation in the absence of Ku–TLC1 interaction or DNA end binding. Moreover, restoration of TLC1 nuclear localization, even when combined with Est2 recruitment, does not bypass the role of Ku. In contrast, forced recruitment of Est1, which has roles in telomerase recruitment and activation, to telomeres promotes efficient and progressive telomere elongation in the absence of Ku–TLC1 interaction, Ku DNA end binding, or Ku altogether. Ku associates with Est1 and Est2 in a TLC1-dependent manner and enhances Est1 recruitment to telomeres independently of Est2. Together, our results unexpectedly demonstrate that the principal role of Ku in telomere length maintenance is to promote the association of Est1 with telomeres, which may in turn allow for efficient recruitment and activation of the telomerase holoenzyme.

TELOMERES are the specialized nucleoprotein structures at the ends of linear chromosomes, which protect the natural chromosome termini from degradation, recombination, and fusion. Telomere length is tightly regulated in cells expressing the telomere replication enzyme telomerase, and proper telomere maintenance is important for the ability of telomeres to promote genome stability. In *Saccharomyces cerevisiae*, telomeres are maintained at 250–350 bp of double-stranded TG₍₁₋₃₎ DNA repeats with a terminal 3' single-stranded G-rich overhang (G-tail) and a repertoire of proteins, which associate either directly or indirectly with the duplex telomeric repeats or G-tails (Wellinger and Zakian 2012).

Due to the inability of the semiconservative DNA replication machinery to fully replicate DNA ends of linear chromosomes, terminal chromosomal DNA is lost with each cell division, which, in the absence of a mechanism to restore telomere length, eventually leads to critically short telomeres and cellular senescence or apoptosis.

Most eukaryotes studied utilize telomerase to circumvent this loss of telomeric DNA. In *S. cerevisiae*, telomerase is composed of an RNA component, TLC1 (Singer and Gottschling 1994), and three protein subunits, Est1, Est2, and Est3 (Lin and Zakian 1995; Lingner *et al.* 1997b; Hughes *et al.* 2000). Absence of any one of these components results in a telomerase deficiency phenotype *in vivo*, with progressive telomere shortening and eventual cellular senescence, referred to as an *est* phenotype (Lundblad and Szostak 1989; Singer and Gottschling 1994; Lendvay *et al.* 1996). In contrast, only the absence of TLC1, which provides the telomeric repeat sequence template, or Est2, the catalytic subunit, results in telomerase deficiency in cell extracts, indicating roles for Est1 and Est3 in the activity of telomerase in the context

Copyright © 2014 by the Genetics Society of America
doi: 10.1534/genetics.114.164707

Manuscript received October 23, 2013; accepted for publication May 23, 2014;
published Early Online May 30, 2014.

Available freely online through the author-supported open access option.

Supporting information is available online at <http://www.genetics.org/lookup/suppl/doi:10.1534/genetics.114.164707/-/DC1>.

¹Corresponding author: Texas Children's Hospital, 1102 Bates, FC 1200, Houston, TX 77030.

of the cell and telomeric chromatin (Cohn and Blackburn 1995; Lingner *et al.* 1997a).

The *Est1* protein has been proposed to mediate two functions in telomere replication. First, it is thought to mediate the recruitment of telomerase to telomeres via its interaction with *Cdc13* (Evans and Lundblad 1999; Qi and Zakian 2000; Pennock *et al.* 2001; Bianchi *et al.* 2004), which binds single-stranded TG₁₋₃ DNA with high affinity (Lin and Zakian 1996; Nugent *et al.* 1996). This essential role of *Est1* in telomere elongation, however, can be bypassed by expression of a *Cdc13–Est2* fusion protein, which enables telomeres to be stably maintained by telomerase and remain viable in the absence of *Est1* (Evans and Lundblad 1999). Second, *Est1* is proposed to play a role in telomerase activation. This was first suggested by the failure of the *Cdc13–Est2* fusion protein to extensively elongate telomeres in the absence of *Est1* (Evans and Lundblad 1999). Further support for this role has come from the identification of separation-of-function alleles of *EST1* that retain telomerase association but are defective in promoting extensive telomere lengthening (Evans and Lundblad 2002). An *Est1* activation function has also been demonstrated *in vitro*, as addition of purified *Est1* protein stimulates telomerase activity in cell extracts (Dezwaan and Freeman 2009; Talley *et al.* 2011). Furthermore, *Est1* interacts directly with *Est3* and is required for telomere association of *Est3* (Tuzon *et al.* 2011). Although the function of *Est3* is not known, *Est3* is required for *in vivo* telomerase activity (Lendvay *et al.* 1996); therefore, part of *Est1*'s activation function may be to recruit *Est3* to telomeres (Tuzon *et al.* 2011).

The evolutionarily conserved Ku heterodimer also contributes to telomere length maintenance. In contrast to the telomerase subunits, the absence of Ku does not result in an *est* phenotype (Boulton and Jackson 1996; Porter *et al.* 1996). Composed of *Yku70* and *Yku80* subunits in budding yeast, Ku binds DNA ends with high affinity via a preformed DNA-binding channel in a sequence-independent manner (Walker *et al.* 2001). Ku associates with telomeric ends throughout the cell cycle (Fisher *et al.* 2004) and interacts directly with a 48-nucleotide stem loop structure of *TLC1* (Peterson *et al.* 2001). How Ku impacts telomere length has been a major area of investigation.

Budding yeast strains lacking Ku have short but stable telomeres (Boulton and Jackson 1996; Porter *et al.* 1996). Several models have been proposed for this effect. One model proposes that Ku's major contribution to telomere length is to aid in the recruitment of *Est2* to telomeres (Fisher *et al.* 2004; Chan *et al.* 2008). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays have demonstrated that, although *Est2* is telomere-associated throughout the cell cycle, it exhibits two peaks, one in G1 and the other in late S/G2 (Fisher *et al.* 2004). The G1 association of *Est2* is strictly dependent on the interaction between Ku and *TLC1* leading to the hypothesis that a principal role of Ku in telomere length maintenance is the recruitment of *Est2* to telomeres. However, telomerase is not active in G1 (Diede and Gottschling

1999; Marcand *et al.* 2000). Moreover, visualization of *TLC1*'s association with telomeres in G1 demonstrated that its association is transient, in contrast to in late S/G2 cells, when it is stably associated (Gallardo *et al.* 2011), suggesting that the *Est2* association in G1 observed in ChIP assays is not indicative of a stable association of telomerase with telomeres. Together, these findings question the significance of the G1 Ku-dependent telomere association of *Est2*.

Ku also impacts the late S/G2 phase association of *Est2* when telomerase is active. The impact, however, is only partial, as strains deficient in Ku–*TLC1* interaction (*tlc1Δ48* and *yku80-135i* strains) have an ~50% reduction in the late S/G2 telomere association (Fisher *et al.* 2004; Chan *et al.* 2008). *Est1* association is similarly reduced. Therefore, Ku's impact on telomere length may be secondary to the reduction in telomere association of one or both of these telomerase components. Notably, disruption of telomerase recruitment by *Cdc13* via the *cdc13-2* allele also results in a 50% reduction of *Est1* and *Est2* in late S/G2 (Chan *et al.* 2008). In contrast to *tlc1Δ48* and *yku80-135i* strains, however, a *cdc13-2* strain exhibits an *est* phenotype (Lendvay *et al.* 1996), indicating an inherent difference between the Ku and *Cdc13* pathways of telomerase recruitment.

Ku–*TLC1* association is also necessary for nuclear localization of *TLC1* RNA (Gallardo *et al.* 2008). When the ability of Ku to bind telomerase is lost, *TLC1* is no longer retained in the nucleus in G1. Thus, an alternative model proposes that it is the failed retention of *TLC1* in the nucleus that underlies the telomere length defect in *yku80-135i* or *yku80Δ* strains. However, telomeres are maintained via telomerase in these strains; therefore, enough *TLC1* must be in the nucleus as part of the telomerase holoenzyme at least at some point in time.

In addition, Ku must bind to DNA ends to perform its telomeric functions (Lopez *et al.* 2011). A mutant allele of *YKU70* (*yku70-R456E*) that has severely reduced DNA end-binding activity but retains the ability to heterodimerize and associate with *TLC1* was found to be defective for telomere length maintenance (Lopez *et al.* 2011). As Ku is unable to simultaneously bind RNA and DNA (Pfungsten *et al.* 2012), this argues against a model in which Ku is bound to telomerase via interaction with *TLC1* and delivers telomerase to the telomere via binding the chromosome end. Therefore, a complete understanding of how Ku promotes elongation remains unclear.

In this study, we aimed to define the primary role of Ku in telomere length maintenance. To determine whether reduced telomere association of *Est2* is the main reason that telomeres are short when Ku cannot interact with *TLC1*, we tethered *Est2* to telomeres using a *Cdc13–Est2* fusion protein (Evans and Lundblad 1999). Surprisingly, the *Cdc13–Est2* fusion was unable to elongate telomeres as efficiently in the absence of Ku–*TLC1* interaction. Furthermore, we found that expression of the *Cdc13–Est2* fusion also resulted in partial retention of *TLC1* in the nucleus, indicating an impact of Ku on telomere length that is independent not

Table 1 Yeast strains

Strains	Genotype
yAB289	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
yAB621	<i>MATa yku80-135i ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
yAB766	<i>MATa yku80Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
yAB471	<i>MATa cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB718	<i>MATa yku80Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB719	<i>MATa yku80-135i cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB620	<i>MATa yku70-R456E cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB285	<i>MATa yku70-R456E YKU80-G8_{myc18}::TRP1 TEL VII-L::URA3 bar1-Δ::KAN^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 (YT5F79 derivative)</i>
yAB470	<i>MATa yku70Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB472	<i>MATa cdc13Δ::NAT^R tlc1Δ48 ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB725	<i>MATa yku70Δ::HPH^R exo1Δ::KAN^R cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB761	<i>MATa/α yku80Δ::KAN^R/yku80-135i est1Δ::HIS3/EST1 cdc13Δ::NAT^R/CDC13 ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101 trp1-Δ1/trp1-Δ1 his3-Δ200/his3-Δ200 leu2-Δ1/leu2-Δ1</i>
yAB800	<i>MATa EST1-(MYC)₁₃::HIS3 cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB801	<i>MATa EST1-(MYC)₁₃::HIS3 yku80Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
yAB802	<i>MATa EST1-(MYC)₁₃::HIS3 yku80-135i cdc13Δ::NAT^R ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 pVL438</i>
YVL3803	<i>MATa EST1-G6-(MYC)₁₂ (MYC)₁₂-G6-EST2 bar1Δ::NAT^R leu2 trp1 ura3-52 prb prc pep4-3 (Lubin et al. 2012)</i>
YVL3906	<i>MATa EST1-G6-(MYC)₁₂ (MYC)₁₂-G6-EST2 YKU80-(FLAG)₃ ::TRP1 bar1Δ::NAT^R leu2 trp1 ura3-52 prb prc pep4-3 (V. Lundblad)</i>
YVL3493	<i>MATa EST1-G6-(MYC)₁₂ (FLAG)₃-(MYC)₁₂-G6-EST2 leu2 trp1 ura3-52 prb prc pep4-3 (Lubin et al. 2012)</i>

only of *Est2* recruitment but also of *TLC1* localization. In contrast, expression of a *Cdc13–Est1* fusion resulted in progressive telomere elongation in the absence of Ku–*TLC1* interaction or DNA end binding to the same extent as in wild-type (WT) strains. Moreover, we found that Ku associates with both *Est1* and *Est2* in a *TLC1*-dependent manner and that *Est1*-telomere association was affected by Ku–*TLC1* interaction independently of *Est2* recruitment. These results reveal a previously unidentified interaction between *Est1* and Ku that is dependent on Ku's association with *TLC1* and is important for telomere length maintenance.

