Le rôle de l'oncoprotéine INT6 dans la maintenance des télomères

Maname Benyelles

▶ **To cite this version:**

Maname Benyelles. Le rôle de l'oncoprotéine INT6 dans la maintenance des télomères. Biologie moléculaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. ⟨NNT : 2015ENSL0978⟩. ⟨tel-01266049⟩

HAL Id: tel-01266049

https://theses.hal.science/tel-01266049v1

Submitted on 2 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

ENS DE LYON

Université Claude Bernard Lyon 1

THESE

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lyon- Ecole Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Science de la vie

Ecole doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Janvier 2015

Par

Maname Benyelles

Le rôle de l'oncoprotéine INT6 dans la maintenance des télomères

Directeur de thèse :
Docteur Pierre Jalinot

JURY : Dr. Maria Teresa Teixeira (Rapporteur)
Dr. Marie-Josèphe Giraud-Panis (Rapporteur)
Dr. Mary Callanan (Examinatrice)
Dr. Evelyne Manet (Présidente)
Dr. Pierre Jalinot (Directeur de thèse)

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les docteurs Marie-Josephe Gireaud-Panis, Teresa Teixeira, Evelyne Manet et Mary Callanan, de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je témoigne toute ma gratitude au ministère de l'enseignement supérieure Algérien de m'avoir octroyé la bourse d'étude qui m'a permis d'effectuer cette thèse.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse, Pierre Jalinot, pour m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir accordé une certaine liberté tout en me guidant dans mon projet. Et surtout je tiens à le remercier de m'avoir permis d'écrire mon article, un détail très important à mes yeux et pendant le quel j'ai pris beaucoup de plaisir.

Une autre personne dont je dois beaucoup, sans qui je pense, ma thèse n'aurai pas évolué dans les bonnes conditions ni dans ces délais, Vincent ; je tiens sincèrement à te remercier de m'avoir guidée à prendre mes marques dans le monde de la recherche, de m'avoir fait profiter sans limite de tes connaissances et d'avoir surtout supporté mes humeurs et mes doutes. Merci pour les nombreuses discussions fructueuses qu'on a eu, même si parfois on ne tombait pas d'accord, cela ne nous empêchait pas pour autant de travailler ensemble. Enfin, merci de m'avoir toujours conseillée à chaque étape de ma thèse.

En plus de la sympathie de Vincent, le reste de l'équipe a été adorable avec moi : JP, tu as été (et j'espère le restera) plus un ami qu'un collègue, tu as su m'écouter et me redonner confiance quand je me remettais en doute (et dieu sait que c'était maintes fois), me recadrer quand je n'étais pas lucide et de toujours voir le bon côté de ma thèse. Et oui ! Le bon côté des choses, c'est moi qui te le conseillais. Comme dans toute amitié, les coups de gueule existent mais je préfère en rire maintenant, il faut dire que je te charriais beaucoup aussi. Une autre personne que j'estime énormément : Armelle. Ta générosité est ce qui m'a le plus marquée : toujours à partager ton repas, ta bonne humeur et surtout ton temps afin de sécher mes larmes. Tu m'as fait profiter de ton expérience personnelle afin que j'aille de l'avant et que je n'oublie pas de vivre ma vie : Merci !
Je remercie aussi Christelle avec qui j'ai peut-être le moins interagit mais j'ai su profiter de chaque instant où on a partagé des discussions très enrichissantes. Merci pour tes conseils, ton aide et ta sympathie. Samuel, tu n'es arrivé qu'en milieu de cette année mais ça m'a suffi de voir que tu es quelqu'un de gentil, serviable et avec qui on rigole bien.
Merci à Franck, Madeleine, Gilbert et Eléonore pour vos conseils en réunion et votre sympathie. Merci aussi à Louis, grâce à vous j'ai retrouvé un petit bout d'Algérie dans le labo, voir le pays à travers votre regard, votre vécu est une richesse personnelle et j'espère avoir l'occasion d'en découvrir plus à l'occasion d'un voyage dans ces terres, en votre compagnie.
Merci aux anciennes de l'équipe : Julia, Khan, Gosia et Amélie grâce à qui je me suis vite acclimaté au labo et surtout avec qui j'ai partagé un bout de ma vie en plus des journées et déjeuners passés au labo. En espérant enrichir les occasions de se revoir !
Merci tout particulièrement à Docteur Morgan, mon voisin de bureau et de labo, qui m'a aidée à reprendre confiance en moi, m'a encouragée à aller de l'avant et m'a couverte de chocolat pour me remonter le moral.

Pendant ces trois années plusieurs personnes ont croisé mon chemin alors MERCI à : Amina, Emilie, Camille, Lama, Antoine, Mathieu, Mehrnaz, Maxime, Delphine, Fabrice, Fabien,

Kevin, Walis, Soisic, Corinne, Djamel, Franck, merci pour tout les bons moments partagés dans les couloirs du LBMC. Merci à mes amis qui malgré les kilomètres qui nous séparent m'ont toujours soutenue.

Enfin, le plus important à mes yeux, ma famille. Papa, maman, merci pour tout, merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé voler de mes propres ailes, de m'avoir soutenue et toujours autant gâtée. J'ai beaucoup de chance de vous avoir, que dieu vous garde toujours à mes côtés. Merci à mes frères qui continuent à me choyer, j'avoue que j'adore avoir cette place de petite sœur.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Je garderai un souvenir mémorable de cette aventure partagée avec vous tous. Merci

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES 8
INDEX DES TABLES 9
Résumé 10
INTRODUCTION 11
CHAPITRE 1 : LES TELOMERES 13
I. Historique 13
II. ADN télomérique et structure 13
III. Conformation télomérique 15
1. Structure G- quadruplexe 15
2. Structure T-Loop 16
IV. Les protéines aux télomères 18
1. Le complexe Shelterin 18
a. Les protéines TRF1/TRF2 20
b. La protéine TIN2 21
c. La protéine TPP1 22
d. La protéine POT1 24
e. La protéine RAP1 24
2. Autres protéines associées aux télomères 25
a. La protéine Apollo 25
b. Le complexe CST 26
V. Réplication des télomères 26
1. Protéines impliquées dans la réplication des télomères 28
2. Horloge biologique 28
3. Sénescence réplicative 29
VI. Transcription au télomère 31
VII. Différentes voies de maintien des télomères 33
1. Maintien par la télomérase 33
a. Structure 33
b. Fonctions de la télomérase 34
i. Elongation 34
ii. Protection 35

iii. Tumorigenèse 36
iv. Fonctions non associées aux télomères 36
c. Régulation de l'activité télomérase 36
2. Maintien par les Shelterin 37
a. Maintien de la taille des télomères 37
b. Maintien de la stabilité des télomères 38
3. Maintien par recombinaison (ALT) 39
a. Mécanisme 40
b. Génétique des ALT 41
4. Maintien par le transcrit télomérique : TERRA 41
5. Maintien par la structure chromatinienne 42
VIII. Reconnaissance des dommages à l'ADN et réparation des télomères 43
1. Télomères et signalisation 43
a. La protéine ATM 43
b. La protéine ATR 44
c. Le complexe MRN 45
2. Mécanismes de réparation des télomères 45
a. Réparation des télomères par le NHEJ 45
b. Réparation des télomères par le RH 47
CHAPITRE 2 : LA PROTEINE INT6 49
I. Découverte 49
II. *Int6*/INT6 49
III. Fonctions d'INT6 50
1. INT6 et tumorigenèse 50
2. INT6, facteur d'initiation de traduction 51
3. INT6 ; un facteur du NMD 52
4. INT6 et son rôle dans la traduction des ARNm histones 56
5. INT6 et la réplication d'ADN 58
6. INT6 et les dommages à l'ADN 61
OBJECTIFS 63
RESULTATS (ARTICLE) 67
The function of the oncoprotein INT6/EIF3E in telomere maintenance 69
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 96

INT6 est importante pour la stabilité du génome, et spécialement aux télomères 98
1. INT6 et intégrité des télomères 98
2. Localisation d'INT6 aux télomères 99
INT6 et la régulation de l'ARN aux télomères 100
INT6 et la longueur des télomères 102
Rôle possible d'INT6 au niveau de la réplication des télomères 103
1. INT6 et structure chromatinienne aux télomères 103
2. INT6 et les modifications épigénétiques aux télomères 104
Conclusions finales 105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 107

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION DE L'ADN TELOMERIQUE HUMAIN. 14
FIGURE 2. REPRESENTATION D'UNE STRUCTURE COPLANAIRE DE 4 GUANINES APPARIEES PAR DES LIAISONS DE TYPE HOGSTEEN-GREEN. D'APRES (HOPFNER, 2014) 15
FIGURE 3. STRUCTURE DU TELOMERE HUMAIN. D'APRES (GRIFFITH ET AL., 1999; PALM AND DE LANGE, 2008) 16
FIGURE 4. VISUALISATION DE TIF. (TAKAI ET AL., 2003). 17
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU POSITIONNEMENT DU COMPLEXE SHELTERIN SUR L'ADN TELOMERIQUE MONTRANT L'INTERACTION DES PROTEINES TRF1 ET TRF2 AVEC L'ADN DOUBLE BRIN ET DE LA PROTEINE POT1 AVEC LE SIMPLE BRIN. D'APRES(NABETANI AND ISHIKAWA, 2011) 18
FIGURE 6. LES STRUCTURES ET DOMAINES D'INTERACTION DES SIX COMPOSANTS DU COMPLEXE SHELTERIN HUMAIN. 21
FIGURE 7. ILLUSTRATION DE LA PROTEINE TPP1 ET SON ROLE DANS LA MAINTENANCE DES TELOMERES. D'APRES (RAJAVEL ET AL., 2014) 23
FIGURE 8. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REPLICATION 27
FIGURE 9. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REPLICATION DES TELOMERES AVEC INTERVENTION DE LA TELOMERASE 29
FIGURE 10. REPRESENTATION GRAPHIQUE ILLUSTRANT LA DIMINUTION DE LA TAILLE DES TELOMERES AU COURS DES DIVISIONS CELLULAIRES ET LES CONSEQUENCES ASSOCIEES. 30
FIGURE 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TELOMERASE HUMAINE. D'APRES (SMOGORZEWSKA AND DE LANGE, 2004) 34
FIGURE 12. MODELE D'ELONGATION PAR LA TELOMERASE. D'APRES (KELLEHER ET AL., 2002) 35
FIGURE 13. REPRESSION DES VOIES ATM/ATR PAR LES SHELTERINS. 39
FIGURE 14. MECANISME MOLECULAIRE D'ELONGATION DES TELOMERES DANS LES CELLULES ALT. D'APRES (AYOUAZ, 2008). 40
FIGURE 15. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION AU DOMMAGE A L'ADN. ADAPTE DE (PALM AND DE LANGE, 2008) 45
FIGURE 16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX VOIES DE REPARATION NHEJ ET HR 46
FIGURE 17. REPRESENTATION DE LA PROTEINE INT6 ET SES DOMAINES FONCTIONNELS. 50
FIGURE 18. SCHEMA TYPIQUE DU MECANISME NMD QUI CIBLE UN ARNM 53
FIGURE 19. LE REARRANGEMENT PROTEIQUE DURANT LE MECANISME 'STANDARD' DU NMD. D'APRES (POPP AND MAQUAT, 2014) 55
FIGURE 20. MODELES D'ACTION D'UPF1 ET D'INT6 SUR LES ARNM HISTONES. A. D'APRES (CHOE ET AL., 2014). B. D'APRES (NEUSIEDLER ET AL., 2012) 58
FIGURE 21. IMPLICATION DES PROTEINES INT6 ET UPF1 DANS LA REPLICATION D'ADN. A. D'APRES (AZZALIN AND LINGNER, 2006A) 60
FIGURE 22. FONCTIONS D'UPF1 ET INT6 SUR LA BIOLOGIE DES TELOMERES.. 65
FIGURE 23. DIFFERENTES POSSIBILITES D'ACTION D'INT6 AUX TELOMERES. 105

INDEX DES TABLES

TABLEAU 1. LES COMPOSANTS DES TELOMERES CHEZ L'HUMAIN, SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE (REVIEW D'APRES NANDAKUMAR AND CECH, 2013)..... 19

Résumé

La protéine INT6/EIF3E codée par le gène mammalien correspondant au site d'intégration du rétrovirus Mouse Mammary tumor virus (MMTV) n°6 (*int*-6), a été impliquée dans le cancer du sein chez la souris et l'homme. Malgré qu'INT6 soit une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3, elle n'est pas essentielle pour la traduction générale mais pour l'expression d'ARNm spécifiques tel qu'il a été montré pour la traduction d'ARNm histones. Elle a aussi été impliquée dans la réplication d'ADN en stabilisant le facteur de licence de la réplication MCM7, dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et dans la voie du "nonsense-mediated mRNA decay" (NMD). Par rapport à cette dernière activité j'ai étudié si INT6 pouvait spécifiquement intervenir au niveau de l'homéostasie des télomères en agissant sur les transcrits TERRA. La délétion d'INT6 par une approche d'ARN interférence révèle une augmentation des niveaux des ARN télomériques TERRA qui est dépendante du chromosome et du type cellulaire. Malgré qu'INT6 soit un facteur du NMD, elle n'agit pas sur la demi-vie des TERRA. Les expériences de DNA-FISH ont montré une augmentation des dommages aux télomères (TIF) dans les cellules en absence d'INT6. Les aberrations observées correspondent à des pertes de télomères (TFE) et des signaux multi-télomériques (MTS). Par la technique de digestion de la chromatine à la nucléase micrococcale, nous avons retrouvé une plus rapide accumulation des mono-nucléosomes aux télomères en absence d'INT6, suggérant un rôle dans la conformation de la chromatine télomérique. Ces résultats mettent en évidence INT6 comme un nouveau facteur régulateur de la stabilité des télomères.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LES TELOMERES

I. Historique

L'ADN, qui est le support de l'information génétique, a une organisation compactée retenue dans le noyau sous forme de chromosome. Ce dernier présente au niveau de ses extrémités, des structures particulières qui permettent de distinguer les extrémités naturelles des cassures de chromosomes, nommées télomères.

Le concept de télomère fut énoncé en 1938 à partir des études d'Herman Muller sur les chromosomes de la Drosophile. En effet, Muller observa la quasi absence de fusions des terminaisons chromosomiques après un traitement aux rayons X. Il en conclut que ces extrémités devaient être protégées par une conformation particulière ; il les nomma 'Télomères' du grec *telos* (Fin) et *mere* (Segment). B. McClintock, à la même période, confirma cette conclusion chez le maïs (McClintock, 1938).

En 1961, L. Hayflick montra que la culture de cellules humaines issues de tissus embryonnaires se limitait à 50 divisions environ avant de s'arrêter (Hayflick, 1961). Par la suite, le scientifique russe Olovnikov, inspiré par le mouvement du train arrivant en gare, expliqua le mécanisme responsable du raccourcissement des chromosomes à chaque cycle de réplication (Olovnikov, 1992). Ceci a permis aux études suivantes de relier les télomères au vieillissement cellulaire comme illustré par les travaux nobélisés d'Elizabeth Blackburn, Jack Szostak et Carol Greider sur l'élucidation de la structure et le maintien des télomères.

Ainsi, les extrémités chromosomiques se sont révélées indispensables au maintien de l'intégrité du génome.

II. ADN télomérique et structure

Les chromosomes eucaryotes sont des molécules d'ADN linéaires dont les extrémités représentent des structures ribonucléoprotéiques nommées télomères.

Dans la majorité des cas, l'ADN télomérique est constitué de courtes séquences répétées en tandem et riches en guanosines (Wellinger and Sen, 1997). Le nombre et la nature des répétitions varient selon les espèces. Par exemple, la levure *S. cerevisiae* possède une

répétition de type TG_{1-3} (un T suivi de 1 à 3 G), alors que les vertébrés comprennent la séquence (TTAGGG)n (Moyzis et al., 1988). Les télomères ont donc la particularité d'être conservés entre les espèces.

Le nombre de répétitions par télomère varie énormément entre 350-500 pb chez Saccharomyces Cerevisiae, 2 à 20 kb chez l'homme et arrive jusqu'à 50 kb chez la souris (de Lange et al., 1990; Starling et al., 1990).

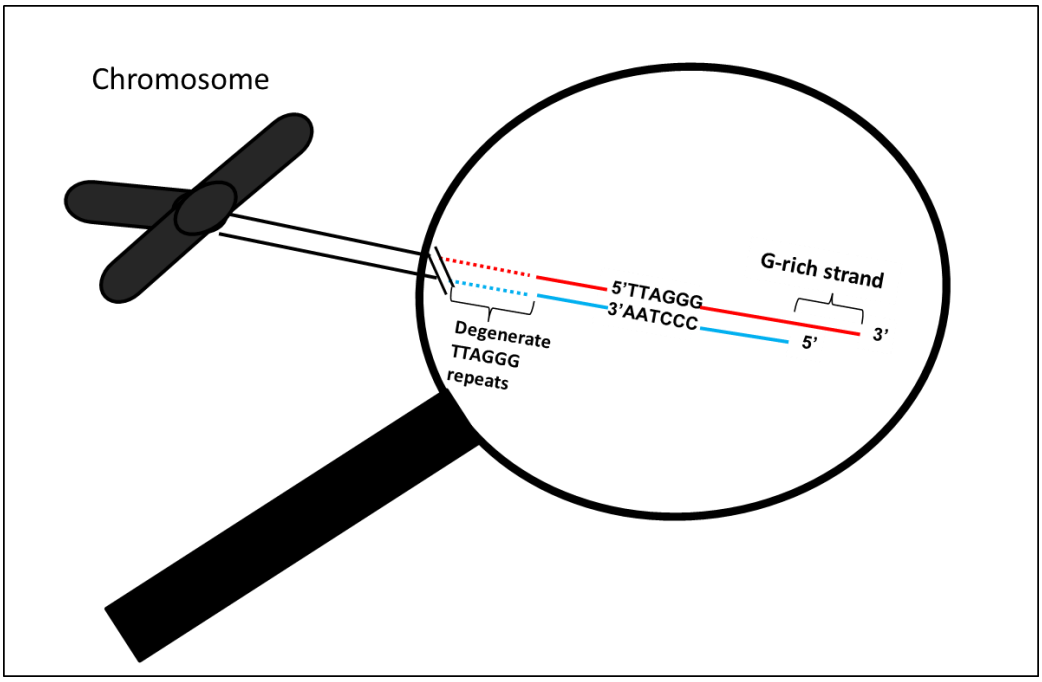


Figure 1. Représentation de l'ADN télomérique humain. L'extrémité est constituée de répétitions de la séquence TTAGGG avec une région double brin et une autre région simple brin nommée brin G-riche sortant.

Les télomères sont précédés par une région subtélomérique constituée de séquences télomériques dégénérées (Horowitz et al., 1984; de Lange et al., 1990). Ces séquences, à la différence des télomères, sont peu conservées durant l'évolution. Les séquences et longueurs de l'élément varient entre les espèces : chez *S. cerevisae*, elles sont constituées de répétitions dispersées appelées X et Y', deux domaines distal et proximal du télomère, respectivement (Wright et al., 1992) alors que chez l'homme, les séquences subtélomériques sont distales du centromère.

L'ADN télomérique qui est majoritairement double brin, a la particularité d'avoir le brin riche en guanines qui dépasse son complément pour former une extrémité simple brin sortante en 3' nommée brin G-riche sortant (McElligott and Wellinger, 1997) (**figure 1**). Cette séquence est conservée au cours de l'évolution. Sa taille varie aussi entre 50-500 bases chez les vertébrés et

de 12-30 bases chez les levures (Jain and Cooper, 2010; O'Sullivan and Karlseder, 2010). Le brin G-riche sortant peut adopter deux conformations importantes: la T-Loop et les G-quadruplexes (G4).

III. Conformation télomérique

1. Structure G- quadruplexe

La structure G-quadruplexe est une structure secondaire stabilisée par des interactions entre guanines (Williamson, 1994). Elle peut se former dans l'ADN et l'ARN, au niveau des télomères, des régions promotrices ainsi que des régions non codantes. Dans le cas des télomères, le brin G-riche sortant va se replier sur lui-même en une structure à quatre brins maintenus par des interactions hydrogènes entre quatre guanines (Henderson et al., 1990) et un chélate (Na+, K+) formant alors un G-quadruplexe (**figure 2**).

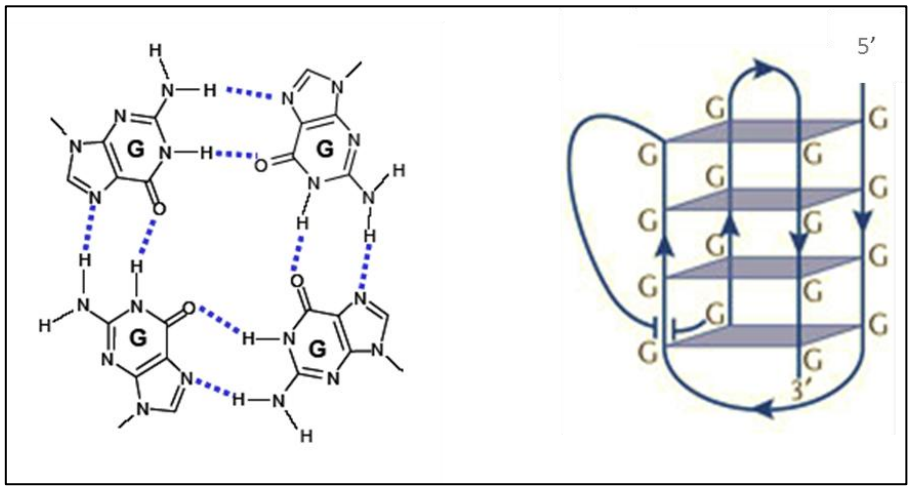


Figure 2. Représentation d'une structure coplanaire de 4 guanines appariées par des liaisons de type Hogsteen-Green. A gauche, une représentation tridimensionnelle d'un quadruplexe de guanines formé au sein d'une même molécule. A droite, modèle de G-quadruplexe intramoléculaire en présence d'ions (d'après (Hopfner, 2014)).

Cette structure séquestrerait l'extension télomérique afin de protéger et réguler la taille des télomères mais interviendrait aussi pour faciliter la compaction des télomères (Parkinson et al., 2002). Le rôle de certaines protéines télomériques par rapport à cette structure a été décrit dans quelques publications. C'est le cas de la protéine RAP1 chez la levure, où elle induirait la formation d'un G-quadruplexe intermoléculaire afin de protéger le brin G-riche sortant d'être reconnu comme dommage nécessitant une réparation. Par contre, la protéine humaine POT1 pourrait se lier avec une forte affinité au simple brin d'ADN entrainant l'ouverture du G-quadruplexe. POT1 faciliterait ainsi l'accès de la protéine télomérase afin de rallonger les

télomères. On peut mentionner aussi la protéine RPA qui intervient au cours de la réplication, de la réparation, de la recombinaison, et qui elle aussi intervient dans le déroulement de la structure G-quadruplexe. En effet ces structures peuvent être une source d'instabilité génomique, c'est pourquoi une régulation minutieuse durant la réplication est nécessaire.

2. Structure T-Loop

L'organisation des télomères en une conformation stable est essentielle afin d'éviter la mort ou la transformation cellulaire responsable du déclenchement de cancers. En effet, une distinction des extrémités naturelles des chromosomes des sites de dommages à l'ADN doit être établie pour éviter leur réparation inadéquate.

Cette prévention est possible grâce à la formation de la structure T-loop (Telomere loop) qui a été mise en évidence en 1999 par Griffith. Cette boucle qui semble être conservée durant l'évolution, car observée chez les protozoaires, souris et homme, varie en taille selon la longueur des télomères (Griffith et al., 1999). En ce qui concerne sa formation, elle consiste en un retournement de la portion d'ADN double brin sur elle-même, permettant son invasion par le brin G-riche sortant et créant ainsi, la boucle de déplacement au point d'insertion (ou D-loop). Le tout forme un modèle de « Lasso » qui isole les extrémités des chromosomes (**figure 3**). L'établissement de la T-loop est favorisé par des protéines spécifiques des télomères (Shelterin) (Bianchi et al., 1997) et permet de protéger les chromosomes des dégradations mais aussi des fusions responsables de perte de matériel génétique.

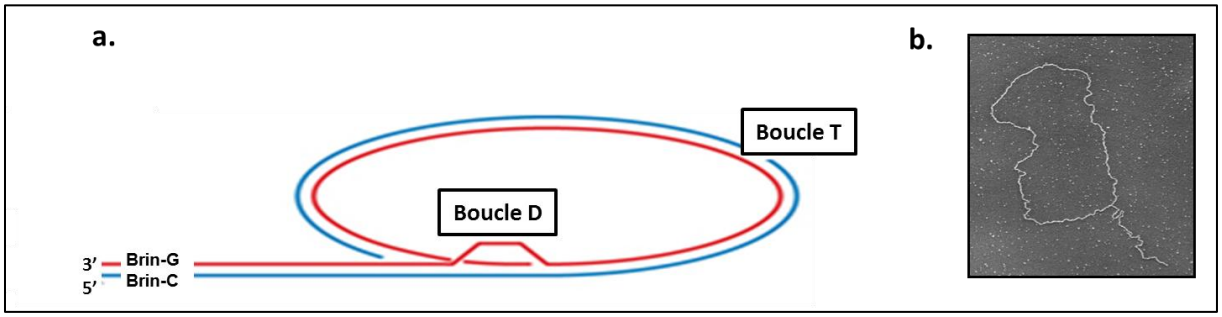


Figure 3. Structure du télomère humain. (a) Représentation schématique de la boucle T formée suite à l'invasion du brin 3' sortant. (b) Visualisation de la boucle T humaine par microscopie électronique. (d'après (Griffith et al., 1999; Palm and de Lange, 2008)).

En absence de la T-loop, le télomère est reconnu comme une cassure double brin et est dit dysfonctionnel. Ceci entraine des cycles de cassure-fusion-pont et l'activation de voies de signalisation des dommages à l'ADN. C'est exactement ce qui est observé lorsqu'une forme

dominante négative de la protéine shelterin TRF2 est exprimée (Celli and de Lange, 2005; Celli et al., 2006). D'autres facteurs qu'on retrouve aussi localisés au niveau du dommage télomérique tels que la protéine 53BP1 (p53-Binding Protein), la protéine histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139 (γH2AX), la kinase ATR, représentent des marques de dysfonctionnement appelés TIF (Telomere-dysfunction Induced Foci) (Takai et al., 2003) (**figure 4**). Alors, la conformation en boucle T des télomères est un moyen de protéger l'extrémité G-riche sortante des mécanismes de détection des dommages à l'ADN (Griffith et al., 1999). Elle est aussi suspectée pour avoir une dynamique particulière au cours du cycle cellulaire en phase S pour permettre la progression de la fourche de réplication (voir chapitre réplication).

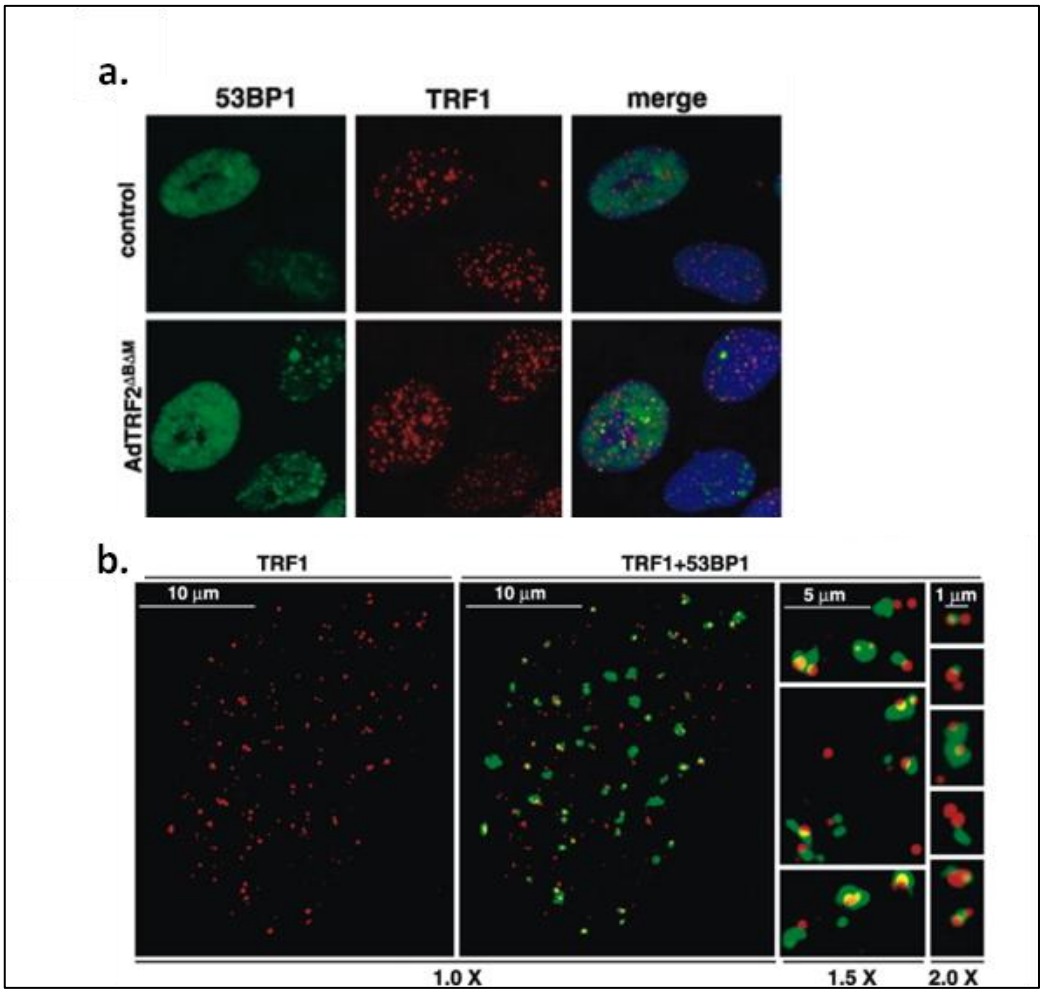


Figure 4. Visualisation de TIF. (a) Le mutant TRF2ΔBΔM induit la localization télomérique de 53BP1. (b) Vision Delta des images. Les images de gauche montrent un seul noyau. Les images zoomées montrent d'autres foci 53BP1 aux télomères de plusieurs noyaux (Takai et al., 2003).

IV. Les protéines aux télomères

Les séquences d'ADN télomèriques sont non seulement associées à des protéines strictement spécifiques aux télomères ; les protéines du complexe 'Shelterin' mais aussi à d'autres protéines importantes pour leur stabilité.

1. Le complexe Shelterin

L'extrémité des chromosomes des mammifères est coiffée par un complexe protéique nécessaire à la formation et stabilisation de la T-loop, nommé complexe 'shelterin'. Il est constitué de six protéines qui sont : TRF1 (Telomeric Repeat binding Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 2), POT1 (Protection Of Telomeres 1), TIN2 (TRF1 Interacting Nuclear protein 2), TPP1 (TIN1/PIP1/PTOP1) et RAP1 (Repressor/Activator Protein 1) (de Lange, 2005; Palm and de Lange, 2008) (**figure 5**). Les télomères de la levure *S.pombe* présente un complexe similaire contenant les protéines Taz1 (homologue de TRF1), Rap1, Pot1, Tpz1, Poz1 et Ccq1 (Miyoshi et al., 2008). Par contre, la levure S.cerevisiae n'exhibe pas de complexe ressemblant au shelterin mais contient plutôt des protéines qui se lient à l'extrémité des chromosomes, telles que : Rap1, Cdc13, Stn1 et Ten1 (**Tableau 1**).

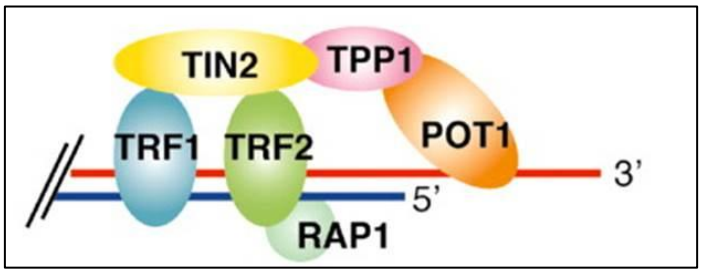


Figure 5. Représentation schématique du positionnement du complexe shelterin sur l'ADN télomérique montrant l'interaction des protéines TRF1 et TRF2 avec l'ADN double brin et de la protéine POT1 avec le simple brin. (d'après(Nabetani and Ishikawa, 2011)).

Des expériences de co-immunoprécipitation permettent d'isoler les facteurs, suggérant que ces protéines forment un complexe stable même en absence d'ADN télomèrique (Liu et al., 2004). En absence de la protection conférée par les shelterin, les télomères sont reconnus comme des cassures et sont réparés de manière inappropriée. Ce complexe joue alors, un rôle crucial aux télomères mais a aussi des fonctions non télomériques.

Humans	*Schizosaccharomyces pombe*	*Saccharomyces cerevisiae*	Function
Telomeric proteins			
TRF1	Taz1	NA	Bind dsDNA
TRF2	Taz1	NA	Bind dsDNA
RAP1	Rap1	Rap1	*S. pombe* Rap1 binds dsDNA
TIN2	Poz1	NA	Bridge telomeric proteins via protein–protein interactions
POT1	Pot1	NA	Bind ssDNA
TPP1	Tpz1	NA	Enhance ssDNA binding of POT1; human TPP1 recruits telomerase
NA	Ccq1	NA	Recruits telomerase
CTC1	NA	NA	Part of a telomeric RPA-like complex
STN1	Stn1	Stn1	Part of a telomeric RPA-like complex
TEN1	Ten1	Ten1	Part of a telomeric RPA-like complex
NA	NA	Cdc13	Binds ssDNA; part of a telomeric RPA-like complex
Telomere-associated proteins or complexes			
KU70–KU80	Ku70–Ku80	Ku70–Ku80	Contribute to telomeric heterochromatin formation
XPF–ERCC1	NA	NA	Endonuclease; mediates 3′ overhang processing
EXO1	NA	Exo1	Mediate 5′ end resection
Apollo	NA	NA	Mediates 5′ end resection
MRN complex	MRN complex	MRX complex	Involved in telomere maintenance
RAD51D	NA	NA	Protects telomeres against attrition and fusion
Tankyrase	NA	NA	Mediates poly(ADP-ribosyl)ation of TRF1 and resolution of sister telomere cohesion prior to mitosis
ORC	NA	NA	Prevents telomere circles
9-1-1 complex	NA	NA	Involved in telomere maintenance
RecQ helicases	NA	NA	Bind TRF2
HP1	NA	NA	Involved in sister telomere cohesion
Telomerase core components			
TERT	Trt1	Est2	Telomerase reverse transcriptase
TR	Ter1	Tlc1	Telomerase RNA
Telomerase accessory factors			
Dyskerin	NA	NA	Binds and stabilizes TR
EST1	Est1	Est1	Promote telomerase recruitment
NA	NA	Est3	Associates with Est2; essential for telomere maintenance *in vivo*
NA	NA	Ku70–Ku80	Mediates nuclear localization of telomerase
NA	Sm, Lsm	Sm	Involved in telomerase biogenesis and telomerase nuclear localization
TCAB1	NA	NA	Localizes telomerase to Cajal bodies
Reptin	NA	NA	Associates with TERT in a cell cycle-dependent manner
Pontin	NA	NA	Associates with TERT in a cell cycle-dependent manner
PINX1	NA	NA	Inhibitor of telomerase
HSP90	NA	Hsp82	Associates with telomerase
p23	NA	Sba1	Associates with telomerase ; HSP90 co-chaperone

Tableau 1. Les composants des télomères chez l'humain, Saccharomyces cerevisiae et Schizosaccharomyces pombe (Review d'après Nandakumar and Cech, 2013).

a. Les protéines TRF1/TRF2

TRF1 et TRF2 partagent une conformation architecturale commune avec le même domaine de type Myb qui confère à chacune la spécificité de se fixer sur les séquences télomèriques double brin (Hanaoka et al., 2005) (**figure 6**). Elles sont aussi composées d'un domaine nommé TRFH (TRF1/2 Homology), qui leur permet l'homodimérisation (Bianchi et al., 1997). Ce domaine est aussi une plateforme de recrutement pour d'autres protéines car malgré leur homologie, TRF1 et TRF2 n'interagissent entre elles que grâce à une liaison à la protéine shelterin TIN2 (Fairall et al., 2001).

TRF1, la première protéine shelterin découverte pour se lier à l'ADN (Chong et al., 1995) a chez l'homme, deux formes distinctes de 20 aa qui sont formées suite à un épissage alternatif (Shen et al., 1997). Ces deux formes ont des fonctions identiques. TRF1 est impliquée dans la réplication des télomères, leur protection et la maintenance de leur longueur. Le gène codant pour cette protéine est essentiel car son inhibition engendre la létalité embryonnaire (Karlseder et al., 2003). La délétion de TRF1 favorise la formation de télomères fragiles ; un type d'anomalie qui peut être causé par un défaut de la réplication (Martinez et al., 2009). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que la quantité de protéines TRF1, ainsi que TRF2, associée à l'ADN télomérique était proportionnelle à la taille des télomères (Loayza and De Lange, 2003). Des travaux de surexpression de ces facteurs montrent une régulation négative de la longueur des télomères. En effet, TRF1 est un régulateur négatif de la taille des télomères et sa phosphorylation par ATM génère sa libération de l'ADN télomérique. Il a aussi été observé que les cellules sans TRF1 accumulaient des fusions de télomères (Iwano et al., 2004; Sfeir et al., 2009), ce qui indique son importance pour la protection des télomères.