Materials and Methods

Strains and plasmids

Strains and plasmids used in this work are listed in Table 1 and Table 2, respectively. *S. cerevisiae* strains used are isogenic derivatives of YPH499 except for yVL3803, yVL3906, and yVL3493, which are isogenic derivatives of the protease-deficient strain *MATa leu2⁻ trp1⁻ ura3-52 prb⁻ prc⁻ pep4-3*. Gene deletions were created using one-step allele replacement using the indicated markers.

Genetic methods

For experiments involving a *CDC13-EST2* or *CDC13-EST1* fusion plasmid, indicated strains containing pVL438 (*CDC13 URA3 CEN*) were transformed with pVL1107 or pVL1091, respectively (Evans and Lundblad 1999). Transformants were struck out immediately (1× streakout) on –leu 5-fluoroorotic acid media to select for loss of the *CDC13*-covering plasmid. Strains were subsequently struck out (2×, 3×, etc.) on –leu

media every 2 days. For *est1Δ yku80-135i* epistasis analysis, diploid strain yAB761 was transformed with plasmids pVL1107 and pVL1037 (*YKU80 TRP1 CEN*), sporulated, and dissected to obtain the haploid spores *yku80Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R pVL1037 pVL1107* (WT), *est1Δ::HIS3 yku80Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R pVL1037 pVL1107* (*est1Δ*), *est1Δ::HIS3 yku80-135i cdc13Δ::NAT^R pVL1107* (*est1Δ yku80-135i*), and *yku80Δ::HPH^R cdc13Δ::NAT^R pVL1107* (*yku80Δ*).

Telomere length analysis

Strains were grown in 8 ml of appropriate minimal media at 28° overnight. Genomic DNA was prepared by zirconia/silica bead disruption using a standard phenol extraction. DNA was digested with *XhoI* and separated on a 0.8% agarose gel. Gels were transferred to a Hybond XL membrane (Amersham) using an alkaline transfer and probed with a radiolabeled telomeric DNA fragment excised from plasmid Ap135. Telomere length analysis was performed at least three times for each strain.

Fluorescence in situ hybridization

Yeast fixation and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to detect endogenous *TLC1* RNA was performed as described (Pfungsten et al. 2012).

Image acquisition, deconvolution, and processing

All images were acquired using an Axio Imager 2-Carl Zeiss epifluorescence upright microscope equipped with a 100× DIC H (1.4 N.A.) objective and with a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera. Images were acquired with Zeiss software and processed with Image J. One hundred

Table 2 Plasmids

Plasmid	Description
pVL999	<i>ADH1-EST2</i> 2 μ <i>LEU2</i> (Nugent <i>et al.</i> 1998)
pAB753	<i>ADH1-Est1</i> 2 μ <i>TRP1</i>
pAB830	<i>ADH1-TLC1</i> 2 μ <i>URA3</i>
pVL1107	<i>CDC13-EST2</i> <i>CEN LEU2</i> (Evans and Lundblad 1999)
pVL1091	<i>CDC13-EST1</i> <i>CEN LEU2</i> (Evans and Lundblad 1999)
pVL438	<i>CDC13</i> <i>CEN URA3</i> (Evans and Lundblad 1999)
pAB548	<i>YKU80-3XFLAG</i> <i>CEN LEU2</i>
pAB922	<i>yku80-135i-3XFLAG</i> <i>CEN LEU2</i>
pVL1037	<i>YKU80</i> <i>CEN TRP1</i> (Bertuch and Lundblad 2004)
Ap135	TG ₍₁₋₃₎ probe
pAB126	TyB probe

fields of yeast cells were acquired as *z* stacks of 12 planes minimum, with 0.5 μ m between planes in the *z* axis. Maximal projection of *z* stacks was performed, deconvolved by Image J or Autoquant X3 software using a theoretical point spread function algorithm, and merged with a DAPI signal for quantification of localization. For each yeast strain, a total of 200 unbudded cells were randomly scored in three independent experiments, and numbers are expressed as a percentage of cells with *TLC1* located mainly in the nucleus, cytoplasm, or distributed between both.

Co-immunoprecipitation assays

Fifty milliliter cultures (OD₆₀₀ = 1.0) of yAB718 pAB548, yAB801 pAB548, yAB801 pAB922, yAB801 pVL1037, YVL3803, YVL3906, and YVL3493 were lysed in 400 μ l of TMG (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA)–50 mM NaCl with silica beads. Fifty microliters of α -FLAG M2 agarose beads (Sigma) were added to 4 mg of total protein in 500 μ l TMG-50 + 0.5% Tween-20 and rotated at 4° for 1 hr. For RNase A and DNase I treatments, 20 units of RNase A (Affymetrics) or 10 μ l of DNase I (NEB) plus 2.5 mM MgCl₂ were added to extracts and incubated at 37° for 15 min prior to addition of α -FLAG M2 beads. Beads were washed once with TMG-50 + 0.5% Tween-20, three times with TMG-300 mM NaCl + 0.5% Tween-20, once with TMG-500 mM NaCl + 0.5% Tween-20, and once with TMG-50. A total of 130 μ g of “input” and total immunoprecipitation (“IP”) samples were run on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were probed with α -myc (Sigma) α -flag (Sigma), and α -PGK (Abcam) primary antibodies and IRDye 800CW-conjugated goat α -rabbit or goat α -mouse secondary antibodies (LiCor).

Cell cycle arrest

For cell cycle arrest experiments, 50 ng/ml α -factor, 0.2 M hydroxyurea, or 15 μ g/ml nocodazole were added to 50 ml YPD cultures (OD₆₀₀ = 0.5) and grown for 2.5 hr. Cells were then harvested and used in co-immunoprecipitation experiments.

ChIP assays

One hundred milliliter –*leu* cultures of 2 \times streakouts of yAB800, yAB801, and yAB802 transformed with pVL1107

were grown at 28° to an OD₆₀₀ = 1.0. Cultures were washed once with YPD and transferred to 100 ml YPD and allowed to grow for 15 min before cross-linking. Formaldehyde cross-linking and cell lysis using a multi-tube vortexer were carried out as described previously (Aparicio *et al.* 2005) with minor modifications. Lysates were sonicated using a Misonex Sonicator 3000 (power level 2: 2 min, six cycles). Total protein levels were equilibrated across samples (typically 13 mg of protein per sample). IPs were performed in 800 μ l lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) incubated with 6 μ l of 9E10 (Sigma, 2.1 mg/ml) antibody overnight at 4°. Protein G-plus agarose beads (Calbiochem) were added, and samples were incubated an additional 1.5 hr. IP washes, reversal of cross-links, and DNA precipitation were done according to Aparicio *et al.* (2005). DNA was dot-blotted on a Hybond XL membrane (Amersham) according to the manufacturer’s protocol. IP samples were probed with a randomly labeled telomeric DNA fragment excised from plasmid Ap135 and inputs with a randomly labeled TyB DNA fragment excised from plasmid pAB126. Membranes were then exposed to a phosphorimager screen and quantified using ImageQuant software. To monitor IP efficiency, 100 μ g of input and 40 μ l of IP sample were run on a 7.5% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with α -myc (9E10 Sigma) antibody.

Results

Overexpression of telomerase subunits or tethering *Est2* to telomeres cannot bypass the role of *Ku* or *Ku-TLC1* interaction in telomere elongation

We first sought to determine whether reduced amounts of *Est2* at telomeres played a major role in the telomere shortening observed in the absence of *Ku* or *Ku-TLC1* interaction. To do this, we overexpressed *Est2* and *Est1* subunits in an attempt to drive more telomerase to telomeres. We found that *Est2* overexpression had no impact on telomere length in *yku80-135i* or, as previously reported, in *yku80 Δ* strains (Figure 1A and Supporting Information, Figure S1) (Teo and Jackson 2001). As previously reported, a slight increase in telomere length was observed when *Est1* was overexpressed in WT strains (Virta-Pearlman *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2010), and a similar effect was observed in *yku80-135i* and *yku80 Δ* strains. However, in contrast to WT strains, where simultaneous overexpression of *Est1* and *Est2* resulted in synergistic telomere elongation, *Est1/Est2* co-overexpression had minimal impact on telomere length in the *yku80-135i* mutant or in the absence of *Ku*, as telomeres were no longer than when *Est1* was overexpressed alone (Figure 1A and Figure S1). Since telomere elongation was minimal when *Est2* was overexpressed alone or in combination with *Est1*, these results suggest that reduced amounts of *Est2* at telomeres in the absence of *Ku-TLC1* interaction may not be the main reason that telomeres are short.

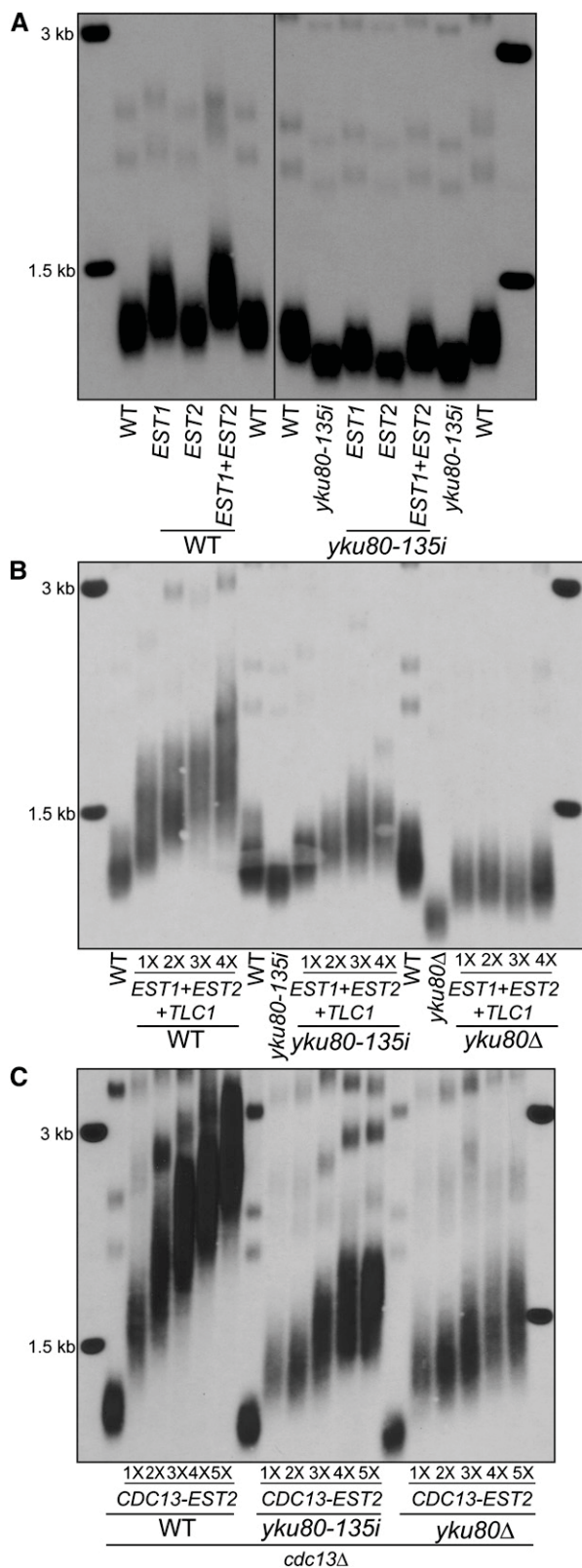


Figure 1 Telomerase overexpression or Cdc13-Est2 expression has differential effects in WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains. (A) Telomere length analysis by Southern blot of *XhoI*-digested DNA isolated from WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains transformed with Est1 and Est2 overexpression plasmids, singly and in combination. (B) Telomere length