La protéine TRF2 est pour sa part, surtout connue pour son rôle de protection des télomères et ce par la stabilisation de la structure T-loop. L'inhibition de TRF2 résulte en la perte de l'extrémité protrusive au télomère (Celli and de Lange, 2005). Il a d'ailleurs été démontré que ce facteur serait suffisant pour reconstituer cette structure (Griffith et al., 1999; Stansel et al., 2001) en agissant sur la topologie de l'ADN pour permettre l'invasion du simple brin G-riche (Amiard et al., 2007). En effet, elle agit sur la conformation de la double hélice en générant des surenroulements positifs. Elle enroulerait ou envelopperait l'ADN sur lui-même. Elle agirait aussi en liant et protégeant la jonction de Holliday in vitro, qu'elle soit ou non composée d'ADN télomérique (Poulet et al., 2009). Il est noté que pour cette fonction, TRF2

ne requiert pas d'ATP et ne peut catalyser une réaction d'échange de brins (Amiard et al., 2007). Une récente étude utilisant l'imagerie avec une super-résolution de fluorescence (STORM), a confirmé chez la souris que la persistance de la T-loop dépend bien de TRF2 (Doksani et al., 2013). Cette dernière, en favorisant la formation de cette structure protègerait les télomères d'être reconnus comme des cassures double brin. TRF2 serait alors capable d'inactiver la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) pour inhiber la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Bradshaw et al., 2005; Tanaka et al., 2005) et la réparation par la voie du NHEJ (Non-Homologous End Joining) (Bae and Baumann, 2007; Smogorzewska et al., 2002). La perte de TRF2 activerait la voie p53 et induit la sénescence (Smogorzewska and de Lange, 2002), alors que sa surexpression prévient les aberrations chromosomiques (Karlseder, 2003). En plus, l'inhibition de TRF2 induit la dérégulation de la longueur des télomères qui corrèle avec des fusions chromosomiques.

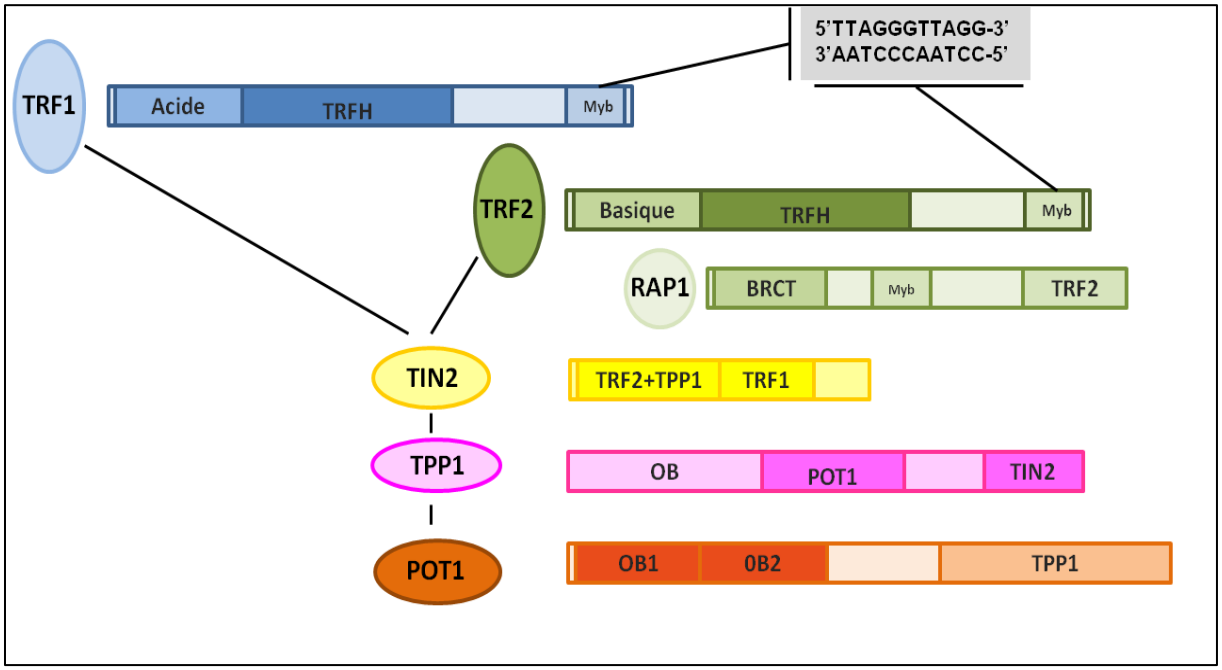


Figure 6. Les structures et domaines d'interaction des six composants du complexe shelterin humain.

b. La protéine TIN2

TIN2 est connue pour interagir avec plusieurs membres du complexe shelterin. Elle effectue un pont entre TRF1 en C-terminal et TRF2 par son domaine N-terminal, qui sont incapables d'interagir autrement (Ye et al., 2004) (**figure 6**). L'invalidation de TIN2 conduit à une

létalité précoce chez la souris confirmant son rôle stabilisateur du complexe shelterin (Iwano et al., 2004; Karlseder et al., 2003). C'est pourquoi, l'expression de TIN2 est indispensable à la survie cellulaire. TIN2 utilise une région située sur son domaine N-terminal pour affecter une autre protéine shelterin, TPP1, aux télomères (Liu et al., 2004; Ye et al., 2004). Ce même domaine est celui utilisé pour fixer TRF2, ce qui suggère l'existence potentielle d'un modèle où les quatre protéines shelterin (TRF1-TRF2-TIN2 et TPP1) coexistent en un complexe uni (O'Connor et al., 2006).

c. La protéine TPP1

Le terme TPP1 dérive de la combinaison des premières lettres des 3 protéines TINT1 (Houghtaling et al., 2004), PTOP (Liu et al., 2004) et PIP1 (Ye et al., 2004) qui le caractérise. La protéine TPP1 n'est pas connue pour interagir directement à l'ADN télomérique mais ce n'est pas pour autant qu'elle n'est pas vitale pour la maintenance des télomères. TPP1 est une protéine à multi-domaines qui lui permettent d'interagir avec les autres facteurs shelterin mais aussi avec la télomérase (Xin et al., 2007). En effet, TPP1 via son interaction par son domaine C-terminal avec TIN2, recrute à travers son domaine central la protéine POT1 aux télomères (Liu et al., 2004) (**figure 7**).

Ceci est confirmé par des expériences de déplétion de TPP1 où l'expression d'un mutant déficient à la fixation de POT1 génèrent l'abolition presque totale de POT1 aux télomères (Denchi and de Lange, 2007; Hockemeyer et al., 2007). Aussi, l'interaction TIN2-TPP1 est importante dans la stabilisation du sous-complexe TRF1-TRF2. Il a été montré que la co-immunoprécipitation de TRF1-TIN2-TRF2 ne se fait qu'en présence de TPP1 et que la surexpression de TPP1 favorise l'association TIN2-TRF2 (O'Connor et al., 2006).

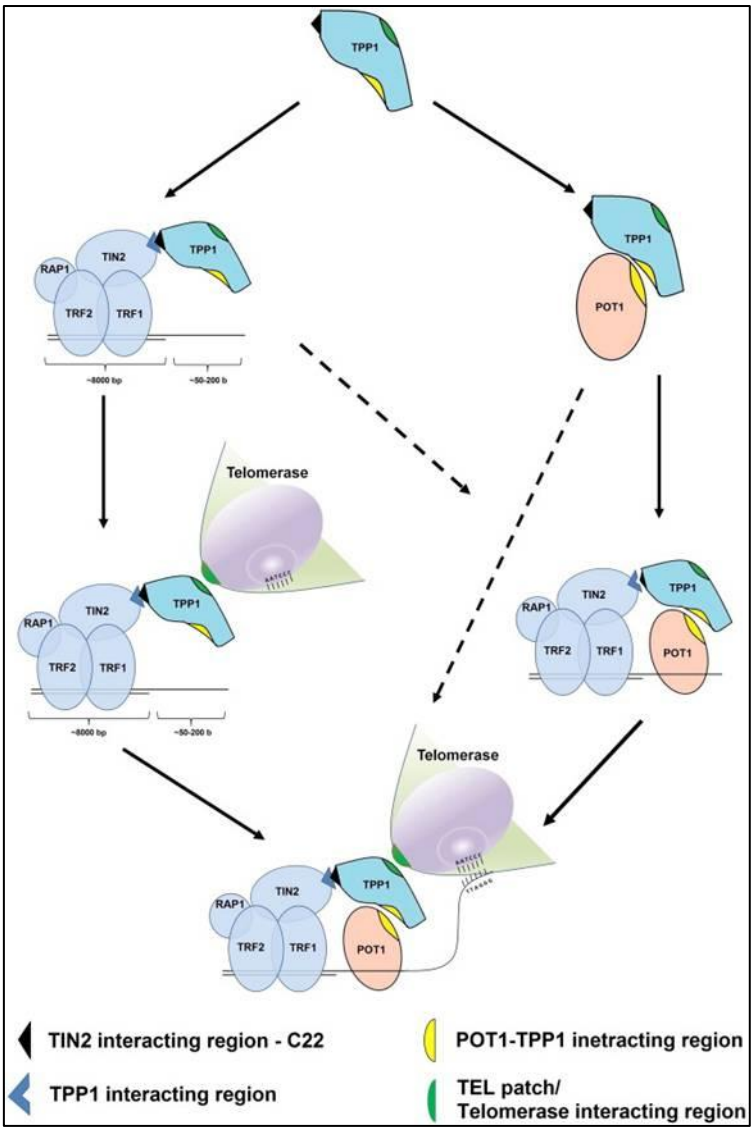


Figure 7. Illustration de la protéine TPP1 et son rôle dans la maintenance des télomères. TPP1 interagit avec différents membres du complexe shelterin. Tpp1 interagit et recrute la télomérase aux télomères. Différentes voies de localisation de TPP1 aux télomères et le recrutement de la télomérase. (d'après (Rajavel et al., 2014)).

D'autres travaux de déplétion de TPP1, réalisés chez la souris et dans les cellules humaines HeLa, démontrent l'abolition de la localisation de la télomèrase aux télomères (Abreu et al., 2010; Martinez et al., 2010). Ceci appuie l'implication de TPP1 dans le recrutement de la télomèrase qui se fait par le domaine conservé OB-fold (oligonucléotide/oligo-saccharides binding) se trouvant à l'extrémité N-terminale de TPP1 (Tejera et al., 2010). En plus du recrutement, l'hétérodimère TPP1 agit sur la processivité de la télomérase pour favoriser le rallongement des télomères (Wang et al., 2007). Toutes ces découvertes révèlent que le lien entre TRF1-TIN2-TRF2 et POT1 n'existe qu'à l'aide du membre indispensable TPP1. Aussi, un défaut d'épissage de TPP1 a été identifié chez des patients atteint de dysplasie

adrenocorticale (défaut de l'appareil urogénital) confirmant l'importance des protéines du shelterin dans le développement embryonnaire (Keegan et al., 2005).

d. La protéine POT1

POT1 a été identifiée par homologie avec la sous-unité α de la protéine des ciliés TEBP (Baumann and Cech, 2001). Le gène hPOT1 comporte 22 exons codant pour cinq protéines distinctes, produits d'un épissage alternatif, chacune pouvant ainsi avoir un rôle différent dans la régulation des télomères (Baumann et al., 2002). POT1 est constituée du motif OB qui lui confère la caractéristique de se lier à l'ADN simple brin avec une grande affinité et spécificité (Mitton-Fry et al., 2002). Sa séquence de fixation minimale au télomère est 5'-TAGGGTTAG-3'(Loayza and De Lange, 2003). En 2001, Baumann et Cech ont révélé l'importance de POT1 dans la protection des télomères à travers les observations des répercussions catastrophiques de la délétion de POT1 au niveau de l'ADN télomérique chez *S. pombe*. De plus, son inhibition par RNA interférant dans les cellules humaines HT1080 conduit à des dysfonctions télomériques, à des fusions chromosomiques, à une augmentation de la taille des télomères et à la sénescence cellulaire (Veldman et al., 2004). Aussi, elle serait capable d'inhiber la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN par le blocage de la kinase ATR (ATM Rad3 Related protein) (Denchi and de Lange, 2007).

Il a déjà été mentionné la présence de l'interaction de POT1 avec TPP1 afin d'augmenter l'activité télomérase. L'équipe de T. Cech a précisé qu'en fonction de la localisation de POT1 sur le simple brin télomérique et l'accessibilité du G-riche sortant, cette protéine pourrait soit être un régulateur négatif soit un régulateur positif de la télomérase (Lei et al., 2005).

e. La protéine RAP1

Chez la levure, RAP1 est capable de se fixer directement à l'ADN télomérique (König and Rhodes, 1997) mais ce n'est pas le cas chez les mammifères où elle requiert l'interaction avec TRF2 pour s'associer aux télomères (Li et al., 2000a). Il a été proposé que RAP1 soit importante pour la protection des télomères et ceci après l'observation de létalité chez les souris après knock out de RAP1. De récentes études ont écarté l'importance de RAP1 pour la coiffe (capping) des télomères mais confirment son implication dans la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN, où avec TRF2, elle jouerait un rôle dans l'inhibition du NHEJ aux télomères (Bae and Baumann, 2007). De plus, la délétion de RAP1 n'affecte pas la structure hétérochromatinienne des télomères, leur transcription ni la localisation des shelterin mais

augmente la recombinaison homologue aux télomères (Sfeir et al., 2010). L'absence de RAP1 dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) montre une diminution de 26% de la taille des télomères avec l'augmentation de foyers de dommages à l'ADN (γH2AX) (Martinez et al., 2010) suggérant un rôle possible de RAP1 dans la régulation de la télomèrase.

2. Autres protéines associées aux télomères

Des facteurs dits « accessoires » sont associés, contrairement aux shelterin, de façon transitoire aux télomères. Ils contribuent, en plus à d'autres fonctions, au maintien et à la protection de ces extrémités. Parmi ces protéines, on peut citer celles impliquées dans la réparation d'ADN, tels que, KU70/KU80 (Hsu et al., 2000), DNA-PKcs (d'Adda di Fagagna et al., 2001), Apollo (Beneke et al., 2008), dans la signalisation des dommages ; le complexe MRN (Zhu et al., 2003), ou encore dans la réplication tel que le complexe ORC (Deng et al., 2007) (**Tableau 1**).

a. La protéine Apollo

Des cribles double hybride réalisés avec le domaine N-terminal de TRF2 ont permis d'identifier la protéine Apollo (Lenain et al., 2006). Cette protéine fait partie de la famille des nucléases, elle est nommée ainsi à cause de sa forte similarité avec la protéine Arthémis qui est impliquée dans la recombinaison V(D)J et la réparation d'ADN. En plus, des études de spectrométrie de masse ont révélé qu'Apollo était une partenaire de hRAP1. Mais cette interaction semble indirecte et dépendante de TRF2 (van Overbeek and de Lange, 2006). Ainsi, Rap1-Apollo-TRF2 formerait un complexe ternaire présent aux télomères. Par son domaine C-terminal, Apollo interagit avec le domaine TRFH de TRF2 lui permettant d'être recrutée aux télomères (Freibaum and Counter, 2006). La protéine Apollo a une activité exonucléase 5'-3'(Lenain et al., 2006) qui contribue à la maintenance de l'extrémité 3'sortante (Wu et al., 2010). En effet, son inhibition entraine des défauts aux télomères en phase S (van Overbeek and de Lange, 2006) et arbore 30 à 40% de moins d'ADN télomérique simple brin. Des fusions des brins directs ainsi que la sénescence de fibroblastes primaires sont aussi observées (van Overbeek and de Lange, 2006; Wu et al., 2010). Ceci suppose l'implication d'Apollo dans la protection des télomères au cours de la réplication. En effet, une étude a démontré que TRF2 et son partenaire Apollo agissaient avec la topoisomérase 2α (TOP2α) dans le but de protéger la portion d'ADN télomérique simple brin du dommage

réplicatif. Une déficience de TRF2 et Apollo génère un superenroulement positif après le passage de la fourche de réplication, mais celui-ci est résolu par la TOP2 (Ye et al., 2010).

b. Le complexe CST

Le complexe CST a d'abord été mis en évidence chez les levures *S. cerevisiae*. Il est composé de trois protéines ; Cdc13, Stn1 et Ten1 qui sont importantes pour la protection et la réplication des télomères (Gao et al., 2007; Qi and Zakian, 2000). Les homologues de Stn1 et Ten1 ont été identifiés chez l'homme, mais une autre protéine nommée CTC1 (Conserved Telomere maintenance Component 1) qui a peu de similarité avec cdc13, forme le complexe trimérique. Le complexe CST humain, comme celui des levures, contient un domaine OB-fold qui permet la liaison à l'ADN simple brin et l'interaction avec d'autres protéines. Il a été démontré que les protéines Stn1 et CTC1 stimulaient l'ADN polymérase α nécessaire à la synthèse et l'élongation des amorces ARN pour la réplication du brin indirect (Casteel et al., 2009). Cette fonction ainsi que la similarité structurale de ce complexe avec la protéine de réplication RPA, sont à l'origine de son appellation ; t-RPA (Giraud-Panis et al., 2010; Miyake et al., 2009). Ce complexe serait donc comme la protéine RPA, important pour la réplication d'ADN aux télomères. En plus, la co-purification de Stn1 avec la protéine shelterin TPP1 suggère l'existence de complexes CST-shelterin (Wan et al., 2009) et ceci malgré la liaison du CST humain aux télomères indépendamment de la protéine POT1 (Miyake et al., 2009).

V. Réplication des télomères

La réplication des télomères répond au fonctionnement conventionnel semi-conservatif qui existe pour le reste du génome. Toutefois, d'autres étapes viennent s'ajouter à ce mécanisme. Elles impliquent le passage de la fourche le long de l'ADN duplex suivi de la transformation de l'extrémité 3' d'ADN en brin protrusif G-riche, essentiel pour la liaison des shelterin, la formation de la T-loop, l'activité de la télomérase et la maintenance de la taille des télomères (Gilson and Géli, 2007).

A partir des origines de réplication situées en région subtélomérique, les télomères sont répliqués unidirectionnellement et ceci au cours de la phase S, des cellules humaines (Wright et al., 1999). L'ADN polymérase α réplique le brin « directeur » (CCCTAA) en direction 5' à 3' de manière continue donnant naissance au brin direct (Leading) mais elle est incapable de

répliquer seule le brin inverse nécessaire à la synthèse du brin indirect (Lagging) (Watson, 1972). En effet, pour la synthèse du brin indirect, l'ADN polymérase α requiert un donneur 3' hydroxyle pour initier la polymérisation, c'est pour cela qu'elle a recours à des amorces d'ARN, formant ainsi, des fragments ADN/ARN appelés fragments d'Okazaki. Une fois que l'ADN polymérase se détache, les amorces d'ARN sont dégradées, les trous sont remplis par la polymérase δ et les fragments d'Okazaki consécutifs sont assemblés entre eux.

Cependant, le télomère généré par la synthèse du brin indirect va automatiquement avoir un brin protrusif en 3' due à l'enlèvement de l'amorce d'ARN sur le dernier fragment d'Okazaki générant un trou que l'enzyme polymérase est incapable de compléter. En ce qui concerne l'autre brin, il y a intervention d'une enzyme éxonucléase qui dégrade l'extrémité 5' du brin parental complémentaire au brin direct générant aussi un brin G-riche protrusif. En absence de mécanisme de compensation, ce processus est responsable du raccourcissement continu des télomères après chaque division cellulaire, il est appelé 'problème de réplication des extrémités' (Sfeir et al., 2005) (**figure 8**).

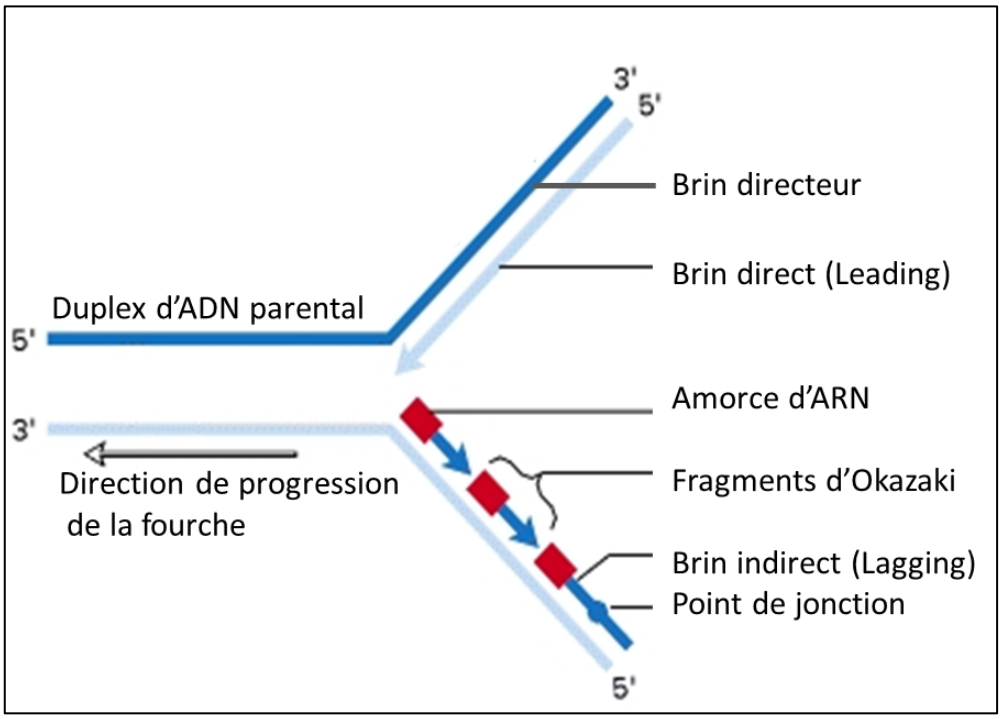


Figure 8. Représentation schématique de la réplication.

1. Protéines impliquées dans la réplication des télomères

Plusieurs protéines ont été rapportées pour être importante à la progression de la fourche de réplication. C'est le cas de la protéine TRF1 dont l'inhibition serait responsable d'apparition de signaux télomériques multiples (MTS), suspectés pour apparaitre seulement en cas de défaut réplicatif (Blanco et al., 2007; Muñoz et al., 2009). Des obstacles de la fourche de réplication peuvent apparaitre, potentiellement au niveau de l'extrémité G-riche ou au duplex d'ADN vu la nature répétitive des séquences qui peuvent former des structures secondaires. La structure G-quadruplexe en est un exemple, mais la protéine hélicase WRN (Werner syndrome ATP-dependent helicase) a été mise en évidence pour être capable de résoudre cette structure qui bloquerait la progression de la fourche (Crabbe et al., 2004). L'absence de cette protéine dans des cellules de souris, induit la perte d'ADN au brin indirect (Chang et al., 2004). La structure T-loop peut aussi être à l'origine de l'arrêt de la réplication. Cette dernière est maintenue par la protéine TRF2 qui favorise l'enroulement positif de l'ADN dans un but de protection (Amiard et al., 2007). Cependant ce changement de topologie est un problème qui est résolu par les Topoisomérases I et II (Nitiss, 2009), en combinaison avec TRF2 et la protéine Apollo afin de permettre la réplication des extrémités télomériques (Ye et al., 2010). Il y a aussi l'intervention de protéines additionnelles tels que les hélicases BLM, RTEL et le complexe CST (Ding et al., 2004; Price et al., 2010) qui favorisent l'ouverture de la boucle.

2. Horloge biologique

Le raccourcissement des télomères dû au problème de réplication correspond à une horloge biologique (Olovnikov, 1971). Comme évoqué précédemment, il y a perte d'ADN sur le brin indirect dû à l'incapacité de l'ADN polymérase de synthétiser sans l'intervention d'amorces d'ARN qui sont dégradés par la suite. D'autre part, cette perte est liée à la nécessité de former une extrémité sortante (Dionne and Wellinger, 1996; Wright et al., 1997). Cependant, il existe un mécanisme pour compenser ce raccourcissement de 50-200pb et ce par l'intervention d'une enzyme particulière : la télomérase. Cette dernière ajoute des répétitions télomériques à l'extrémité 3' simple brin après la réplication (Gilson and Géli, 2007) (**figure 9**).

La télomérase est exprimée dans les cellules germinales et cellules souches ainsi que dans les cellules cancéreuses où elle permet leur prolifération infinie. Par contre, l'expression de la télomérase est généralement réprimée dans les cellules somatiques, c'est pourquoi, les télomères se raccourcissent après chaque division cellulaire (Flores et al., 2008). Ainsi, cette perte de longueur de télomères est corrélée avec le vieillissement.

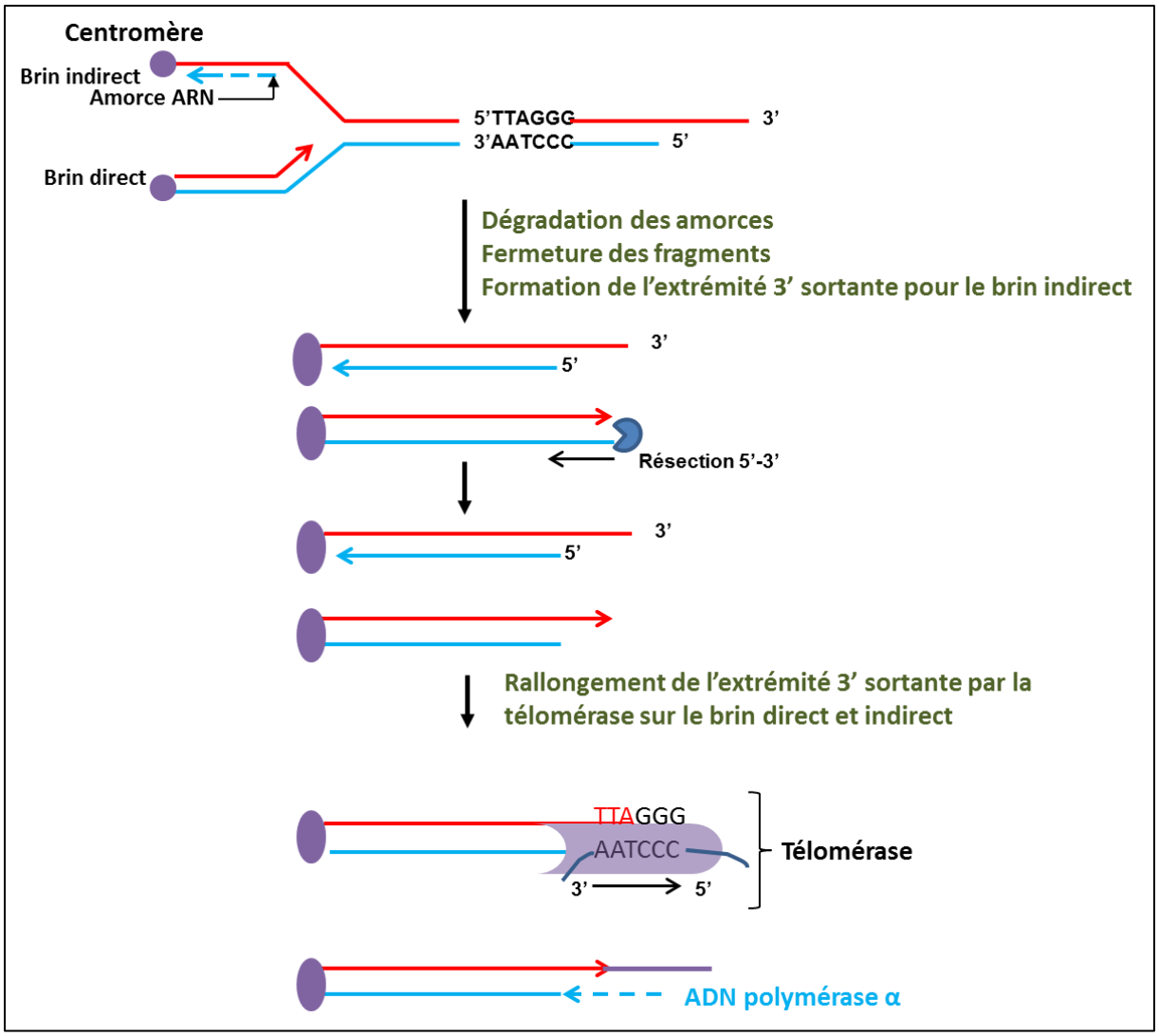


Figure 9. Représentation schématique de la réplication des télomères avec intervention de la télomérase.

3. Sénescence réplicative

L'absence d'expression de l'enzyme télomérase dans les cellules somatiques, empêche la réplication des télomères. Ceci génère un raccourcissement continu de la longueur des télomères après chaque division cellulaire, et une fois que la taille atteint un seuil critique appelé, « la limite de Hayflick » (Pas plus de 40-60 divisions), un arrêt irréversible de la division cellulaire nommé sénescence réplicative est alors induite (Sozou and Kirkwood, 2001).

C'est au début des années 1990, que Jerry Shay avec son équipe, a mis en place une technique pour mesurer l'activité télomérase. Par transfection de hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) dans des cellules télomérase négatives, il a observé une restauration de l'activité télomérase. Cette transfection montre des cellules qui exhibent des télomères

rallongés, une durée de vie infinie avec moins de sénescence (Kim et al., 1994). Cette sénescence peut être induite autrement que par l'inactivation de la télomérase, mais aussi par l'inhibition de TRF2 qui induirait une réversion du phénotype malin dans une lignée de mélanome humain (Biroccio et al., 2006).

Il est maintenant connu que l'attrition excessive des télomères engage l'arrêt de la division cellulaire et/ou la sénescence en activant la voie p53/pRb. Eviter ce contrôle ou inactiver ces checkpoints crée une instabilité génétique provoquant une crise cellulaire. Cette crise est un état caractérisé par le raccourcissement excessif des télomères, leurs fusions et la mort cellulaire. Cette inhibition de la croissance dépendante de la longueur des télomères a été proposée comme étant le mécanisme principal de suppression tumorale in vivo, car elle représente une barrière vis-à-vis de la prolifération cellulaire illimitée et de l'instabilité génomique. Mais contourner cette sénescence en inhibant les suppresseurs de tumeurs (p53, pRB) et en réactivant la télomérase permet le maintien des télomères et la réactivation du cycle cellulaire. Ce processus aboutit donc à la prolifération des cellules transformées immortalisées, autrement dit, à l'émergence des clones cancéreux (Klingelhutz, 1999) (**figure 10**).

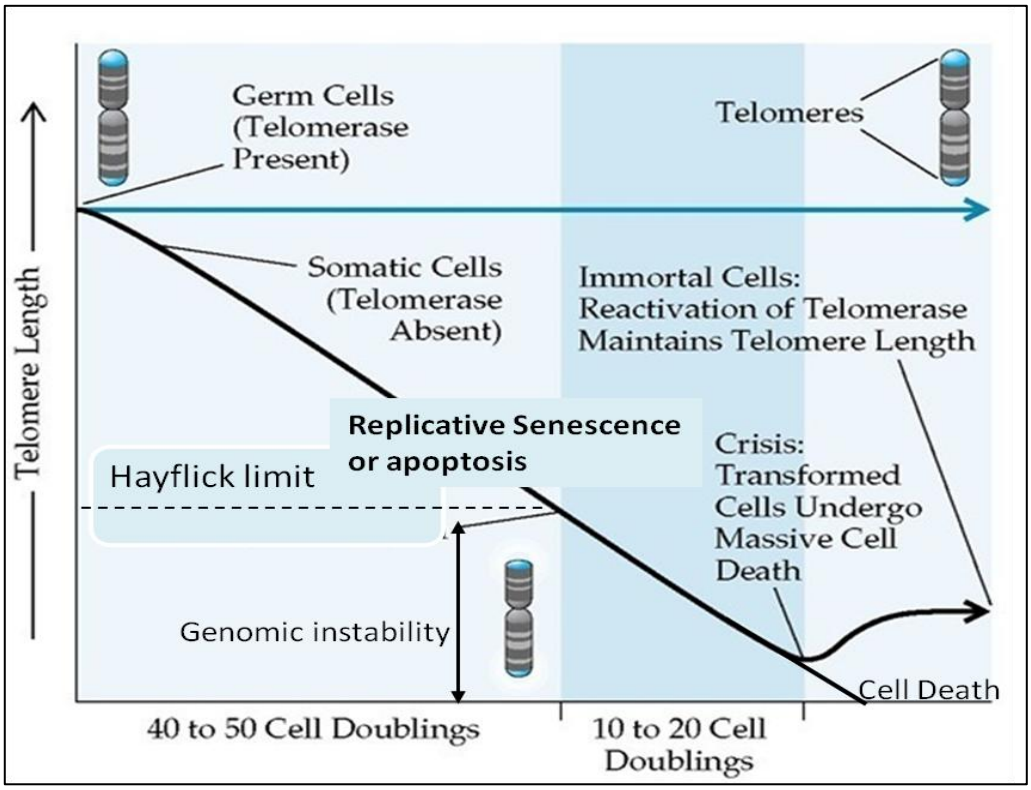


Figure 10. Représentation graphique illustrant la diminution de la taille des télomères au cours des divisions cellulaires et les conséquences associées.

Cependant, dans 10-15% des cancers humains, l'immortalisation est assurée par une autre voie qui requiert des évènements de recombinaison; la voie ALT (Alternative Lengthening of Telomeres). Ces extrémités chromosomiques représentent donc une cible thérapeutique prometteuse pour différents cancers.

VI. Transcription au télomère

L'hétérochromatine présente des marques épigénétiques qui répriment la transcription. Ainsi l'insertion de gènes rapporteurs en région subtélomérique entraîne leur répression. Ce phénomène est appelé effet de position télomérique « TPE » (Telomere Position Effect) (Gottschling et al., 1990). Il a d'abord été décrit chez D. melanogaster (Hazelrigg et al., 1984) puis observé chez les levures (Gottschling et al., 1990; Pryde and Louis, 1999), la souris (Pedram et al., 2006) et l'humain (Baur et al., 2001), indiquant sa conservation au cours de l'évolution. Ce processus établit un état silencieux des gènes mitoyens des répétitions télomèriques et semble répondre à la longueur des télomères et la structure de la chromatine: plus le télomère est long, plus la chromatine est réorganisée et plus fort est le TPE (Ottaviani et al., 2008). En effet, des expériences de surexpression de la télomérase montrent une répression de l'expression du gène rapporteur de la luciférase inséré à proximité des répétitions télomériques. Aussi, la surexpression de TRF1 qui induit le raccourcissement des télomères, lève cette répression (Koering et al., 2002). En ce qui concerne l'implication de l'état épigénétique, des travaux d'inhibition des déacétylases par traitement à la trichostatine A, montrent une dérépression de la transcription d'un transgène en position télomérique accompagnée d'une diminution de la longueur des télomères (Baur et al., 2001; Koering et al., 2002).

Sachant alors que les télomères sont caractérisés par le phénomène TPE et vu leur nature hétérochromatinienne avec une faible densité de gènes en région subtélomérique, il a longtemps été accepté que les télomères soient transcriptionnellement silencieux. Cependant, des molécules d'ARN non codants transcrits par l'ARN polymérase II ont été découvertes chez la souris, la levure *S. cerevisaie*, le poisson zèbre et chez l'homme (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008) ; elles sont nommés TERRA (Telomeric Repeats containing RNA). Ces ARN sont majoritairement transcrits à partir des régions subtélomériques, sont coiffés et à 7% polyadénylés (Azzalin and Lingner, 2008). Leur taille varie entre 100 bases jusqu'à 9 kb et ils sont capables de former des structures secondaires impliquant les répétitions télomériques (telles que des G-quadruplexes) (Azzalin et al., 2007; Xu et al.,

2008). Dans les cellules immortalisées, la longueur moyenne d'un télomère est corrélée avec le taux de transcription de TERRA (Schoeftner and Blasco, 2008). Les régions subtélomériques de 20 chromosomes humains partagent une région conservée qui comprend des éléments répétés de 61 pb, 29 pb puis 37 pb et ceci dans le sens centromère vers télomère (Brown et al., 1990; Nergadze et al., 2009) . Les répétitions de 29 pb et 37 pb se retrouvent au niveau des ilots riches en CpG (Juven-Gershon et al., 2008). En plus, les sites de transcription (TSS ; Transcription Start Site) sont localisés à 27 pb en aval du dernier élément de 37 pb et environ 250 pb en amont des répétitions télomériques (Nergadze et al., 2009). Au niveau de ces sites, la transcription générant les TERRA est régulée positivement par le facteur d'organisation de la chromatine CTCF et la cohésine Rad 21 (Deng et al., 2012a).

Ces ARN sont régulés par des protéines de types SMG (Suppressors with Morphogenetic defects in Genitalia) qui font partie de la voie de dégradation des transcrits présentant des codons stop prématurés appelée NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay) (Azzalin et al., 2007; Luke et al., 2008). De plus, les TERRA sont restreints au noyau et sont sous le contrôle du cycle cellulaire : il y a un pic d'accumulation en G1 suivi d'une diminution drastique en fin de phase S et G2 (Porro et al., 2010). TRF2 est en partie responsable de cette localisation aux télomères car elle fixe par son domaine N-terminal l'ARN TERRA (Deng et al., 2009).

Un groupe de protéines interagissant avec TERRA et important pour son renouvellement dans la cellule, a été mis en évidence. L'effet le plus marquant sur les niveaux totaux de l'ARN a été attribué à la protéine SRRT/ARS2, une enzyme qui intervient dans la maturation des miRNA et à la protéine MORF4L2, un composant du complexe histone acétyl transférase NuA4. La déplétion de ces facteurs cause respectivement l'augmentation et la diminution des TERRA (Scheibe et al., 2013). Les ribonucléoprotéines hnRNP ont aussi été identifiées pour interagir avec TERRA chez l'homme et la souris et pourraient affecter négativement la stabilité de l'ARN (Deng et al., 2012a; Scheibe et al., 2013).

Différentes données suggèrent que le taux du transcrit TERRA est sensible au changement des marques hétérochromatiniennes en régions subtélomériques et télomériques. Deng et al. fournissent la première évidence d'un rôle potentiel de TERRA dans l'établissement d'un état hétérochromatinien aux télomères par la découverte d'une interaction entre TERRA et le complexe de reconnaissance d'origine de réplication (ORC) (Deng et al., 2009). En plus de son rôle dans le pré-assemblage du complexe de réplication, ORC avait été impliqué dans la répression transcriptionnelle, la formation d'hétérochromatine et la condensation mitotique de

la chromatine (Sasaki and Gilbert, 2007). Chez les eucaryotes, l'hétérochromatine semble influencer les niveaux globaux de TERRA. En effet, dans les cellules de souris déficientes en HMTases Suv39h ou Suv4-20h, les niveaux de TERRA sont augmentés (Azzalin and Lingner, 2008). De même dans des cellules souches embryonnaires de souris, les TERRA issus des régions où l'hétérochromatine télomérique adopte une structure plus relâchée, sont augmentés (Marion et al., 2009). Par contre, l'histone H3K9 méthyltransférase et l'histone HP1α régulent négativement l'expression de TERRA (Arnoult et al., 2012). Ainsi, la régulation de l'hétérochromatine par la méthylation d'ADN et les modifications d'histones impacte sur l'expression des TERRA.

Les TERRA seraient impliqués dans la régulation des télomères. Chez les mammifères, il y a fixation des protéines POT1/TPP1 au simple brin d'ADN télomérique mais durant la réplication la protéine RPA s'y fixe aussi. La protéine hnRNPA1 a aussi une affinité pour la séquence d'ADN simple brin (Redon et al., 2013). Cependant comment toutes ces protéines se fixent sur leur substrat durant le cycle cellulaire est encore mal connu. Des essais in vitro ont révélé le déplacement de RPA du simple brin par hnRNPA1 et cette dernière était en compétition avec les TERRA. L'hypothèse est que les TERRA et hnRNPA1 permettraient le switch de RAP1 à POT1/TPP1 après la réplication (Flynn et al., 2011).

VII. Différentes voies de maintien des télomères

Le nombre de répétitions en tandem des séquences télomériques est étroitement régulé, prévenant ainsi les télomères de devenir trop court ou trop long. L'homéostasie de la longueur des télomères est préservée par une dynamique qui balance entre addition et perte des répétitions télomériques. Le maintien de cet équilibre dépend de plusieurs facteurs : la composition en protéines associées à l'ADN télomérique, l'action de la télomérase mais aussi d'autres mécanismes tel que le phénomène ALT (Blasco, 2003).

1. Maintien par la télomérase

a. Structure

En 1985, la découverte d'une enzyme capable d'ajouter chez le cilié Tetrahymena thermophila, des séquences TTGGG sur une amorce simple brin, a valu le prix Nobel de médecine à Elisabeth Blackburn et ses collaborateurs. Cette holoenzyme, très conservée, est une ribonucléoprotéine avec un composant catalytique (chez l'humain appelé hTERT) et un composant ARN (hTERC ou hTR) (**figure 11**). La sous-unité ARN sert de matrice pour la

synthèse d'ADN par complémentarité à l'extrémité simple brin G-riche des télomères. Toutes les cellules somatiques humaines expriment constitutivement hTR mais l'expression de télomérase active dépend de la présence ou non d'hTERT (Nakamura et al., 1997).

En effet, la protéine hTERT est une ADN polymérase appartenant à la famille des transcriptases inverses, constituées de plusieurs domaines dont un, responsable de l'activité catalytique de l'enzyme (Bachand and Autexier, 2001).

Plusieurs protéines interagissant avec hTERT et hTR sont requises pour l'assemblage, la conformation et la localisation nucléaire de la télomérase (Beattie et al., 2001; Holt et al., 1999). Il y a parmi elles des protéines chaperonnes telles que HSP90 et P23, qui permettent l'assemblage du complexe, et la dyskérine, une protéine associée à la télomèrase et qui est aussi impliquée dans la genèse des ribosomes.

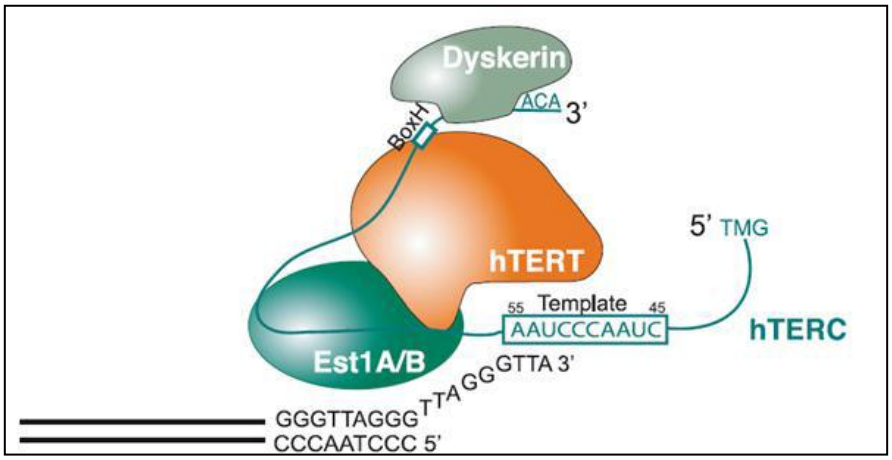


Figure 11. Représentation schématique de la télomérase humaine (D'après (Smogorzewska and de Lange, 2004). La télomérase est constituée d'une partie ARN codée par hTERC et d'une sous-unité protéique codée par hTERT. Le complexe télomérase regroupe d'autres protéines telles que EST1 et la dyskérine.

b. Fonctions de la télomérase

i. Elongation : L'une des conséquences prévisibles de la perte de protection des chromosomes serait la perturbation de l'élongation de ces extrémités, causée par la dérégulation de l'accès de la télomérase aux télomères. En effet, la télomérase est une enzyme processive (Greider, 1991) qui allonge les télomères et ceci selon trois étapes: la reconnaissance de l'extrémité 3' et l'hybridation de la matrice ARN au substrat, suivi de l'élongation de l'extrémité 3' via la «rétro-transcription» de hTR, et enfin, la translocation du complexe télomérase avec repositionnement de la matrice ARN par rapport au substrat pour initier un second cycle (**figure 12**). Une fois la synthèse complètement achevée, le complexe

est déplacé grâce à une hélicase PIF1 qui dissocierait l'ADN de hTR (Boulé et al., 2005; Snow et al., 2007).

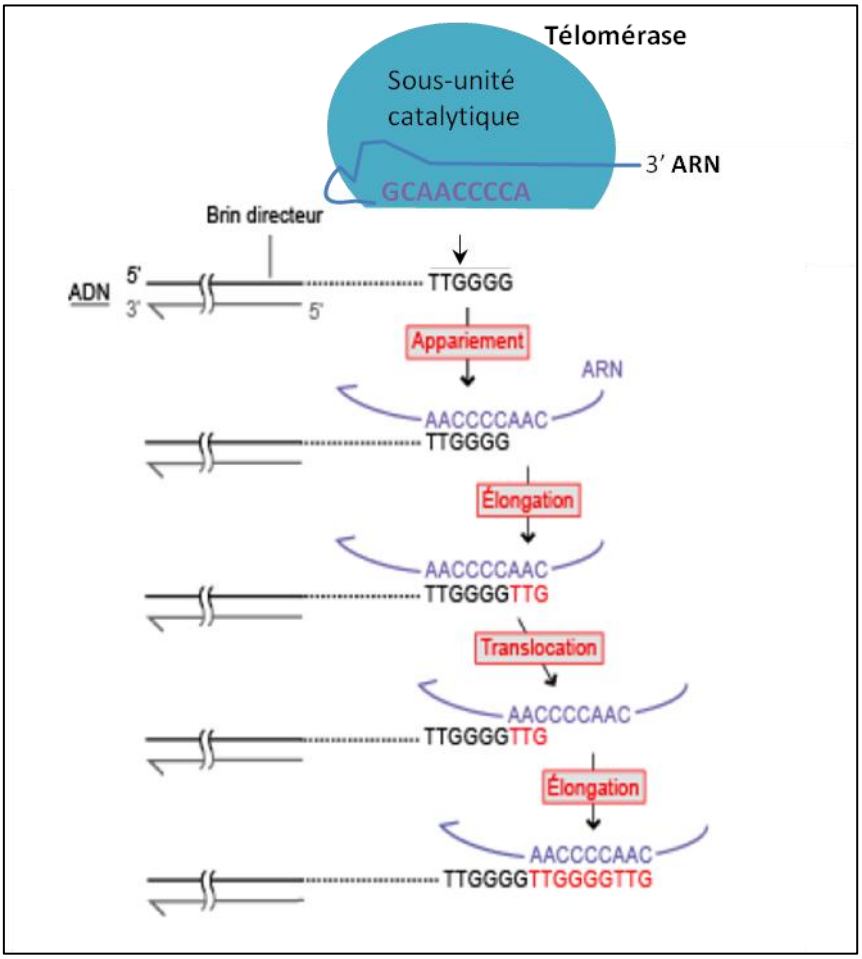


Figure 12. Modèle d'élongation par la télomérase. (D'après (Kelleher et al., 2002)).

Cette activité d'élongation est régulée en fonction du cycle cellulaire : chez les mammifères, elle est restreinte à la phase S (Tomlinson et al., 2006). A cette même période, des corps nucléaires nommés Cajal Bodies (CB) qui sont des sites de transcription des ARN histones, jouent aussi un rôle dans la maintenance des télomères. Ils seraient importants pour la maturation et le recrutement de la télomérase aux télomères (Londoño-Vallejo and Wellinger, 2012; Stern et al., 2012).

ii. Protection : La télomérase exerce une protection des télomères contre d'éventuelles fusions (Blackburn, 2001; Melek and Shippen, 1996). Par contre, elle agirait de préférence sur les télomères les plus courts car il a été démontré que dans les cellules immortalisées humaines qui ont de longs télomères et expriment hTERT, les télomères continuent à se

raccourcir alors que dans les cellules aux télomères plus courts ils sont stabilisés (Zhu et al., 1999). Cet allongement préférentiel des télomères les plus courts serait établi par simple localisation de la télomérase à leur niveau, afin de limiter les signaux responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (der-Sarkissian et al., 2004).

iii. Tumorigenèse : En 1994, deux groupes ont rapporté qu'il y avait une activité télomérase dans des tissus cancéreux humains, cancers de l'ovaire et hématopoïétiques (Counter et al., 1994; Nilsson et al., 1994). D'autres évidences de l'association de la télomérase avec la tumorigenèse sont ensuite apparues grâce à l'élaboration de la technique TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) qui permet de mesurer quantitativement l'activité télomérase (Hiyama and Hiyama, 2002). Il a été montré que l'expression de la télomérase dépourvue de sa fonction catalytique nécessaire au maintien de la taille des télomères, arrivait à restaurer seule, un état tumorigène. C'est ce qui est observé lors de l'introduction de la télomérase dans les cellules ALT, ces cellules qui habituellement maintiennent leur taille de télomères sans induire de tumeurs. La télomérase joue donc bien un rôle dans la tumorigénèse indépendamment de son rôle de maintien de la longueur des télomères (Stewart et al., 2002).

iv. Fonctions non associées aux télomères : En plus de son rôle prolifératif, la télomérase protège aussi les cellules de la mort cellulaire ; elle a donc un rôle anti-apoptotique (Folini et al., 2005). En effet, des travaux de surexpression de télomérase sous exposition à des radiations ionisantes ou stress génotoxique montrent un caryotype peu remanié (Pirzio et al., 2004).

c. Régulation de l'activité télomérase

La régulation de la télomérase est dépendante de l'expression de la sous-unité hTERT. hTR est exprimé de manière ubiquitaire alors que hTERT est présente dans les cellules immortalisées, mais est quasi-absente dans les cellules somatiques (Feng et al., 1995) ce qui explique la présence d'activité télomérase dans 85% des tumeurs (Kim et al., 1994). Le promoteur régulant hTERT regroupe différents sites potentiels de liaison de facteurs de transcription. Le couple c-MYC et son antagoniste MAD1 sont dans cet ordre, des exemples d'activateur et répresseur de hTERT (Xu et al., 2001). De plus, la régulation épigénétique telle que la méthylation apparait importante. En effet, l'expression de la télomérase peut être réprimée si les îlots CpG qui constituent les séquences promotrices sont méthylés (Lopatina et al., 2003). Par ailleurs, dans des lignées télomérase-positives, une acétylation des histones H3 et H4 est observée (Atkinson et al., 2005; Hou et al., 2002). Il est aussi probable, bien que ce

ne soit pas clairement établi, que l'épissage alternatif des transcrits de TERT module négativement l'activité télomérase (Ulaner et al., 2000). Il a récemment été montré que l'épissage alternatif pouvait aboutir à des formes non fonctionnelles ; seul le transcrit entier, sans délétions ni insertions, donne lieu à une protéine hTERT active.

2. Maintien par les Shelterin

Le complexe shelterin participe à l'homéostasie des télomères. Il remplit de nombreuses fonctions en coopération avec des partenaires qui le prenne pour plateforme télomérique.

a. Maintien de la taille des télomères

Chez les mammifères, les composants shelterin sont quantitativement associés aux télomères, requièrent les répétitions TTAGGG pour s'assembler et sont présents aux télomères le long du cycle cellulaire (van Steensel and de Lange, 1997). Cette localisation est stratégique dans le but d'estimer la taille des télomères pour établir un équilibre entre l'élongation et le raccourcissement des extrémités. Et ceci n'est possible qu'à travers la régulation de l'accès de la télomérase aux télomères.

Différents travaux d'inhibition et de surexpression de facteurs shelterin ont été effectués. La protéine POT1 est la seule shelterin à fixer spécifiquement la télomérase au niveau du brin 3' sortant. Le remplacement de POT1 par une forme tronquée pour son domaine de fixation à l'ADN simple brin, induit l'augmentation rapide et importante de la taille des télomères, dépendamment de l'expression de la télomérase. Il a aussi été démontré que la présence de POT1 sur l'extrémité télomérique réduirait l'activité télomérase (Kelleher et al., 2005; Lei et al., 2005). La protéine TPP1 qui se lie à POT1 est aussi impliquée dans le maintien des télomères. Sa déplétion induit la diminution de POT1, la libération des extrémités télomériques et leur accessibilité à la télomérase pour être rallongées (Wang et al., 2007).

Toujours dans le but de maintenir l'équilibre de la longueur des télomères, la présence de TRF1 et TRF2 permet au couple TIN2-POT1 d'inhiber l'action de la télomérase. Alors que l'absence de TRF1, diminue POT1 entrainant l'élongation des télomères (Houghtaling et al., 2004). Il a aussi été rapporté que le raccourcissement est une conséquence directe de l'augmentation des niveaux de TRF1 et TRF2 aux télomères et ce n'est pas par un effet *trans* favorisé par la surexpression des protéines (Ancelin et al., 2002). Tout ceci suggère que TRF1 agit en cis pour inhiber la télomérase, c'est-à-dire : si le télomère est long, il y a recrutement d'un grand nombre de TRF1 pour empêcher l'élongation et si le télomère est court il y a

moins de TRF1 permettant l'intervention de la télomérase. En ce qui concerne TRF2, elle agirait aussi en cis mais pas en réprimant simplement la télomérase. Une étude avait révélé que la surexpression de TRF2 dans des fibroblastes délétés pour la télomérase, engendrait l'augmentation du taux de télomères raccourcis. TRF2 serait alors susceptible d'activer un mécanisme de dégradation d'ADN télomérique (Ancelin et al., 2002).

Cependant, les autres facteurs shelterin peuvent aussi intervenir directement sur la taille des télomères. C'est le cas pour RAP1 dont le rôle de régulateur négatif des télomères est avéré chez la levure (Marcand et al., 1997) mais qui nécessite l'interaction avec TRF2 chez l'homme (Li et al., 2000a; O'Connor et al., 2004). TIN2, importante pour réguler la présence de POT1, est aussi nécessaire pour inhiber l'action de TANK1, une polymérase poly(ADP-ribose) (PARP) responsable d'élongation des télomères au détriment de TRF1 (Donigian and de Lange, 2007). En effet, en présence de TANK1, TRF1 est poly(ADP) ribosylé et perd son affinité pour les télomères (Smith and de Lange, 2000). Ainsi, les modifications des shelterin ont une incidence sur la taille des télomères.

b. Maintien de la stabilité des télomères

Comme je l'avais déjà mentionné auparavant, la déprotection des télomères entraine leur association à des facteurs impliqués dans la réponse aux dommages comme 53BP1, Rad17 (Dimitrova and de Lange, 2006; Takai et al., 2003) formant ainsi des TIFs. C'est ce qui est observé lors de l'absence de TRF2 et POT1 où des cassures chromosomiques sont générés aux télomères (Celli and de Lange, 2005; Hockemeyer et al, 2005). La formation de TIFs est aussi observée en surexprimant un mutant de TIN2 qui est tronqué au niveau du domaine d'interaction avec TRF1 et TRF2 (Kim et al., 2004). Ces phénomènes de déprotection des télomères les entrainent vers une réparation délétère pour la cellule, soit par l'intermédiaire du NHEJ, soit par la recombinaison homologue.

Pour éviter que les télomères soient reconnus comme des cassures ou DSB (Double Strand Break), les séquences télomériques, à l'aide des facteurs shelterin, développent la structure T-loop qui cache l'extrémité 3'. En plus, les protéines shelterin inhibent les protéines de signalisation du dommage ATM et ATR. En effet, la surexpression de TRF2 inhibe ATM sur les séquences non télomériques (Karlseder et al., 2004; Zhu et al., 2000). L'absence de TRF2 génère des TIFs et des fusions de télomères avec une réponse aux dommages à l'ADN transduite par ATM, montrant alors que TRF2 réprime aussi ATM aux télomères (Celli and

de Lange, 2005). En ce qui concerne ATR, c'est la protéine POT1 qui est suspectée d'être l'auteur de sa répression (**figure 13**).

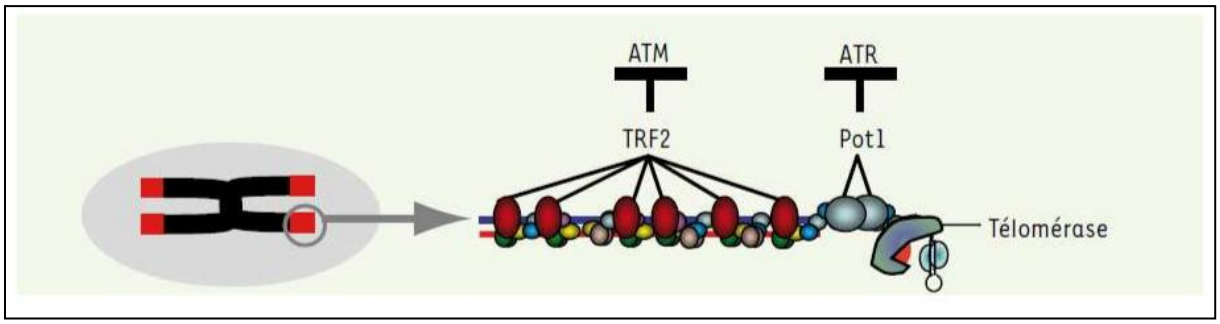


Figure 13. Répression des voies ATM/ATR par les shelterins.

3. Maintien par recombinaison (ALT)

Bien que la plupart des cellules immortalisées et cancéreuses expriment une activité détectable de télomérase, une minorité significative n'expriment pas hTERT mais maintiennent leurs longueurs télomériques par un second mécanisme nommé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres). Ce mécanisme alternatif a été identifié chez la levure où des mutants pour hTR, activent une voie de maintien par recombinaison (Lundblad and Blackburn, 1993). Deux types de survivants ont été décrits : le type I qui maintient ses télomères en allongeant les séquences subtélomériques alors que le type II amplifie les séquences télomèriques (Teng and Zakian, 1999).

Chez l'homme, environ 15% de cellules cancéreuses ont recours au ALT (Bryan et al., 1997). Il consiste à allonger les extrémités par recombinaison homologue entre les répétitions d'ADN télomériques et cet évènement est très certainement lié à la réplication d'ADN et est provoqué par une mutation de la protéine P53 dans le cas de patients atteints de la maladie de Li-Fraumeni. Ces cellules sont caractérisées par une hétérogénéité de la taille des télomères (de 3 à 50kb) (Murnane et al., 1994; Opitz et al., 2001), par la présence de cercles d'ADN télomériques extrachromosomiques et par des agrégats intra-nucléaires appelés APB (Associated ALT PML Bodies) (Henson et al., 2002; Yeager et al., 1999). Ces APB sont enrichis en une protéine PML associée à de l'ADN télomérique, en des protéines shelterin (TRF1 et TRF2) et en des protéines de recombinaison et réparation de l'ADN (Rad51, Rad52, MRN, BLM…) (Dantzer et al., 2004; Nabetani et al., 2004). Ces structures APB représentent

peut être le milieu où l'ADN télomérique assimilé à une lésion ou un intermédiaire de recombinaison, pourrait être réparé.

a. Mécanisme **:** Le mécanisme ALT est loin d'être entièrement compris mais ressemble au mécanisme de conversion de gêne par la voie BIR (Break-Induced Replication). Deux modèles d'élongation des télomères par ALT sont possibles :

- L'échange asymétrique entre chromatides sœurs : afin de réparer les cassures synthétisées pendant la réplication, les chromatides sœurs échangent leurs brins (Blagoev and Goodwin, 2008). L'analyse des échanges entre chromatides sœurs a révélé que ce phénomène était fréquent dans les cellules ALT, il est nommé T-SCE (Telomere Sister Chromatid Exchange) mais n'est pas un marqueur exclusif de ce dernier car les cellules exprimant la télomérase échangent aussi leurs chromatides sœurs (Bailey et al., 2004a).
- Recombinaison inter-télomérique : l'extrémité 3' simple brin d'un chromosome, envahirait le télomère d'un chromosome adjacent pour l'utiliser comme matrice afin d'allonger sa taille. La matrice copiée peut être la séquence télomérique d'un chromosome mais aussi des structures circulaires « t-cirles », « c-cirles » ou même les boucles télomériques (T-loop) (Muntoni et al., 2009) (**figure 14).**

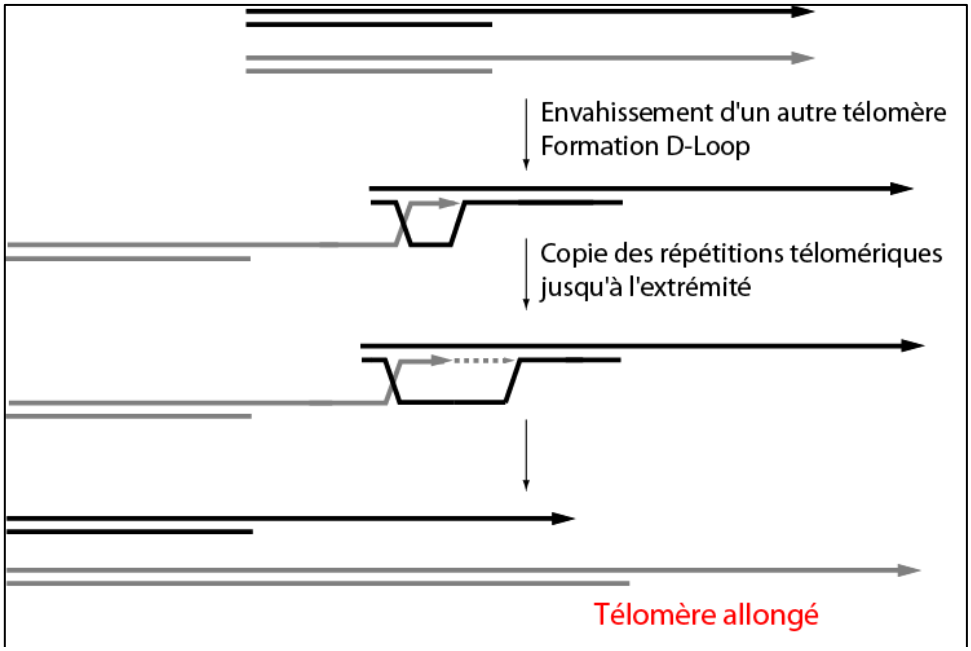


Figure 14. Mécanisme moléculaire d'élongation des télomères dans les cellules ALT. (d'après Ayouaz, 2008).

b. Génétique des ALT **:** Dans les cellules somatiques, ALT est totalement absent alors que la télomérase est exprimée transitoirement ou à un niveau basal. Plusieurs études suggèrent qu'il pourrait exister un contrôle qui réprime le mécanisme ALT mais les gènes régulateurs ne sont pas encore identifiés (Kumata et al., 2002; Shigeeda et al., 2003). Une maintenance par la télomérase peut coexister avec ALT indiquant, qu'ils ne sont pas mutuellement exclusifs (Perrem et al., 2001) même si certains proposent que l'expression de la télomérase pourrait inhiber le phénotype ALT (Ford et al., 2001).

Plusieurs candidats de répression du phénomène ALT ont été décrits ; P53, l'hélicase WRN et les protéines du MMR (MisMatch Repair). En effet, certaines lignées ALT sont immortalisées par des virus (HPV et SV40) capables d'inactiver P53 et RB. Aussi, les patients atteints du syndrôme de Li Fraumeni présentent une perte de P53/P16 qui est responsable de l'activation du mécanisme ALT (Rogan et al., 1995; Vogt et al., 1998). De plus, les protéines du MMR inhibent la recombinaison homologue des séquences imparfaitement appariées (Bechter et al., 2004). Par ailleurs, d'autres facteurs ont été décrits pour inhiber la recombinaison aux télomères. L'absence de TRF2 et de Ku70 dans des souris exprimant la télomérase, augmente le taux de T-SCE (Celli et al., 2006). C'est aussi le cas pour POT1 qui protège la taille de l'extrémité 3' qui serait recombinogène (He et al., 2006; Hockemeyer et al., 2006).

4. Maintien par le transcrit télomérique : TERRA

L'ARN TERRA est transcrit à partir du brin C-riche et c'est pourquoi il arbore des séquences complémentaires à la sous-unité ARN de la télomérase. Comme attendu, TERRA agit in vitro comme inhibiteur de la télomérase, en partie par l'hybridation de ces séquences avec l'ARN télomérase. Il a été démontré dans une étude que TERRA est impliqué dans la régulation de l'activité télomérase car leurs niveaux corrèlent négativement (Luke and Lingner, 2009; Schoeftner and Blasco, 2008). En effet, des expériences faites sur des embryons de souris en période d'activité télomérase, révèlent l'absence de TERRA. Ceci est corrélé avec le haut niveau de marques hétérochromatiniennes présentes avec la protéine télomérase et qui sont indicateurs d'une transcription réprimée. En plus, dans les cellules humaines, l'élongation de la taille des télomères par la télomérase inhibe la production de TERRA (Ng et al., 2009) mais est aussi observée, dans les mêmes conditions, l'augmentation de la longueur de TERRA. Ce qui suggère la possibilité d'un rétrocontrôle négatif de l'activité télomérase pour favoriser la transcription de TERRA (Azzalin et al., 2007). De plus, la possibilité que TERRA inhibe la

télomérase a été démonté in vitro mais ne semble pas se produire in vivo (Redon et al., 2010; Schoeftner and Blasco, 2008). Il a aussi été montré que lorsqu'il y a inhibition de TRF2 donc déprotection des télomères, les niveaux des transcrits augmentent fortement (Caslini et al., 2009). Ceci suggère la possibilité que TERRA deviennent fortement augmentés lorsque les télomères se raccourcissent dramatiquement, en absence de TRF2. De plus, les cellules ALT qui expriment aussi TERRA, sont caractérisées par une hétérogénéité de la taille des télomères. La réintroduction de la télomérase dans ces cellules, génère l'élongation des télomères les plus courts qui corrèle avec une diminution de l'expression de TERRA (Episkopou et al., 2014).

Par ailleurs, de récentes publications suggèrent que les TERRA n'affecteraient pas négativement la télomérase, in vivo. Farnung et al. observèrent que la télomérase allongeait les télomères qui expriment fortement TERRA due à l'absence des méthyltransférases DNMT1 et DNMT3b (Farnung et al., 2010). En accord avec ce résultat, les patients atteints du syndrome ICF, expriment la télomérase qui rallongent les télomères malgré les niveaux élevés des transcrits. Ainsi, une autre image est en train d'émerger où TERRA agirait positivement sur la régulation de la longueur des télomères in vivo.

En ce qui concerne les transcrits télomériques chez *Arabidopsis Thaliana* et *S. cerevisiae*, il existe aussi les ARRET, des anti-sens à TERRA (Luke et al., 2008; Vrbsky et al., 2010). Des siRNA dérivés de TERRA/ARRET interférent avec la méthylation de l'ADN télomérique, ce qui suggère la possibilité que TERRA ait un rôle pour la formation de l'hétérochromatine télomérique (Vrbsky et al., 2010).

5. Maintien par la structure chromatinienne

Les télomères ont longtemps été classifiés comme domaines constitutifs hétérochromatiniens, dû à la présence de modifications épigénétiques répressives à la transcription, telles que ; Histone H3 triméthylé à la lysine 9 (H3K9me3), Histone H4 triméthylé à la lysine 20 (H4K20me3), histone hypoacétylé et la présence de plusieurs isoformes de la protéine Hétérochromatine 1 (HP1) (García-Cao et al., 2004; Gonzalo et al., 2005, 2006). En outre, malgré l'absence d'îlots CpG susceptibles de subir la méthylation dans les répétitions télomériques de cellules somatiques humaines, les régions subtélomériques contiennent un grand nombre de cytosines hautement méthylées (Benetti et al., 2007a; Ottaviani et al., 2008;

Tilman et al., 2009). En plus, découvrir des transcrits contenant des répétitions télomériques, suggère une dynamique « ouverte-fermée » de la chromatine aux télomères. La perte de ces marques chromatiniennes coïncide avec l'élongation des télomères (García-Cao et al., 2004; Gonzalo et al., 2006). D'ailleurs, chez des souris où les télomères sont très courts car déficients pour la télomérase, les marques hétérochromatiniennes sont remplacées par celles de l'euchromatine (Benetti et al., 2007a). La méthylation agit aussi sur la taille des télomères, en effet, l'absence de méthyltransferases d'ADN (DNMT) et/ou des méthyltransferases d'histones, dans des cellules souches de souris, conduit à l'élongation des télomères avec augmentation d'échanges entre chromatides sœurs (Gonzalo et al., 2006).

Ces résultats révèlent l'implication de l'hétérochromatine télomérique dans la régulation de la taille des télomères, indépendamment de l'activité télomérase mais avec la possibilité d'intervention de la recombinaison homologue (Benetti et al., 2007a, 2007b; García-Cao et al., 2004).

VIII. Reconnaissance des dommages à l'ADN et réparation des télomères

La cellule distingue le télomère fonctionnel d'un dommage à l'ADN. Mais lorsque le télomère devient trop court ou déprotégé, il active une réponse aux dommages à l'ADN ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire, à la formation d'aberrations chromosomiques et éventuellement à une mort cellulaire (d' Adda di Fagagna et al., 2003, 2004; Bailey et al., 2004b; Bolzán and Bianchi, 2006; Hao et al., 2004; Karlseder et al., 2002, 2004; Slijepcevic, 2006; Slijepcevic and Al-Wahiby, 2005; Takai et al., 2003; Tarsounas et al., 2004). La réponse aux dommages à l'ADN pourrait aussi être suivie d'un mécanisme de réparation. Les télomères présentent alors en plus des protéines télomériques, des protéines de réparation et de signalisation de cassures.

1. Télomères et signalisation

Il existe plusieurs éléments importants pour la signalisation des cassures aux télomères.

a. La protéine ATM y figure comme étant primordiale pour la signalisation des cassures double brin mais aussi pour le maintien des télomères. En effet, un signal apoptotique qui est p53-dépendant, est diffusé par ATM lorsqu'il y a déprotection des télomères par absence de

TRF2 (Karlseder et al., 1999; Smogorzewska and de Lange, 2002) et se traduit par le recrutement de facteurs de réparation aux télomères sous forme de TIFs (Takai et al., 2003). Cette réponse est inhérente au type cellulaire ; pour les fibroblastes, l'altération favorise la sénescence des cellules alors que pour les lymphocytes c'est l'apoptose qui prédomine (Karlseder et al., 1999). Cependant, au niveau des télomères intacts, la répression d'ATM serait régie par TRF2 qui inhibe son autophosphorylation et abolit donc sa fonction de contrôle du cycle cellulaire et de signalisation du dommage (Denchi and de Lange, 2007; Karlseder et al., 2004) (**figure 15**).

b. La protéine ATR : Le second élément essentiel à la réparation est nommé ATR. L'activité de celle-ci répond principalement au blocage des fourches de réplication et aux lésions simple brin souvent induites par les UV. Peu d'études relatent le rôle d'ATR dans la maintenance des télomères. Toutefois, cette kinase accomplit bien un rôle de réponse aux dommages suite à l'absence d'ATM et l'érosion des télomères (Herbig et al., 2004). De plus, l'inhibition de cette protéine abolit à l'instar d'ATM à la formation de TIFs. Cependant, dans des conditions physiologiques, ATR est inhibé par POT1 car ce dernier agirait en compétition avec RPA pour se fixer au brin sortant 3' empêchant ainsi la fonction d'ATR (Denchi and de Lange, 2007) (**figure 15**).

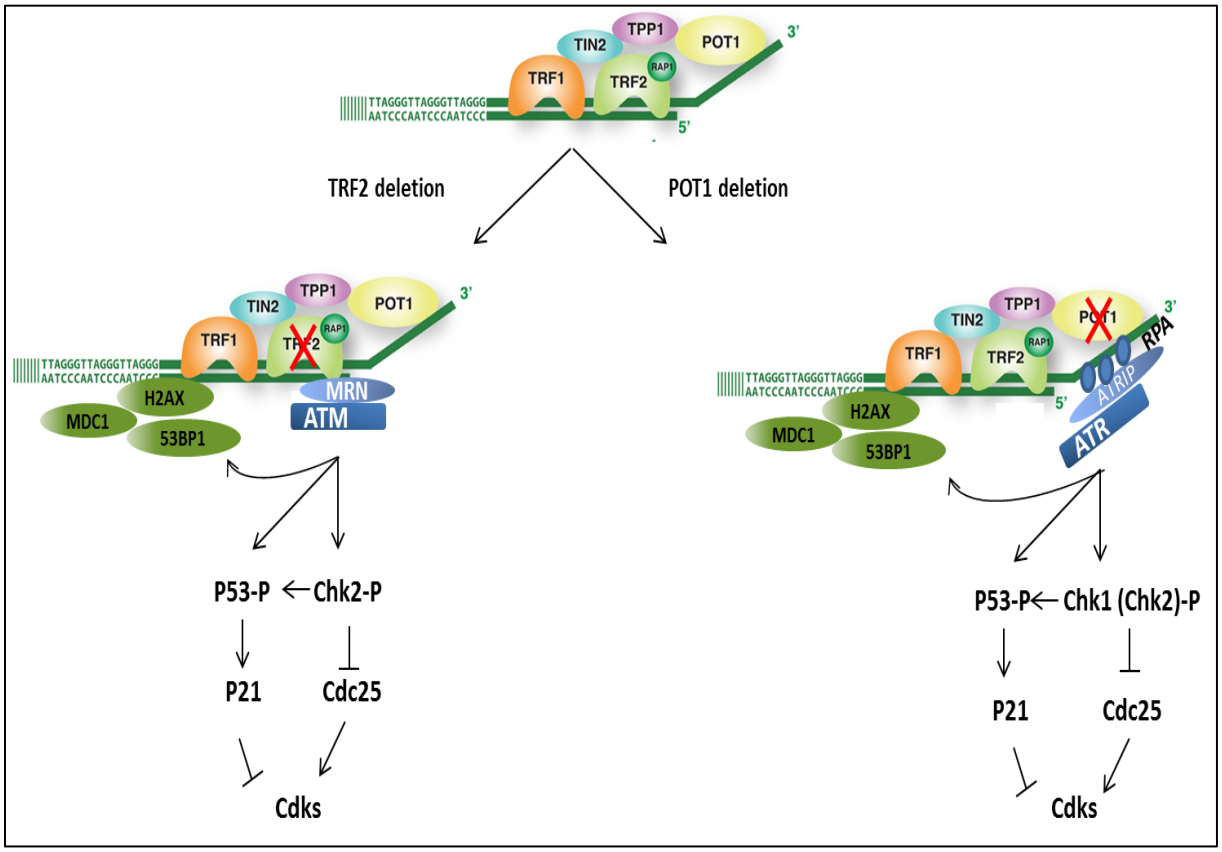


Figure 15. Représentation schématique des voies de signalisation au dommage à l'ADN. L'absence aux télomères de la protéine TRF2 et POT1 déclenche l'activation des voies ATM et ATR et le recrutement de protéines de signalisation de télomères dysfonctionnels (MDC1, 53BP1, gamma-H2AX) (Adapté de (Palm and de Lange, 2008)).

c. Le complexe MRN : Un autre élément est aussi recruté lors d'un dommage aux télomères ; le complexe MRN. Ce dernier interviendrait après le passage de la fourche de réplication en fin de phase S (Verdun and Karlseder, 2006). Le complexe MRN, constitué des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, se met en place après le signal de phosphorylation de l'histone H2AX par ATM (Petrini and Stracker, 2003). Après quoi, MRE11 reconnait par son activité nucléase la cassure (Buis et al., 2008) et fait intervenir RAD50, qui comble le trou entre les deux brins d'ADN cassés permettant alors la réparation.