The loss of Ku or Ku–TLC1 interaction results in a slight reduction in total TLC1 RNA (Zappulla *et al.* 2011), and TLC1 is detected mainly in the cytoplasm (Gallardo *et al.* 2008). Therefore, it was possible that TLC1 was the limiting factor in telomere elongation when *Est1* and *Est2* were overexpressed. To address this possibility, we also overexpressed TLC1. Examination of telomere length revealed no effect of TLC1 overexpression alone or in combination with *Est1* or *Est2* in WT, *yku80-135i*, or *yku80Δ* strains (Table 3 and Figure S1). However, triple overexpression of TLC1, *Est1*, and *Est2* had a synergistic effect on telomere lengthening in WT and *yku80-135i* strains but not in *yku80Δ* strains (again, the additional effect in the WT strain was indicative that TLC1 was overexpressed) (Figure 1B and Table 3). Telomere length analysis of single-colony serial streakouts resulted in progressive telomere elongation in WT strains, which continued for four successive streakouts (indicated by 1×, 2×, etc.), whereas elongation plateaued in *yku80-135i* strains after three streakouts (Figure 1B; Table 3; Figure S1D). These results indicate that Ku, and specifically Ku–TLC1 interaction, has a role in promoting telomere elongation that cannot be completely bypassed by increasing the amount of telomerase. However, the greater telomere elongation observed in the *yku80-135i* strain, when Ku can bind DNA but not RNA, compared to the Ku null strain suggests that Ku may have a role in promoting telomere elongation independently of its interaction with TLC1.

Although in the previous experiment telomerase subunits were overexpressed, we did not know if that led to increased telomerase associated with telomeres. To directly test whether recruitment of the catalytic subunit, *Est2*, plays a major role in Ku-mediated telomere length maintenance, we made use of a *Cdc13–Est2* fusion protein to tether *Est2* to telomeres (Evans and Lundblad 1999). Expression of the *Cdc13–Est2* fusion results in extensive telomere elongation in WT strains likely due to increased recruitment of *Est2* to telomeres (Evans and Lundblad 1999). Furthermore, *Cdc13* recruitment to telomeres is not dependent on Ku–TLC1 interaction, as the *tlc1Δ48* mutation has no impact on *Cdc13* telomere association and the amount of *Cdc13* at telomeres increases in the absence of Ku, presumably due to the increase in G-tail DNA (Fisher *et al.* 2004). Thus, expression of a *Cdc13–Est2* fusion should lead to efficient recruitment of *Est2* to telomeres in the absence of Ku–TLC1 interaction or Ku. Additionally, *Cdc13* is associated with telomeres throughout the cell cycle in the absence of Ku as opposed to WT and strains lacking Ku–TLC1 interaction where *Cdc13* telomere association is restricted to S phase (Fisher *et al.* 2004). For this reason, expression of a *Cdc13–Est2* fusion would result in recruitment

analysis by Southern blotting of 1×–4× serial single-colony streakouts of WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains simultaneously overexpressing *Est1*, *Est2*, and TLC1. (C) Telomere length analysis of 1×–5× serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*), and *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*) strains expressing a *Cdc13–Est2* fusion.

Table 3 Summary of the effects of telomerase subunit overexpression on telomere length in WT and *yku80* mutant strains

	WT	<i>yku80-135i</i>	<i>yku80Δ</i>
Est1	Slight, stable increase	Slight, stable increase	Slight, stable increase
Est2	Slight, progressive increase	No effect	No effect
TLC1	No effect	No effect	No effect
Est1+Est2	Progressive increase	Slight, stable increase	Slight, stable increase
Est1+TLC1	Slight, stable increase	Slight, stable increase	Slight, stable increase
Est2+TLC1	No effect	No effect	No effect
Est1+Est2 +TLC1	Progressive increase, additive effect of TLC1	Stable increase, additive effect of TLC1	Slight, stable increase, no additive effect of TLC1

of *Est2* to telomeres in G1 in *yku80Δ* strains, allowing us to specifically test the role of *Est2* recruitment to telomeres in G1 in telomere length regulation.

For experiments involving a *Cdc13* fusion protein, *cdc13Δ*, *cdc13Δ yku80-135i*, and *cdc13Δ yku80Δ* strains were constructed to eliminate competition between endogenous *Cdc13* and the fusion. We will refer to these strains subsequently as simply WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ*, respectively, indicating the mutation status of Ku. As previously demonstrated, expression of a *Cdc13–Est2* fusion resulted in extensive, progressive telomere elongation over successive colony streakouts in WT strains (Figure 1C). Interestingly, the effect was greatly attenuated in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains, in which Ku does not interact with *TLC1* or is absent (Figure 1C), with telomeres elongating to a much lesser extent. A similar effect was observed in *tlc1Δ48* and *yku70Δ* strains expressing a *Cdc13–Est2* fusion (Figure S2), confirming that the defect in telomere elongation was due to loss of Ku–*TLC1* interaction or Ku function. Furthermore, the failure of the expression of the *Cdc13–Est2* fusion to extensively elongate telomeres in the *yku80Δ* strain, in particular, argues that Ku-dependent *Est2* recruitment to telomeres in G1 does not contribute significantly to telomere length regulation.

Ku's role in promoting telomere elongation requires both DNA and RNA binding but is independent of end protection

After finding that Ku was unable to promote extensive telomere elongation in the presence of a *Cdc13–Est2* fusion in the absence of *TLC1* binding, we wanted to know if Ku's interaction with *TLC1* in the absence of DNA binding was sufficient to promote telomere elongation. The ability of Ku–*TLC1* interaction to promote telomere elongation in the absence of DNA binding was plausible because Ku cannot bind *TLC1* and DNA ends simultaneously (Pfungsten *et al.* 2012). To test the requirement of DNA binding to promote extensive telomere elongation in the presence of a *Cdc13–Est2* fusion, we made use of a previously characterized DNA-binding-defective allele of *Yku70*, *yku70-R456E* (Lopez *et al.* 2011). The single amino acid substitution in the DNA-binding channel of *Yku70* results in a Ku heterodimer that can no longer efficiently bind DNA ends but still associates with *TLC1* *in vivo* as determined by co-immunoprecipitation

(Lopez *et al.* 2011). However, much like the *yku80-135i* and *yku80Δ* strains, telomeres did not extensively elongate when a *Cdc13–Est2* fusion was expressed in the absence of DNA binding by Ku (Figure 2A, *yku70-R456E* strain). The reduced telomere elongation was unlikely due to *TLC1* mislocalization in the cytoplasm as *TLC1* was mainly nuclear in a *yku70-R456E* strain (Figure 2B). These data suggest that, although Ku does not associate with RNA and DNA simultaneously, its role in telomere length maintenance requires it to retain the ability to bind both *TLC1* and DNA ends.

DNA end binding by Ku is known to inhibit nucleolytic processing by *Exo1*. In the absence of Ku, telomeres are deprotected, resulting in extensive single-stranded telomeric DNA (Maringele and Lydall 2002; Bertuch and Lundblad 2004). Therefore, it was possible that the failure of telomeres to progressively elongate in Ku null strains in the presence of a *Cdc13–Est2* fusion was a secondary effect of loss of end protection. To address this possibility, *EXO1* was deleted in the *yku70Δ* strain to reduce the amount of single-stranded telomeric DNA (Maringele and Lydall 2002; Bertuch and Lundblad 2004). However, expression of a *Cdc13–Est2* fusion in an *yku70Δ exo1Δ* strain did not allow for progressive telomere elongation (Figure 2C), just an initial increase that stabilized, indicating that Ku's role in promoting telomere elongation is independent of its end protection function. These results further demonstrate that the Ku heterodimer has a previously unidentified role in telomere elongation.

Recruitment of Est1 to telomeres via a Cdc13–Est1 fusion is sufficient to bypass the role of Ku in promoting telomere elongation

The above results indicate that the recruitment of *Est2* to telomeres is not the main role of Ku in telomere elongation. As *Est1* recruitment to telomeres in the absence of Ku–*TLC1* interaction or Ku is also reduced (Fisher *et al.* 2004), we next wanted to determine whether expression of a *Cdc13–Est1* fusion could bypass the role of Ku. It was previously demonstrated that, after ~100 generations of growth, telomere lengths in WT and *yku70Δ* strains expressing a *Cdc13–Est1* fusion were similarly elongated (Grandin *et al.* 2000). These analyses, however, were conducted at high temperature to reveal effects conferred by the *cdc13-1* allele also present in the strains, and it is known that telomere and

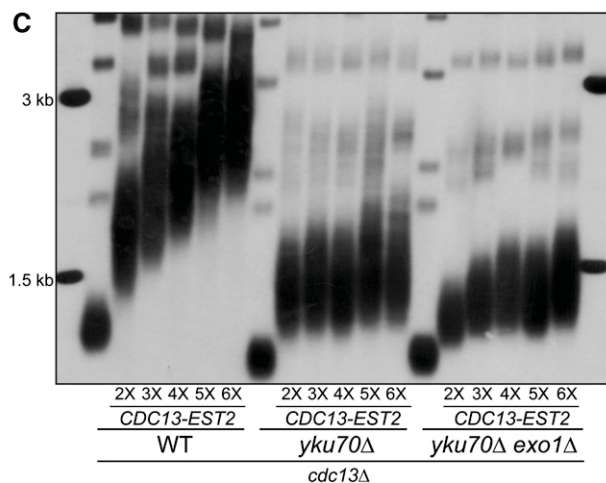
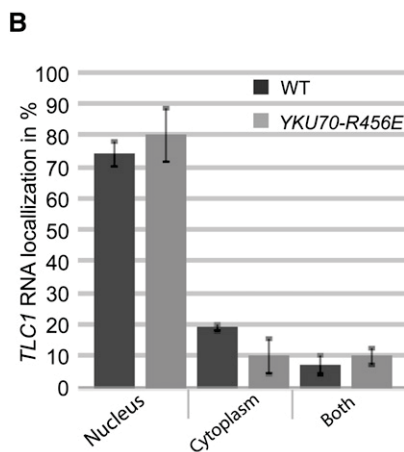
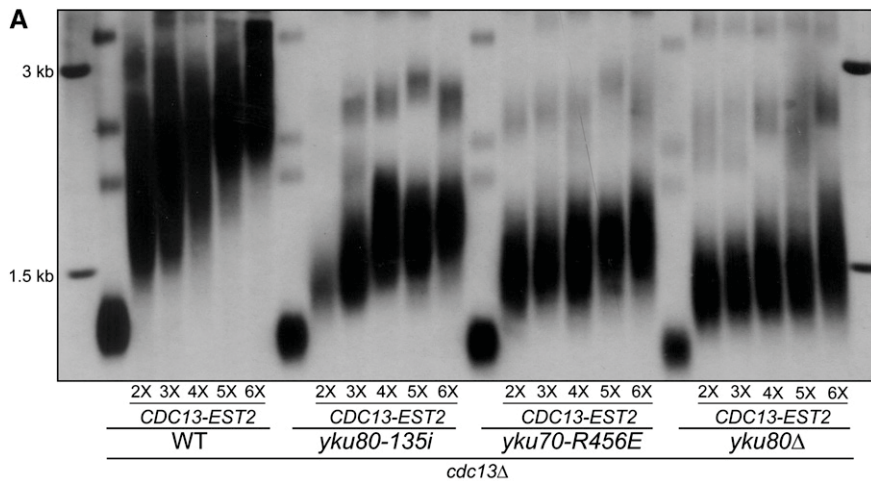