2. Mécanismes de réparation des télomères

Une fois que la signalisation des cassures est effective, la réparation des télomères se met en place. En règle générale, quatre principales voies de réparation de l'ADN existent : la réparation par excision du nucléotide (NER pour Nucléotide Excision Repair), la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair), la réparation des mésappariements (MMR pour MisMatch Repair) et enfin la réparation des cassures double brin qui comprend la recombinaison homologue (RH pour Homologous Recombination) et la recombinaison non homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining).
Les deux derniers mécanismes sont ceux qui interviennent au niveau des télomères. En effet, l'activation des deux kinases ATM ou ATR (en fonction du dommage) conduit à la phosphorylation et à l'activation des régulateurs du cycle cellulaire p53, CHK1 et CHK2 qui facilitent l'arrêt en phase G1 et G2 permettant la réparation par le HR ou NHEJ (Khanna and Jackson, 2001). Actuellement, on ne sait pas très bien, quels sont les facteurs qui déterminent l'utilisation d'un mécanisme plutôt que l'autre, mais le stade du cycle cellulaire jouerait un rôle important dans cette décision. En effet, la RH est possible uniquement en phase S et G2 car elle nécessite un deuxième brin matrice. De plus, les CDK (Cycline-dependent Kinases) régulateurs de la progression du cycle cellulaire sont capables de moduler les deux mécanismes (Esashi et al., 2005; Konishi and de Lange, 2008).

a. Réparation des télomères par le NHEJ

Le NHEJ est présent dans les cellules de mammifères et est opérationnel durant toutes les phases du cycle cellulaire (Kim et al., 2005a; Rothkamm et al., 2003). Il se manifesterait aux

télomères suite à l'absence de la télomérase ou d'un facteur shelterin. Le mécanisme suit le même déroulement que dans le reste de la cellule, c'est-à-dire : l'hétérodimère Ku70/80 fixe les extrémités double brin au niveau de la cassure, puis, recrute la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) qui interagit avec l'ADN fixé à Ku pour former les complexes DNA-PKcs. Cette association assure le maintien des extrémités dans une configuration permettant leur ligation par XRCC4/Ligase IV après avoir phosphorylé XRCC4 (Leber et al., 1998). Le recrutement de l'endonucléase XRCC4/XLF assure aux sites déprotégés la dégradation du brin sortant en 3', une étape essentielle à la mise en place des fusions télomériques (Zhu et al., 2003) (**figure 16**).

Cependant, une hypothèse de l'existence d'un mécanisme NHEJ indépendant de Ku subsiste, ceci est dû à des observations de fusions télomériques en absence de Ku qui s'accompagneraient de raccourcissement de télomères (d' Adda di Fagagna et al., 1999).

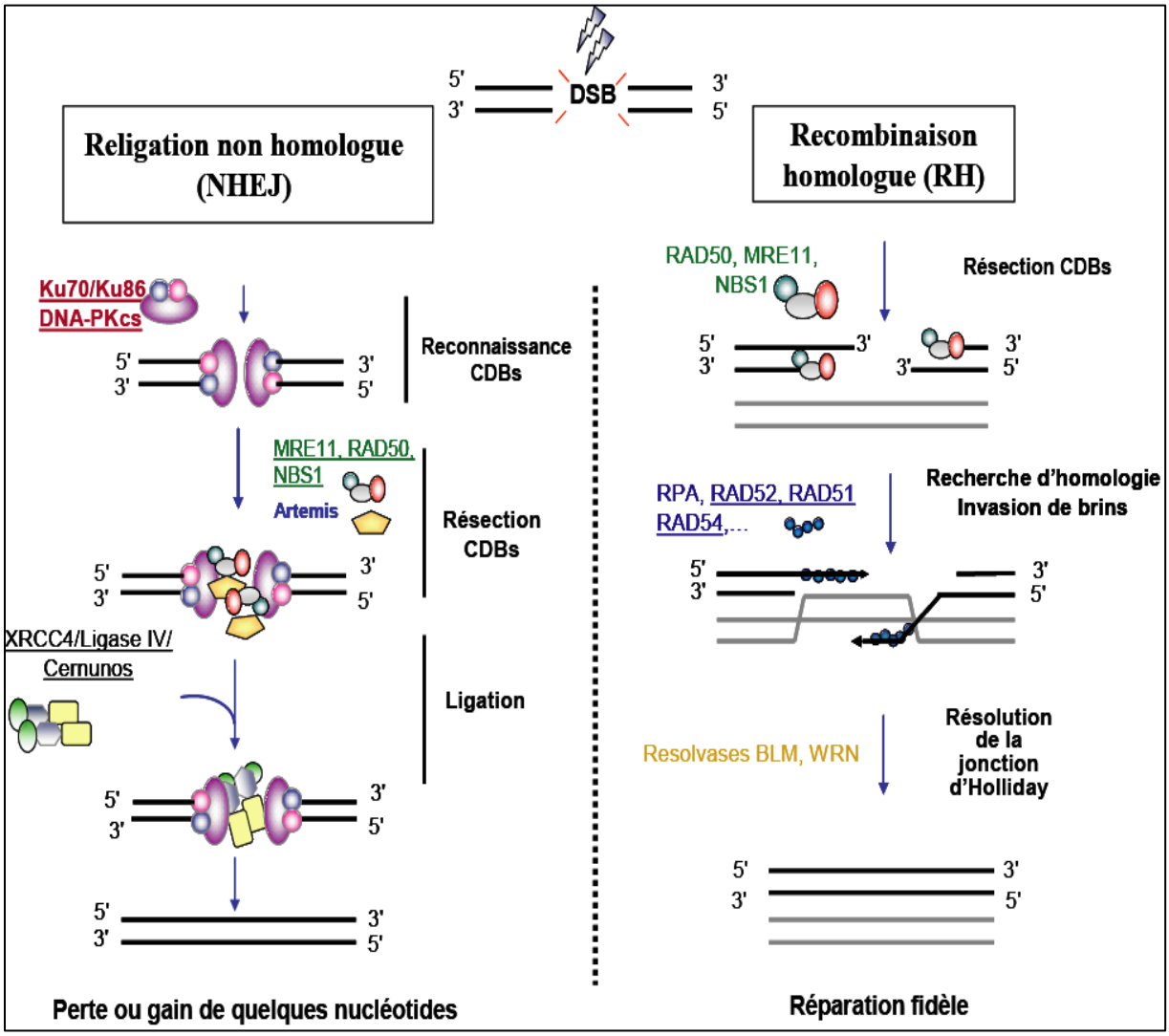


Figure 16. Représentation schématique des deux voies de réparation NHEJ et HR.

b. Réparation des télomères par le RH

Cette voie moins fréquente, est la plus souvent utilisée pour réparer des cassures en S/G2. Elle nécessite l'appariement d'un fragment d'ADN avec une séquence homologue servant de matrice à la séquence réparatrice. Les échanges entre chromatides-sœurs (T-SCE) au niveau télomérique sont surtout présents dans les cellules ALT (Bailey et al., 2004a; Bechter et al., 2004). Ces échanges pourraient être des réactions accessoires de la recombinaison homologue pour allonger les télomères ou bien la conséquence d'une réponse au dommage à l'ADN.

Dans la cellule, en règle générale c'est le complexe MRN qui agit comme effecteur de la recombinaison en réalisant la résection des extrémités des cassures double brin qui sont ensuite maturées afin de générer les simples brins nécessaire à la recombinaison (**figure 16**). Ensuite, les protéines RAD52 et RPA se fixent sur les extrémités pour faciliter le recrutement de la protéine RAD51 en éliminant les structures secondaires de l'ADN (Baumann and West, 1997; Golub et al., 1998; Kurumizaka et al., 1999). Une extrémité 3' de la molécule lésée envahit la molécule duplex homologue et s'apparie au brin matrice. La protéine RAD51 peut alors se fixer sur les extrémités d'ADN simple brin ainsi générées. Par la suite le processus synaptique se met en place : premièrement, la recherche d'homologie entre l'ADN simple brin et le duplex, puis, l'appariement des brins et enfin, l'échange de brins qui initie la formation de l'hétéroduplex.
Sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2, RAD51 recherche la séquence correspondante sur le chromosome homologue pour ensuite envahir l'autre brin. Cette invasion de brins est facilitée par la protéine Rad54 (Golub et al., 1997; Mazina and Mazin, 2004). En effet, cette protéine forme des enroulements négatifs au niveau du duplex qui facilite l'accès et l'invasion de brins. Pour aboutir à un échange de brins complets, l'hétéroduplex formé est étendu. L'extension de l'hétéroduplex peut se faire de deux façons, soit la protéine RAD51 continue l'échange de brins avec une polarité 5' vers 3' par rapport au brin déplacé : l'échange de brins est donc unidirectionnel, soit l'extension de l'hétéroduplex est assurée par la migration de la jonction de Holiday formée par l'initiation d'échanges de brins (**figure 16**).

Un télomère fonctionnel requiert la machinerie de reconnaissance des dommages à l'ADN pour une réplication efficace des répétitions télomériques, la mise en forme de l'extrémité après la réplication et la formation de la coiffe protectrice. Un télomère dysfonctionnel requiert cette même machinerie pour être détecté comme tel et pour le préparer à être réparé. Les protéines de la machinerie de la RH assurent donc un double rôle aux télomères. Le

complexe MRN intervient dans le maintien des télomères à travers la voie de recombinaison homologue, il est de plus, requis pour la mise en forme des télomères après la réplication mais aussi dans la détection et signalement des cassures double brin. La protéine TRF2 inhiberait l'activité MRN en empêchant sa fixation (Dimitrova and de Lange, 2009). Les deux autres protéines RAD51 et BRCA2 agissent avec le complexe MRN afin de permettre aussi la maintenance des télomères par l'intermédiaire de la voie de la recombinaison homologue. En effet, les travaux chez la souris ont montré que l'absence de l'une de ces deux protéines induit le raccourcissement des télomères avec augmentation des signaux télomériques de type MTS (Multiple Telomere Signals), qui sont une marque de fragilité associée à la réplication (Badie et al., 2010).

Par contre, la protéine KU déjà mentionnée pour avoir un rôle dans le NHEJ, serait aussi responsable de l'inhibition d'évènements de réparation inappropriées aux télomères (Fisher and Zakian, 2005; Fisher et al., 2004). La protéine semble être un inhibiteur de la RH aux télomères avec l'aide de TRF2 car l'inhibition conjointe de ces protéines augmenterait le nombre d'évènements de T-SCE (Celli et al., 2006).

Une autre possibilité d'intervention d'évènement de la RH est la perte d'expression de TRF2. En effet, l'expression d'une protéine mutante de TRF2 dans les cellules induit une perte rapide des télomères et la formation de cercles chromosomiques télomériques (Wang et al., 2004). Ce raccourcissement serait dépendant des protéines XRCC3 et NBS1 impliquées dans la RH. Ceci suggère l'importance de TRF2, en plus du reste des shelterin dans la protection des télomères contre la recombinaison homologue inappropriée.

CHAPITRE 2 : LA PROTEINE INT6

I. Découverte

La découverte du gène int6 remonte aux années 1995, lors de recherches sur l'intégration du virus MMTV. Le MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) est un rétrovirus oncogène de la souris, induisant la transformation et l'expansion clonale des cellules infectées. L'observation des souris infectées a révélé 6 loci d'intégration du virus, nommés *int* pour site d'intégration: int1/wnt1, wnt3, wnt10B, int2/fgf3, fgf4 et int6 (Tekmal and Keshava, 1997). Le virus s'intègre dans certains introns du gène *int6*, générant la synthèse d'ARNm tronqués. Il a été montré que les protéines Int6 codées par ces ARNm tronqués sont oncogènes chez la souris (Marchetti et al., 1995).

II. *Int6*/INT6

Le gène *int6* humain, dont le produit est aussi connu sous les noms ; EIF3E, EIF3S6, EIF3-P48, eIF3-p46, LOC3646 ou moyshoy, PCI.3, est localisé sur le chromosome 8 avec une taille de 254kb. Il est conservé au cours de l'évolution, de la levure (chez *S. pombe*) à l'humain, suggérant son importance pour la cellule.

Le gène code pour une protéine ubiquitaire de 48kDa. Elle possède une localisation aussi bien cytoplasmique que nucléaire car elle est pourvue à la fois d'une séquence d'export nucléaire NES (« Nuclear Export Sequence ») et d'un signal de localisation nucléaire NLS (« Nuclear Localisation Signal »), ce qui est caractéristique des protéines navettes (Guo and Sen, 2000) (**figure 17**). De plus, INT6 contient un domaine particulier, nommé PCI pour Proteasome-COP9 signalosome (CSN)-Initiation of translation (Hofmann and Bucher, 1998; Lee et al., 2011), retrouvé dans plusieurs sous unités du protéasome, du signalosome COP9 (constitutive photomorphogenesis 9) et du facteur d'initiation de la traduction eIF3. Le domaine PCI existe donc dans des sous-unités de complexes intervenant dans : la dégradation de protéines, la régulation des E3 ubiquitine ligase de type SCF et la traduction d'ARNm, respectivement. Si, INT6 a été caractérisée comme une sous-unité de eIF3, elle a aussi été montrée qu'elle interagissait avec le protéasome 26S et le COP9 signalosome (Hoareau Alves et al., 2002; Karniol et al., 1998; Yahalom et al., 2001; Yen and Chang, 2003). Par exemple, INT6 lie la protéine Rpt4 qui est l'une des six AAAs qui forment la base de la particule 19S et déploient

les protéines pour être dégradé par le protéasome. La perte de ce domaine (PCI) pourrait perturber les fonctions d'INT6 car l'intégration du MMTV tronque la protéine INT6 qui perd ainsi son domaine. Ceci révèle un rôle probable d'INT6 en tant que protéine régulatrice qui coordonne l'activité des trois complexe ; protéasome, CSN et eIF3.

Chez les mammifères, INT6 est largement exprimée ; un transcrit de 1,6kb est retrouvé dans le cerveau, poumon, cœur, foie, rate, pancréas, muscle squelettique, ganglions lymphatiques, glandes mammaires et thymus (Desbois et al., 1996). Cependant, l'analyse par Northern blot révèle des niveaux d'expression variables. Le plus haut niveau a été retrouvé au pancréas, muscles et tissus lymphatiques.

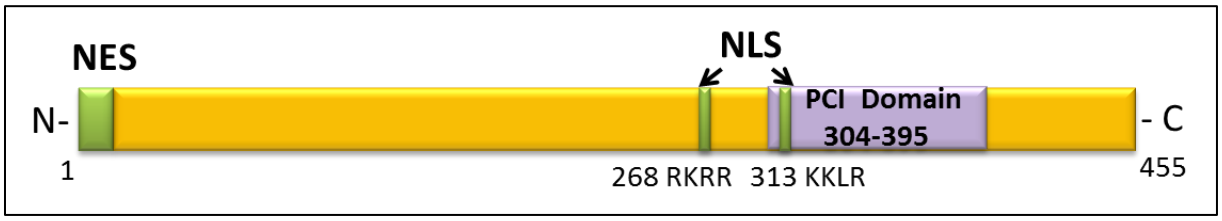


Figure 17. Représentation de la protéine INT6 et ses domaines fonctionnels.

III. Fonctions d'INT6

1. INT6 et tumorigenèse

En ce qui concerne son rôle dans le développement de tumeurs, le sujet reste ouvert (Buttitta et al., 2005; Chen et al., 2007; Marchetti et al., 2001; Rasmussen et al., 2001) car il est impossible de générer des modèles animaux avec une absence d'expression de la protéine (Knock-down). Les essais faits sur la souris et la drosophile se sont révélés létaux pour leurs survies (Rencus-Lazar et al., 2008).

Néanmoins, des pistes de son implication dans le développement tumoral existent. INT6 serait un suppresseur de tumeur : la surexpression d'une forme d'INT6 tronquée de sa moitié C-terminale induit la transformation de lignées cellulaires murines et humaines (Mayeur and Hershey, 2002; Rasmussen et al., 2001), la synthèse d'INT6 tronquée par l'insertion du MMTV, au niveau des glandes mammaires, induit l'hyperplasie et la formation tumorale (Mack et al., 2007). Il y a aussi l'évidence qu'INT6 est impliquée dans la transition des cellules épithéliales à mésenchymateuses (EMT), un évènement important au cours de l'embryogénèse mais aussi dans la tumorigenèse. En effet, ce changement peut induire des métastases, permettant aux cellules d'acquérir des propriétés migratoires. Il a été montré que

l'expression d'INT6 dans les cellules épithéliales du sein affecte l'expression de Snail et Zeb2, deux régulateurs de l'EMT et de l'apparition de métastases (Gillis and lewis, 2013). De plus, une diminution du niveau de l'ARNm *int6* est observée dans 27% des carcinomes pulmonaires ; cet événement constituant un indice de mauvais pronostic (Buttitta et al., 2005). INT6 peut aussi cibler la dégradation du facteur d'hypoxie : Hypoxia Induced Factor 2 alpha (HIF-2α), supprimant alors l'induction de facteurs angiogéniques (Chen et al., 2007, 2010). Selon Okamoto, un traitement avec des siRNA INT6 pourrait être une thérapie pour promouvoir l'angiogénèse et le recouvrement des artères (Okamoto et al, 2011 ; Miyashita et al, 2012).

Par contre, des études ont rapporté qu'INT6 pouvait être oncogène : le traitement de cellules cérébrales par siRNA INT6 induit l'apoptose des tumeurs gliales et l'inhibition du cycle cellulaire entrainant une diminution de la prolifération des glioblastomes (Sesen et al., 2014) et la surexpression d'INT6 agirait sur la traduction d'ARNm impliqués dans la croissance tumorale ; ARNs impliqués dans l'invasion et l'inhibition d'apoptose tel que l'activateur plasminogène type urokinase (PLAU) et le régulateur apoptotic BCL-XL (Grzmil et al., 2010). Si l'implication d'INT6 dans les cancers reste mal connue, plusieurs observations indiquent que l'altération qualitative ou quantitative de cette protéine a des effets tumorigènes.

2. INT6, facteur d'initiation de traduction

En 1997, INT6 a été identifiée comme sous unité « e » du facteur eucaryote d'initiation de traduction eIF3 (Asano et al., 1997). Chez les mammifères, eIF3 est considéré comme étant le plus grand facteur d'initiation avec une taille avoisinante les 800 kDa. Il est constitué de 13 protéines chez l'homme, qui sont consécutivement appelées eIF3a-m (Browning et al., 2001; Zhou et al., 2008). eIF3 dirige les interactions entre l'ARNm, la sous-unité ribosomale 40S et l'initiateur Met-tRNA, pour permettre l'initiation de la traduction. Il fonctionne comme plateforme pour les interactions avec d'autres régulateurs eIFs (Hinnebusch, 2006). Chez les levures à bourgeonnement, eIF3 comprend un cœur de 5 sous-unités, requis pour la traduction générale (Asano et al., 1998; Phan et al., 1998). Chez ce type de levures ne comprend pas la protéine eIF3e/INT6, mais a plutôt une autre protéine étroitement ressemblante nommée Pci8p (Shalev et al., 2001). Par contre chez la levure *s.pombe*, eIF3 comprend un homologue d'INT6 appelé Yin6.

Des travaux effectués chez cette levure avec des mutants de Yin6 afin de caractériser sa fonction, montrent une faible diminution du taux des protéines synthétisées et des polysomes (Akiyoshi et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2000; Zhou et al., 2005). De plus, chez cet organisme, des travaux ont rapporté la présence de deux complexes eIF3 distincts : l'un d'eux défini par la sous-unité Csn7Bp/eIF3m qui parait être responsable de la traduction d'une majorité d'ARNm, alors que le deuxième complexe comprenant INT6 semble être associé à la régulation d'un nombre restreint d'ARNm (Zhou et al., 2005). En ce qui concerne les mammifères, INT6 forme probablement une organisation similaire avec les sous-unités a, b, c, f et h mais en contraste avec les autres, elle est non essentielle pour la traduction générale. Cependant, il a été découvert qu'INT6 était requis pour la dégradation des ARNm avec un codon stop prématuré car son extinction inhibe le NMD (Morris et al., 2007). Alors que l'inhibition de eIF3l, un facteur eIF3 associé à INT6, n'a aucun effet sur le NMD (Morris-Desbois et al., 2001). Il a aussi été rapporté qu'INT6 agissait positivement sur des ARNm impliqués dans la coagulation, l'endocytose et le rôle de navette et négativement sur des gènes contrôlant la division cellulaire et l'adhésion (Grzmil et al., 2010).

3. INT6 ; un facteur du NMD

En 2007, une étude élaborée dans notre laboratoire a découvert la présence d'une association entre INT6, UPF2, UPF1 et CBP80. Ces trois dernières étant des agents importants du Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD). Ces travaux ont montré qu'INT6 participait à ce mécanisme (Morris et al., 2007).

Le NMD est un mécanisme de contrôle de qualité des ARNm. Il détecte les ARNm présentant des codons stop prématurés (PTC) afin d'empêcher l'expression de protéines qui sont potentiellement dangereuses pouvant fonctionner d'une manière dominante négative (reviewed in Chang et al., 2007; Ishigaki et al., 2001; Mühlemann, 2008) (**figure 18**). Il a d'ailleurs été démontré que l'abolition du facteur NMD UPF1 dans les cellules embryonnaires de la souris était létale (Medghalchi et al., 2001). En plus de ce rôle de contrôle de la qualité d'ARNm, le NMD participe aussi à la régulation de l'expression de gènes normaux en modulant l'expression de plusieurs transcrits physiologiques (Rehwinkel et al., 2005). Ces gènes ne contiennent pas de codon stop prématuré mais des séquences déclenchant le NMD, par exemple : un intron à l'extrémité 3'UTR, une séquence 3'UTR longue, les ARNm codants pour des sélénoprotéines… (Kebaara and Atkin, 2009; Mendell et al., 2004; Sun and Maquat, 2002).

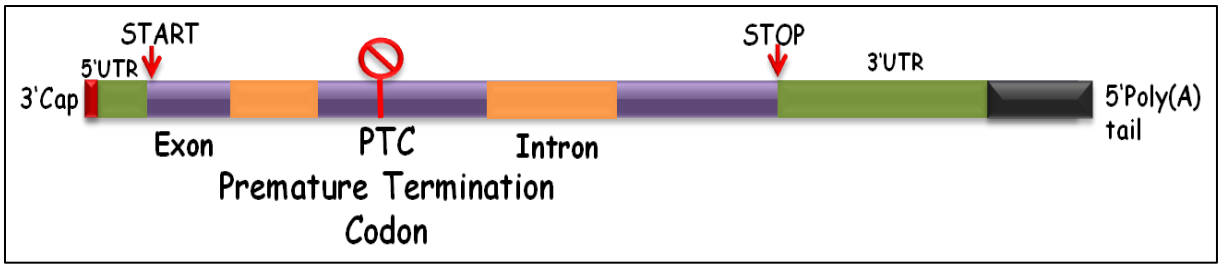


Figure 18. Schéma typique du mécanisme NMD qui cible un ARNm

Les facteurs du NMD sont conservés au cours de l'évolution mais leur action diffère selon les espèces. Chez les mammifères, le groupe cœur des facteurs du NMD est constitué des protéines UP-frameshift : UPF1, UPF2 et UPF3 (**figure 19**). Il y a aussi les facteurs essentiels à la phosphorylation et déphosphorylation d'UPF1, nommés SMG (Suppressor with Morphological effects on Genitalia) : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9 (Isken and Maquat, 2007; Mühlemann and Lykke-Andersen, 2010; Rebbapragada and Lykke-Andersen, 2009). Un autre complexe clé participant au NMD est le complexe EJC (Exon-Junction Complex) constitué de l'ARN hélicase eIF4A3, l'hétérodimère Y14-MAGOH qui inhibe l'activité ATPase d'eIF4A3 (Ballut et al., 2005; Nielsen et al., 2009), la protéine Barentsz (BTZ) (Noble and Song, 2007) qui renforce l'activité hélicase, ainsi que d'autres facteurs secondaires (Saulière et al., 2010; Singh et al., 2012; Viegas et al., 2007). La distinction par la cellule entre un codon stop normal et un PTC dépend de leurs distances par rapport à la queue poly (A) et de la compétition entre UPF1 et PABP (Protéine de liaison à la queue poly(A)) à se lier à l'EJC à proximité du ribosome de terminaison (Behm-Ansmant et al., 2007).

Le processus NMD va d'abord cibler un ARNm non seulement avec un PTC mais qui doit aussi être relié à une protéine Cap-binding (CBP) sur laquelle vient se fixer UPF1 (Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002). Le mécanisme démarre par le ralliement d'UPF3 au complexe EJC au niveau du noyau. Durant le tour pionnier de la traduction, il y a formation dans le cytoplasme, d'un complexe sur l'ARNm nommé SURF, composé des facteurs **S**MG1-e**R**F1-e**R**F3-**U**PF1 (Kashima et al., 2006). eRF1 et eRF3 (Eukaryotic Release Factors) sont importants pour l'intervention du ribosome de terminaison dont le NMD est dépendant. Le complexe SURF est donc recruté par le ribosome qui est arrêté au niveau du PTC. Ensuite, UPF2 relie le complexe SURF (via UPF1) à l'EJC (via UPF3) (Yamashita et al., 2009). Par la suite, UPF1 est phosphorylé par SMG1 provoquant la dissociation des deux facteurs eRF1 et eRF3 et le recrutement de SMG6 et SMG5-SMG7 (Okada-Katsuhata et al., 2012). SMG5 entraîne la déphosphorylation d'UPF1 et SMG6 agit comme endonucléase. Ces cycles de

phosphorylation et déphosphorylation d'UPF1 régis par les autres facteurs NMD (Hosoda et al., 2005; Hwang et al., 2010; Kadlec et al., 2006; Ohnishi et al., 2003), sont nécessaires pour faciliter le regroupement des facteurs de dégradation et la répression de la traduction (Cho et al., 2009). En effet, comme résultat, le complexe contenant l'EJC, UPF2, UPF3, UPF1 phosphorylé et SMG1 inhibe la traduction de l'ARNm sensible au NMD et le dégrade par des enzymes déadenylases et de décoiffage puis par des enzymes exonucléases 5'-3' et 3'-5' (Eberle et al., 2009; Mühlemann and Lykke-Andersen, 2010) (**figure 19**).

Ce modèle canonique du NMD est simplifié, d'autres voies impliquant des interactions protéiques différentes interviendraient (Bühler et al., 2006). Il y aurait par exemple une autre voie gérée par UPF1 qui consiste par sa forme phosphorylée à réprimer la traduction en interagissant avec eIF3, composant du complexe 43S de pré-initiation, prévenant ainsi l'adhésion de la sous-unité ribosomale 60S nécessaire à la traduction (Isken et al., 2008).

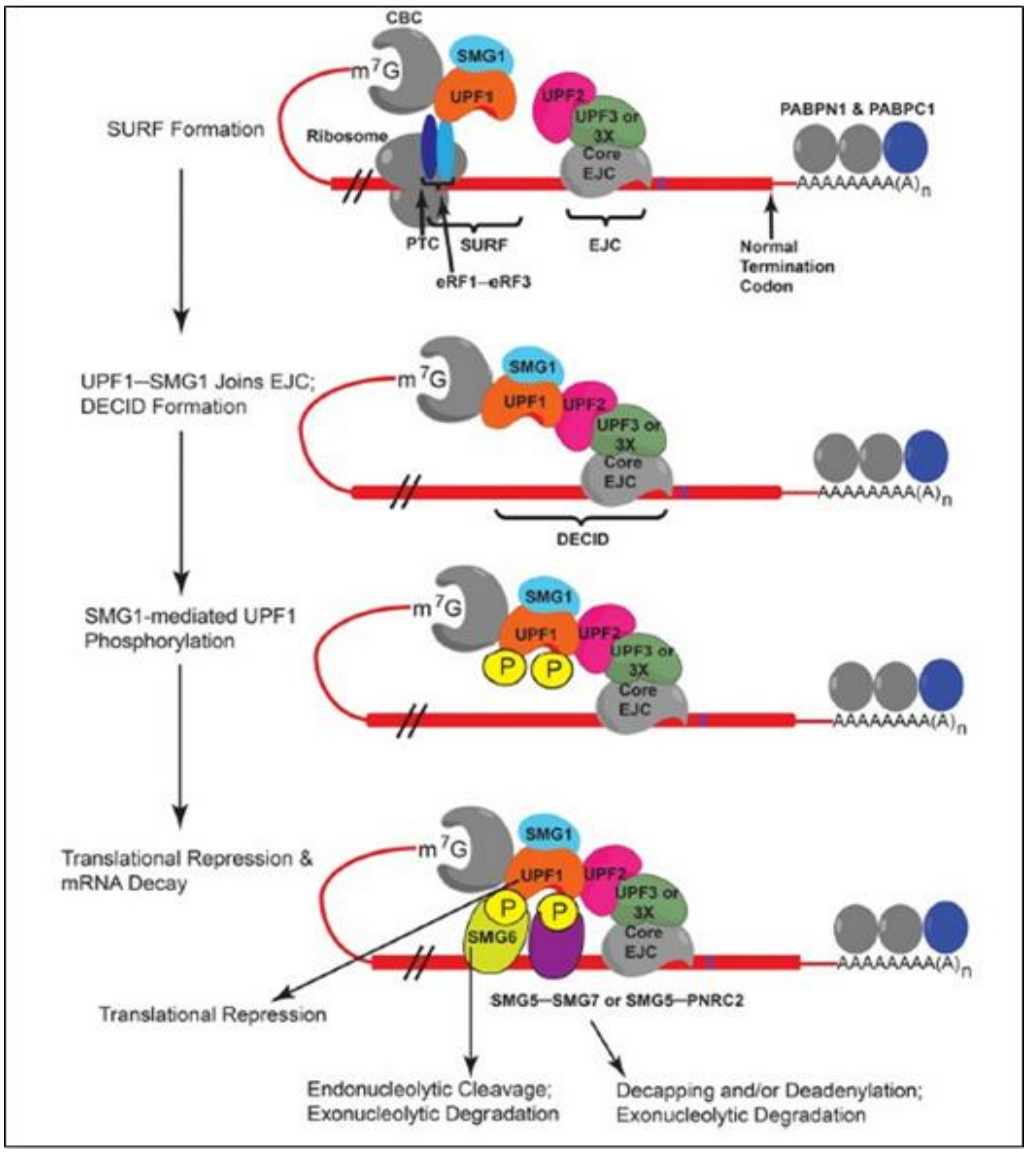


Figure 19. Le réarrangement protéique durant le mécanisme 'standard' du NMD. Immédiatement après l'export nucléaire, L'ARNm lié au CBC (CBP20/80) est sujet à un tour pionnier de traduction. Quand un codon stop réside à 50 nt en amont de la jonction exon-exon où se lie l'EJC et que le CBC escorte UPF1-SMG1 au complexe eRF3 (constitué de l'hétérodimère eRF1-eRF3) à proximité du ribosome de terminaison, le complexe SURF est alors formé (première image, en haut). CBC escorte aussi UPF1-SMG1 à l'EJC grâce à UPF2 via UPF3 pour former le complexe DECID (deuxième image). Dans cette configuration, SMG1 phosphoryle UPF1 (troisième image). UPF1 phosphorylé a alors plusieurs fonctions (quatrième image, en bas) : répression de la traduction, recrutement de SMG6, SMG5-SMG7 qui clivent l'ARN et entrainent sa dégradation. (D'après (Popp and Maquat, 2014)).

Ce modèle s'est enrichi avec la découverte de l'implication d'INT6 dans le NMD. Comme mentionnée plus haut, INT6 a été révélé dans notre laboratoire pour interagir avec UPF2 associé à UPF1 (Morris et al., 2007). Son absence inhiberait le NMD, il serait donc important pour ce dernier. Ceci est en accord avec la capacité d'INT6 de lier CBP80, plus fort qu'avec EIF4e, et ceci le présente comme étant non nécessaire pour la traduction générale mais plutôt pour un processus de lecture pré-traductionnelle. Aussi, la composition dynamique du complexe eIF3 assoit l'hypothèse d'une fonction dans la traduction pionnière. Une étude faite en 1999, montre qu'une mutation au niveau de PRT1 qui est l'homologue de eIF3b chez la levure, induit la stabilisation de l'ARNm Ty 10 (SPT10) codant pour le régulateur transcriptionnel HH2F, d'une manière similaire à la déplétion d'UPF1 (Welch and Jacobson, 1999). Morris & al, ont montré qu'INT6 interagissait avec CBP80 et UPF2 ainsi qu'avec eIF4G-1 même quand l'ARN est dégradé. Ces protéines incluent toutes un domaine MIF4G (Middle domain of eIF4G). INT6 serait recrutée à l'ARNm chargée d'UPF2 afin de promouvoir un cycle pionnier de traduction. INT6 interviendrait alors dans le contrôle-qualité des ARNm en plus de la régulation des niveaux de traduction spécifiques à certains ARNs.

En plus d'être un facteur NMD interagissant avec UPF2 et UPF1, INT6 a aussi été découvert par criblage double hybride dans notre laboratoire pour interagir avec la protéine Tax du virus HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type 1) (Desbois et al., 1996). Une banque de cDNA de lymphocytes B humains immortalisés transformés par le virus Epstein-Barr a été criblée en utilisant Tax comme appât et a permis l'isolation d'INT6. Tax est une protéine qui joue un rôle important dans l'induction de la transcription du provirus et dans la stimulation de la prolifération de la cellule hôte. Les expériences d'immunoprécipitation ont permis de confirmer la forte interaction qui existe entre les deux protéines et a caractérisé la localisation du complexe au niveau du cytoplasme (Desbois et al., 1996; Watkins and Norbury, 2004). Mais en absence de Tax, INT6 est présent aussi dans le compartiment nucléaire, où il colocalise partiellement avec les corps nucléaires PML. Ces corps qu'on retrouve dans différents types cellulaires sont des sites d'activation de la transcription, suspectés (en plus

d'autres fonctions) de participer à la suppression de la tumorigenèse. De manière intéressante, il a été montré une perte d'INT6 au niveau de ces corps PML dans des cellules surexprimant Tax. Ainsi Tax serait responsable de la redistribution d'INT6 du compartiment nucléaire vers le cytoplasme (Desbois et al., 1996). En plus de ces découvertes, une récente étude publiée au sein de notre laboratoire a révélé que par l'interaction de Tax à INT6 et aussi UPF1, ce facteur viral inhibait le NMD (Mocquet et al., 2012). Il a aussi été observé que l'expression de Tax altérait la morphologie des P-bodies qui sont des corps cytoplasmiques où les facteurs de dégradation d'ARN sont concentrés. Tax augmente la présence d'UPF1 sous forme phosphorylée dans ces structures alors qu'elle diminue celle d'INT6. En effet, Tax séquestre INT6 l'empêchant de se lier à UPF1, inhibant alors le NMD. Tax est donc capable de stabiliser des ARN viraux spécifiques en agissant au niveau post-transcriptionnel (Mocquet et al., 2012).

4. INT6 et son rôle dans la traduction des ARNm histones

Un caractère spécifique des ARNm codant les protéines est la queue poly(A) à l'extrémité 3' qui lie différentes protéines comme la protéine de liaison au poly(A) (PABP). Cette protéine joue un rôle important dans la traduction en créant des interactions avec des facteurs d'initiation tel que eIF4G et circularise des molécules d'ARN (Amrani et al., 2008; Martineau et al., 2008). Cependant, il existe une famille d'ARNs cellulaires qui n'ont pas de queue poly(A), ceux qui expriment les cinq classes d'histones (H1, H2, H2B, H3 et H4). A la place de cette queue, ces ARNs comportent en amont de leur extrémité 3', une tige-boucle de 16 nucléotides qui interagit avec la protéine SLBP (Townley-Tilson et al., 2006; Zhao et al., 2004). En plus du rôle joué par SLBP dans la formation de l'extrémité 3', SLBP intervient aussi dans l'export des ARNm histones (Ghule et al., 2008; Sullivan et al., 2009), ainsi que dans leur traduction en interagissant avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G et eIF3 (Gorgoni et al., 2005; Ling et al., 2002). Plus récemment, un criblage double hybride avec SLBP comme appât a permis d'identifier une protéine nommée MIF4GD (ou SLIP1 pour SLBP interacting protein 1).

Similairement, un criblage avec INT6 comme appât a aussi permis d'identifier MIF4GD. De plus, il a été observé qu'INT6 était requise pour l'efficacité de la traduction des ARNm histones en phase S (Neusiedler et al., 2012). En effet, l'inhibition d'INT6 par ARN interférant révèle un effet similaire à celui observé en cas de suppression de MIF4GD ou de SLBP (Cakmakci et al., 2008). Neusiedler et al. suggèrent qu'INT6 interviendrait dans la

traduction spécifique des ARN histones par interaction avec SLBP-MIF4GD, d'une manière similaire à l'interaction de PABP-PAIP1 avec les facteurs d'initiation (Neusiedler et al, 2012; Martineau et al., 2008) (**figure 20**), permettant ainsi la circularisation (looping) de l'ARN accompagné du contact avec eIF4G et eIF3 (Amrani et al., 2008; Martineau et al., 2008) nécessaire à la traduction.