Figure 2 TLC1 nuclear retention in addition to Est2 recruitment cannot bypass the role of Ku. (A) Telomere length analysis of 2×–6× serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku70-R456E* (*yku70-R456E*), and *cdc13Δ yku70Δ* (*yku70Δ*) strains expressing a Cdc13–Est2 fusion. (B) Quantification of TLC1 localization by FISH in a *yku70-R456E* strain. Error bars represent ± 1 SD. Unbudded cells from asynchronous cultures were analyzed. However, TLC1 localization was similar in all cells (data not shown). (C) Telomere length analysis of 2×–6× serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku70Δ* (*yku70Δ*), and *cdc13Δ yku70Δ exo1Δ* (*yku70Δ exo1Δ*) strains expressing a Cdc13–Est2 fusion.

subtelomeric structure is altered in Ku-deficient strains at high temperature (Gravel *et al.* 1998; Fellerhoff *et al.* 2000; Maringele and Lydall 2002) due to an apparently naturally thermolabile telomere-specific activity (Paschini *et al.* 2012). Additionally, the presence of extensive G-tails in the *yku70Δ* strain would have resulted in a marked increase in binding sites of the Cdc13–Est1 fusion. Therefore, we wanted to test whether defects in Ku–TLC1 interaction alone affects the ability of a Cdc13–Est1 fusion to promote progressive telomere elongation. To do this, we examined telomere length in WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains expressing a Cdc13–Est1 fusion over successive colony streakouts. In contrast to what was seen in the presence of a Cdc13–Est2 fusion, expression of a Cdc13–Est1 fusion resulted in progressive telomere elongation to approximately the same extent in all strains (Figure 3A and Figure S2). Because a *yku80-135i* strain does not exhibit extensive G-tails (Stellwagen *et al.* 2003), this indicates that the extensive elongation observed in the *yku80-135i* strain was not a consequence of additional Cdc13-binding sites. These results suggest that Ku influences telomere length mainly via Est1.

The reason telomeres are short in a *yku70-R456E* mutant is not clear. As TLC1 is mainly nuclear in this mutant (Figure 2C) yet telomeres are still short, one possibility is that Ku

bound to TLC1 in the absence of DNA binding sequesters TLC1 from associating with active telomerase. We therefore sought to determine the impact of Ku–TLC1 interaction in the absence of DNA end binding by Ku on the ability of a Cdc13–Est1 fusion to promote telomere elongation. Expression of a Cdc13–Est1 fusion in a *yku70-R456E* strain resulted in efficient and progressive telomere elongation (Figure 3B), refuting the hypothesis that end-binding-deficient Ku sequesters TLC1. These results demonstrate that both Ku’s DNA binding-dependent and RNA binding-dependent roles in telomere elongation can be bypassed by tethering Est1 to telomeres.

Expression of a Cdc13–Est2 or Cdc13–Est1 fusion partially rescues TLC1 nuclear localization in the absence of Ku–TLC1 interaction or Ku

In the context of a fusion, Cdc13–Est1 and Cdc13–Est2 might differentially promote TLC1 nuclear localization in the absence of Ku–TLC1 interaction and, thereby, result in differences in telomere elongation. To examine this possibility, TLC1 localization was determined by FISH in WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains alone or expressing a Cdc13–Est1 or Cdc13–Est2 fusion. As previously reported, TLC1 was mainly cytoplasmic in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains not expressing a fusion protein

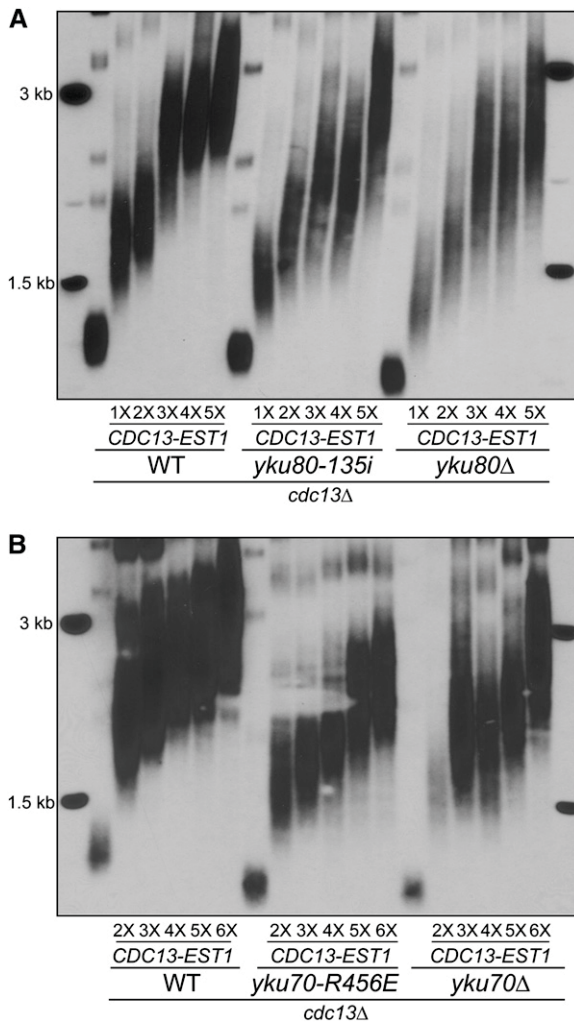


Figure 3 Tethering Est1 to telomeres promotes efficient telomere elongation in Ku mutant strains. (A) Telomere length analysis by Southern blot of *Xho*I-digested DNA isolated from 1×–5× serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*), and *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*) strains expressing a Cdc13–Est1 fusion. (B) Telomere length analysis of 2×–6× serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku70-R456E* (*yku70-R456E*), and *cdc13Δ yku70Δ* (*yku70Δ*) strains expressing a Cdc13–Est1 fusion.

(Figure 4A). Interestingly, both the Cdc13–Est1 and the Cdc13–Est2 fusion restored TLC1 nuclear localization to about the same extent in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains with ~40–60% of cells having mainly nuclear TLC1 (Figure 4A). Expression of a Cdc13–Est1 fusion had a slightly greater effect on TLC1 nuclear retention in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains compared to expression of a Cdc13–Est2 fusion. However, the *yku80-135i/CDC13-EST2* and *yku80Δ/CDC13-EST1* strains had a comparable number of cells with TLC1 mainly in the nucleus (51 and 49.5%, respectively), yet telomere lengths in these strains were vastly different (Figure 4B). Therefore, differences in the ability of the Cdc13–Est1 and Cdc13–Est2 fusion to retain TLC1 in the nucleus could not fully account for differences in their ability to promote telomere elongation in Ku mutant strains. These findings suggest that, although TLC1 nuclear localization is important for telomere length

maintenance, Ku makes additional contributions to telomere elongation.

Ku, Est1, and Est2 are present in a complex, which is dependent on TLC1

The ability of the Cdc13–Est1 fusion to bypass the role of Ku suggests that Ku’s primary contribution to telomere length maintenance is via Est1. In further support of an interaction between Ku and Est1, we found that myc-tagged Est1 co-immunoprecipitated with flag-tagged Yku80 in asynchronous cells (Figure 5A). This interaction was dependent on the ability of Ku to bind TLC1 as the Ku–Est1 interaction was reduced when a *yku80-135i* allele was expressed (Figure 5A). Using a strain harboring identically myc-tagged Est1 and Est2, we found that Est2, in addition to Est1, co-immunoprecipitated with flag-tagged Yku80 (Figure 5, B–D). Consistent with the interaction between Ku and Est1 being dependent upon Ku’s ability to bind TLC1, treatment of lysates with RNase A abolished the co-immunoprecipitation of Est1 and Est2 with Yku80 (Figure 5B). Furthermore, the interaction between Ku and Est1 and Est2 was not mediated by DNA as treatment of lysates with DNase I had no impact on the co-immunoprecipitation efficiency (Figure 5C and Figure S3A). Although no genomic DNA was detected in the lysates used in this experiment, samples were treated under conditions sufficient to degrade 3 μg of a 1.2-kb PCR fragment (Figure S3B). Therefore, any endogenous DNA in the extracts should have been degraded.

Next, to determine if Ku’s interaction with telomerase subunits is cell-cycle-regulated, co-immunoprecipitation experiments were performed in G1-, S-, and G2/M-arrested cells by treatment with α-factor, hydroxyurea, and nocodazole, respectively. Interaction between Ku and Est2 was detected at all three points in the cell cycle (Figure 5D). As expression of Est1 is low in G1, no interaction between Ku and Est1 was detected in α-factor-arrested cells (Figure 5D). However, in both hydroxyurea- and nocodazole-treated cells, when Est1 was equivalently expressed, Est1 co-immunoprecipitated with Ku with similar efficiency (Figure 5D). These findings indicate that Est1 interacts with Ku in a TLC1-dependent manner in S phase and that the interaction persists through G2/M. Given that Est1 and Est2 shared the identical myc epitope tag, we could compare their relative association with Ku in these assays. We found that 3.5 and 1.8 times more Est1 than Est2 was associated with Ku in hydroxyurea- and nocodazole-arrested cells, respectively. Together with the ability of Est2 to interact with Ku in G1 in the absence of Est1, these results suggest that Ku can form separate complexes involving Est1 and Est2. However, compared to the association of Est1 with Est2, the association between Est1 and Ku was much less robust (Figure 5E, *EST1-MYC FLAG-MYC-EST2* vs. *EST1-MYC MYC-EST2 YKU80-FLAG* strain). As equivalent amounts of protein were used in Est2 and Ku immunoprecipitations, only a small portion of Est1 and Est2 are associated with Ku. Therefore, although Ku associates with telomerase subunits throughout the cell