UPF1 intervient aussi dans la régulation des histones, plus précisément dans la dégradation des ARNm histones en phase G2 qui implique une interaction physique avec la protéine SLBP (Kim et al., 2005b; Müller et al., 2007). Les protéines SLBP et CBC nécessaires à la traduction de ces ARNm histones, ont été montrées comme interagissant ensemble (Narita et al., 2007) (**figure 20)**. Toutes deux ont la capacité de recruter CTIF (Facteur d'initiation de traduction dépendante de CBC/eIF4G-like protéine), qui pourrait induire la circularisation des RNPm histones nécessaire à la traduction. Lorsqu'un stress réplicatif est généré, on observe un remodelage de cette structure, entrainant la dégradation de l'ARNm histone. ATR ou les DNA-PK sont activés, et vont hyperphosphoryler UPF1. Ce dernier se fixe sur SLBP, entrainant la perte d'interaction entre SLBP et CTIF, ce qui a pour conséquence le détachement du complexe CTIF-eIF3 de l'ARNm. L'ARNm histone est ensuite dégradé par l'intervention des enzymes TUTases ou bien des protéines PNRC2/SMG5 (Cho et al., 2009; Kaygun and Marzluff, 2005) (**figure 20**).

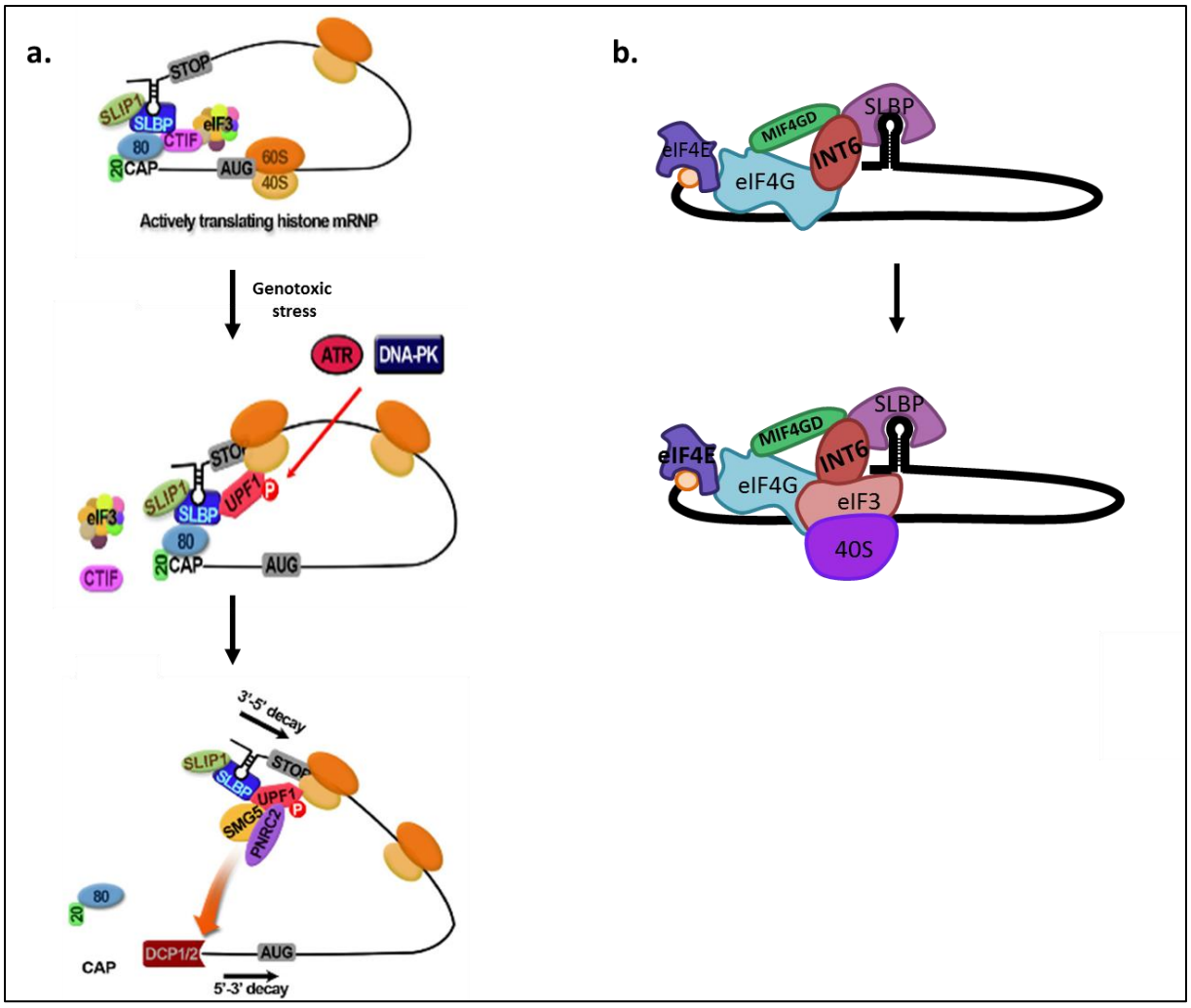


Figure 20. Modèles d'action d'UPF1 et d'INT6 sur les ARNm histones. a. Modèle proposé de l'action d'UPF1 sur le remodelage des RNPm histones afin de permettre la dégradation des ARNm histones (d'après(Choe et al., 2014)). b. Modèle proposé de l'action d'INT6 sur la traduction des ARNm histones (d'après (Neusiedler et al., 2012).

5. INT6 et la réplication d'ADN

Le même criblage double hybride effectué au sein de notre laboratoire a permis d'identifier MCM7 comme partenaire d'INT6. MCM7 est une sous-unité du complexe MCM (MCM2-7), importante pour la réplication d'ADN. Le trimère formé des sous unités MCM 4, 6 et 7 est doté *in vitro* d'une activité hélicase, mais l'hétérogène hexamère MCM entier est nécessaire chez la levure aussi bien pour l'initiation que pour l'élongation de la réplication (Labib et al., 2000; Prokhorova and Blow, 2000; You et al., 2002).

L'initiation de la réplication débute par la formation du complexe de pré-réplication constitué de l'association du complexe MCM à la chromatine lors de la phase G1 du cycle cellulaire. Cette association est effectuée via les protéines ORC, CDC6 et CDT1, qui agissent de concert

pour ouvrir l'anneau formé des six protéines MCM et permettre son chargement au niveau des origines de réplication. Les origines de réplication avec l'aide du complexe MCM sont programmées pour initier la réplication une fois seulement par cycle cellulaire (Cook et al., 2004; Gillespie et al., 2001; Yanagi et al., 2002; Tsuyama et al., 2005) et il permettra alors d'éviter la sur-réplication ou la non réplication de certaines régions d'ADN. Ensuite, MCM 2 est phosphorylée ce qui permet le recrutement d'autres protéines nécessaires à l'initiation de la réplication. La séparation de la double hélice commence alors et les simples brins sont immédiatement recouverts par RPA (Pollok et al., 2003) permettant la progression de la fourche. Le complexe MCM et les ADN polymérases s'éloignent progressivement de l'origine de réplication (Kanemaki et al., 2003) pour permettre la continuité de la réplication. Enfin, les facteurs MCM se dissocient de l'ADN et ne peuvent se réassocier à l'ADN qu'après la prochaine division cellulaire.

Des résultats de co-immunopécipitation des protéines endogènes ont confirmé l'existence d'une interaction entre INT6 et le domaine C-terminal de MCM7 (Buchsbaum et al., 2007) et ceci malgré qu'INT6 interagisse avec le 26S protéasome (Hoareau Alves et al., 2002) et que MCM7 pourrait être ciblé par ce dernier. Au contraire, la surexpression d'INT6 stabilise MCM7, en accord avec son rôle de contrôle de stabilité de différentes protéines. Ainsi, le traitement siRNA dirigé contre INT6 induit la diminution des niveaux de MCM7. Ces observations révèlent donc, qu'en phase S, INT6 se lie à la forme polyubiquitinylée de MCM7 la protégeant d'être dégradé par le protéasome (Buchsbaum et al., 2007). Cette fonction d'INT6 est semblable à celle de la protéine Rad23, chez la levure. Cette dernière, avec ses domaine ubiquitine-like (UbL) et domaine d'association à l'ubiquitine (UBA), peut se lier au protéasome et protéger les protéines ubiquitinylées de la dégradation (Hwang et al., 2005; Raasi and Pickart, 2003). Un autre exemple similaire, est celui de la protéine d'adénovirus E1a, qui interagit avec les sous unités du protéasome 19S : Rpn1, Rpt2 et Rpt6. Elle protège p53 de la dégradation en empêchant sa forme polyubiquitinylée d'être ciblé par le protéasome (Zhang et al., 2004). Et comme INT6 interagit avec Rpt4 (Hoareau Alves et al., 2002) Rpn5 (Yen et al., 2003), elle pourrait aussi restreindre la dégradation de MCM7 au cours de la réplication d'ADN en inhibant l'activité protéase.

INT6 a un impact direct sur la réplication d'ADN : Le traitement par siRNA INT6 conduit à l'inhibition de la réplication, évaluée par incorporation de thymidine tritié, à l'augmentation de RPA et claspin associées à la chromatine et à la diminution de MCM7. Ceci suggère une dérégulation de l'activité hélicase du complexe MCM entrainant un stress réplicatif (Buchsbaum et al., 2007).

De récentes études ont révélé l'interaction physique d'un autre facteur NMD : UPF1 avec l'ADN polymérase δ, nécessaire à la réplication et à sa progression durant la phase S, de manière NMD indépendante (Azzalin and Lingner, 2006a, 2006b). L'inhibition d'UPF1 par shRNA (Short Hairpin RNA) dans des cellules de carcinome du col de l'utérus (HeLa), entraine l'arrêt du cycle cellulaire au début de la phase S, avec le blocage de la fourche de réplication (Azzalin and Lingner, 2006b). Ce blocage déclenche une réponse aux dommages à l'ADN qui est ATR dépendante. Ces résultats indiquent donc l'implication d'UPF1 dans la réponse aux dommages à l'ADN durant la phase S. D'ailleurs, l'inhibition d'UPF1 génère l'accumulation de foci nucléaires contenant le marqueur des dommages à l'ADN, l'histone H2AX phosphorylée (γ-H2AX) (Azzalin and Lingner, 2006b). Il a été montré une accumulation de la forme phosphorylée d'UPF1 associée à la chromatine dans des cellules irradiées par rayons gamma (Azzalin and Lingner, 2006b). Cette accumulation d'UPF1 phosphorylée est inhibée dans des cellules déficientes pour ATR. Ces données suggèrent que l'induction de dommage à l'ADN par rayons gamma active ATR, qui a son tour induit la phosphorylation d'UPF1 (**figure 21**). Ce rôle d'UPF1 dans la réplication d'ADN serait indépendant du mécanisme NMD car aucune de ces observations ne sont retrouvées avec UPF2.

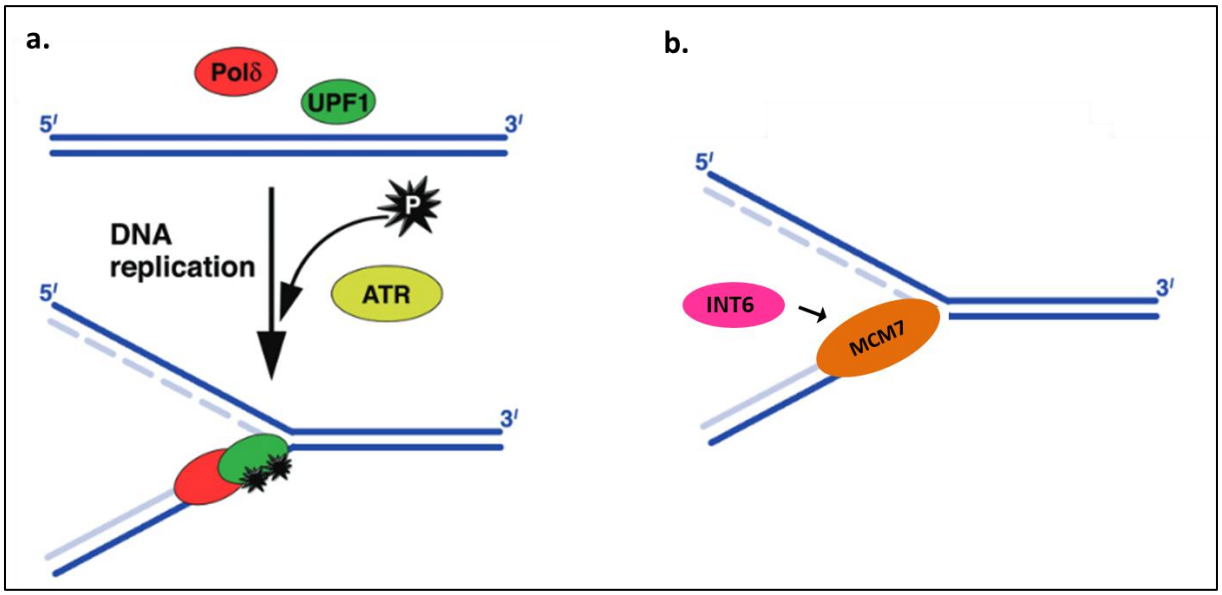


Figure 21. Implication des protéines INT6 et UPF1 dans la réplication d'ADN. a. UPF1 s'associe à l'ADN polymérase δ essentielle à la réplication et la réparation, un processus où ATR intervient afin de phosphoryler UPF1 (d'après(Azzalin and Lingner, 2006a)). b. INT6 est essentielle à la progression de la fourche de réplication, elle agit pour protéger la protéine MCM7 ubiquitinylée de la dégradation.

6. INT6 et les dommages à l'ADN

Des travaux menés dans notre laboratoire avaient déjà montré qu'une perte d'INT6 provoquait des altérations de la mitose en induisant des défauts de ségrégation des chromosomes, aboutissant à l'apparition de cellules plurinucléées (Morris and Jalinot, 2005). Ces dommages sont d'ailleurs visibles dans des cellules appauvries en INT6 par le niveau élevé de la forme phosphorylée de l'histone H2AX.

INT6 intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN, elle est requise pour la survie des cellules après une irradiation aux rayons γ. Son inhibition est responsable de la diminution de la phosphorylation des kinases CHK1 et CHK2 après un dommage à l'ADN. Elle réduit aussi les évènements d'ubiquitynilation générant la rétention des protéines de réparation telle que BRCA1. De plus, INT6 interagit avec ATM qui sont tous deux recrutées au niveau de la lésion d'ADN (Morris et al., 2012). INT6 aurait donc un rôle protecteur par son action conjointe avec ATM et BRCA1.

OBJECTIFS

Les données de la littérature présentées dans cette introduction mettent clairement en évidence les similarités de fonctions des protéines INT6 et UPF1. Effectivement, elles sont toutes les deux des facteurs du NMD, elles sont impliquées dans la réplication de l'ADN, et finalement elles ont été montrées comme participantes à la régulation de l'expression des ARNm histones.

Par ailleurs, UPF1 est aussi connue pour être impliquée dans des processus nucléaires nécessaires à la stabilité du génome, notamment aux télomères. Cette protéine, ainsi que des facteurs SMG sont retrouvées associées *in vivo*, aux télomères (Azzalin et al., 2007). De plus, des mutations d'UPF1, UPF2 et UPF3 provoquent le raccourcissement de la taille des télomères chez Saccharomyces cerevisiae (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). L'étude de cellules involuées pour UPF1, SMG6 ou SMG1 a montré une augmentation des niveaux de l'ARN telomérique TERRA, sans affecter la stabilité de l'ARN télomèrique. De sévères aberrations télomèriques, incluant la perte d'un télomère entier sont aussi observés dans les cellules déficientes pour ces facteurs (Azzalin et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'UPF1 interagissait avec TPP1 et la télomèrase, deux protéines majeures pour la stabilité des télomères. L'implication d'UPF1 dans la réplication des télomères a été validée par des expériences de CO-FISH, suggérant fortement que le brin direct d'ADN est sévèrement atteint en absence d'UPF1 (Chawla et al., 2011). Ces données suggèrent un modèle dans lequel UPF1, SMG1 et SMG-6, délocaliseraient l'ARN télomérique TERRA, permettant la progression de la fourche de réplication (Azzalin et al., 2007) (**figure 22a**).

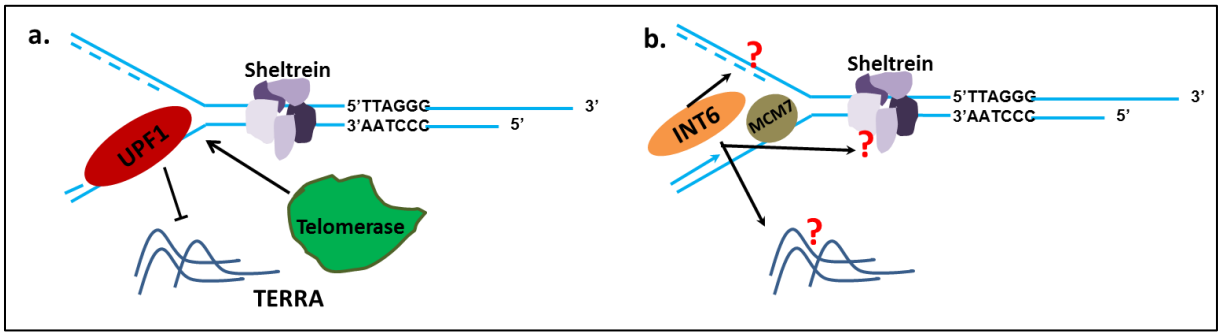


Figure 22. Fonctions d'UPF1 et INT6 sur la biologie des télomères. a. UPF1 agirait sur la réplication des télomères et inhibe l'hybridation de TERRA sur le brin C afin de permettre la progression de la fourche. B. L'hypothèse d'un potentiel fonctionnement d'INT6 sur les télomères, encore non démontré.

Dans ce contexte, connaissant l'étroite similarité de fonction entre les protéines INT6 et UPF1, il nous a paru opportun d'adresser le rôle d'INT6 dans la biologie des télomères (**figure 22b**).

Mes travaux de thèse ont abordé la question du rôle d'INT6 sur la biologie des télomères par une approche systématique d'involution d'INT6 dans des lignées cellulaires. Dans un premier temps, mon travail a consisté à analyser l'impact d'INT6 sur les niveaux d'expression de l'ARN télomèrique TERRA, ainsi que sur l'apparition des dommages aux télomères. Dans un deuxième temps, j'ai essayé d'expliquer les effets observés via un rôle d'INT6 sur la réplication des télomères ainsi que sur la régulation de la chromatine télomèrique.

RESULTATS (ARTICLE)

The function of the oncoprotein INT6/EIF3E in telomere maintenance

Maname Benyelles1, Vincent Mocquet1 and Pierre Jalinot1.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et de la Cellule, Unité Mixte de Recherche 5239, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France.

Corresponding author: Dr Pierre Jalinot: Email: pjalinot@ens-lyon.fr; Phone: + 33 4 7272 8563; Fax: + 33 4 7272 8080.

Abstract

The INT6/EIF3E protein encoded by the mammalian integration site 6 (*int-6*) gene, has been implicated in mouse and human breast carcinogenesis. Although, INT6 is a subunit of the eIF3 translation initiation factor, it is not essential for bulk translation but for specific mRNAs expression as histone mRNA translation. It has also been implicated in DNA replication by stabilizing the DNA replication licensing factor MCM7, in DNA Damage Response (DDR) and in the Nonsense mRNA Decay (NMD) pathway. Relative to the latter activity, I investigated whether INT6 can specifically meddle in telomere homeostasis by acting on TERRA transcripts. Deletion of INT6 by RNA interference approach revealed an increase in the telomeric RNA TERRA levels which is depending on the chromosome and cellular type. Although INT6 is a NMD factor, it doesn't change TERRA steady-state. DNA-FISH experiments showed an increase in Telomere Induced Foci (TIFs) in INT6 depleted cells. These aberrations correspond to Telomere Free Ends (TFE) and Multi-Telomeric signals (MTS) which implicate INT6 in DDR. By means of Micrococcal Nuclease (MNase) mapping assay, we found a rapid accumulation of telomeric mono-nucleosomes in INT6-depleted cells, suggesting a role in telomeric chromatin structure. These findings evidenced that INT6 is a novel key player in telomere stability.

Keywords: INT6/EIF3E/ Telomere/ TERRA/ TIF/ Chromatin

INTRODUCTION

Int-6 gene was first identified as one of the insertion sites of the mouse mammary tumor virus (MMTV) (Marchetti et al., 1995). This provirus integrates into the mouse genome leading to a high incidence of mammary tumours (reviewed by Li et al., 2000b; Nusse, 1991). The protein INT6, also named EIF3E, of 48-kDa corresponds to a subunit of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) (Asano et al., 1997). In contrast to other eIF3 subunits, INT6 is not essential for global translation but plays a role of scaffold by its proteasome-COP9 signalosome-initiation of translation (PCI) domain. Indeed, the PCI domain of INT6 is shared by 5 other subunits of eIF3. This domain is also present in 6 subunits of the proteasome 19S regulatory particle and the COP9 signalosome (CSN). Interestingly INT6 has been reported to interact with these complexes suggesting the implication of INT6 in the regulation of protein stability (Hoareau Alves et al., 2002). It was recently confirmed that INT6 is implicated in the stabilisation of HIF-2α, an Hypoxia Inducible Factor (Sesen et al., 2014) even if other controversial studies demonstrate the contrary (Chen et al., 2007, 2010), which throws blur about INT6 function in tumorgenesis. Another example of protein stabilized by INT6 is MCM7; a subunit of the DNA replication licensing factor MCM. It was shown in our laboratory that INT6 interacts with the polyubiquitinylated form of MCM7 to permit its stabilization (Buchsbaum et al., 2007; Grzmil et al., 2010), implicating INT6 in the replication process. Additionally, INT6 intervenes in the translation of specific mRNAs as these encoding histones (Neusiedler et al., 2012). INT6 is also required for genome stability: it is involved in DDR by its recruitment at DSBs and interacts with ATM (Morris et al., 2012). Additionally, it was established that INT6 is a member of the nonsense-mediated mRNA decay pathway (NMD) (Morris et al., 2007; Mocquet et al, 2012). The NMD is a mechanism which prevents translation of mutated mRNA encoding truncated proteins that could exert deleterious effects. This activity is correlated with the ability of INT6 to interact with specific NMD factors like UPF1 and UPF2 (Morris et al., 2007). Importantly, it was also shown that some NMD effectors play roles in telomere stability.

The telomeres consist of nucleoprotein structures capping the physical ends of linear eukaryotic chromosomes. They are essential to assure genome stability by allowing cells to distinguish between intrachromosomal DNA double-stranded breaks and natural chromosome ends, thereby preventing inappropriate DNA repair events (Palm and de Lange, 2008; Xin et al., 2008). The core protein component is referred to as shelterin, and in humans it comprises six polypeptides TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 and Rap1. The complex is involved in

telomere length regulation and telomere protection (Palm and de Lange, 2008; Xin et al., 2008). In spite of the heterochromatine state exhibited by telomeres with epigenetic marks as H3K9me3, H4K20me 3, HP1 (Benetti et al., 2007a; Blasco, 2007), they are transcribed into a long non-coding RNAs named TERRA which preferentially localize at telomeres (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). It has also been established that this TERRA positioning is regulated post-transcriptionally by NMD factors. Indeed, UPF1 (SMG2), SMG1 and ESTA1 (SMG6) depletion causes TERRA increases at telomeres (Azzalin and Lingner, 2006; Snow et al., 2003). In addition, these factors were revealed to bind telomeres *in vivo* and their depletion induces telomeric aberrations (Azzalin et al., 2007).

Regarding INT6 which share a common pathway and other similarities with UPF1 (NMD, replication, DNA repair), we discovered a potential role of INT6 in telomere maintenance. Deletion of this protein increases TERRA RNA levels without affecting their stability. This increase is chromosome and cellular type specific. Moreover, INT6 is required to prevent telomeric defects and to protect telomeric chromatin conformation. Finally our results have provided insight into the function and the importance of INT6 in telomere stability.

RESULTS

TERRA accumulates in total RNA fractions upon INT6 depletion:

Our laboratory had previously described INT6 as a NMD factor, implicated in transcripts quality control (Morris et al., 2007). As well, several NMD proteins including UPF1 have been shown to be associated to telomeres and their depletion modifies TERRA nuclear localization (Azzalin et al., 2007). Therefore, to determine if INT6 also regulates TERRA expression, we performed a nuclease S1 mapping to quantify TERRA amounts in U20S and HT1080 cells. This method allows to quantify specific RNAs in a mixture of total cellular RNA by using a single-stranded DNA probe, here, composed of three repetitions of the sequence TTAGGG, followed by a flap (of unrelated sequence) marked on 5' with a fluorescent dye (Figure 1A, lane 1). A dose response analysis of TERRA RNA produced by *in vitro* transcription shows a signal at 18 nucleotides (Figure 1A, lane 2, 3, 4); as expected, it attests the technique sensitivity since it even detects 0.1pmol of this *in vitro* transcribed RNA. Then, S1 mapping with the telomeric probe carried on total cellular RNA from U2OS cells, generates a signal of 18 nucleotides (Figure 1, lane 6, 7, 8 and 9) which corresponds to the one observed with TERRA transcribed *in vitro* (Figure 1A, lane 10). The quantification of TERRA RNA amounts in U2OS total cellular RNA shows a substantial increase of ~4-fold

with two different siRNA targeting INT6 (I6.1 and I6.3) as compared with siRNA control (Figure 1B, Supplementary Figure S2A). The efficiency of INT6 depletion by the two INT6 siRNA is indicated by western blot (Supplementary Figure S1). In HT1080 cells, three different concentrations of total cellular RNA transfected with siI6.3 and siControl shows also an increase in TERRA RNA levels (Figure 2C). Unlike U2OS, The quantification of TERRA levels in HT1080 revealed an increase of only ~1.5-fold in INT6-deficient cells (Supplementary Figure S2B). These S1 mapping results demonstrated that INT6 silencing impacts on total TERRA RNA levels.

INT6-depletion increases specific TERRA steady-state levels without modifying their stability:

Consistent with S1 mapping analysis, we sought evidence of TERRA levels change upon INT6-depletion by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) measurements from different chromosome arms (Chromosomes 10, 15, Xp and Xq). In U2OS cells treated by siRNA I6.3, the quantitative RT-PCR analysis of TERRA expression from individual subtelomeres of the chromosomes 15 and Xq, revealed an increase of TERRA expression ($p<0.05$) but any change was not observed for chromosome 10 (Figure 2A). Then, we also performed analogous experiments in HT1080 treated cells and, contrary to U2OS cells, a significant increase of TERRA levels was observed in the chromosome 10 ($p<0.05$) (Figure 2B). An increase was also observed in chromosome Xp and Xq but the variations were too high between experiments. These results are in agreement with S1 mapping data, indicating an increase of TERRA RNA levels upon INT6 depletion while the qRT-PCR experiments specifically state that this increase is chromosome specific and cellular type phenomenon.

Therefore, to determine whether INT6 acts on TERRA expression because of its NMD function, we analysed TERRA RNA half-life of the chromosome 10. For that, we blocked RNA transcription with 100 ug/ml of 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) and measured by qRT-PCR, at different times, TERRA levels in INT6 depleted conditions. GAPDH was included in the analysis for normalization. Quantification did not revealed any effect of TERRA stability even in U2OS and HT1080 cells (Figure 2C and 2D). So, the increase of TERRA levels shown above could not be explained by a NMD function of INT6.

INT6 depletion results in telomere DNA damage and chromosomal aberrations:

It was previously shown that NMD factors inhibition increases TERRA levels and they are also involved in genome stability and telomere maintenance. Indeed, UPF1, SMG1 and

SMG6 factors depleted cells increase telomere aberrations as TFEs (Telomere free end) and FT (Fragile telomeres, also named MTS) (Chawla et al., 2011). It was also shown that TRF2 knock-down increases telomere damage and TERRA levels (Caslini et al., 2009). It clearly appears that TERRA levels increase after telomere dysfunction. To assess whether loss of INT6 is associated to telomere dysfunction, U20S cells depleted for INT6 by siRNA transfection (Supplementary Figure S1) were examined by indirect immunofluorescence using antibodies against 53BP1 and the protein shelterin TRF1 (Figure 3A). 53BP1 foci are markers for DNA DSBs and have been used as an indicator of dysfunctional telomeres (TIF). We considered a cell TIF-positive if it contains four or more 53BP1 foci that colocalize with TRF1. Quantification of these TIFs showed that 30% of TRF1 foci co-localized with 53BP1 foci in cells depleted for INT6, as opposed to 7% in control siRNA transfected cells (Figure 3B). These observations disclose that in the absence of INT6, telomeres are recognized as sites of DNA damage. Then, to confirm that these results are not only due to an increase of 53BP1 foci in INT6 siRNA conditions, a scoring of 53BP1 foci in 600 nuclei was done. It showed a mean of 5,4 (SD = 2,1) and 5,6 (SD = 2) 53BP1 foci per nucleus under control and INT6 depleted conditions, respectively (Figure 3C). Thus, there was no significant variation in 53BP1 foci due to INT6 silencing and TIFs foci are really representative of INT6 compromised cells.

To address a role for INT6 in telomere protection, we further asked what is the impact of it loss on the formation of chromosomal aberrations. Consistently, we performed a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining using telomeric PNA probe, on metaphase spreads (Figure 3D). The presence of telomere free ends (TFE) and multi-telomeric signals (MTS) which are known to result from replication fork stalling and breakage at fragile sites (Durkin and Glover, 2007; Sfeir et al., 2009), were scored. In INT6-depleted U20S cells, TFE and MTS frequencies are significantly increased, 2,3 and 1,7 fold, respectively, compared to control siRNA transfected cells (Figure 3E). These findings indicate the implication of INT6 in telomere protection.

In addition, these aberrations could not be explained by a decreasing in telomere length, because experiment conditions didn't allow us to have this information. Indeed, the measurement by Southern blot was realised in U2OS and Super-HT1080 cells and only in two PD (Population Doubling), because of the toxicity of the INT6 siRNA treatment (Supplementary Figure S3). Indeed, it was shown that silencing of INT6 impairs mitosis

progression (Morris and Jalinot, 2005) explaining why a long treatment of cells with INT6 siRNA to visualise telomere length is impossible.

INT6 depletion results in de-condensed chromatin and in decreased H3K9me3 and H4K20me3 at telomeres:

Considering the role of INT6 in histone expression, we further analyzed whether these telomere aberrations might be related to a change in chromatin status. For that, we investigate histone density at telomeres by digesting nuclei from U2OS control and INT6-depleted cells with micrococcal nuclease (MNase). Cell nuclei were treated by this enzyme which preferentially cuts between nucleosomes for increasing times. Then, DNA was analysed by Southern blot, with a probe corresponding to telomeric repetitions (right panel) and to Alu sequences as control (left panel) (Figure 4A). The quantification of radioactivity signal corresponding to every mono-nucleosome in single lanes was measured. Then, the ratio of Telo probe signal towards Alu probe signal was calculated. The quantification analysis indicates a rapid mono-nucleosomes accumulation in siRNA transfected cells as compared with the control (Figure 4B). Then, we examined the changes in telomere-associated chromatin. Our data suggests that nucleosome organization at human telomeres is affected by the absence of INT6, indicating a less compact chromatin. To further explore the role of INT6 in telomere heterochromatin formation, we used the ChIP assay to determine whether INT6 depletion changes any known histone modification specific of heterochromatin. We assayed TRF2 as ChIP control, histone H3 (H3), histone H4 (H4), H3 trimethyl K9 (H3 K9me3), and H4 trimethyl K20 (H4 K20me3) in U2OS cells depleted for INT6 (Figure 4C). ChIP results revealed a reduced density of about 5 times for H3K9me3 and 1.5 times for H4K20me3 at telomeres, in INT6 deficient cells. However, any such differences were not detected for histones H3 and H4 (Figure 4D). The reduction of modified histones is in agreement with the telomeric chromatin decondensation uncovered by the MNase assay. These data indicated a clear change in chromatin status at telomeres when INT6 was silenced.

DISCUSSION

Our analyses support a previously unrecognized role of INT6 in telomere end protection. In this report, we demonstrated that INT6 depletion is associated with an increase in total TERRA expression. Moreover, this regulation is chromosome and cellular type specific (Figure 1 and 2). Then, we showed that this result couldn’t be explained by a NMD effect of INT6 on TERRA mRNA stability. Similarly, Azzalin et al demonstrated that UPF1, SMG1

and SMG6 NMD factors depletion increase TERRA levels without affecting its stability (Azzalin et al., 2007). Moreover, they demonstrated that this TERRA accumulation is associated with telomeric chromatin. In addition, it was discovered that UPF1 interacts with polymerase polδ and telomerase (Azzalin and Lingner, 2006b). All these results suggested that UPF1, SMG1 and SMG6 factors participate in displacing TERRA to permit replication fork progression. Like UPF1, our data suggest the possibility of INT6 to displace TERRA helping replication fork progression. However, TERRA localization in INT6 depleted cells remains to be addressed.

We had next showed that INT6 plays a role in telomere stability. Indeed, INT6 depletion induces an increase in the colocalization of 53BP1 with the telomere shelterin TRF1 indicative of TIFs (Figure 3). Interestingly, similar effects were demonstrated in UPF1 depleted cells (Azzalin et al., 2007). Consistently, our DNA-FISH analysis performed in INT6-depleted cells revealed an increase in telomere aberrations, including multi-telomeric signals (MTS) which reflects replication defects. Similar results were observed in UPF1-depleted cells (Azzalin et al., 2007) and the authors specified that these defects stem predominantly from incomplete leading-strand telomere replication (Chawla et al., 2011). In this line, INT6 is also implicated in general replication by stabilizing MCM7: a subunit of the MCM complex which permits to replication origins to initiate replication only once per cell cycle. Indeed, INT6 contributes to the replication process by protecting the polyubiquitinylated form of MCM7 from degradation during S phase (Buchsbaum et al., 2007). This knowledge and our findings in this report clearly suggest the implication of INT6 in telomere replication.

TERRA upregulation observed in INT6-depleted cells could be a consequence of telomere deprotection. Effectively, it was reported that the increase in TERRA at damaged telomeres is p53-dependent (Caslini et al., 2009). Nevertheless, another study shown that p53 does not account for TERRA upregulation following telomere deprotection. Moreover, they added that depletion of ATM, known to silence transcription near DSBs, does not change TERRA levels at both functional and deprotected telomeres (Porro et al., 2014). Our previous data demonstrated the capacity of INT6 to stabilize ATM at DSBs and of facilitating its signalling upon DNA damage (Morris et al., 2012). This information supports the idea that DDR pathways are not responsible of TERRA accumulation. Otherwise, TERRA level regulation might be responsible for telomeric damage. This hypothesis is sustained by the discovery that TERRA depletion causes telomere damage (Deng et al., 2009). In addition, several studies

demonstrated the correlation between TERRA accumulation and telomeric DNA damage (Azzalin et al., 2007; Deng et al., 2012a; Porro et al., 2014) under telomere deprotected conditions. However, because of technical issues, it is impossible to connect TERRA overexpressing with DNA damage induction.

In this report, we demonstrated that INT6 depletion alters telomeric chromatin. Chromatin state and transcription level are related to histones post-translational modification. Moreover, DNA and histone synthesis are coupled, and ongoing replication is required to maintain chromatin conformation. Thus, chromatin reorganization at dysfunctional telomeres could be responsible for TERRA overexpression in INT6-depleted cells. Moreover, INT6 could be implicated in the establishment of telomere heterochromatin in relation with telomere replication progression. By the way, INT6 could protect telomeric chromatin from DSBs and/or TERRA accumulation. This result resembles TRF2 function, which depletion increases telomeric damage (Caslini et al., 2009), accumulates TERRA amounts (Porro et al., 2014) and unpacked chromatin (Baker et al., 2011). In this line, we observed that INT6 depletion leads to a reduction of H3K9me3 and H4K20me3 histone trimethylation marks, characteristic modifications of silenced chromatin (Benetti et al., 2007b; García-Cao et al., 2004). It is in agreement with the findings that H3K9me3 is enriched at the TTAGGG repeats and more telomere-distant regions in U2OS cells (Deng et al., 2012b) and that SIRT6 (silent information regulator) increases H3K9me3 for maintaining transcriptional repression at telomeres (Arnoult et al., 2012; Tennen et al., 2011).

Together, these findings highlight a novel role for INT6 in telomere biology. In future studies it will be interesting to decipher the exact mechanisms underlying the function of this factor at telomeres, thereby, précising the role of INT6 in genome stability and oncogenesis repression.

Figure Legends

Figure 1: INT6 deficiency increases TERRA RNA levels.

(A) Analyses of TERRA RNA hybridization with (TTAGGG) probe containing a flap and marked with fluorescence in 5'. Probe molecules or RNA molecules that do not hybridize are removed by S1 nuclease digestion. The hybrid molecules are separated on a denaturing polyacrylamide gel followed by fluorescence analysis. The amount of the signal at 18 bp is a measure of the steady-state level of TERRA. Lane 5 and 1 correspond to the single strand probe with or without digestion by S1 nuclease, respectively. Lanes 2, 3 and 4 correspond to a range of TERRA RNA amounts produced *in vitro* (0,1-0,05-0,01 pmol). Lanes 6, 7, 8 and 9 correspond to total U2OS RNA hybridized cells with the telomeric probe.