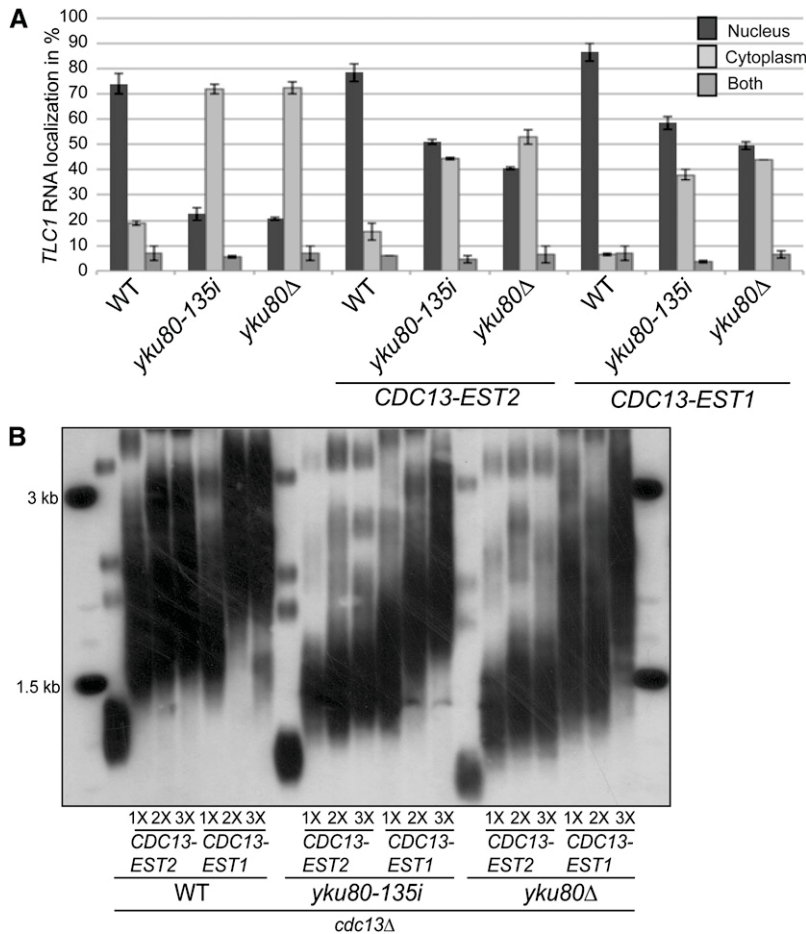


Figure 4 Cdc13-Est2 or Cdc13-Est1 expression partially rescues TLC1 nuclear localization in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains. (A) Quantification of TLC1 localization by FISH in *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*), and *cdc13Δ yku80Δ* strains expressing either a Cdc13-Est2 or Cdc13-Est1 fusion protein. Error bars represent ± 1 SD. Unbudded cells from asynchronous cultures were analyzed. However, TLC1 localization was similar in all cells (data not shown). (B) Telomere length analysis of 1 \times -3 \times serial single-colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*), and *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*) strains expressing a Cdc13-Est2 or Cdc13-Est1 fusion.

cycle, the associations are transient or unable to be sustained under the conditions of these experiments.

Ku-TLC1 interaction promotes efficient Est1 association with telomeres independently of Est2

To explore the role that Ku's interaction with Est1 may play in telomere length maintenance, we examined the impact of Ku on Est1's association with telomeres. It was previously shown that both Est1 and Est2 telomere association is reduced in the absence of Ku-TLC1 interaction (Fisher *et al.* 2004; Chan *et al.* 2008). However, robust association of Est1 and Est2 are mutually dependent, with the absence of one subunit resulting in reduced telomere association of the other (Chan *et al.* 2008). Therefore, it is difficult to determine whether Ku is important for recruitment of one or both of the subunits. As telomere association of Est2 in G1 is completely dependent on Ku (Fisher *et al.* 2004), one hypothesis is that Ku is required for efficient Est2 recruitment and the reduction of Est1 at telomeres is a secondary effect of less Est2 present. The results with the Cdc13 fusion proteins, however, do not support this hypothesis as tethering Est2 to telomeres in the absence of Ku-TLC1 interaction or Ku could not bypass the role of Ku in promoting telomere elongation (Figure 1C). Furthermore, tethering Est1 to telomeres is sufficient for extensive telomere elongation in the absence of Ku-TLC1 interaction or Ku (Fig-

ure 3A), suggesting that a major role of Ku may be to promote Est1 recruitment to telomeres. To determine if Ku influences Est1's telomere association independently of promoting Est2 recruitment, ChIP experiments were performed in WT, *yku80Δ*, and *yku80-135i* strains expressing a Cdc13-Est2 fusion. To facilitate immunoprecipitation, endogenous Est1 was C-terminally tagged with a 13 \times -myc epitope. We found that both *yku80Δ* and *yku80-135i* mutants had reduced telomere association of Est1 compared to WT strains when a Cdc13-Est2 fusion was expressed (Figure 6, A and B). The decrease in Est1 telomere association could not be explained by differences in Est1 protein level or immunoprecipitation efficiency in Ku mutant strains as Est1 protein levels were equivalent in input and IP samples (Figure 6C).

In the absence of a Cdc13 fusion, Est1 and Est2 telomere association is dependent on TLC1 (Chan *et al.* 2008); therefore, it is possible that the reduced amount of Est1 at telomeres in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains expressing a Cdc13-Est2 fusion was due to decreased TLC1 nuclear localization. If the failure of telomeres to elongate was completely due to limiting amounts of nuclear TLC1, similar results would be expected when a Cdc13-Est1 fusion was expressed as less Est2 would be associated with telomeres. However, as telomeres elongated equivalently in WT, *yku80-135i*, and *yku80Δ* strains in the presence of a

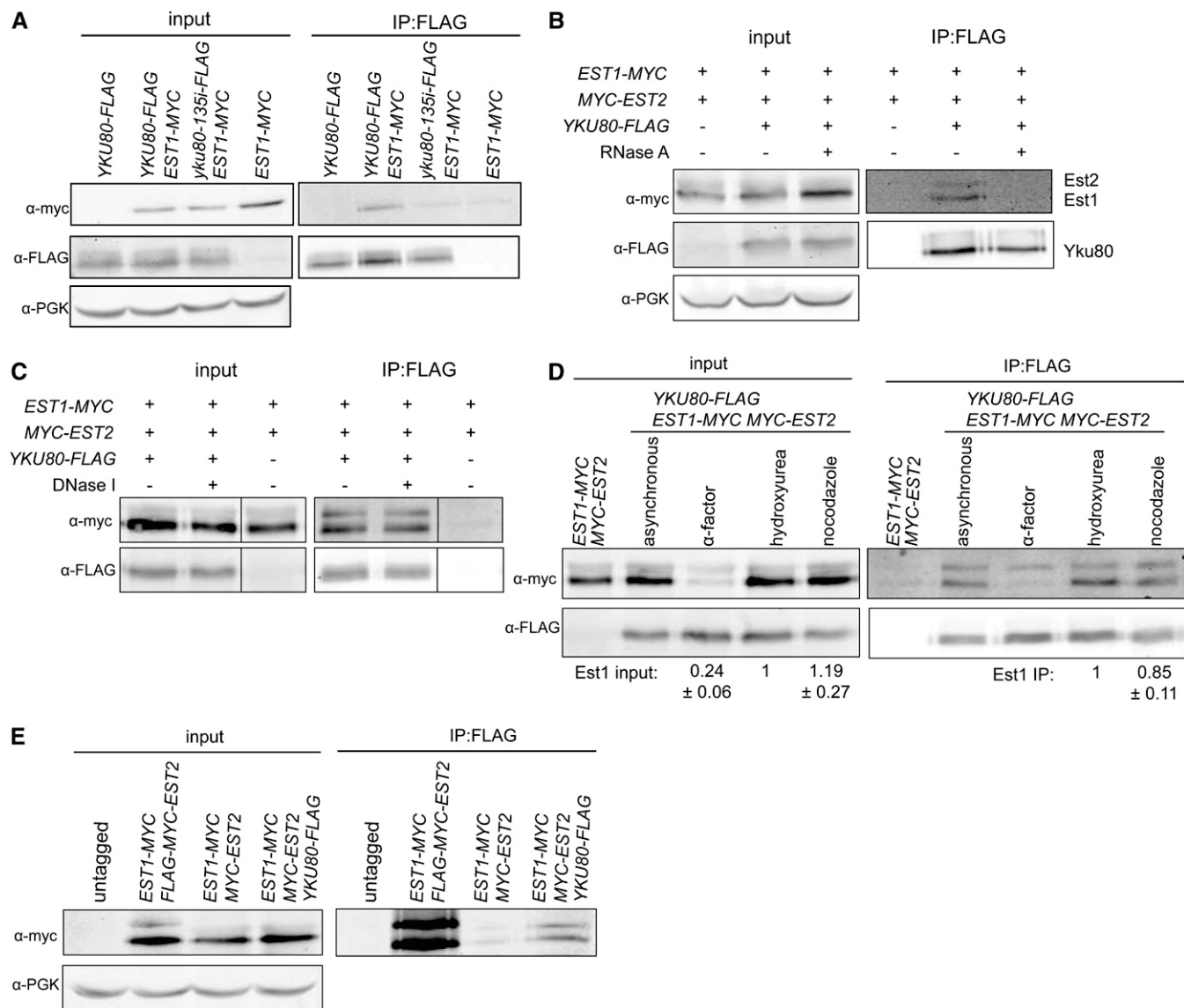


Figure 5 Ku associates with Est1 and Est2 in a TLC1-dependent manner. (A) Co-immunoprecipitation of Est1-myc with Yku80-FLAG and Yku80-135i-FLAG. Anti-FLAG immunoprecipitations were performed with whole-cell extracts of indicated strains. Inputs and IPs were analyzed by Western blotting with α -myc to detect Est1 and with α -FLAG to detect Yku80 or Yku80-135i. Inputs were also probed with α -PGK as a loading control. (B) Co-immunoprecipitation of Est1-myc and myc-Est2 with Yku80-FLAG in RNase A-treated and untreated extracts. Western blots were probed with α -myc to detect Est1 (bottom band) and Est2 (top band). (C) Co-immunoprecipitation of Est1-myc and myc-Est2 with Yku80-FLAG in DNase I-treated and untreated extracts. (D) Co-immunoprecipitation of Est1-myc and myc-Est2 with Yku80-FLAG in asynchronous, α -factor-, hydroxyurea-, and nocodazole-arrested cells. Quantification of relative amount of Est1 in inputs and immunoprecipitates represents the average and standard deviation of four independent experiments. (E) Co-immunoprecipitation of Est1 with Est2 (*EST1-MYC FLAG-MYC-EST2* strain) or Yku80 (*EST1-MYC MYC-EST2 YKU80-FLAG* strain).

Cdc13–Est1 fusion (Figure 3A and Figure S2), this suggests that Est2 was efficiently recruited in all three strains.