(B) Analyses of total TERRA amounts from U2OS cells treated with siControl, siI6.1 or siI6.3 (Lane 1, 2 and 3). siRNA transfections were verified by western blot (Supplementary Figure S1). The protected fragments correspond to TERRA RNA and the signal intensity of the hybridization was quantified (Supplementary Figure S3A). An increasing of TERRA levels is observed in INT6-depleted cells.

(C) Analyses of three different amounts of total RNA in HT1080 treated with siControl or siI6.3. The signals of the lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6, corresponding to TERRA RNA hybridized with the probe were quantified (Supplementary Figure S3B). An increase in the signal is observed, for the three different concentrations.

Figure 2: INT6 deficiency increases chromosome-specific TERRA RNA levels and does not affect its stability.

(A) qRT-PCR analysis of TERRA expressed from individual 10q, 15q and Xp chromosomes in U2OS cells treated with siControl and siI6.3. Bars and error bars are averages and s.d from three experiments are shown, asterisk indicates a p-value<0,05 based on a student's *t*-test.

(B) qRT-PCR analysis of 10, 15, Xp and Xq subtelomere-specific TERRA transcripts in HT1080 cells treated with siI6.3. Averages and s.d from three experiments are represented as in A.

(C) The half-life of TERRA mRNA of the chromosome 10q was measured in U2OS cells treated with siI6.3. The amounts of TERRA mRNA were measured by qRT-PCR at each time point after the addition of DRB and normalized to GAPDH mRNA levels. Each point corresponds to the mean of data from two independent measurements, and error bars indicate standard deviations. Each experiment was done with two replicates. *P* value = 0, 88 (Insignificant).

(D) Same as in the panel C. The half-life of TERRA mRNA of the chromosome 10q was measured in HT1080 cells treated with siI6.3. Each point corresponds to the mean of data from three independent measurements, and error bars indicate standard deviations. Student's *t*-test showed insignificant result.

Figure 3: Induction of DNA damage signals and telomere aberrations in INT6 compromised cells.

(A) Representative images of confocal sections of 53BP1 foci (red) and TRF1 (green) in nuclei of U2OS cells transfected with siRNA control or siRNA targeting INT6. The merge and DAPI counterstained images are shown in the right panels and in enlarged panels. White arrowheads indicate collocation between 53BP1 and TRF1. Scale bar 10 µM.

(B) Quantification of the induction of TIFs by siRNA shown in (A). Cells with four or more 53BP1 foci colocalising with TRF2 were scored as TIF positive. Bars and error bars are averages and s.d from three independent TIF assays (>100 cells were scored for each transfection). An induction of TIF-positive cells is observed in siI6 transfected cells (Student's *t*-test, $P < 0.0003$).

(C) Quantification of 53BP1 foci shown in siRNA control and siI6.3. Bars and error bars are averages and s.d from three independent TIF assays (600 nuclei were scored). Student *t*-test doesn't reveal any statistical change.

(D) Examples of telomeric DNA-FISH performed on chromosomes from U2OS cells transfected with siI6.3 or siControl. Telomeric sequences are in green and DAPI-stained chromosomes in red. Yellow and white arrows point to telomere-free ends (TFEs) and to multi-telomeric signals (MTS), respectively. Enlarged chromosomes in the right are from siI6.3 transfected cells.

(E) Quantifications of TFE and MTS in metaphase spread of U2OS cells transfected with the indicated siRNA. Frequencies are expressed as numbers of TFE and MTS per

chromosome. Bars and error bars are averages and s.d from two independent experiments and n>800 indicate the cumulative number of scored chromosomes. Statistical significance was assessed with Student's *t*-test ($P < 0,0001$).

Figure 4: INT6 deficiency alters chromatin status.

(A) Digestion of chromatin from U2OS cells treated with siControl or SiI6.3 with micrococcal nuclease for increasing times. MNase digests were separated on 1.2% agarose gel and detected by hybridization with a telomeric probe (right panel) or an Alu probe (left panel). Lanes 19, 18 are negative and positive control for Telo probe hybridization, respectively. Lane 14 to 17 correspond to nuclei of siControl treated cells digested for 0,5-1,5-2,5 and 4,5 min. Lanes 10 to 13 represent nuclei of siI6.3 treated cells digested for the same times. In the left panel, analysis of digested DNA was done with Alu probe. The lane 1 is a positive control of Alu probe hybridization.

(B) Ratio of the mono-nucleosome signal to the overall hybridization signal of the telomeric probe with respect to the Alu probe. Bars and error bars are averages and s.d, respectively, of two independent experiments. Asterisks indicate $p<0,01$ and $p<0,05$ for the two first bars. The two last bars do not show any statistical change.

(C) DNA ChIP assay was performed in U2OS cells transfected with siControl or siINT6. Telomere repeat DNA was detected by dot blotting and hybridization with telomeric probe. Antibodies specific for TRF2, H3, H4, H3K9me3, H4K20me3, or control IgG were used for ChIP assays.

(D) Quantification of DNA ChIP assay represented by (A). ChIP DNA signals were normalized to input DNA signal and occupancies of H3K9me3 and H4K20me3 are relative to that of H3 and H4 at telomeres in INT6-deficient cells.

Supplementary data

Figure S1: Western-blot analysis of extracts of U2OS and HT1080 cells transfected with siRNA control, siI6.1 or siI6.3 and assayed with anti-INT6 or anti-actin at 3 days post-transfection. For each western-blot, correspondence with the article figures is indicated.

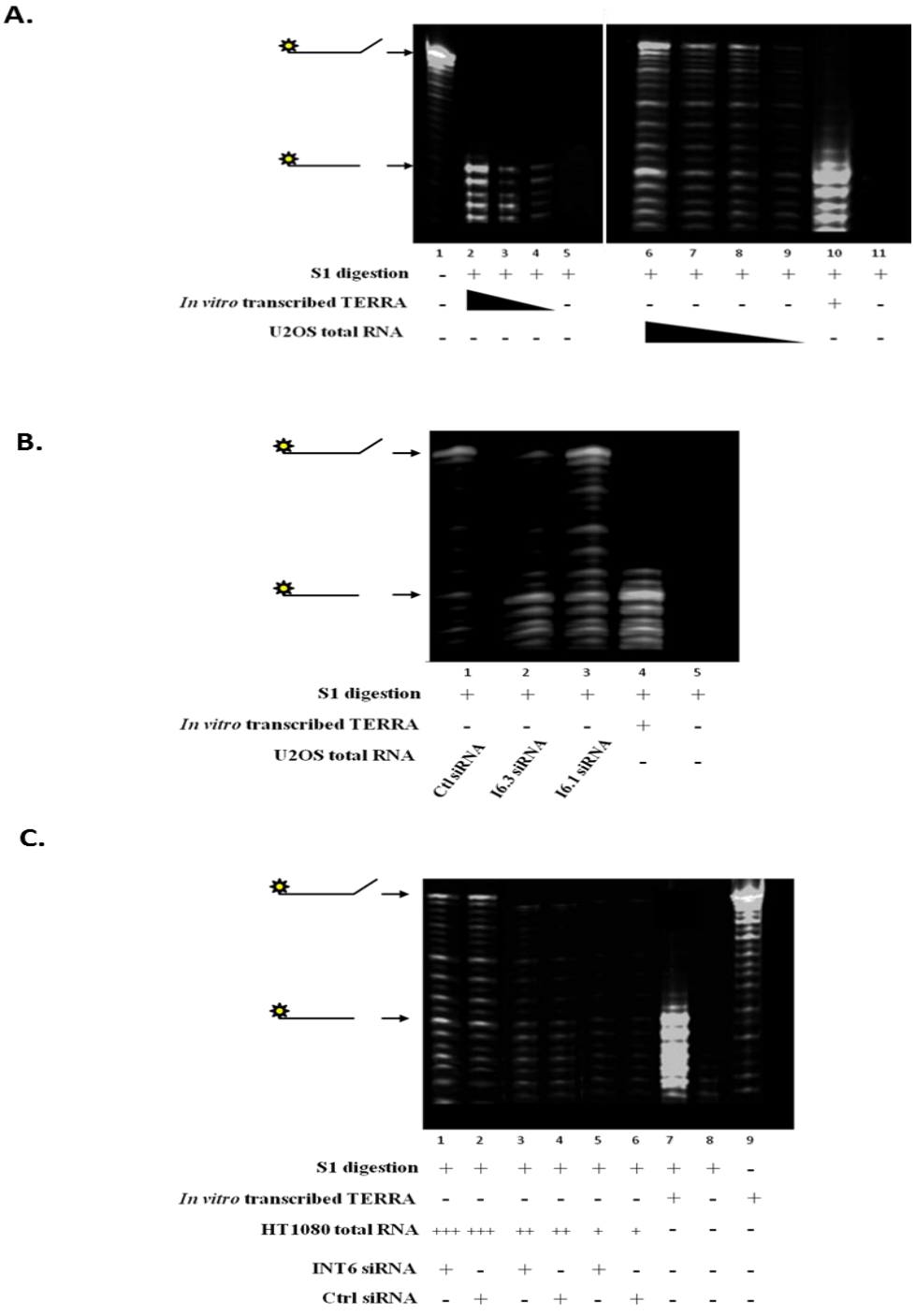
Figure S2: (A) Quantification of signal intensity of the S1 assay shown in Figure 1B for U2OS treated with siControl, siI6.1 and siI6.3. (B) Quantification of signal intensity shown in

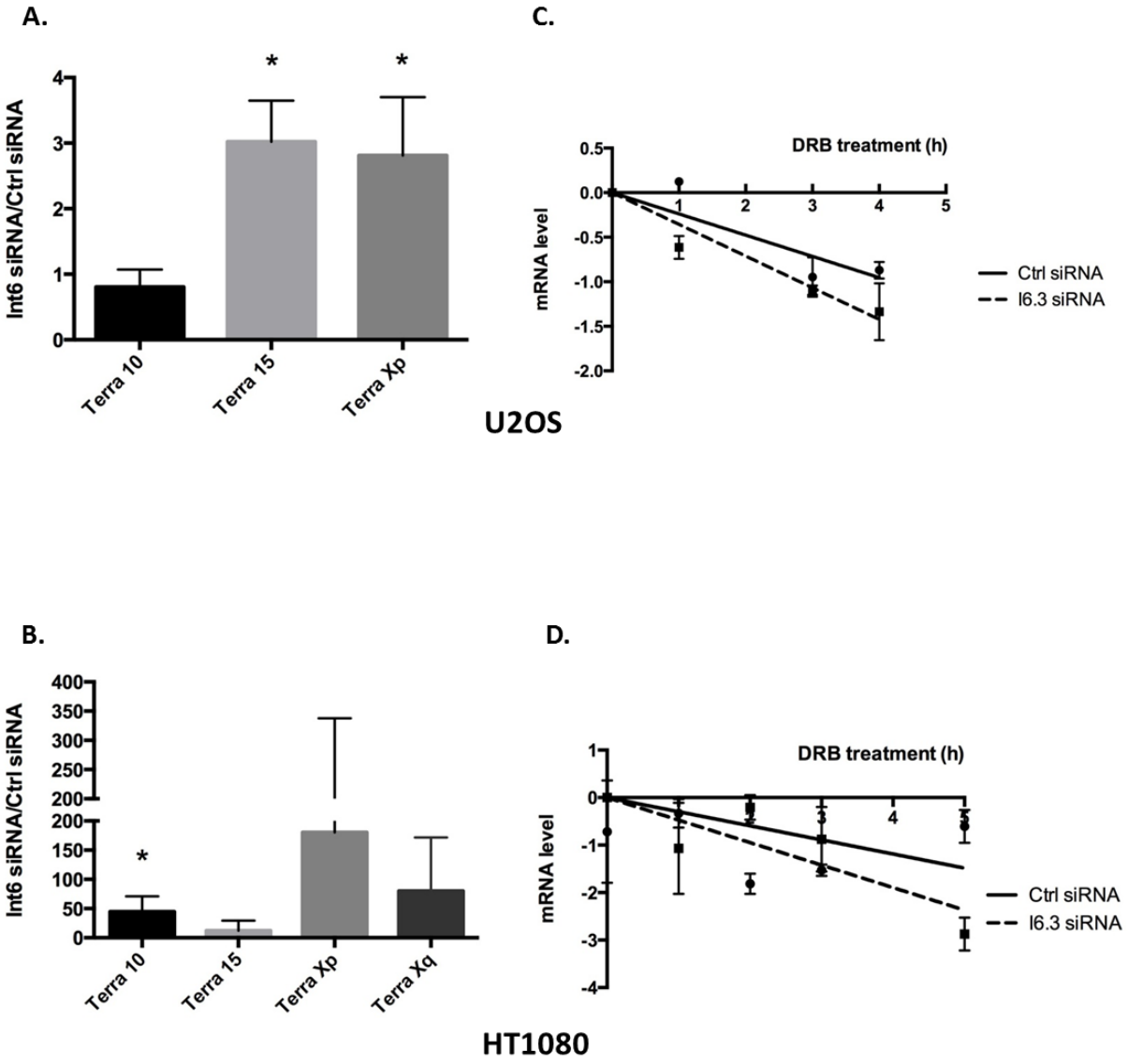
Figure 1C, in HT1080 cells treated with siControl, siI6.1 and siI6.3, for three different total RNA amounts conditions.

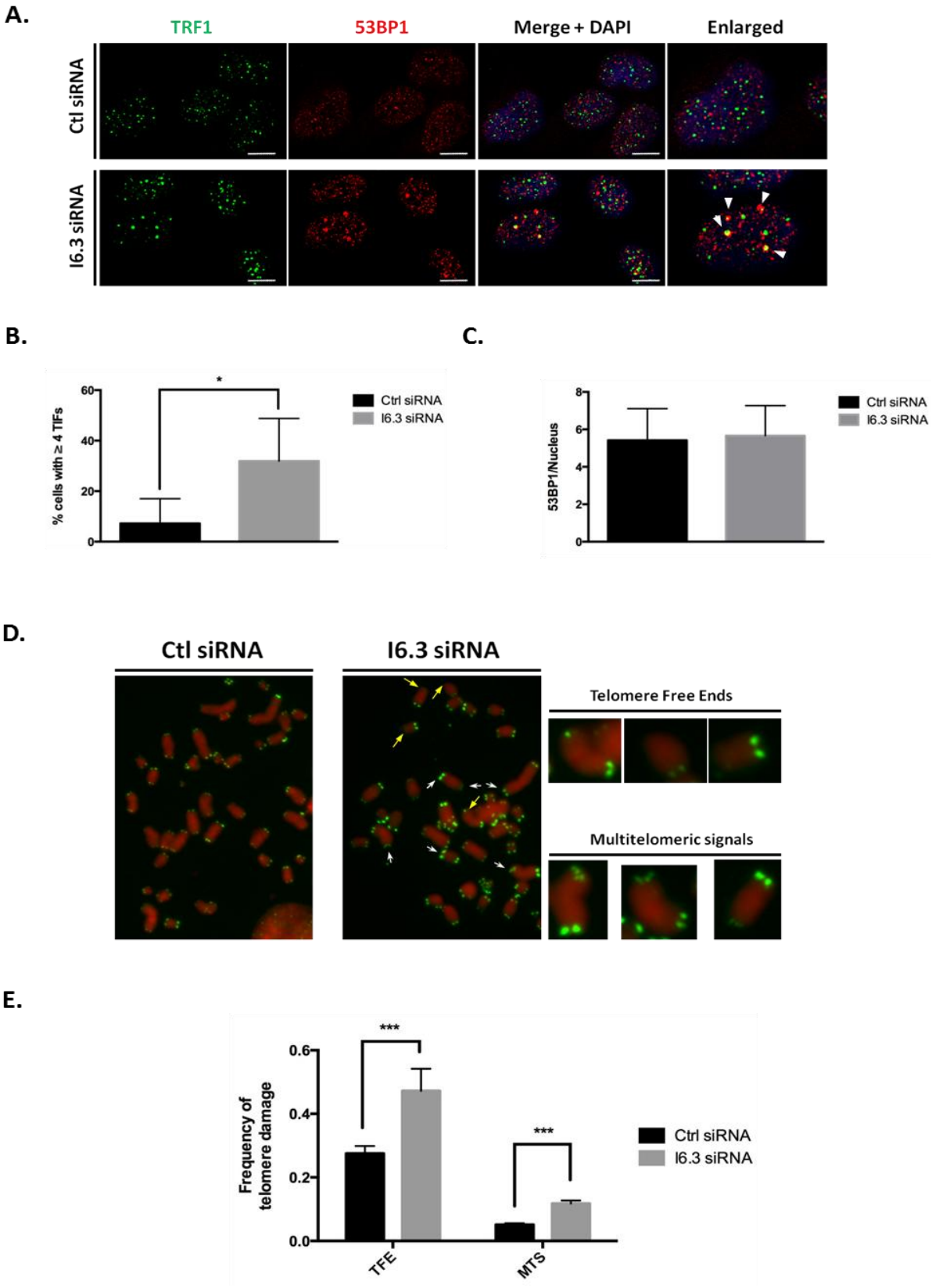
Figure S3: Telomere length is not changed in INT6-compromised cells.

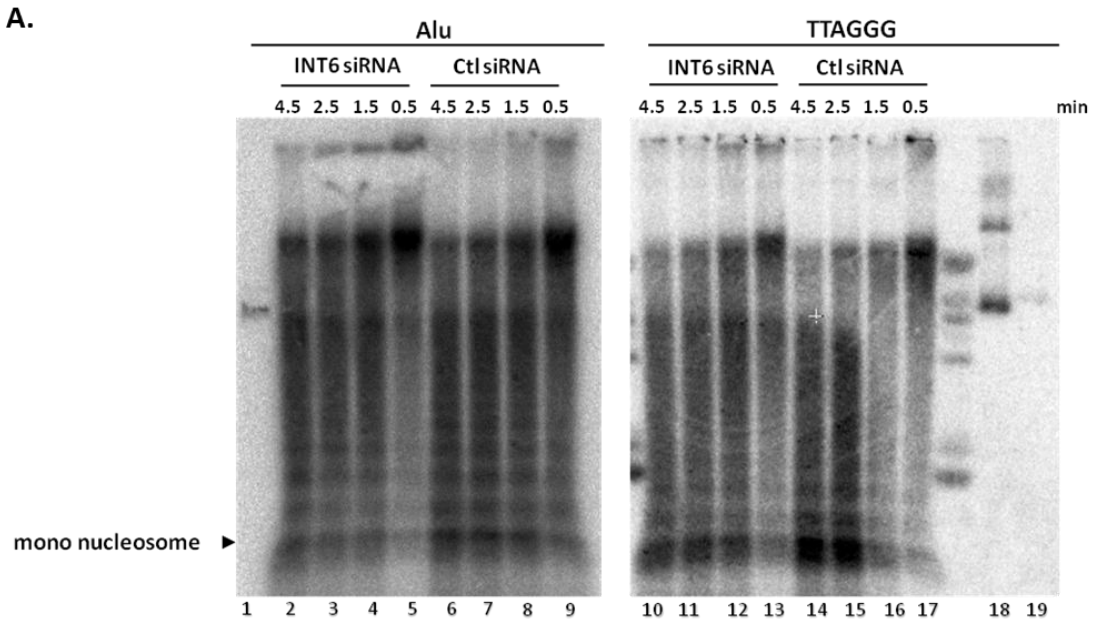
(A) Telomere restriction fragment analysis (TRF) of superHT1080 and U2OS cells expressing siControl or siI6.3, with positive control (PBS TTAGGG). Genomic DNA was purified; equal amounts were digested by *RsaI* and *HinfI* restriction enzymes, and then separated on the same gel before to be transferred on a membrane. $(T_2AG_3)_n$ ^{32}P labelled probe was used. Numbers on the left show the size corresponding to ladder (in kb).

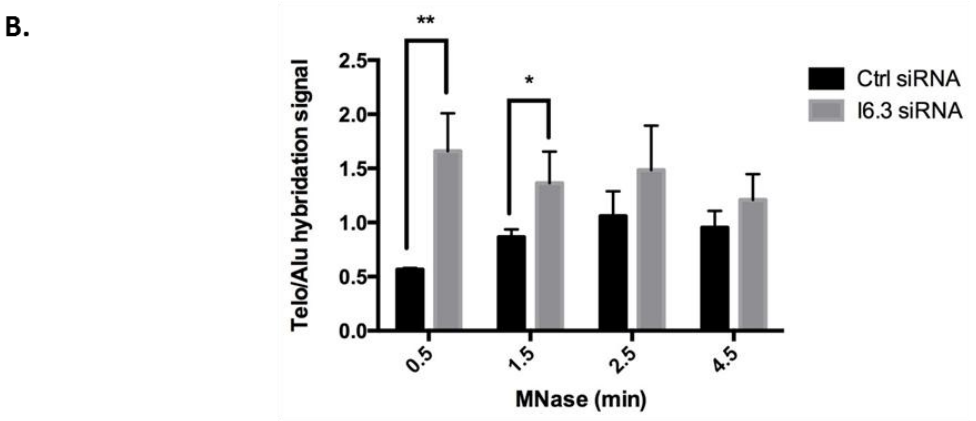
(B) Quantification of the DNA bands on the Southern-blot shown in (A), for U2OS cells. Bars and error bars are averages and s.d from five independent experiments, student's *t*-test revealed non-significant results.

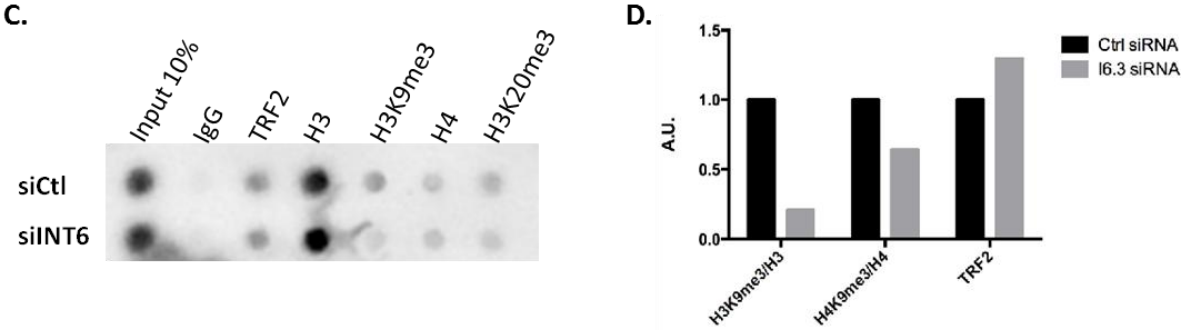

A.
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
S1 digestion - + + + + + + + + + +
In vitro transcribed TERRA - - - - - - - - - + -
U2OS total RNA - - - - - - - - - - -
B.
1 2 3 4 5
S1 digestion + + + + +
In vitro transcribed TERRA - - - + -
U2OS total RNA - -
Ctl siRNA
I6.3 siRNA
I6.1 siRNA
C.
1 2 3 4 5 6 7 8 9
S1 digestion + + + + + + + + -
In vitro transcribed TERRA - - - - - - + - +
HT1080 total RNA +++ +++ ++ ++ + + - - -
INT6 siRNA + - + - + - - - -
Ctrl siRNA - + - + - + - - -


A.
C.
Int6 siRNA/Ctrl siRNA
Terra 10
Terra 15
Terra Xp
DRB treatment (h)
mRNA level
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
U2OS
B.
D.
Int6 siRNA/Ctrl siRNA
Terra 10
Terra 15
Terra Xp
Terra Xq
DRB treatment (h)
mRNA level
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
HT1080


A.
TRF1
53BP1
Merge + DAPI
Enlarged
Ctl siRNA
I6.3 siRNA
B.
% cells with ≥ 4 TIFs
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
C.
53BP1/Nucleus
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
D.
Ctl siRNA
I6.3 siRNA
Telomere Free Ends
Multitelomeric signals
E.
Frequency of telomere damage
TFE
MTS
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA


A.
Alu
TTAGGG
INT6 siRNA
Ctl siRNA
INT6 siRNA
Ctl siRNA
4.5 2.5 1.5 0.5 4.5 2.5 1.5 0.5
4.5 2.5 1.5 0.5 4.5 2.5 1.5 0.5
min
mono nucleosome
1 2 3 4 5 6 7 8 9
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19


B.
Telo/Alu hybridation signal
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
0.5
1.5
2.5
4.5
MNase (min)


C.
Input 10%
IgG
TRF2
H3
H3K9me3
H4
H3K20me3
siCtl
siINT6
D.
A.U.
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
H3K9me3/H3
H4K9me3/H4
TRF2

Supplementary data

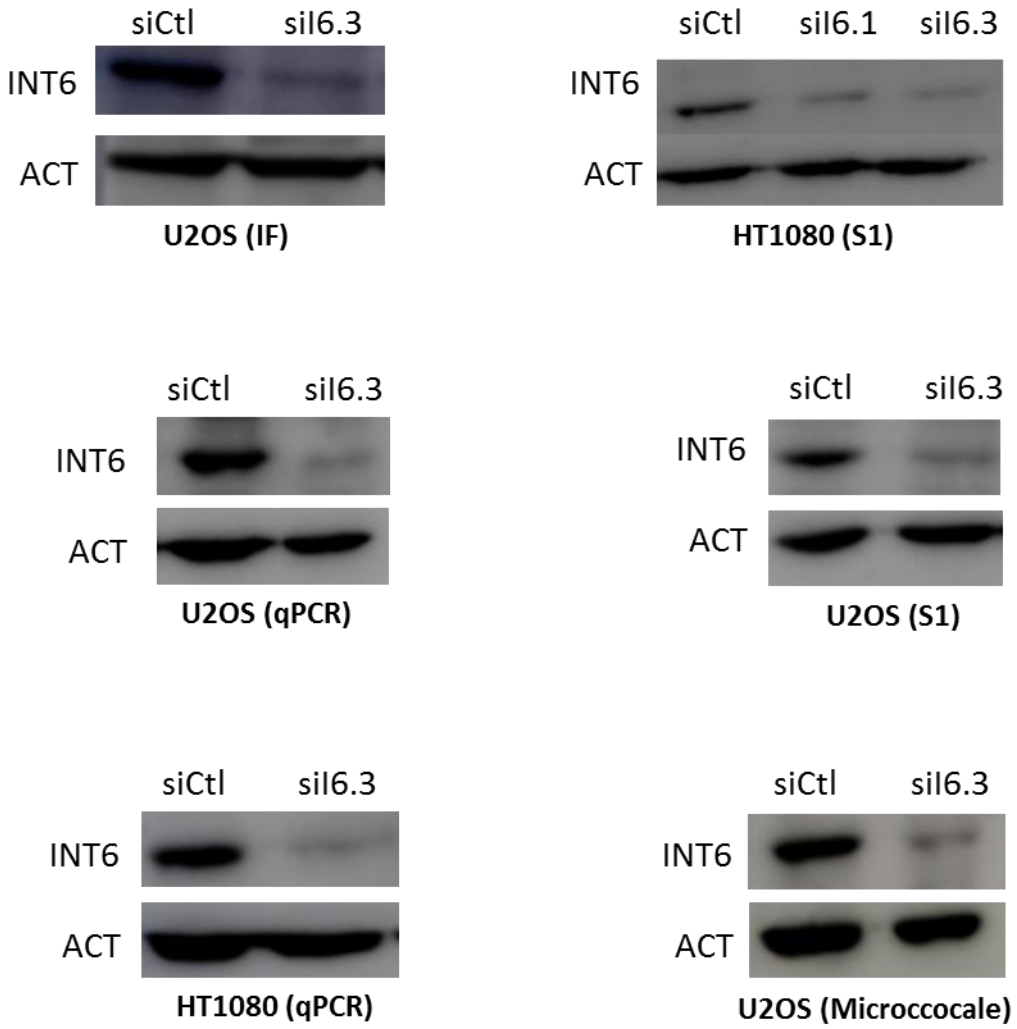


Figure S1

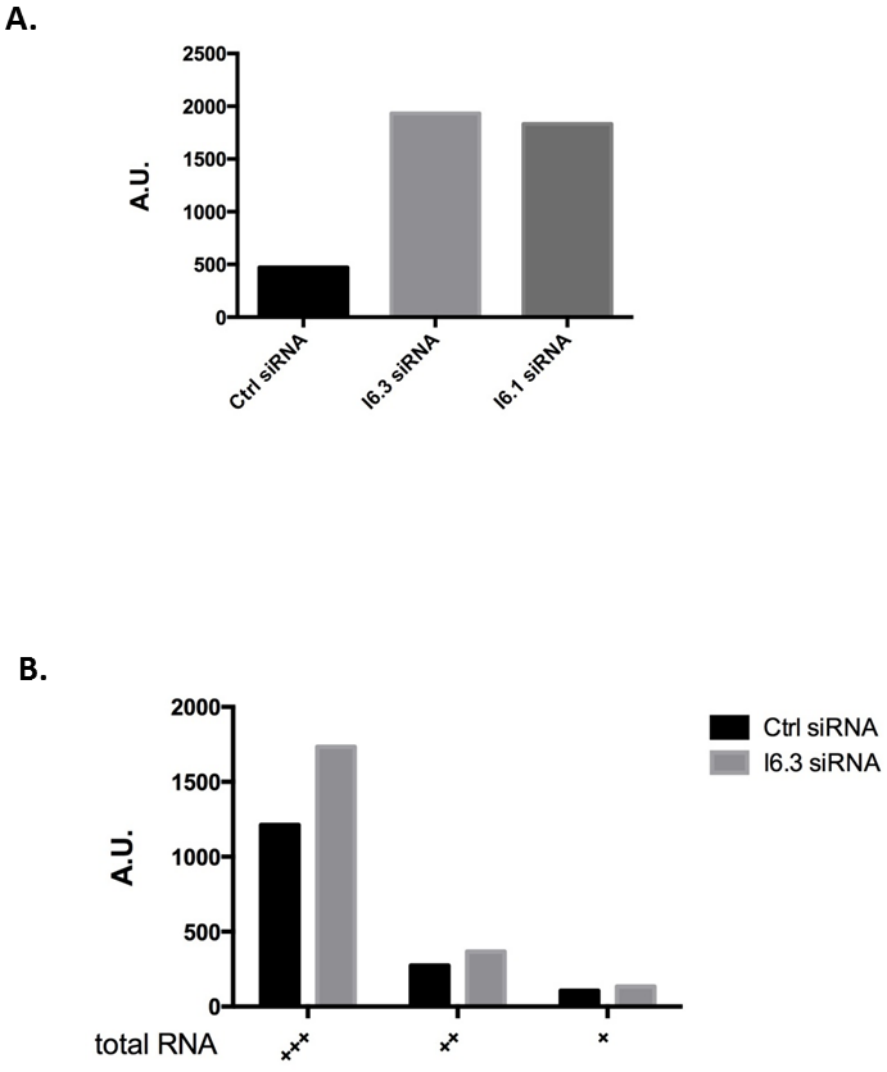

A.
2500
2000
1500
1000
500
0
A.U.
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
I6.1 siRNA
B.
2000
1500
1000
500
0
A.U.
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA
total RNA
+++
++
+

Figure S2

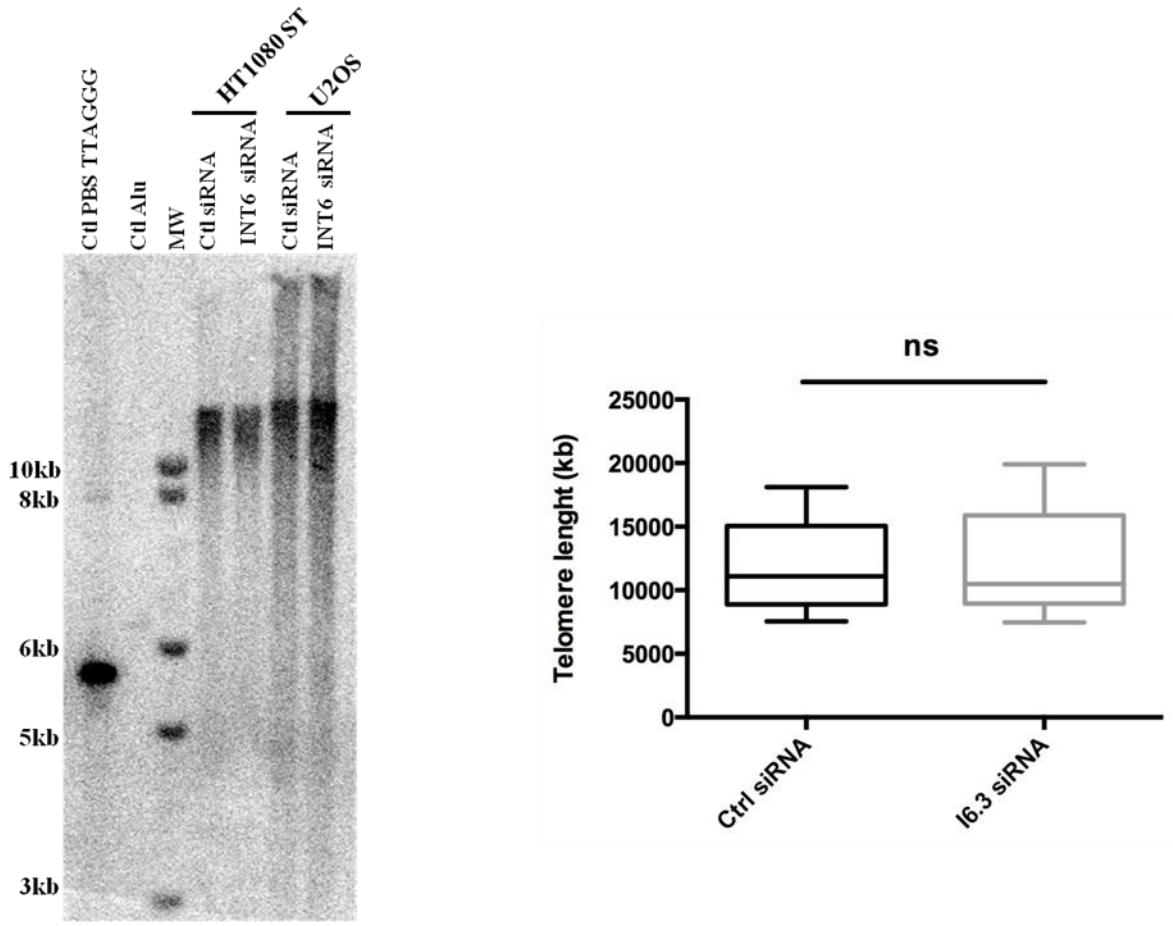

Ctl PBS TTAGGG
Ctl Alu
MW
HT1080 ST
Ctl siRNA
INT6 siRNA
U2OS
Ctl siRNA
INT6 siRNA
10kb
8kb
6kb
5kb
3kb
ns
Telomere lenght (kb)
25000
20000
15000
10000
5000
0
Ctrl siRNA
I6.3 siRNA

Figure S3

Materials and methods

Cell culture and transfection

Human osteosarcoma U2OS cells, HT1080 and superHT1080 fibrosarcoma cells were cultured in high-glucose DMEM supplemented with 10% Fetal Calf Serum (Invitrogen) and penicillin-streptomycin at 37°. FCS was reduced to 5% and antibiotics were omitted for siRNA transfection which was performed using INTERFERin (Polyplus transfections) as described by the manufacturer. Cells were then collected 72 h after transfection. One portion of cells was used as a source of RNA, whereas the other was used as a source of protein. siRNA I6.1 and I6.3 have been described previously (Morris and Jalinot, 2005; Morris et al., 2007).

Antibodies

Primary antibodies were: Rabbit monoclonal to INT6 C-20, mouse monoclonal to TRF1 (ABCAM-ab 10579), rabbit polyclonal to 53BP1 (Novus Biologicals – NB 100-305). Secondary antibodies were: donkey polyclonal anti mouse ALEXA 488 (A21202), donkey polyclonal anti rabbit ALEXA 555 (A31572), from Cell Signalling Technology.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells grown on coverslips were fixed by MeOH at 20°C, or by 4% paraformaldehyde at RT, 10 to 15min. After air dry, cells were incubated for 1h in blocking solution (0.8x PBS, 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 3% milk) followed by 1h of incubation at 37°C with the first antibody. Primary antibodies were prepared in blocking solution as following dilutions: monoclonal anti-53BP1 (1:300), and mouse polyclonal TRF1 (1:300). Cells were further washed three times with 0.8xPBS, 50mM NaCl, 0.1% Triton X-100. The secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 555 (Invitrogen), prepared on blocking solution, was then incubated for 1 h in the dark, and the cells were further washed three times with 0.8xPBS, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 and once with PBS 1X. Finally, cells were mounted in Vectashield DAPI (1.5 μg/mL; Vector Laboratories). Slides were observed with Confocal Spectral Leica SP5.

Metaphase preparation

Approximately 24h after cells were seeded, colcemid (60 ng/ml final concentration; KaryoMAX, INVITROGEN) was added to the medium for 30 min. Cells were harvested and resuspended in 30 ml of 75 mM KCl for 15 min. at 37°C. 100ml fixative (methanol:acetic acid, 3:1) was added and supernatant was removed after centrifugation. Cells were resuspended in fixative by vortexing and left overnight at 4°C. Then cells were centrifuged and an aliquot was spread on cleaned slides. After drying overnight at room temperature, slides were stored at 20°C until use.

Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) on metaphase chromosomes

The cells spread on slides were permeabilised in Triton X-100 buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl2, 0.5% Triton X-100 and 300 mM sucrose) at room temperature (RT) for 5 min, followed by 15 min fixation in 3% paraformaldehyde and 2% sucrose, then again permeabilized in Triton X-100 buffer at RT for 10 min. Cells were blocked in 2% BSA in PBS overnight at 4°C. Then followed IF steps mentionned above. After final washes, slides were fixed for 2 min at RT in 4% paraformaldehyde, followed by dehydration through an ethanol series (50%, 75% and 100%, 5 min. each). Fluorochrome-coupled PNA probe (AATCCC) was then applied to the slides (0.3 ng PNA probe/ml, dissolved in 70% formamide, 10 mM Tris pH 7.2, 1% Blocking Reagent (ROCHE BIOCHEMICALS) first denaturing at 80°C for 3 min, then hybridization for 2h at RT. Washes were the following: 2x15 min at RT in 70% formamide, 10 mM Tris pH 7.2, 3x5 min in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20. Finally, slides were counterstained with DAPI, mounted in VECTASHIELD (VECTOR LABORATORIES). IF images were acquired using the AxioImager. Colocalization was evaluated either by visual inspection of signal overlap on merged images and by using the Colocalization Highlighter plug-in of ImageJ software (National Institutes of Health).

Nuclease S1 assay using fluorescence oligonucleotide probe

Total RNAs were extracted using the Nucleic Acid and Protein Purification Kit (Macherey-Nagel), then, hybridized with telomere probe $(TTACCC)_3$ in hybridization buffer (1M NaCl, 10 mM EDTA, 380 mM HEPES pH 7.0) and 25% Triton X-100 at 55°C, over-night. The next day, digestion by 20 units of S1 nuclease (Invitrogen) is applied in 0.33M NaCl, 66 mM NaOAc pH 4.6, 2.2 mM ZnSO4, 0.01% Triton X-100, for 60 min at 37°C. The reaction is then stopped by 2.5 M NaOAc, 40 mM EDTA, 3 µg tRNA. RNA samples were precipitated

by ethanol, dried in speedvac, resuspended in formamide Blue dye, then, separated in a 14% acrylamide-urea gel (1:19) (~4h at 14mA). Fluorescent images were acquired using the Odyssey LI-COR scanner.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Then, reverse transcribed with telomere-specific primers [$(CCCTAA)_5$] (5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA-3') at 55°C using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). For Syber Green reactions, four different TERRA transcripts generated from four distinct chromosome ends (10q, 15q, XpYp, and XqYq), were analyzed using specific oligonucleotides listed below. TERRA levels were normalized against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA signals. Real-time PCR analysis was performed using Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). The LightCycler apparatus (Roche) is used according to the cycling conditions: denaturation for 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 60 s and 72°C for 10 s. To check that the primers used for amplification are giving a specific PCR product, melting curve analysis was always performed.

Similarly, for the analysis of the chromosome 10 TERRA half-life, total RNA was extracted by Trizol reagent (Invitrogen). One-step qRT-PCR (QuantiTect SYBR green qRT-PCR kit) was further performed by using appropriate primers with normalization with respect to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA.

Primers used:

Primer Chr 10q Forward 5'-GAATCCTGCGCACCGAGAT-3'
Primer Chr 10q Reverse 5'-CTGCACTTGAACCCTGCAATAC-3'
Primer Chr 15q Forward 5'-CAGCGAGATTCTCCCAAGCTAAG-3'
Primer Chr 15q Reverse 5'-AACCCTAACCACATGAGCAACG-3'
Primer Chr Xp/Yp Forward 5'-GCAAAGAGTGAAAGAACGAAGCTT-3'
Primer Chr Xp/Yp Reverse 5'-CCCTCTGAAAGTGGACCAATCA-3'
Primer Chr Xq/Yq Forward 5'-GGAAAGCAAAAGCCCCTCTGAATG-3'
Primer Chr Xq/Yq Reverse 5'-ACCCTCACCCTCACCCTAAGC-3'

MNase pattern assay

Telomeric nucleosome patterns were analysed by micrococcal nuclease (MNase) digestion. Briefly, cells from a 10 cm diameter petri dish, treated with siControl or siI6.3, were washed three times in PBS and resuspended in 100 µl of NIB buffer (15 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 1 mM CaCl2, 250 mM sucrose, 0.5 mM DTT). Cells were

lysed by 3 cycles of freeze thaw in liquid nitrogen. 10 µl of cell extract were mixed with 90 µl of NIB supplemented with micrococcal nuclease (NEB) to give a final concentration of 5 u/µl. Digestions were carried out at 37°C for the indicated increasing amounts of time and reaction was stopped by addition of 25 mM EGTA. DNA was prepared by phenol/chloroform extraction and 10-15 % of the preparation runs through a 1.2 % agarose gel in TBE 0.5 x buffer. Then, transferred to nylon membrane (Hybond N, Amersham International, Buckinghamshire, UK) and hybridized with ^{32}P-labelled $(TTACCC)_4$ probe or ^{32}P-labelled Alu probe. Filters were scanned by Fuji FLA5100 phosphoimager (Fujifilm) and images analyzed with imagequant software.

ChIP assays

Cells growing at 80% confluence were crosslinked by the addition of formaldehyde to a final concentration of 1% for 10 min at room temperature and gentle agitation. The reaction was stopped by adding glycine pH 7-7,5 (0.25 M final concentration) and incubated 5 min at room temperature, with gentle agitation. Cells were washed with cold PBS 1X and store at -80°C until usage. Cells pellet were resuspended in Lysis Working Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate and 1X Protease Inhibitor Roche). Then, the chromatin was sonicated (0.5/0.5 time, High) for 40 min. RIPA Buffer Working solution (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl and 1% NP40) was added. Protein G/A Dynabeads (Novex, 10004D/10002D) were incubated with the chromatin for 1 hr at 4°C to pre-clear. The pre-cleared chromatin was incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (rabbit polyclonal anti-histone H4, UPSTATE 07-108; mouse monoclonal anti-histone H3, Active Motif 39763; rabbit polyclonal anti-H3K9me3, Active Motif 39765; rabbit polyclonal anti-H4K20me3, Active Motif 39180; Rabbit polyclonal antibody to TRF2, Abcam 13579 and murine serum IgG, Sigma 18765). Immune complexes were collected on Protein G/A dynabeads for 2h at 4°C. Following washes with RIPA Wash Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1% NP40, 0.25% Sodium Deoxycholate), the immune complex was resuspended in (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1% SDS). Crosslinking was reversed by incubation at 65°C, overnight. The resulting DNA was purified by treatment with RNase A, proteinase K, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation and was resuspended in water. Then, DNA was spotted into a nitrocellulose membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences) which was crosslinked at 0.12 Joules for slot blot hybridization at 55°C by using TTAGGG probe sequence labelled with

γ-[^{32}P]ATP. Membrane was washed once with SSC 2X at 55°C, developed with a Fuji FLA5100 and quantified with ImageQuant 8.1 software.

Southern blot

Genomic DNAs are extracted with the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). 8 µg of genomic DNA were digested with relevant restriction enzymes (*HinfI*/*RsaI*) and separated by gel electrophoresis on 1% agarose gel/0.5X TBE at 6v/cm, over-night. After verification of the quality of the separation by UV, the gel was denatured, depurinated and neutralized inside the following solutions: 0.25 M HCl, 0.5 M NaOH/1M NaCl, and 1 M NH4 acetate. Then by capillarity (20× SSC), the DNA was blotted into a nitrocellulose membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences) and crosslinked by UV (254 nm and 0.12 Joule). The membranes was neutralized with 250 mM pH 7.2 phosphate buffer at 50 °C, prehybridized one hour at 50 °C (6× SSC, 0.5× SDS, 1% milk) and hybridized O.N. at 50 °C (6× SSC, 0,1× SDS, 1% milk) with radioactive telomeric probes, $(T_2AG_3)_n$, labelled by random priming with γ-dATP^{32}. The membrane was exposed to a phosphorimager screen, scanned by Fuji FLA5100, and telomere length was analyzed using Multigauge software (Fuji). The probe $(T_2AG_3)_n$ used was a fragment of 700 nucleotides from PBS plasmid (restriction sites: *BamH1*/*EcoR1*).

Acknowledgements

This work was supported by the 'Fondation ARC pour la recherche sur le cancer'. PhD student supported by a fellowship from Algerian Ministry of research and Higher education, and further from International Relation (RI) of Lyon.

Conflict of interest

None of the authors have a financial interest related to this work.

References

Arnoult, N., Van Beneden, A., and Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 948–956.

Asano, K., Merrick, W.C., and Hershey, J.W. (1997). The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. J. Biol. Chem. *272*, 23477–23480.

Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2006). The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. Curr. Biol. CB *16*, 433–439.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. Science *318*, 798–801.

Baker, A.M., Fu, Q., Hayward, W., Victoria, S., Pedroso, I.M., Lindsay, S.M., and Fletcher, T.M. (2011). The telomere binding protein TRF2 induces chromatin compaction. PloS One *6*, e19124.

Benetti, R., García-Cao, M., and Blasco, M.A. (2007a). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. Nat. Genet. *39*, 243–250.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2007b). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. J. Cell Biol. *178*, 925–936.

Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nat. Rev. Genet. *8*, 299–309.

Buchsbaum, S., Morris, C., Bochard, V., and Jalinot, P. (2007). Human INT6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle. Oncogene *26*, 5132–5144.

Caslini, C., Connelly, J.A., Serna, A., Broccoli, D., and Hess, J.L. (2009). MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. Mol. Cell. Biol. *29*, 4519–4526.

Chawla, R., Redon, S., Raftopoulou, C., Wischnewski, H., Gagos, S., and Azzalin, C.M. (2011). Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. EMBO J. *30*, 4047–4058.

Chen, L., Uchida, K., Endler, A., and Shibasaki, F. (2007). Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. J. Biol. Chem. *282*, 12707–12716.

Chen, L., Endler, A., Uchida, K., Horiguchi, S., Morizane, Y., Iijima, O., Toi, M., and Shibasaki, F. (2010). Int6/eIF3e silencing promotes functional blood vessel outgrowth and enhances wound healing by upregulating hypoxia-induced factor 2alpha expression. Circulation *122*, 910–919.

Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., and Lieberman, P.M. (2009). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. Mol. Cell *35*, 403–413.

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H.-S., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R.V., Bartolomei, M.S., et al. (2012a). A role for CTCF and

cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. EMBO J. *31*, 4165–4178.

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H.-S., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R.V., Bartolomei, M.S., et al. (2012b). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. EMBO J. *31*, 4165–4178.

Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. Annu. Rev. Genet. *41*, 169–192.

García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H.F.M., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. Nat. Genet. *36*, 94–99.

Grzmil, M., Rzymski, T., Milani, M., Harris, A.L., Capper, R.G., Saunders, N.J., Salhan, A., Ragoussis, J., and Norbury, C.J. (2010). An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer. Oncogene *29*, 4080–4089.

Hoareau Alves, K., Bochard, V., Réty, S., and Jalinot, P. (2002). Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. FEBS Lett. *527*, 15–21.

Li, Y., Hively, W.P., and Varmus, H.E. (2000). Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. Oncogene *19*, 1002–1009.

Marchetti, A., Buttitta, F., Miyazaki, S., Gallahan, D., Smith, G.H., and Callahan, R. (1995). Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. J. Virol. *69*, 1932–1938.

Morris, C., and Jalinot, P. (2005). Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. Oncogene *24*, 1203–1211.

Morris, C., Wittmann, J., Jäck, H.-M., and Jalinot, P. (2007). Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay. EMBO Rep. *8*, 596–602.

Morris, C., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Cluet, D., Burma, S., Khanna, K.K., and Jalinot, P. (2012). INT6/EIF3E interacts with ATM and is required for proper execution of the DNA damage response in human cells. Cancer Res. *72*, 2006–2016.

Neusiedler, J., Mocquet, V., Limousin, T., Ohlmann, T., Morris, C., and Jalinot, P. (2012). INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation. RNA N. Y. N *18*, 1163–1177.

Nusse, R. (1991). Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *171*, 43–65.

Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. Annu. Rev. Genet. *42*, 301–334.

Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., and Lingner, J. (2014). Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. Nat. Commun. *5*, 5379.

Schoeftner, S., and Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. Nat. Cell Biol. *10*, 228–236.

Sesen, J., Cammas, A., Scotland, S.J., Elefterion, B., Lemarié, A., Millevoi, S., Mathew, L.K., Seva, C., Toulas, C., Moyal, E.C.-J., et al. (2014). Int6/eIF3e is essential for proliferation and survival of human glioblastoma cells. Int. J. Mol. Sci. *15*, 2172–2190.

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

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

Tennen, R.I., Bua, D.J., Wright, W.E., and Chua, K.F. (2011). SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. Nat. Commun. *2*, 433.

Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. Genome Biol. *9*, 232.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

INT6 est importante pour la stabilité du génome, et spécialement aux télomères

Une étude réalisée dans notre laboratoire avait révélé la présence d'INT6 au niveau des chromosomes, dans la zone médiane du fuseau mitotique (Morris and Jalinot, 2005). Dans cette étude, ils démontrent que l'involution d'INT6 cause des défauts significatifs de la mitose tels que des aberrations du fuseau ainsi qu'une mauvaise ségrégation des chromosomes. Cet effet corrèle avec une inhibition de l'activité cyclin B-Cdk1 en l'absence d'INT6, dû à une inhibition prolongée de la phosphorylation de Cdk1. D'autres études réalisées sur l'homologue d'INT6 chez les levures *s.pombe*, Yin6, avait aussi révélé l'importance de ce dernier dans la ségrégation des chromosomes. En effet, les cellules nulles pour Yin6 montrent une ségrégation incorrecte des chromosomes, due à la dégradation de securin/Cut2 via le protéasome (Yen et al., 2003). Une seconde étude de la même équipe suggère qu'Yin6 jouerait un rôle, entre autres, dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes via son interaction avec Cdc48 et Moe1 (Otero et al., 2010; Yen and Chang, 2000).

INT6 est indispensable au maintien du génome, elle interviendrait au cours de la réplication. L'inhibition d'INT6 ralentit la réplication. Une étude élaborée au sein de notre équipe avait révélée l'implication d'INT6 dans la protection du facteur d'initiation de réplication MCM7 (Buchsbaum et al., 2007). MCM7 est une hélicase réplicative du complexe MCM2-7 (Mini-Chromosome Maintenance complexe MCM2-7) nécessaire au déroulement de la double hélice afin de permettre la progression de la fourche de réplication. INT6 stabiliserait la forme polyubiquitinylée de MCM7 durant la phase S. Une autre étude réalisée au sein de notre laboratoire avait mis en évidence l'intervention d'INT6 dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, elle interagit avec ATM qui sont tous deux recrutées au niveau de la lésion d'ADN (Morris et al., 2012).

1. INT6 et intégrité des télomères

Les résultats décrits dans ce rapport viennent confirmer l'implication d'INT6 dans la stabilité du génome et lui spécifie un nouveau périmètre d'intervention au niveau des télomères. En effet, l'absence de cette protéine induit des dommages au niveau de ces extrémités chromosomiques essentielles à la viabilité des cellules. Les types d'aberrations générées dans ces conditions sont des pertes des extrémités de télomères ainsi que des duplications de signaux télomériques. La perte d'extrémités chromosomiques peut être dramatique pour la

cellule car cela favorise des fusions responsables de réactivation de protéines. La protéine hybride BCR-ABL issue d'un remaniement chromosomique est un exemple de protéine qui active des enzymes contrôlant le cycle cellulaire et qui par conséquence accélère la division et la prolifération cellulaire responsables de tumorigénèse (Reviewed in (Bailey and Murnane, 2006)). Alors que la duplication des signaux est signe de stress réplicatif (McNees et al., 2010; Sfeir et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère un rôle d'INT6 dans la réplication spécifique aux télomères.

De manière intéressante, les facteurs du NMD UPF1, SMG1 et SMG6 ont eux aussi été montré comme étant impliqués dans la régulation de la réplication spécifique aux télomères. En effet, la diminution de ces protéines induit des dommages aux télomères (Azzalin et al., 2007). De plus, UPF1 est trouvé associé à la chromatine préférentiellement en phase S (Azzalin and Lingner, 2006b). Sa déplétion par shRNA dans les cellules HeLa génère un arrêt du cycle cellulaire en phase S, des cassures de chromosomes et chromatides ainsi que l'accumulation du marqueur de dommage à l'ADN γ-H2AX au niveau des télomères (Azzalin and Lingner, 2006b). Une autre étude précise qu'UPF1 est localisée au niveau des télomères pendant la phase S, de manière ATR dépendante. ATR est une kinase essentielle pour la stabilisation de la fourche de réplication dans les régions difficiles à répliquer telles que les télomères (Brown and Baltimore, 2003; McNees et al., 2010). Il a ensuite été précisé que l'absence d'UPF1 générait principalement une réplication incomplète du brin direct des télomères (Chawla et al., 2011). Dans notre contexte, des résultats préliminaires ont révélé un défaut d'incorporation du BrdU aux télomères en absence d'INT6, appuyant de plus, un rôle probable d'INT6 dans la réplication spécifique des télomères.

2. Localisation d'INT6 aux télomères

Les cellules ALT, dont les U2OS, exhibent des corps nucléaires PML (Promyelocytic Leukaemia), aussi nommés APBs (ALT-associated PML-NBs). Ce sont des structures nucléaires, liées à la chromatine, contenant plus de 100 protéines, qui régulent différents processus tel que la réparation d'ADN, la maintenance de la stabilité génomique et la réponse antivirale. Bien que les rôles physiologiques des PML soient toujours à l'étude, il semblerait qu'ils jouent un rôle suppresseur de tumeur (Salomoni and Pandolfi, 2002; Trotman et al., 2006). Dans les cellules ALT, les APB contiennent des protéines de recombinaison et réparation d'ADN tel que BLM (Bloom syndrome protein), RAD50, RAD51 et RPA, qui colocalisent avec l'ADN télomérique et les protéines shelterin TRF1 et TRF2. Les APB

participeraient au maintien de la longueur des télomères et la recombinaison dans les ALT (Chung et al., 2012; Jiang et al., 2005; Potts and Yu, 2007). La protéine INT6 est connue pour colocaliser avec les PML. En effet, une étude réalisée dans notre laboratoire a révélé la présence d'INT6 au PML. INT6 serait délocalisée de ce compartiment par l'oncoprotéine Tax du HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus Type 1) (Desbois et al., 1996). Au niveau des cellules ALT, INT6 pourrait donc se localiser au niveau des PML, comme il a été montré pour un autre facteur du complexe eIF3 : eIF3K (Salsman et al., 2013). En se localisant au niveau des PML, INT6 pourrait ainsi se trouver aux télomères. Il est donc nécessaire d'étudier la localisation d'INT6, pour savoir si elle colocalise aux télomères, ce qui nous aiderait à comprendre les mécanismes d'action d'INT6 sur la stabilité des télomères. Des résultats préliminaires de co-immunoprécipitation d'INT6 et de TRF2 n'ont pas réussi pour l'instant à montrer d'interaction entre ces deux protéines (données non fournies).

INT6 et la régulation de l'ARN aux télomères

Bien qu'INT6 soit une sous-unité du complexe d'initiation de traduction eIF3, elle n'est pour autant pas indispensable pour la traduction générale (Bandyopadhyay et al., 2000; Zhou et al., 2005). Par contre, il a clairement été montré que l'inhibition d'INT6 stabilisait des ARNm contenants des PTCs (Morris et al., 2007). Par ailleurs, INT6 a été découvert pour interagir avec le facteur NMD, UPF2 (Morris et al., 2007). De plus, il a été mis en évidence qu'INT6 agissait en complexe avec le facteur NMD : UPF1 et eIF3 (Mocquet et al., 2012; Flury et al, 2014). Une étude a révélé que lorsqu'un ARN contient un PTC, UPF1 est phosphorylée puis interagit avec eIF3 afin d'inhiber la traduction, entrainant la dégradation de l'ARNm (Isken et al., 2008; Lejeune et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré qu'INT6 est retrouvée au niveau des P-bodies, riches en facteurs du NMD tel que UPF1 (Mocquet et al., 2012). En s'appuyant sur les données de la littérature démontrant l'implication des facteurs du NMD UPF1, SMG1 et SMG6 dans la biologie des télomères, nous avons alors émis l'hypothèse qu'INT6 pouvait être elle aussi impliquée dans l'homéostasie télomèrique via une action sur l'ARN. De façon intéressante, l'étude d'Azzalin et al. a permis de révéler que les télomères était transcriptionnellement actifs. Ils ont mis en évidence une augmentation des niveaux d'expression de l'ARN télomèrique TERRA en absence des protéines UPF1, SMG1 et SMG6, localisés par RNA-FISH aux télomères (Azzalin et al., 2007). Dans notre contexte, nous avons aussi mis en évidence une augmentation d'expression de TERRA en absence d'INT6. L'involution d'INT6 n'ayant pas révélé de variation sur la stabilité de l'ARN

TERRA, l'augmentation de ce dernier semble donc être indépendante d'un effet du NMD. Ce résultat corrèle avec la découverte de l'implication d'UPF1, SMG1 et SMG6 dans la biologie des télomères de manière indépendante de leur rôle dans le NMD. En effet, l'augmentation d'expression de TERRA observée en absence de ces facteurs n'est pas due à une modification de la stabilité de cet ARN (Azzaline t al, 2007). De plus, à l'inverse d'UPF1, la déplétion d'UPF2, un autre facteur NMD, ne perturbe aucunement la progression du cycle cellulaire, et n'induit pas de dommage aux télomères (Azzalin and Lingner, 2006b). Nos observations suggèrent qu'INT6 interviendrait aussi autrement qu'à travers la déstabilisation de TERRA afin de maintenir l'homéostasie des télomères.

De plus, notre étude a précisé que l'accumulation de TERRA différait d'un chromosome à un autre, et d'un type cellulaire à un autre. Ceci est en conformité avec la bibliographie de la régulation de l'expression de TERRA. Celle-ci est dépendante de promoteurs spécifiques à chaque extrémité chromosomique, de la structure des régions subtélomériques ainsi que la nature des cellules étudiées. En effet, l'expression de TERRA varie en fonction du mécanisme de maintien des cellules : soit en fonction de la télomèrase, soit par le mécanisme ALT (Feuerhahn et al., 2010; Porro et al., 2014).

On pourrait se demander si l'augmentation des niveaux de TERRA observée en absence d'INT6 pouvait être une conséquence des dommages aux télomères. En effet, une étude de 2009 montre l'augmentation de l'expression de TERRA lors de l'involution de la sheltrein TRF2. Ils observent la perte de l'augmentation de TERRA en l'absence de TRF2 et le knockdown simultané de p53, suggérant que l'augmentation de TERRA était la conséquence de l'activation de la voie de réparation de l'ADN (Caslini et al., 2009). Cependant, en 2014, une autre étude parvient à un résultat contradictoire. Dans le contexte d'inhibition de TRF2, ils observent l'augmentation de l'expression de TERRA même en absence de p53 ou bien d'ATM, suggérant que la voie de réparation des dommages à l'ADN ne joue pas de rôle dans la régulation de l'expression de TERRA (Porro et al., 2014). ATM est une kinase majeure dans la réponse aux dommages à l'ADN, et est connue pour induire l'inhibition de la transcription au niveau des sites de dommage. Dans notre contexte, il a été montré dans notre laboratoire qu'INT6 est nécessaire pour la stabilisation d'ATM au niveau des sites de cassures double brin (Morris et al., 2012). On peut donc penser qu'en absence d'INT6, ATM est moins bien recrutée au niveau des sites de dommages aux télomères. Ces données laissent à penser que la voie de réparation des dommages à l'ADN aux télomères n'est pas responsable de l'augmentation de l'expression de TERRA, comme l'ont démontré Porro et al. Il reste

cependant possible que le défaut de réparation soit responsable de ces niveaux de TERRA en agissant à travers d'autres protéines. En effet Azzalin et al, avaient démontré que l'absence d'UPF1 réprime ATR qui est responsable de l'accumulation de TERRA (Azzalin et al., 2007).

A l'inverse, on peut se demander si la modification des niveaux d'expression de TERRA pourrait avoir un rôle sur l'induction des dommages aux télomères. Il a été montré que l'inhibition de l'expression de TERRA par siRNA induit l'apparition des marqueurs de dommage aux télomères (Deng et al., 2009). De plus, plusieurs études ont montré une corrélation entre l'augmentation des niveaux de TERRA et l'accumulation de dommages aux télomères (Azzalin et al, 2007 ; Porro et al., 2014). Cependant nous ne pouvons pas savoir si l'augmentation de TERRA est la cause de l'apparition de dommage aux télomères. Dans notre contexte, nous ne pouvons pas non plus répondre à cette question. Pour adresser l'effet direct de l'augmentation de l'expression de TERRA sur l'induction de dommage à l'ADN, il faudrait pouvoir surexprimer TERRA. Il serait intéressant d'utiliser le mécanisme des tiTel qui permet d'induire l'expression d'un télomère défini afin de surexprimer l'ARN TERRA spécifique à un chromosome et déterminer son impact sur la cellule.

INT6 et la longueur des télomères

On peut penser que la longueur des télomères pourrait être un des mécanismes de régulation de l'expression de TERRA. Une étude récente a mis en évidence un mécanisme de rétrocontrôle de la longueur des télomères sur l'expression de TERRA. En effet, ce travail montre une corrélation positive entre la longueur des télomères et l'enrichissement d'H3K9me3 et HP1 au niveau des télomères, entrainant la répression de l'expression de TERRA (Arnoult et al., 2012). Dans notre cas, il serait très intéressant de connaître l'effet de l'involution d'INT6 sur la longueur des télomères. Les résultats que j'ai obtenus par Southern-blot ne nous permettent pas de conclure. En effet, ces résultats laissent à penser qu'il n'y aurait pas de modification de la longueur des télomères lors de l'involution d'INT6. Cependant, le traitement des cellules par siRNA INT6 ne nous permet pas de laisser les cellules en culture pendant de nombreux passages, ce qui est habituellement fait lorsque l'on veut voir un effet sur la taille des télomères. Pour l'instant, nous ne pouvons ni affirmer ou infirmer l'implication d'INT6 sur la régulation de la taille des télomères.

Rôle possible d'INT6 au niveau de la réplication des télomères

Les résultats décrits ci-dessus ainsi que les études publiées à ce sujet, nous laissent à penser, qu'INT6 pourrait jouer un rôle dans la réplication des télomères. Il a précédemment été révélé que l'absence d'UPF1, SMG1 et SMG6 générait des défauts réplicatifs sous forme de MTS au niveau des télomères ainsi que l'augmentation des niveaux de TERRA (Azzalin et al., 2007). De plus, UPF1 est connue pour interagir physiquement avec la polymérase processive du brin indirect d'ADN : polδ et la télomérase (Azzalin and Lingner, 2006b; Carastro et al., 2002), suggérant un rôle d'UPF1 dans la réplication des télomères. Ces données suggèrent qu'UPF1, SMG1 et SMG6 interviendraient en phase S au niveau des télomères, déplaceraient l'ARN TERRA, permettant ainsi la progression de la fourche de réplication. Pour ce qui nous concerne, INT6 a déjà été impliquée dans la réplication générale, via son rôle sur la stabilisation du facteur réplicatif MCM7. Ces données ainsi que mes résultats qui décrivent des défauts de nature réplicative et une dérégulation des niveaux de TERRA, supposent qu'INT6, comme UPF1, pourrait jouer un rôle dans la délocalisation de TERRA ainsi que la réplication spécifique des télomères. Il serait donc important de regarder la localisation de TERRA lors de l'involution d'INT6. Il serait aussi intéressant de savoir si INT6 est localisée au niveau des télomères lors de la phase de réplication de l'ADN, et si son involution retarde la réplication de l'ADN télomèrique.

De plus, il semblait intéressant de regarder la structure chromatinienne car il est maintenant bien établi que l'état de compaction de la chromatine joue un rôle sur le contrôle de la réplication, de la transcription ainsi que la réparation des dommages à l'ADN (Zane et al, 2014).

1. INT6 et structure chromatinienne aux télomères

La composition de la chromatine en histones est l'un des paramètres importants pour la progression de la fourche de réplication. En effet, l'expression des histones dites conventionnelles est couplée à la réplication d'ADN. Via le contrôle de l'accès à l'ADN, la chromatine permet la régulation du processus réplicatif (Budhavarapu et al, 2013). Une étude réalisée dans notre laboratoire a mis en évidence la nécessité de la protéine INT6 pour la traduction des ARNm histones, via son interaction avec les facteurs MIF4GD (SLIP1) et SLBP. L'involution de l'une de ces trois protéines est responsable d'une diminution de l'expression des histones H3/H2B/H2A et H4 (Neusiedler et al., 2012). Pour cette raison, il

semble intéressant de voir la composition en histones aux télomères en absence d'INT6. Le résultat obtenu en ChIP ne nous a pas permis de voir de différence de quantité des histones H3 et H4 en absence d'INT6 mais ceci pourrait être lié à une quantité limitante d'anticorps. Cependant, les expériences de digestion micrococcale avec la nucléase en absence d'INT6 ont révélé une structure ouverte de la chromatine indicatrice d'un défaut de synthèse des histones (Kerzendorfer et al, 2012) aux télomères. Une faible densité des histones aux télomères pourrait être confirmée par l'immuno-précipitation de TRF2 à partir d'ADN crosslinké suivi d'un western blot afin de déterminer la composition en histones. Cette expérience permettra de révéler l'impact d'INT6 sur la composition en histones au niveau des télomères.

2. INT6 et les modifications épigénétiques aux télomères

Les modifications épigénétiques sont aussi impliquées dans les processus majeurs pour la cellule, ainsi que lors du vieillissement ou la transformation tumorale. Pour cette raison, nous avons posé la question du rôle d'INT6 sur la régulation épigénétique aux télomères. Mes résultats montrent une diminution d'H3K9me3 et d'H4K20me3, lors de l'involution d'INT6, montrant son implication dans l'établissement de l'hétérochromatine aux télomères. De manière intéressante, l'absence de TRF2 est aussi associée à une décondensation de la chromatine aux télomères (Caslini et al., 2009). Ces résultats suggèrent qu'en absence d'INT6 ou de TRF2, on observe une décondensation de la chromatine, qui serait alors plus sensible aux cassures de l'ADN, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de dommages aux télomères dans ces deux conditions. Nos expériences de digestion micrococcales et ChIP ont été réalisées sur la lignée U2OS. Ces cellules sont issues d'ostéosarcome, dont l'une des principales caractéristiques est le maintien de la longueur des télomères par le phénomène ALT. Il a été montré que les cellules ALT exhibent une chromatine décondensée au niveau des télomères, qui est associée à une augmentation des niveaux d'expression de TERRA en comparaison à des lignées télomèrase positives (Episkopou et al., 2014). Il a notamment été montré que cette lignée présente une diminution d'H3K9me3 et HP1, des marqueurs de chromatine condensée (Arnoult et al., 2012). Ces résultats laissent à penser qu'INT6 pourrait jouer le rôle de régulateur de l'hétérochromatine dans les cellules ALT, régulant ainsi la progression de la fourche de réplication ainsi que l'expression de TERRA.

Conclusions finales

Nos découvertes ouvrent de nouvelles perspectives sur les différentes fonctions d'INT6. Cette étude a permis d'identifier INT6 comme acteur important dans la biologie des télomères. Les études futures permettront d'établir plus précisément les champs d'activités d'INT6 aux télomères et voir si elles sont indépendantes ou reliées, directe ou indirecte.

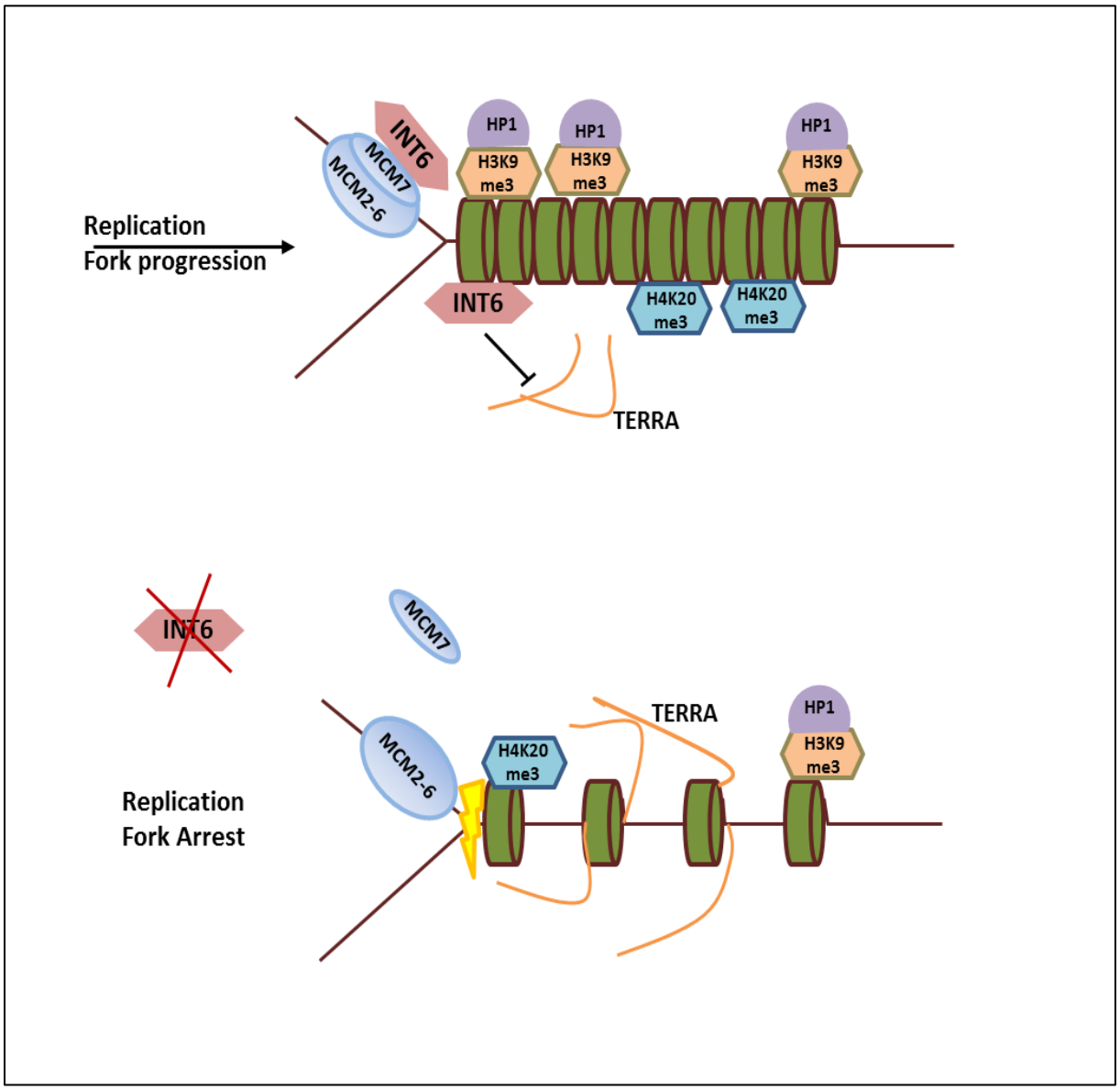


Figure 23. Différentes possibilités d'action d'INT6 aux télomères.

En présence d'INT6, la chromatine aux télomères est compacte et exhibent des marques de méthylation. INT6 interagit avec MCM7 et délocalise TERRA afin de permettre la progression de la fourche de réplication (Figure du haut).
En absence d'INT6, MCM7 est déstabilisée et la chromatine est ouverte permettant la transcription de TERRA qui inhibent la réplication aux télomères (Figure du bas).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., and Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. Mol. Cell. Biol. *30*, 2971–2982.

D' Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., and Jackson, S.P. (1999). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. Nat. Genet. *23*, 76–80.

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

D' Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature *426*, 194–198.

D' Adda di Fagagna, F., Teo, S.-H., and Jackson, S.P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. Genes Dev. *18*, 1781–1799.

Akiyoshi, Y., Clayton, J., Phan, L., Yamamoto, M., Hinnebusch, A.G., Watanabe, Y., and Asano, K. (2001). Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3. J. Biol. Chem. *276*, 10056–10062.

Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Angelov, D., Hug, N., Vindigni, A., Bouvet, P., et al. (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 147–154.

Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D.A., and Jacobson, A. (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. Nature *453*, 1276–1280.

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

Arnoult, N., Van Beneden, A., and Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1α. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 948–956.

Asano, K., Merrick, W.C., and Hershey, J.W. (1997). The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. J. Biol. Chem. *272*, 23477–23480.

Asano, K., Phan, L., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *273*, 18573–18585.

Atkinson, S.P., Hoare, S.F., Glasspool, R.M., and Keith, W.N. (2005). Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. Cancer Res. *65*, 7585–7590.

Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2006a). The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. Cell Cycle Georget. Tex *5*, 1496–1498.

Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2006b). The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. Curr. Biol. CB *16*, 433–439.

Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2008). Telomeres: the silence is broken. Cell Cycle Georget. Tex *7*, 1161–1165.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. Science *318*, 798–801.

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

Badie, S., Escandell, J.M., Bouwman, P., Carlos, A.R., Thanasoula, M., Gallardo, M.M., Suram, A., Jaco, I., Benitez, J., Herbig, U., et al. (2010). BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 1461–1469.

Bae, N.S., and Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. Mol. Cell *26*, 323–334.

Bailey, S.M., and Murnane, J.P. (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. Nucleic Acids Res. *34*, 2408–2417.

Bailey, S.M., Brenneman, M.A., and Goodwin, E.H. (2004a). Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. Nucleic Acids Res. *32*, 3743–3751.

Bailey, S.M., Cornforth, M.N., Ullrich, R.L., and Goodwin, E.H. (2004b). Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks. DNA Repair *3*, 349–357.