Ku has a minor role in telomere length maintenance that is independent of Est1

It has been previously demonstrated that, in an *est1* Δ strain, expression of a Cdc13–Est2 fusion can bypass Est1’s telomerase recruitment function, resulting in approximately WT length telomeres (Evans and Lundblad 1999). Furthermore, the Cdc13–Est2 fusion was unable to promote extensive,

progressive elongation in an *est1* Δ strain, leading to the conclusion that Est1 has a telomerase activation function (Evans and Lundblad 1999). The inability of the Cdc13–Est2 fusion to promote telomere elongation to the same extent as in a WT strain in *yku80-135i* or *yku80* Δ mutants suggests that Ku may also have a role in telomerase activation. Additionally, the ability of the Cdc13–Est1 fusion to promote progressive telomere elongation in the absence of Ku indicates that Ku’s role in telomere length maintenance may be primarily through an Est1-dependent pathway. To test this, we performed epistasis

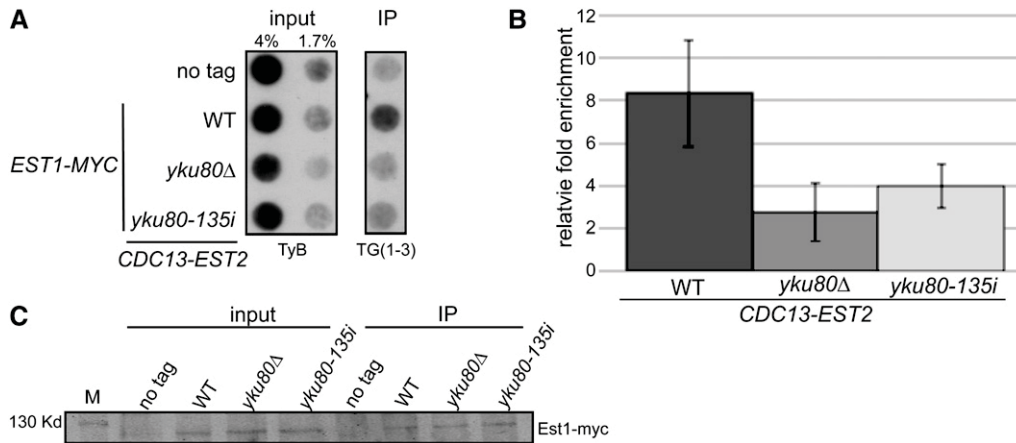


Figure 6 The association of Est1 with telomeres is dependent on Ku–TLC1 interaction even when Est2 is tethered to the telomere. (A) Myc-tagged Est1 was immunoprecipitated from formaldehyde cross-linked *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*), and *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*) strains expressing a Cdc13–Est2 fusion. Isolated DNA was dot-blotted onto a membrane and probed with a radiolabeled TyB (inputs) or telomere-specific T-G₍₁₋₃₎ (IPs) probe. (B) Graphical representation of the average IP/input signal relative to the no-tag control strain based on four independent experiments. Error bars represent ± 1 SD. (C) Western blot showing equivalent amounts of Est1 protein immunoprecipitated from *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*), and *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*) strains expressing a Cdc13–Est2 fusion. A total of 100 μ g of whole-cell extract prior to immunoprecipitation (input) was loaded, demonstrating that Est1 protein level is equal in all three strains.

analysis of *EST1* and the *yku80-135i* mutation in the presence of a Cdc13–Est2 fusion. To enable recovery of all genotypes of interest from a single parental stain, *EST1/est1Δ yku80Δ/yku80-135i CDC13/cdc13Δ* diploid strains harboring both *YKU80* and *CDC13-EST2* plasmids were sporulated and dissected, ensuring similar initial telomere lengths. After dissection of 20 tetrads, however, no *est1Δ yku80Δ* double mutants were recovered even in the presence of a Cdc13–Est2 fusion. This was presumably due to the previously reported synthetic lethality of *est1Δ yku80Δ* mutations (Nugent *et al.* 1998) and increased single-stranded DNA that cannot be rescued by a Cdc13–Est2 fusion (Tong *et al.* 2011). Telomere length analysis of recovered haploid genotypes revealed, as expected, extensive telomere elongation in the WT strain expressing a Cdc13–Est2 fusion whereas telomeres were stably maintained but not elongated in the absence of Est1 (Figure 7). Interestingly, combining *est1Δ* and *yku80-135i* mutations had a slightly additive negative effect, with telomeres shorter in the *est1Δ yku80-135i* strain than in the *est1Δ* strain in the presence of a Cdc13–Est2 fusion (Figure 7). Although tethering Est1 to telomeres is sufficient to bypass the role of Ku in promoting telomere elongation, the *est1Δ yku80-135i* epistasis results demonstrate a specific contribution of Ku–TLC1 interaction that is independent of Est1. However, deletion of Est1 has a much greater impact on telomere lengthening in the presence of a Cdc13–Est2 fusion than deletion of *YKU80* (Figure 7, *est1Δ* strain compared to *yku80Δ* strain), suggesting that any contribution that Ku may have in telomerase activation is minor compared to that of Est1.

Discussion

The role of Ku at telomeres is complex, making Ku's contribution specifically to telomere length maintenance difficult to examine. Prior to this study, the two predominant hypotheses

for the major contribution of Ku to telomere length were to promote the recruitment of Est2, and therefore telomerase, to telomeres and to enforce the nuclear localization of TLC1. Although both of these functions are important, our results demonstrate that neither tethering Est2 to telomeres nor promoting TLC1 nuclear accumulation is sufficient to bypass the role of Ku in telomere elongation. Instead, we have uncovered an interaction between Est1 and Ku that appears to be the main determinant of Ku's impact on telomere elongation.

Previous work supports a genetic interaction between Ku and Est1. A study by Evans and Lundblad (2002) discovered a class of Est1 mutants (*est1-50* and *est1-51*) that they proposed functioned in the same pathways as Ku. This was in part due to the lack of synthetic lethality when combined with a *yku70* deletion. These mutants had short telomeres but did not senesce and, although telomeres elongated in the presence of a Cdc13–Est2 fusion, they did not to the same extent as in a WT strain (Evans and Lundblad 2002). The phenotype of the *est1-50* and *est1-51* mutants is reminiscent of a *yku80-135i* strain and supports a role of Ku in telomere length maintenance that involves Est1. In further support of an interaction between Ku and Est1, tethering of chromosomes to the nuclear periphery by Ku is dependent on TLC1 interaction and Est1 (Schober *et al.* 2009). However, disruption of tethering had no effect on telomere length, which argues against tethering as a mechanism of telomere length maintenance by Ku.

Our data support a model in which Ku's main contribution to telomere length maintenance is to promote the stable association of Est1 with the telomere, where Est1 performs both its telomerase activation and its recruitment functions. Although Ku has other functions at the telomere, the defect in telomere elongation can be completely bypassed by tethering Est1, but not Est2, to telomeres. The different effects of these fusions are consistent with this model, with the

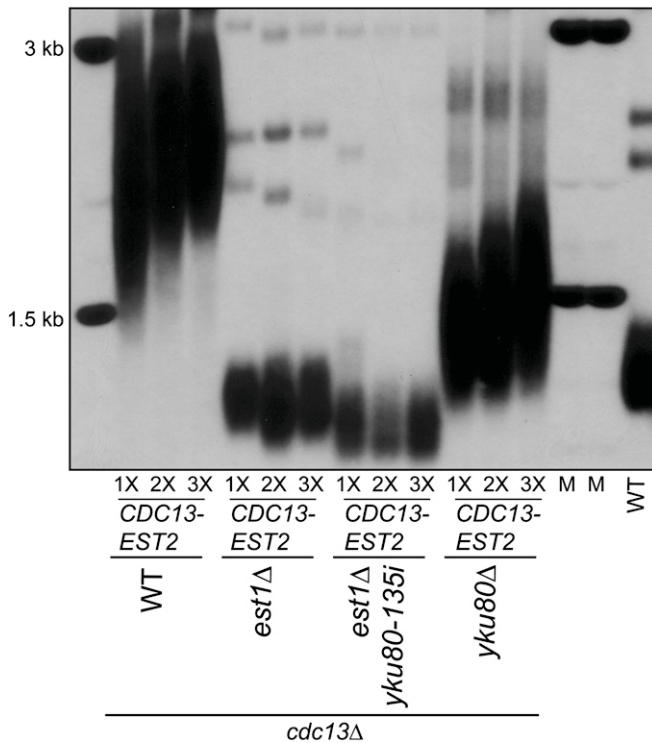


Figure 7 Ku has a minor role in telomere length maintenance that is independent of Est1. Telomere length analysis by Southern blot of 1×–3× serial single-colony streakouts of haploid strains *cdc13*Δ (WT), *cdc13*Δ *est1*Δ (*est1*Δ), *cdc13*Δ *est1*Δ *yku80-135i* (*est1*Δ *yku80-135i*), and *cdc13*Δ *yku80*Δ (*yku80*Δ) strains expressing a Cdc13–Est2 fusion dissected from a *EST1/est1*Δ *yku80*Δ/*yku80-135i* *CDC13/cdc13*Δ diploid strain harboring both *YKU80* and *CDC13-EST2* plasmids.

caveat that the promotion of telomere elongation in the context of the fusions may be fundamentally different from what occurs under physiologic conditions.

As *Est1* recruitment to telomeres was not significantly different between *yku80-135i* and *yku80*Δ strains in the presence of a Cdc13–Est2 fusion (Figure 6B), Ku–TLC1 interaction is necessary for efficient or stable *Est1* recruitment. We observed a physical association between *Est1* and Ku by co-immunoprecipitation that is dependent on Ku's ability to bind TLC1 (Figure 5, A and B), demonstrating the presence of a complex containing *Est1*, TLC1, and Ku. We also detected an RNA-dependent association of Ku with *Est2* (Figure 5B). From these experiments we are unable to determine if Ku, *Est1*, and *Est2* are part of a single complex. However, we found that *Est2* associated with Ku in G1 in the absence of *Est1* (Figure 5D). In other phases of the cell cycle, immunoprecipitation of *Yku80* resulted in more *Est1* than *Est2* co-immunoprecipitated. These results suggest that Ku can form independent complexes containing *Est1* and *Est2*.

The influence of the Ku–*Est1* interaction on telomere length maintenance and the mechanism by which Ku impacts *Est1*'s association with telomeres remain to be elucidated. The small fraction of *Est1* that co-immunoprecipitates with Ku may indicate that the interaction is transient. One

possibility is that Ku binding to TLC1 promotes a conformational change or otherwise facilitates *Est1* binding to TLC1. As association of *Est1* with telomeres is dependent on TLC1 and *Est2* (Chan *et al.* 2008), an influence of Ku on telomerase holoenzyme formation could promote *Est1*'s recruitment to telomeres. Additionally, it has previously been proposed that the higher affinity of Ku for DNA than RNA may result in the release of TLC1 from Ku, thereby allowing telomerase recruitment by *Cdc13* and telomere elongation (Pfungsten *et al.* 2012). Therefore, Ku may promote interaction between *Cdc13* and *Est1*, leading to stable association of *Est1* with the telomere. However, the binding of Ku to the telomeric end must occur prior to *Cdc13* binding, as *in vitro* studies have shown that Ku cannot bind to an end prebound by *Cdc13* (Wu *et al.* 2009). This suggests that *Cdc13* would not yet be present at the telomere to receive telomerase handed off by Ku. Thus, the timing of these interactions is critical and remains unclear.

Similar to our findings with Ku, replication protein A (RPA) has been shown to be required for telomeric binding of *Est1* *in vivo* (Schramke *et al.* 2004). RPA, which associates with telomeres and acts in the telomerase pathway (Schramke *et al.* 2004), also interacts with Ku, *Cdc13*, *Est2*, and TLC1 *in vivo* and weakly binds *Est1* *in vitro* (Wu and Zakian 2011; Luciano *et al.* 2012). Its interaction with Ku occurs independently of RNA, whereas its association with TLC1 is dependent on both Ku and *Est1* (Luciano *et al.* 2012). These results have led to a model whereby the two telomerase recruitment pathways contribute to RPA's interaction with telomerase at telomeres, which then facilitates telomere elongation. While these results raise the possibility that RPA may be the protein that receives telomerase handed off by Ku, the same concerns regarding the timing of RPA vs. Ku association with telomeric DNA theoretically pertain.

Furthermore, the cell-cycle-regulated recruitment of *Est3* to telomeres is dependent upon *Est1* and has been proposed to be part of *Est1*'s telomerase activation function (Tuzon *et al.* 2011). This raises the possibility that reduced telomere elongation in Ku mutant strains is partly due to less *Est3* recruitment. However, we found reduced *Est1* associated with telomeres in Ku mutant strains expressing a Cdc13–*Est2* fusion (Figure 6). Efficient *Est1* association with telomeres is not dependent on *Est3* (Tuzon *et al.* 2011). Therefore, an impact of Ku on *Est3* recruitment would most likely be an indirect effect of less *Est1* at telomeres.

Additionally, we found that the *yku70-R456E* mutant strain, which has markedly reduced association of Ku at telomeres (Lopez *et al.* 2011), maintained WT levels of TLC1 nuclear localization (Figure 2B). This result is consistent with the finding that Ku's association with TLC1 and DNA ends is mutually exclusive (Pfungsten *et al.* 2012) and, importantly, establishes that Ku docks TLC1 in the nucleus via a mechanism independent of its association with DNA ends. However, Ku's interaction with TLC1 alone is not sufficient for telomere length maintenance as telomeres are

short in the *yku70-R456E* mutant (Lopez *et al.* 2011) and do not extensively elongate when a *Cdc13–Est2* fusion is expressed (Figure 2A). In this case, *Est2* recruitment and *TLC1* nuclear localization are achieved but telomere elongation is still reduced in the absence of telomere-bound Ku. Furthermore, expression of a *Cdc13–Est2* fusion in a *yku80-135i* strain partially rescued nuclear localization of *TLC1* (Figure 4A). In this strain, Ku is at the telomere, *Est2* is recruited to telomeres via the *Cdc13–Est2* fusion, and *TLC1* is in the nucleus yet the telomere elongation defect is not overcome. Taken together, these data suggest that the Ku heterodimer must have the ability to bind both DNA and RNA for proper telomere maintenance. As DNA and RNA binding is mutually exclusive (Pfingsten *et al.* 2012), it precludes the possibility that Ku binds to the telomere and tethers telomerase via an interaction with *TLC1*. Therefore, the mechanism by which Ku's interaction with *TLC1* and DNA ends influences telomere length is unclear. One possibility is that separate pools of Ku exist—one that is bound to the DNA and another that associates with *TLC1*—and both must be present for proper telomere elongation. This is probable given that the amount of Ku molecules per cell greatly exceeds the amount of *TLC1*. Alternatively, one Ku heterodimer may need to interact with both RNA and DNA but these interactions occur at different times in the cell cycle.

Acknowledgments

We thank Victoria Lundblad (Salk Institute for Biological Sciences) for the generous gift of plasmids and yeast strains; members of the Bertuch lab; Dorothy Shippen (Texas A&M University), Grzegorz Ira, Richard Kelly, and John Wilson (Baylor College of Medicine) for helpful discussions; and Kyle Renfrew (Texas A&M University) for critical reading of the manuscript. The project was supported by the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences grants T32GM008307 (to J.M.W.) and GM077509 (to A.A.B.). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of General Medical Sciences or the National Institutes of Health. In addition, we are grateful for the support from The Cullen Foundation (to J.W.). This work was funded in part by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-89768 (to P.C.).

Literature Cited

- Aparicio, O. M., J. V. Geisberg, E. Sekinger, A. Yang, Z. Moqtaderi *et al.*, 2005 Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic regions *in vivo*, pp. 21.23.21–21.23.17 in *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman *et al.* John Wiley & Sons, New York.
- Bertuch, A. A., and V. Lundblad, 2004 *EXO1* contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166: 1651–1659.
- Bianchi, A., S. Negrini, and D. Shore, 2004 Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol. Cell* 16: 139–146.
- Boulton, S. J., and S. P. Jackson, 1996 Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homolog: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 24: 4639–4648.
- Chan, A., J. B. Boule, and V. A. Zakian, 2008 Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet.* 4: e1000236.
- Cohn, M., and E. H. Blackburn, 1995 Telomerase in yeast. *Science* 269: 396–400.
- Dezwaan, D. C., and B. C. Freeman, 2009 The conserved Est1 protein stimulates telomerase DNA extension activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 17337–17342.
- Diede, S. J., and D. E. Gottschling, 1999 Telomerase-mediated telomere addition *in vivo* requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* 99: 723–733.
- Evans, S. K., and V. Lundblad, 1999 Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286: 117–120.
- Evans, S. K., and V. Lundblad, 2002 The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* 162: 1101–1115.
- Fellerhoff, B., F. Eckardt-Schupp, and A. A. Friedl, 2000 Subtelomeric repeat amplification is associated with growth at elevated temperature in *yku70* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154: 1039–1051.
- Fisher, T. S., A. K. Taggart, and V. A. Zakian, 2004 Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1198–1205.
- Gallardo, F., C. Olivier, A. T. Dandjinou, R. J. Wellinger, and P. Chartrand, 2008 *TLC1* RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J.* 27: 748–757.
- Gallardo, F., N. Laterreur, E. Cusanelli, F. Ouenzar, E. Querido *et al.*, 2011 Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol. Cell* 44: 819–827.
- Grandin, N., C. Damon, and M. Charbonneau, 2000 Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8397–8408.
- Gravel, S., M. Larrivee, P. Labrecque, and R. J. Wellinger, 1998 Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280: 741–745.
- Hughes, T. R., S. K. Evans, R. G. Weilbaecher, and V. Lundblad, 2000 The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr. Biol.* 10: 809–812.
- Lendvay, T. S., D. K. Morris, J. Sah, B. Balasubramanian, and V. Lundblad, 1996 Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 144: 1399–1412.
- Lin, J. J., and V. A. Zakian, 1995 An *in vitro* assay for *Saccharomyces cerevisiae* telomerase requires *EST1*. *Cell* 81: 1127–1135.
- Lin, J. J., and V. A. Zakian, 1996 The *Saccharomyces cerevisiae* CDC13 protein is a single-strand TG₁₋₃ telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13760–13765.
- Lingner, J., T. R. Cech, T. R. Hughes, and V. Lundblad, 1997a Three Ever Shorter Telomere (*EST*) genes are dispensable for *in vitro* yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11190–11195.
- Lingner, J., T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad *et al.*, 1997b Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276: 561–567.
- Lopez, C. R., A. Ribes-Zamora, S. M. Indiviglio, C. L. Williams, S. Haricharan *et al.*, 2011 Ku must load directly onto the chromosome end in order to mediate its telomeric functions. *PLoS Genet.* 7: e1002233.

- Lubin, J. W., T. M. Tucey, and V. Lundblad, 2012 The interaction between the yeast RNA and the Est1 protein requires three structural elements. *RNA* 18: 1597–1604.
- Luciano, P., S. Coulon, V. Faure, Y. Corda, J. Bos *et al.*, 2012 RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. *EMBO J.* 31: 2034–2046.
- Lundblad, V., and J. W. Szostak, 1989 A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57: 633–643.
- Marcand, S., V. Brevet, C. Mann, and E. Gilson, 2000 Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr. Biol.* 10: 487–490.
- Maringele, L., and D. Lydall, 2002 ExoI-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast *yku70Δ* mutants. *Genes Dev.* 16: 1919–1933.
- Nugent, C. I., T. R. Hughes, N. F. Lue, and V. Lundblad, 1996 Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274: 249–252.
- Nugent, C. I., G. Bosco, L. O. Ross, S. K. Evans, A. P. Salinger *et al.*, 1998 Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 8: 657–660.
- Paschini, M., T. B. Toro, J. W. Lubin, B. Braunstein-Ballew, D. K. Morris *et al.*, 2012 A naturally thermolabile activity compromises genetic analysis of telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191: 79–93.
- Pennock, E., K. Buckley, and V. Lundblad, 2001 Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104: 387–396.
- Peterson, S. E., A. E. Stellwagen, S. J. Diede, M. S. Singer, Z. W. Haimberger *et al.*, 2001 The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat. Genet.* 27: 64–67.
- Pfingsten, J. S., K. J. Goodrich, C. Taabazuing, F. Ouenzar, P. Chartrand *et al.*, 2012 Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* 148: 922–932.
- Porter, S. E., P. W. Greenwell, K. B. Ritchie, and T. D. Petes, 1996 The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homolog) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24: 582–585.
- Qi, H., and V. A. Zakian, 2000 The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated Est1 protein. *Genes Dev.* 14: 1777–1788.
- Schober, H., H. Ferreira, V. Kalck, L. R. Gehlen, and S. M. Gasser, 2009 Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev.* 23: 928–938.
- Schramke, V., P. Luciano, V. Brevet, S. Guillot, Y. Corda *et al.*, 2004 RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat. Genet.* 36: 46–54.
- Singer, M. S., and D. E. Gottschling, 1994 TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266: 404–409.
- Stellwagen, A. E., Z. W. Haimberger, J. R. Veatch, and D. E. Gottschling, 2003 Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 17: 2384–2395.
- Talley, J. M., D. C. Dezwaan, L. D. Maness, B. C. Freeman, and K. L. Friedman, 2011 Stimulation of yeast telomerase activity by the ever shorter telomere 3 (Est3) subunit is dependent on direct interaction with the catalytic protein Est2. *J. Biol. Chem.* 286: 26431–26439.
- Teo, S. H., and S. P. Jackson, 2001 Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast *yku80* mutant. *EMBO Rep.* 2: 197–202.
- Tong, X. J., Q. J. Li, Y. M. Duan, N. N. Liu, M. L. Zhang *et al.*, 2011 Est1 protects telomeres and inhibits subtelomeric γ' -element recombination. *Mol. Cell. Biol.* 31: 1263–1274.
- Tuzon, C. T., Y. Wu, A. Chan, and V. A. Zakian, 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.
- Virta-Pearlman, V., D. K. Morris, and V. Lundblad, 1996 Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev.* 10: 3094–3104.
- Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg, 2001 Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607–614.
- Wellinger, R. J., and V. A. Zakian, 2012 Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* 191: 1073–1105.
- Wu, T. J., Y. H. Chiang, Y. C. Lin, C. R. Tsai, T. Y. Yu *et al.*, 2009 Sequential loading of *Saccharomyces cerevisiae* Ku and Cdc13p to telomeres. *J. Biol. Chem.* 284: 12801–12808.
- Wu, Y., and V. A. Zakian, 2011 The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 20362–20369.
- Zappulla, D. C., K. J. Goodrich, J. R. Arthur, L. A. Gurski, E. M. Denham *et al.*, 2011 Ku can contribute to telomere lengthening in yeast at multiple positions in the telomerase RNP. *RNA* 17: 298–311.
- Zhang, M. L., X. J. Tong, X. H. Fu, B. O. Zhou, J. Wang *et al.*, 2010 Yeast telomerase subunit Est1p has guanine quadruplex-promoting activity that is required for telomere elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 202–209.

Communicating editor: O. Cohen-Fix

GENETICS

Supporting Information

<http://www.genetics.org/lookup/suppl/doi:10.1534/genetics.114.164707/-/DC1>

The Principal Role of Ku in Telomere Length Maintenance Is Promotion of Est1 Association with Telomeres

Jaime M. Williams, Faissal Ouenzar, Laramie D. Lemon, Pascal Chartrand, and Alison A. Bertuch

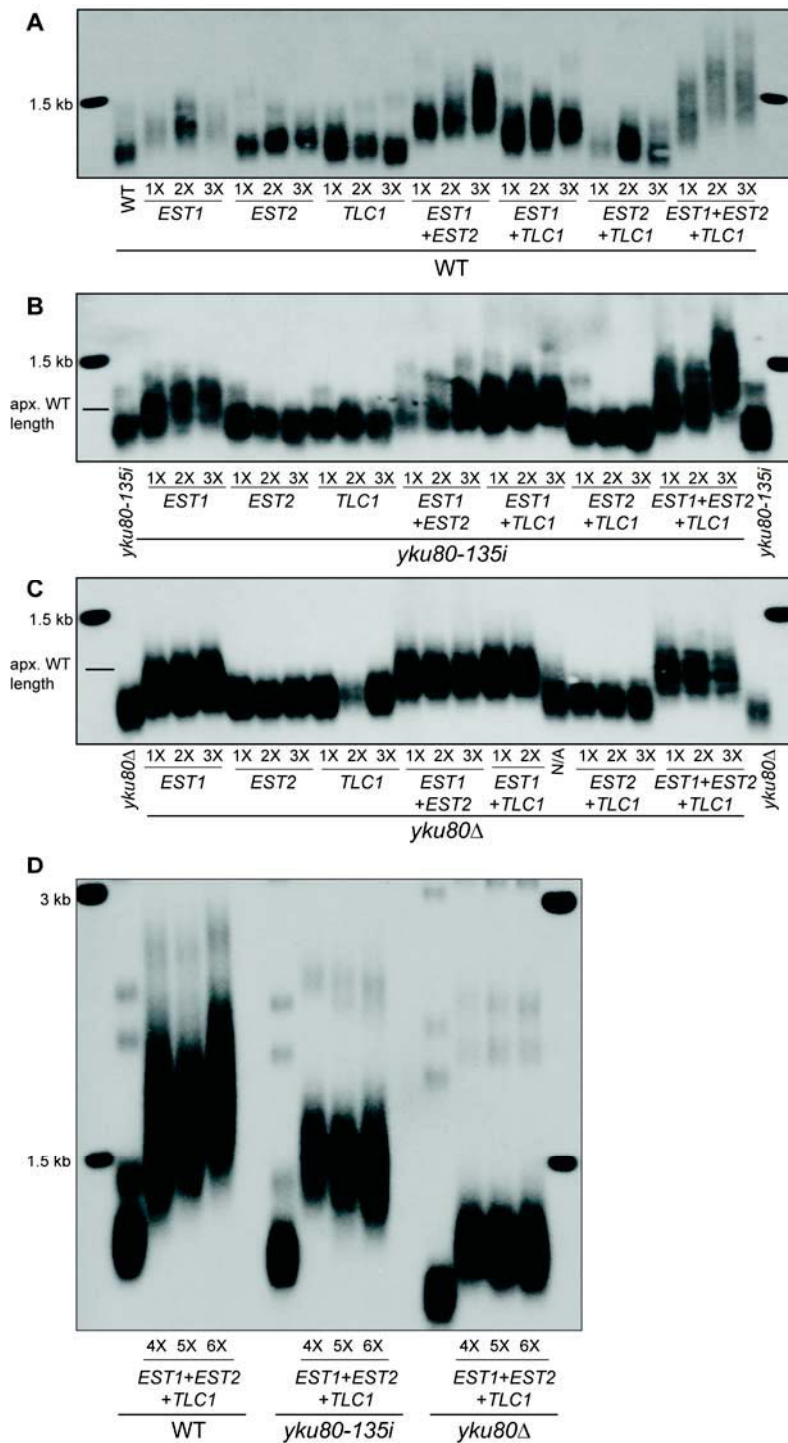


Figure S1 Overexpression of telomerase subunits has differential effects in WT, *yku80-135i* and *yku80Δ* strains. Telomere length analysis by Southern blot of XhoI digested DNA isolated from 1X-3X serial single colony streakouts of (A) WT, (B) *yku80-135i* and (C) *yku80Δ* strains transformed with *EST1*, *EST2* and *TLC1* overexpression plasmids singly and in combination. Approximate WT length depicted in B and C were based on migration in A as all gels were run under the same conditions. (D) Telomere length analysis of 4X-6X streakout of WT, *yku80-135i* and *yku80Δ* strains simultaneously overexpressing Est1, Est2 and TLC1.

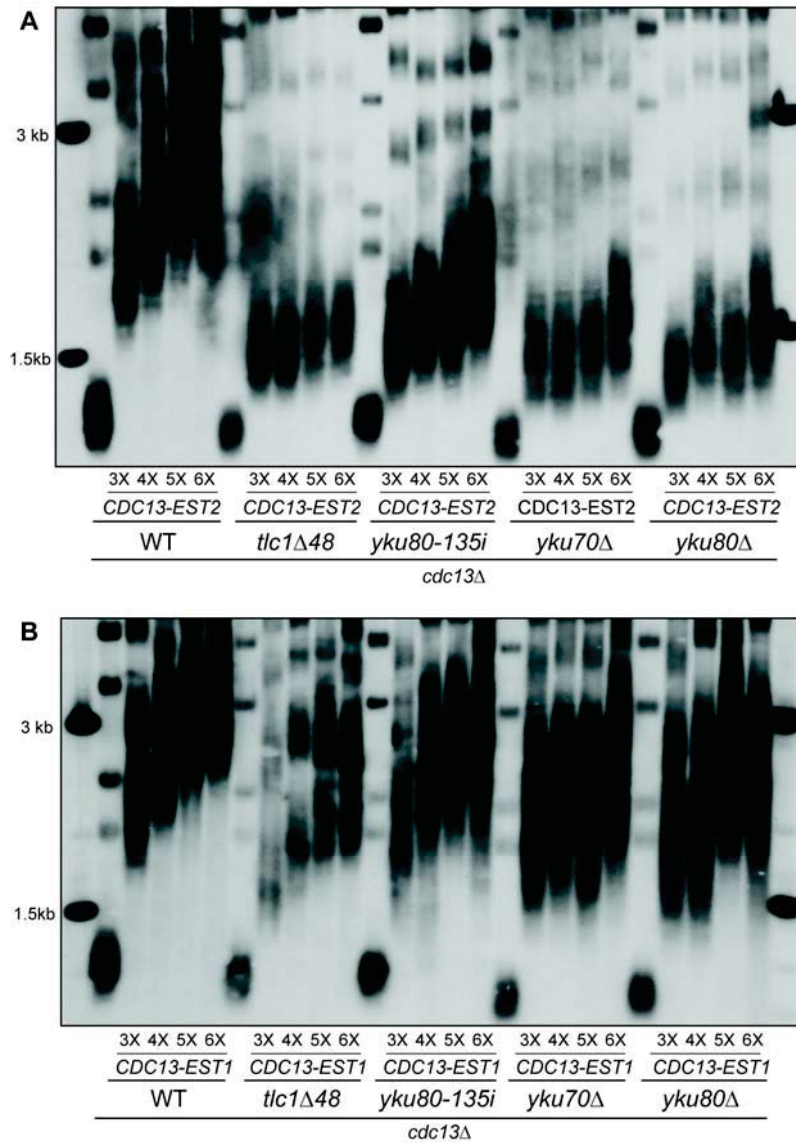


Figure S2 Effects of expression of a Cdc13-Est2 or Cdc13-Est1 fusion in *tlc1Δ48* or *yku70Δ* are similar to those observed in *yku80-135i* and *yku80Δ* strains, respectively. Telomere length analysis by Southern blot of XhoI digested DNA isolated from 3X-6X serial single colony streakouts of *cdc13Δ* (WT), *cdc13Δ tlc1Δ48* (*tlcΔ48*), *cdc13Δ yku80-135i* (*yku80-135i*), *cdc13Δ yku70Δ* (*yku70Δ*), and *cdc13Δ yku80Δ* (*yku80Δ*) strains expressing a (A) Cdc13-Est2 or (B) Cdc13-Est1 fusion.

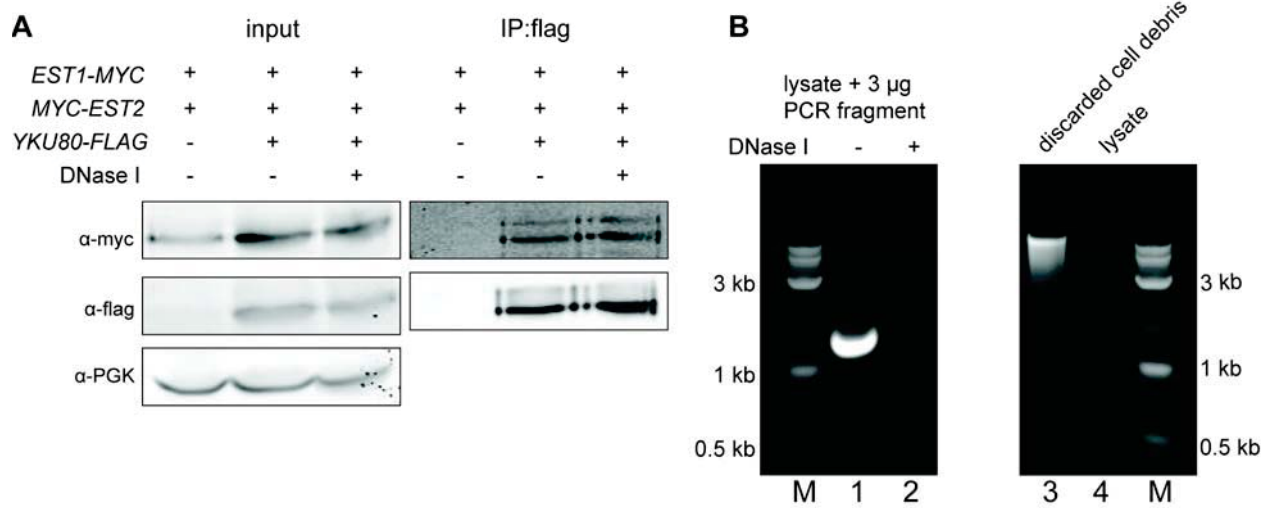


Figure S3 Treatment of lysates with DNase I does not affect the association of Est1 and Ku. (A) Independent co-immunoprecipitation experiment of Est1 and Est2 with Ku in the presence of DNase I confirming the results in Figure 5C. (B) A 1.2 kb PCR fragment was added to lysates and treated with DNase I under the same conditions as Figure 5C and S3A. DNA isolation and analysis by ethidium bromide stained agarose gel demonstrates conditions were sufficient to degrade 3 µg of DNA (lanes 1 and 2). The protein preparation used in these experiments resulted in no detectable genomic DNA shown in the lane marked 'lysate' (lane 4). Instead genomic DNA was present in the cell debris that was discarded during preparation of lysates (lane 3).