Baker, A.M., Fu, Q., Hayward, W., Victoria, S., Pedroso, I.M., Lindsay, S.M., and Fletcher, T.M. (2011). The telomere binding protein TRF2 induces chromatin compaction. PloS One *6*, e19124.

Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., and Le Hir, H. (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*, 861–869.

Bandyopadhyay, A., Matsumoto, T., and Maitra, U. (2000). Fission yeast Int6 is not essential for global translation initiation, but deletion of int6(+) causes hypersensitivity to caffeine and affects spore formation. Mol. Biol. Cell *11*, 4005–4018.

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

Baumann, P., and West, S.C. (1997). The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. EMBO J. *16*, 5198–5206.

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

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

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

Bechter, O.E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2004). Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. Cancer Res. *64*, 3444–3451.

Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V., and Izaurralde, E. (2007). A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. EMBO J. *26*, 1591–1601.

Beneke, S., Cohausz, O., Malanga, M., Boukamp, P., Althaus, F., and Bürkle, A. (2008). Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Nucleic Acids Res. *36*, 6309–6317.

Benetti, R., García-Cao, M., and Blasco, M.A. (2007a). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. Nat. Genet. *39*, 243–250.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2007b). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. J. Cell Biol. *178*, 925–936.

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

Biroccio, A., Rizzo, A., Elli, R., Koering, C.-E., Belleville, A., Benassi, B., Leonetti, C., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Zupi, G., et al. (2006). TRF2 inhibition triggers apoptosis and reduces tumourigenicity of human melanoma cells. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *42*, 1881–1888.

Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. Cell *106*, 661–673.

Blagoev, K.B., and Goodwin, E.H. (2008). Telomere exchange and asymmetric segregation of chromosomes can account for the unlimited proliferative potential of ALT cell populations. DNA Repair *7*, 199–204.

Blanco, R., Muñoz, P., Flores, J.M., Klatt, P., and Blasco, M.A. (2007). Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. Genes Dev. *21*, 206–220.

Blasco, M.A. (2003). Telomeres and cancer: a tale with many endings. Curr. Opin. Genet. Dev. *13*, 70–76.

Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nat. Rev. Genet. *8*, 299–309.

Bolzán, A.D., and Bianchi, M.S. (2006). Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. Mutat. Res. *612*, 189–214.

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

Bradshaw, P.S., Stavropoulos, D.J., and Meyn, M.S. (2005). Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. Nat. Genet. *37*, 193–197.

Brown, E.J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. Genes Dev. *17*, 615–628.

Brown, W.R., MacKinnon, P.J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V.J., and Dobson, M.J. (1990). Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. Cell *63*, 119–132.

Browning, K.S., Gallie, D.R., Hershey, J.W., Hinnebusch, A.G., Maitra, U., Merrick, W.C., and Norbury, C. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. Trends Biochem. Sci. *26*, 284.

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

Buchsbaum, S., Morris, C., Bochard, V., and Jalinot, P. (2007). Human INT6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle. Oncogene *26*, 5132–5144.

Budhavarapu, V.N., Chavez, M., and Tyler, J.K. (2013). How is epigenetic information maintained though DNA replication?. Epigenetics Chromatin. *6*, 1756-1788.

Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2006). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 462–464.

Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., and Ferguson, D.O. (2008). Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. Cell *135*, 85–96.

Buttitta, F., Martella, C., Barassi, F., Felicioni, L., Salvatore, S., Rosini, S., D'Antuono, T., Chella, A., Mucilli, F., Sacco, R., et al. (2005). Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 3198–3204.

Cakmakci, N.G., Lerner, R.S., Wagner, E.J., Zheng, L., and Marzluff, W.F. (2008). SLIP1, a factor required for activation of histone mRNA translation by the stem-loop binding protein. Mol. Cell. Biol. *28*, 1182–1194.

Carastro, L.M., Tan, C.-K., Selg, M., Jack, H.-M., So, A.G., and Downey, K.M. (2002). Identification of delta helicase as the bovine homolog of HUPF1: demonstration of an

interaction with the third subunit of DNA polymerase delta. Nucleic Acids Res. *30*, 2232–2243.

Caslini, C., Connelly, J.A., Serna, A., Broccoli, D., and Hess, J.L. (2009). MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. Mol. Cell. Biol. *29*, 4519–4526.

Casteel, D.E., Zhuang, S., Zeng, Y., Perrino, F.W., Boss, G.R., Goulian, M., and Pilz, R.B. (2009). A DNA polymerase-{alpha}{middle dot}primase cofactor with homology to replication protein A-32 regulates DNA replication in mammalian cells. J. Biol. Chem. *284*, 5807–5818.

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

Celli, G.B., Denchi, E.L., and de Lange, T. (2006). Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. Nat. Cell Biol. *8*, 885–890.

Chang, S., Multani, A.S., Cabrera, N.G., Naylor, M.L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L., and DePinho, R.A. (2004). Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. Nat. Genet. *36*, 877–882.

Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu. Rev. Biochem. *76*, 51–74.

Chawla, R., Redon, S., Raftopoulou, C., Wischnewski, H., Gagos, S., and Azzalin, C.M. (2011). Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. EMBO J. *30*, 4047–4058.

Chen, L., Uchida, K., Endler, A., and Shibasaki, F. (2007). Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. J. Biol. Chem. *282*, 12707–12716.

Chen, L., Endler, A., Uchida, K., Horiguchi, S., Morizane, Y., Iijima, O., Toi, M., and Shibasaki, F. (2010). Int6/eIF3e silencing promotes functional blood vessel outgrowth and enhances wound healing by upregulating hypoxia-induced factor 2alpha expression. Circulation *122*, 910–919.

Cho, H., Kim, K.M., and Kim, Y.K. (2009). Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. Mol. Cell *33*, 75–86.

Choe, J., Ahn, S.H., and Kim, Y.K. (2014). The mRNP remodeling mediated by UPF1 promotes rapid degradation of replication-dependent histone mRNA. Nucleic Acids Res. *42*, 9334–9349.

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

Chung, I., Osterwald, S., Deeg, K.I., and Rippe, K. (2012). PML body meets telomere: the beginning of an ALTernate ending? Nucl. Austin Tex *3*, 263–275.

Cook, J.G., Chasse, D.A.D., and Nevins, J.R. (2004). The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. J. Biol. Chem. *279*, 9625–9633.

Counter, C.M., Hirte, H.W., Bacchetti, S., and Harley, C.B. (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 2900–2904.

Crabbe, L., Verdun, R.E., Haggblom, C.I., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. Science *306*, 1951–1953.

Dantzer, F., Giraud-Panis, M.-J., Jaco, I., Amé, J.-C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.-E., Gilson, E., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G., et al. (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. Mol. Cell. Biol. *24*, 1595–1607.

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

Deng, Z., Dheekollu, J., Broccoli, D., Dutta, A., and Lieberman, P.M. (2007). The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. Curr. Biol. CB *17*, 1989–1995.

Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., and Lieberman, P.M. (2009). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. Mol. Cell *35*, 403–413.

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H.-S., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R.V., Bartolomei, M.S., et al. (2012a). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. EMBO J. *31*, 4165–4178.

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H.-S., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R.V., Bartolomei, M.S., et al. (2012b). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. EMBO J. *31*, 4165–4178.

Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996). Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. Science *273*, 951–953.

Dimitrova, N., and de Lange, T. (2006). MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. Genes Dev. *20*, 3238–3243.

Dimitrova, N., and de Lange, T. (2009). Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. Mol. Cell. Biol. *29*, 5552–5563.

Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E., et al. (2004). Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. Cell *117*, 873–886.

Dionne, I., and Wellinger, R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 13902–13907.

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

Donigian, J.R., and de Lange, T. (2007). The role of the poly(ADP-ribose) polymerase tankyrase1 in telomere length control by the TRF1 component of the shelterin complex. J. Biol. Chem. *282*, 22662–22667.

Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. Annu. Rev. Genet. *41*, 169–192.

Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., and Jensen, T.H. (2009). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 49–55.

Episkopou, H., Draskovic, I., Van Beneden, A., Tilman, G., Mattiussi, M., Gobin, M., Arnoult, N., Londoño-Vallejo, A., and Decottignies, A. (2014). Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. Nucleic Acids Res. *42*, 4391–4405.

Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. Nature *434*, 598–604.

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

Farnung, B.O., Giulotto, E., and Azzalin, C.M. (2010). Promoting transcription of chromosome ends. Transcription *1*, 140–143.

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

Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., and Lingner, J. (2010). TERRA biogenesis, turnover and implications for function. FEBS Lett. *584*, 3812–3818.

Fisher, T.S., and Zakian, V.A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. DNA Repair *4*, 1215–1226.

Fisher, T.S., Taggart, A.K.P., and Zakian, V.A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. Nat. Struct. Mol. Biol. *11*, 1198–1205.

Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. Genes Dev. *22*, 654–667.

Flury, V., Restuccia, U., Bachi, A. and Mühlemann, O. (2014). Characterization of phosphorylation- and RNA-dependent UPF1 interactors by quantitative proteomics. J Proteome Res. *13*, 3038-3053.

Flynn, R.L., Centore, R.C., O'Sullivan, R.J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., Chang, S., Karlseder, J., and Zou, L. (2011). TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. Nature *471*, 532–536.

Folini, M., Brambilla, C., Villa, R., Gandellini, P., Vignati, S., Paduano, F., Daidone, M.G., and Zaffaroni, N. (2005). Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *41*, 624–634.

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

Freibaum, B.D., and Counter, C.M. (2006). hSnm1B is a novel telomere-associated protein. J. Biol. Chem. *281*, 15033–15036.

Gao, H., Cervantes, R.B., Mandell, E.K., Otero, J.H., and Lundblad, V. (2007). RPA-like proteins mediate yeast telomere function. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 208–214.

García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H.F.M., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. Nat. Genet. *36*, 94–99.

Ghule, P.N., Dominski, Z., Yang, X.-C., Marzluff, W.F., Becker, K.A., Harper, J.W., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2008). Staged assembly of histone gene expression machinery at subnuclear foci in the abbreviated cell cycle of human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 16964–16969.

Gillespie, P.J., Li, A., and Blow, J.J. (2001). Reconstitution of licensed replication origins on Xenopus sperm nuclei using purified proteins. BMC Biochem. *2*, 15.

Gilson, E., and Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 825–838.

Giraud-Panis, M.-J., Teixeira, M.T., Géli, V., and Gilson, E. (2010). CST meets shelterin to keep telomeres in check. Mol. Cell *39*, 665–676.

Golub, E.I., Kovalenko, O.V., Gupta, R.C., Ward, D.C., and Radding, C.M. (1997). Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. Nucleic Acids Res. *25*, 4106–4110.

Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S., and Radding, C.M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. Nucleic Acids Res. *26*, 5388–5393.

Gonzalo, S., García-Cao, M., Fraga, M.F., Schotta, G., Peters, A.H.F.M., Cotter, S.E., Eguía, R., Dean, D.C., Esteller, M., Jenuwein, T., et al. (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. Nat. Cell Biol. *7*, 420–428.

Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M.F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., and Blasco, M.A. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. Nat. Cell Biol. *8*, 416–424.

Gorgoni, B., Andrews, S., Schaller, A., Schümperli, D., Gray, N.K., and Müller, B. (2005). The stem-loop binding protein stimulates histone translation at an early step in the initiation pathway. RNA N. Y. N *11*, 1030–1042.

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.

Greider, C.W. (1991). Telomerase is processive. Mol. Cell. Biol. *11*, 4572–4580.

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

Grzmil, M., Rzymski, T., Milani, M., Harris, A.L., Capper, R.G., Saunders, N.J., Salhan, A., Ragoussis, J., and Norbury, C.J. (2010). An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer. Oncogene *29*, 4080–4089.

Guo, J., and Sen, G.C. (2000). Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. J. Virol. *74*, 1892–1899.

Hanaoka, S., Nagadoi, A., and Nishimura, Y. (2005). Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *14*, 119–130.

Hao, L.-Y., Strong, M.A., and Greider, C.W. (2004). Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. J. Biol. Chem. *279*, 45148–45154.

Hayflick, L. (1961). The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. Exp. Cell Res. *23*, 14–20.

Hazelrigg, T., Levis, R., and Rubin, G.M. (1984). Transformation of white locus DNA in drosophila: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. Cell *36*, 469–481.

He, H., Multani, A.S., Cosme-Blanco, W., Tahara, H., Ma, J., Pathak, S., Deng, Y., and Chang, S. (2006). POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. EMBO J. *25*, 5180–5190.

Henderson, E.R., Moore, M., and Malcolm, B.A. (1990). Telomere G-strand structure and function analyzed by chemical protection, base analogue substitution, and utilization by telomerase in vitro. Biochemistry (Mosc.) *29*, 732–737.

Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R., and Reddel, R.R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. Oncogene *21*, 598–610.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). Mol. Cell *14*, 501–513.

Hinnebusch, A.G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem. Sci. *31*, 553–562.

Hiyama, K., and Hiyama, E. (2002). [Telomere and telomerase in lung cancer]. Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med. *60 Suppl 5*, 737–742.

Hoareau Alves, K., Bochard, V., Réty, S., and Jalinot, P. (2002). Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. FEBS Lett. *527*, 15–21.

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

Hockemeyer, D., Palm, W., Else, T., Daniels, J.-P., Takai, K.K., Ye, J.Z.-S., Keegan, C.E., de Lange, T., and Hammer, G.D. (2007). Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 754–761.

Hofmann, K., and Bucher, P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. Trends Biochem. Sci. *23*, 204–205.

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

Hopfner, K.-P. (2014). Single-molecule choreography between telomere proteins and G quadruplexes. Struct. Lond. Engl. 1993 *22*, 801–802.

Horowitz, H., Thorburn, P., and Haber, J.E. (1984). Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *4*, 2509–2517.

Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2005). CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*, 893–901.

Hou, M., Wang, X., Popov, N., Zhang, A., Zhao, X., Zhou, R., Zetterberg, A., Björkholm, M., Henriksson, M., Gruber, A., et al. (2002). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. Exp. Cell Res. *274*, 25–34.

Houghtaling, B.R., Cuttonaro, L., Chang, W., and Smith, S. (2004). A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. Curr. Biol. CB *14*, 1621–1631.

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

Hwang, G.-W., Sasaki, D., and Naganuma, A. (2005). Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in saccharomyces cerevisiae via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins. Mol. Pharmacol. *68*, 1074–1078.

Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., and Maquat, L.E. (2010). UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. Mol. Cell *39*, 396–409.

Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. Cell *106*, 607–617.

Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. Genes Dev. *21*, 1833–1856.

Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., and Maquat, L.E. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. Cell *133*, 314–327.

Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M., and Shinkai, Y. (2004). Importance of TRF1 for functional telomere structure. J. Biol. Chem. *279*, 1442–1448.

Jain, D., and Cooper, J.P. (2010). Telomeric strategies: means to an end. Annu. Rev. Genet. *44*, 243–269.

Jiang, W.-Q., Zhong, Z.-H., Henson, J.D., Neumann, A.A., Chang, A.C.-M., and Reddel, R.R. (2005). Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. Mol. Cell. Biol. *25*, 2708–2721.

Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J.W., and Kadonaga, J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 253–259.

Kadlec, J., Guilligay, D., Ravelli, R.B., and Cusack, S. (2006). Crystal structure of the UPF2-interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. RNA N. Y. N *12*, 1817–1824.

Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A., and Labib, K. (2003). Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. Nature *423*, 720–724.

Karlseder, J. (2003). Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check. Cancer Lett. *194*, 189–197.

Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. Science *283*, 1321–1325.

Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science *295*, 2446–2449.

Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., and de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. Mol. Cell. Biol. *23*, 6533–6541.

Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O.K., Bakkenist, C., Kastan, M.B., Petrini, J.H.J., and de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. PLoS Biol. *2*, E240.

Karniol, B., Yahalom, A., Kwok, S., Tsuge, T., Matsui, M., Deng, X.W., and Chamovitz, D.A. (1998). The Arabidopsis homologue of an eIF3 complex subunit associates with the COP9 complex. FEBS Lett. *439*, 173–179.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. *20*, 355–367.

Kaygun, H., and Marzluff, W.F. (2005). Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*, 794–800.

Kebaara, B.W., and Atkin, A.L. (2009). Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *37*, 2771–2778.

Keegan, C.E., Hutz, J.E., Else, T., Adamska, M., Shah, S.P., Kent, A.E., Howes, J.M., Beamer, W.G., and Hammer, G.D. (2005). Urogenital and caudal dysgenesis in adrenocortical dysplasia (acd) mice is caused by a splicing mutation in a novel telomeric regulator. Hum. Mol. Genet. *14*, 113–123.

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

Kelleher, C., Kurth, I., and Lingner, J. (2005). Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. Mol. Cell. Biol. *25*, 808–818.

Kerzendorfer, C., Hannes, F., Colnaghi, R., Abramowicz, I., Carpenter, G., Vermeesch, J.R., and O'Driscoll, M. (2012). Characterizing the functional consequences of haploinsufficiency of NELF-A (WHSC2) and SLBP identifies novel cellular phenotypes in Wolf-Hirschhorn syndrome. Hum. Mol. Genet. *21*, 2181-2193.

Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat. Genet. *27*, 247–254.

Kim, J.-S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M.R., and Yokomori, K. (2005a). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. J. Cell Biol. *170*, 341–347.

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

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

Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005b). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. Cell *120*, 195–208.

Koering, C.E., Pollice, A., Zibella, M.P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J.F., et al. (2002). Human telomeric position effect is

determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. EMBO Rep. *3*, 1055–1061.

König, P., and Rhodes, D. (1997). Recognition of telomeric DNA. Trends Biochem. Sci. *22*, 43–47.

Konishi, A., and de Lange, T. (2008). Cell cycle control of telomere protection and NHEJ revealed by a ts mutation in the DNA-binding domain of TRF2. Genes Dev. *22*, 1221–1230.

Kumata, M., Shimizu, M., Oshimura, M., Uchida, M., and Tsutsui, T. (2002). Induction of cellular senescence in a telomerase negative human immortal fibroblast cell line, LCS-AF.1-3, by human chromosome 6. Int. J. Oncol. *21*, 851–856.

Kurumizaka, H., Aihara, H., Kagawa, W., Shibata, T., and Yokoyama, S. (1999). Human Rad51 amino acid residues required for Rad52 binding. J. Mol. Biol. *291*, 537–548.

Labib, K., Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. Science *288*, 1643–1647.

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

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

Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R., and Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. *273*, 1794–1801.

Lee, M.-H., Zhao, R., Phan, L., and Yeung, S.-C.J. (2011). Roles of COP9 signalosome in cancer. Cell Cycle Georget. Tex *10*, 3057–3066.

Lei, M., Zaug, A.J., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2005). Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. J. Biol. Chem. *280*, 20449–20456.

Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L.E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. EMBO J. *21*, 3536–3545.

Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. Mol. Cell *12*, 675–687.

Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M.-J., and Gilson, E. (2006). The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. Curr. Biol. CB *16*, 1303–1310.

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

Li, Y., Hively, W.P., and Varmus, H.E. (2000b). Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. Oncogene *19*, 1002–1009.

Ling, J., Morley, S.J., Pain, V.M., Marzluff, W.F., and Gallie, D.R. (2002). The histone 3'-terminal stem-loop-binding protein enhances translation through a functional and physical interaction with eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) and eIF3. Mol. Cell. Biol. *22*, 7853–7867.

Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. J. Biol. Chem. *279*, 51338–51342.

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

Londoño-Vallejo, J.A., and Wellinger, R.J. (2012). Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. Trends Biochem. Sci. *37*, 391–399.

Lopatina, N.G., Poole, J.C., Saldanha, S.N., Hansen, N.J., Key, J.S., Pita, M.A., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2003). Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *306*, 650–659.

Luke, B., and Lingner, J. (2009). TERRA: telomeric repeat-containing RNA. EMBO J. *28*, 2503–2510.

Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., and Lingner, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell *32*, 465–477.

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

Mack, D.L., Boulanger, C.A., Callahan, R., and Smith, G.H. (2007). Expression of truncated Int6/eIF3e in mammary alveolar epithelium leads to persistent hyperplasia and tumorigenesis. Breast Cancer Res. BCR *9*, R42.

Marchetti, A., Buttitta, F., Miyazaki, S., Gallahan, D., Smith, G.H., and Callahan, R. (1995). Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. J. Virol. *69*, 1932–1938.

Marchetti, A., Buttitta, F., Pellegrini, S., Bertacca, G., and Callahan, R. (2001). Reduced expression of INT-6/eIF3-p48 in human tumors. Int. J. Oncol. *18*, 175–179.

Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *4*, 141–154.

Martineau, Y., Derry, M.C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J.J., Shyu, A.-B., Imataka, H., Gehring, K., and Sonenberg, N. (2008). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. Mol. Cell. Biol. *28*, 6658–6667.

Martinez, P., Siegl-Cachedenier, I., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2009). MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres. Aging Cell *8*, 2–17.

Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A.R., Gómez-López, G., Tejera, A.M., Schoeftner, S., Dominguez, O., Pisano, D.G., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. Nat. Cell Biol. *12*, 768–780.

Mayeur, G.L., and Hershey, J.W.B. (2002). Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e). FEBS Lett. *514*, 49–54.

Mazina, O.M., and Mazin, A.V. (2004). Human Rad54 protein stimulates DNA strand exchange activity of hRad51 protein in the presence of Ca2+. J. Biol. Chem. *279*, 52042–52051.

McClintock, B. (1938). The Production of Homozygous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behavior of Ring-Shaped Chromosomes. Genetics *23*, 315–376.

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

McNees, C.J., Tejera, A.M., Martínez, P., Murga, M., Mulero, F., Fernandez-Capetillo, O., and Blasco, M.A. (2010). ATR suppresses telomere fragility and recombination but is dispensable for elongation of short telomeres by telomerase. J. Cell Biol. *188*, 639–652.

Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., and Dietz, H.C. (2001). Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. Hum. Mol. Genet. *10*, 99–105.

Melek, M., and Shippen, D.E. (1996). Chromosome healing: spontaneous and programmed de novo telomere formation by telomerase. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *18*, 301–308.

Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H.C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. Nat. Genet. *36*, 1073–1078.

Mitton-Fry, R.M., Anderson, E.M., Hughes, T.R., Lundblad, V., and Wuttke, D.S. (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. Science *296*, 145–147.

Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Saito, M., and Ishikawa, F. (2009). RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. Mol. Cell *36*, 193–206.

Miyoshi, T., Kanoh, J., Saito, M., and Ishikawa, F. (2008). Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. Science *320*, 1341–1344.

Mocquet, V., Neusiedler, J., Rende, F., Cluet, D., Robin, J.-P., Terme, J.-M., Duc Dodon, M., Wittmann, J., Morris, C., Le Hir, H., et al. (2012). The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. J. Virol. *86*, 7530–7543.

Morris, C., and Jalinot, P. (2005). Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. Oncogene *24*, 1203–1211.

Morris, C., Wittmann, J., Jäck, H.-M., and Jalinot, P. (2007). Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay. EMBO Rep. *8*, 596–602.

Morris, C., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Cluet, D., Burma, S., Khanna, K.K., and Jalinot, P. (2012). INT6/EIF3E interacts with ATM and is required for proper execution of the DNA damage response in human cells. Cancer Res. *72*, 2006–2016.

Morris-Desbois, C., Réty, S., Ferro, M., Garin, J., and Jalinot, P. (2001). The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3. J. Biol. Chem. *276*, 45988–45995.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 6622–6626.

Mühlemann, O. (2008). Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. Biochem. Soc. Trans. *36*, 497–501.

Mühlemann, O., and Lykke-Andersen, J. (2010). How and where are nonsense mRNAs degraded in mammalian cells? RNA Biol. *7*, 28–32.

Müller, B., Blackburn, J., Feijoo, C., Zhao, X., and Smythe, C. (2007). DNA-activated protein kinase functions in a newly observed S phase checkpoint that links histone mRNA abundance with DNA replication. J. Cell Biol. *179*, 1385–1398.

Muñoz, P., Blanco, R., de Carcer, G., Schoeftner, S., Benetti, R., Flores, J.M., Malumbres, M., and Blasco, M.A. (2009). TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis. Mol. Cell. Biol. *29*, 1608–1625.

Muntoni, A., Neumann, A.A., Hills, M., and Reddel, R.R. (2009). Telomere elongation involves intra-molecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres. Hum. Mol. Genet. *18*, 1017–1027.

Murnane, J.P., Sabatier, L., Marder, B.A., and Morgan, W.F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. EMBO J. *13*, 4953–4962.

Nabetani, A., and Ishikawa, F. (2011). Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. J. Biochem. (Tokyo) *149*, 5–14.

Nabetani, A., Yokoyama, O., and Ishikawa, F. (2004). Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. J. Biol. Chem. *279*, 25849–25857.

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

Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 69–82.

Narita, T., Yung, T.M.C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2007). NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. Mol. Cell *26*, 349–365.

Nergadze, S.G., Farnung, B.O., Wischnewski, H., Khoriauli, L., Vitelli, V., Chawla, R., Giulotto, E., and Azzalin, C.M. (2009). CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. RNA N. Y. N *15*, 2186–2194.

Neusiedler, J., Mocquet, V., Limousin, T., Ohlmann, T., Morris, C., and Jalinot, P. (2012). INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation. RNA N. Y. N *18*, 1163–1177.

Ng, L.J., Cropley, J.E., Pickett, H.A., Reddel, R.R., and Suter, C.M. (2009). Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. Nucleic Acids Res. *37*, 1152–1159.

Nielsen, K.H., Chamieh, H., Andersen, C.B.F., Fredslund, F., Hamborg, K., Le Hir, H., and Andersen, G.R. (2009). Mechanism of ATP turnover inhibition in the EJC. RNA N. Y. N *15*, 67–75.

Nilsson, P., Mehle, C., Remes, K., and Roos, G. (1994). Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. Oncogene *9*, 3043–3048.

Nitiss, J.L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nat. Rev. Cancer *9*, 327–337.

Noble, C.G., and Song, H. (2007). MLN51 stimulates the RNA-helicase activity of eIF4AIII. PloS One *2*, e303.

Nusse, R. (1991). Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *171*, 43–65.

O'Connor, M.S., Safari, A., Liu, D., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. J. Biol. Chem. *279*, 28585–28591.

O'Connor, M.S., Safari, A., Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2006). A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 11874–11879.

Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., and Ohno, S. (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. Mol. Cell *12*, 1187–1200.

Okada-Katsuhata, Y., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F., and Ohno, S. (2012). N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. Nucleic Acids Res. *40*, 1251–1266.

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

Olovnikov, A.M. (1992). [Aging is a result of a shortening of the "differotene" in the telomere due to end under-replication and under-repair of DNA]. Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol. 641–643.

Opitz, O.G., Suliman, Y., Hahn, W.C., Harada, H., Blum, H.E., and Rustgi, A.K. (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. J. Clin. Invest. *108*, 725–732.

O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 171–181.

Otero, J.H., Suo, J., Gordon, C., and Chang, E.C. (2010). Int6 and Moe1 interact with Cdc48 to regulate ERAD and proper chromosome segregation. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 147–161.

Ottaviani, A., Gilson, E., and Magdinier, F. (2008). Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? Biochimie *90*, 93–107.

Van Overbeek, M., and de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. Curr. Biol. CB *16*, 1295–1302.

Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. Annu. Rev. Genet. *42*, 301–334.

Parkinson, G.N., Lee, M.P.H., and Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature *417*, 876–880.

Pedram, M., Sprung, C.N., Gao, Q., Lo, A.W.I., Reynolds, G.E., and Murnane, J.P. (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. Mol. Cell. Biol. *26*, 1865–1878.

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

Petrini, J.H.J., and Stracker, T.H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. Trends Cell Biol. *13*, 458–462.

Phan, L., Zhang, X., Asano, K., Anderson, J., Vornlocher, H.P., Greenberg, J.R., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. Mol. Cell. Biol. *18*, 4935–4946.

Pirzio, L.M., Freulet-Marrière, M.-A., Bai, Y., Fouladi, B., Murnane, J.P., Sabatier, L., and Desmaze, C. (2004). Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable karyotype stability even after exposure to ionizing radiation. Cytogenet. Genome Res. *104*, 87–94.

Pollok, S., Stoepel, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E., and Nasheuer, H.-P. (2003). Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. Biochem. Soc. Trans. *31*, 266–269.

Popp, M.W.-L., and Maquat, L.E. (2014). The dharma of nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. Mol. Cells *37*, 1–8.

Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. Mol. Cell. Biol. *30*, 4808–4817.

Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., and Lingner, J. (2014). Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. Nat. Commun. *5*, 5379.

Potts, P.R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 581–590.

Poulet, A., Buisson, R., Faivre-Moskalenko, C., Koelblen, M., Amiard, S., Montel, F., Cuesta-Lopez, S., Bornet, O., Guerlesquin, F., Godet, T., et al. (2009). TRF2 promotes, remodels and protects telomeric Holliday junctions. EMBO J. *28*, 641–651.

Price, C.M., Boltz, K.A., Chaiken, M.F., Stewart, J.A., Beilstein, M.A., and Shippen, D.E. (2010). Evolution of CST function in telomere maintenance. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 3157–3165.

Prokhorova, T.A., and Blow, J.J. (2000). Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity. J. Biol. Chem. *275*, 2491–2498.

Pryde, F.E., and Louis, E.J. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. EMBO J. *18*, 2538–2550.

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

Raasi, S., and Pickart, C.M. (2003). Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. J. Biol. Chem. *278*, 8951–8959.

Rajavel, M., Mullins, M.R., and Taylor, D.J. (2014). Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance. Biochim. Biophys. Acta *1844*, 1550–1559.

Rasmussen, S.B., Kordon, E., Callahan, R., and Smith, G.H. (2001). Evidence for the transforming activity of a truncated Int6 gene, in vitro. Oncogene *20*, 5291–5301.

Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2009). Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 394–402.

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

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

Rehwinkel, J., Letunic, I., Raes, J., Bork, P., and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. RNA N. Y. N *11*, 1530–1544.

Rencus-Lazar, S., Amir, Y., Wu, J., Chien, C.-T., Chamovitz, D.A., and Segal, D. (2008). The proto-oncogene Int6 is essential for neddylation of Cul1 and Cul3 in Drosophila. PloS One *3*, e2239.

Rogan, E.M., Bryan, T.M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A.C., Moy, E.L., Englezou, A., Warneford, S.G., Dalla-Pozza, L., and Reddel, R.R. (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. Mol. Cell. Biol. *15*, 4745–4753.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Mol. Cell. Biol. *23*, 5706–5715.

Salomoni, P., and Pandolfi, P.P. (2002). The role of PML in tumor suppression. Cell *108*, 165–170.

Salsman, J., Pinder, J., Tse, B., Corkery, D., and Dellaire, G. (2013). The translation initiation factor 3 subunit eIF3K interacts with PML and associates with PML nuclear bodies. Exp. Cell Res. *319*, 2554–2565.

der-Sarkissian, H., Bacchetti, S., Cazes, L., and Londoño-Vallejo, J.A. (2004). The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. Oncogene *23*, 1221–1228.

Sasaki, T., and Gilbert, D.M. (2007). The many faces of the origin recognition complex. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 337–343.

Saulière, J., Haque, N., Harms, S., Barbosa, I., Blanchette, M., and Le Hir, H. (2010). The exon junction complex differentially marks spliced junctions. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 1269–1271.

Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., and Mann, M. (2013). Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. Genome Res. *23*, 2149–2157.

Schoeftner, S., and Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. Nat. Cell Biol. *10*, 228–236.

Sesen, J., Cammas, A., Scotland, S.J., Elefterion, B., Lemarié, A., Millevoi, S., Mathew, L.K., Seva, C., Toulas, C., Moyal, E.C.-J., et al. (2014). Int6/eIF3e is essential for proliferation and survival of human glioblastoma cells. Int. J. Mol. Sci. *15*, 2172–2190.

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

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

Sfeir, A.J., Chai, W., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2005). Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. Mol. Cell *18*, 131–138.

Shalev, A., Valásek, L., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Phan, L., Clayton, J., He, H., Brady, J.N., Hinnebusch, A.G., and Asano, K. (2001). Saccharomyces cerevisiae protein Pci8p and human protein eIF3e/Int-6 interact with the eIF3 core complex by binding to cognate eIF3b subunits. J. Biol. Chem. *276*, 34948–34957.

Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T., and Lu, K.P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 13618–13623.

Shigeeda, N., Uchida, M., Barrett, J.C., and Tsutsui, T. (2003). Candidate chromosomal regions for genes involved in activation of alternative lengthening of telomeres in human immortal cell lines. Exp. Gerontol. *38*, 641–651.

Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Weng, Z., and Moore, M.J. (2012). The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. Cell *151*, 750–764.

Slijepcevic, P. (2006). The role of DNA damage response proteins at telomeres--an "integrative" model. DNA Repair *5*, 1299–1306.

Slijepcevic, P., and Al-Wahiby, S. (2005). Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. Chromosoma *114*, 275–285.

Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. Curr. Biol. CB *10*, 1299–1302.

Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. EMBO J. *21*, 4338–4348.

Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annu. Rev. Biochem. *73*, 177–208.

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

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

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

Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. EMBO J. *20*, 5532–5540.

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

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

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

Stewart, S.A., Hahn, W.C., O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A.S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D.B., et al. (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 12606–12611.

Sullivan, K.D., Mullen, T.E., Marzluff, W.F., and Wagner, E.J. (2009). Knockdown of SLBP results in nuclear retention of histone mRNA. RNA N. Y. N *15*, 459–472.

Sun, X., and Maquat, L.E. (2002). Nonsense-mediated decay: assaying for effects on selenoprotein mRNAs. Methods Enzymol. *347*, 49–57.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. Curr. Biol. CB *13*, 1549–1556.

Tanaka, H., Mendonca, M.S., Bradshaw, P.S., Hoelz, D.J., Malkas, L.H., Meyn, M.S., and Gilley, D. (2005). DNA damage-induced phosphorylation of the human telomere-associated protein TRF2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 15539–15544.

Tarsounas, M., Muñoz, P., Claas, A., Smiraldo, P.G., Pittman, D.L., Blasco, M.A., and West, S.C. (2004). Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. Cell *117*, 337–347.

Tejera, A.M., Stagno d'Alcontres, M., Thanasoula, M., Marion, R.M., Martinez, P., Liao, C., Flores, J.M., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2010). TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. Dev. Cell *18*, 775–789.

Tekmal, R.R., and Keshava, N. (1997). Role of MMTV integration locus cellular genes in breast cancer. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *2*, d519–d526.

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

Tennen, R.I., Bua, D.J., Wright, W.E., and Chua, K.F. (2011). SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. Nat. Commun. *2*, 433.

Tilman, G., Loriot, A., Van Beneden, A., Arnoult, N., Londoño-Vallejo, J.A., De Smet, C., and Decottignies, A. (2009). Subtelomeric DNA hypomethylation is not required for telomeric sister chromatid exchanges in ALT cells. Oncogene *28*, 1682–1693.

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

Townley-Tilson, W.H.D., Pendergrass, S.A., Marzluff, W.F., and Whitfield, M.L. (2006). Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. RNA N. Y. N *12*, 1853–1867.

Trotman, L.C., Alimonti, A., Scaglioni, P.P., Koutcher, J.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2006). Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. Nature *441*, 523–527.

Tsuyama, T., Tada, S., Watanabe, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2005). Licensing for DNA replication requires a strict sequential assembly of Cdc6 and Cdt1 onto chromatin in Xenopus egg extracts. Nucleic Acids Res. *33*, 765–775.

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

Veldman, T., Etheridge, K.T., and Counter, C.M. (2004). Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. Curr. Biol. CB *14*, 2264–2270.

Verdun, R.E., and Karlseder, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. Cell *127*, 709–720.

Viegas, M.H., Gehring, N.H., Breit, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2007). The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. Nucleic Acids Res. *35*, 4542–4551.

Vogt, M., Haggblom, C., Yeargin, J., Christiansen-Weber, T., and Haas, M. (1998). Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 139–146.

Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J.M., Turner, T.L., Daxinger, L., Vyskot, B., Aufsatz, W., and Riha, K. (2010). siRNA-mediated methylation of Arabidopsis telomeres. PLoS Genet. *6*, e1000986.

Wan, M., Qin, J., Songyang, Z., and Liu, D. (2009). OB fold-containing protein 1 (OBFC1), a human homolog of yeast Stn1, associates with TPP1 and is implicated in telomere length regulation. J. Biol. Chem. *284*, 26725–26731.

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

Wang, R.C., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. Cell *119*, 355–368.

Watkins, S.J., and Norbury, C.J. (2004). Cell cycle-related variation in subcellular localization of eIF3e/INT6 in human fibroblasts. Cell Prolif. *37*, 149–160.

Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. Nature. New Biol. *239*, 197–201.

Welch, E.M., and Jacobson, A. (1999). An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA. EMBO J. *18*, 6134–6145.

Wellinger, R.J., and Sen, D. (1997). The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *33*, 735–749.

Williamson, J.R. (1994). G-quartet structures in telomeric DNA. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. *23*, 703–730.

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

Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., and Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. Genes Dev. *11*, 2801–2809.

Wright, W.E., Tesmer, V.M., Liao, M.L., and Shay, J.W. (1999). Normal human telomeres are not late replicating. Exp. Cell Res. *251*, 492–499.

Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., and de Lange, T. (2010). Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. Mol. Cell *39*, 606–617.

Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., and Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. Nature *445*, 559–562.

Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. Genome Biol. *9*, 232.

Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Björkholm, M., Gruber, A., Menkel, A.R., and Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3826–3831.

Xu, Y., Kimura, T., and Komiyama, M. (2008). Human telomere RNA and DNA form an intermolecular G-quadruplex. Nucleic Acids Symp. Ser. 2004 169–170.

Yahalom, A., Kim, T.H., Winter, E., Karniol, B., von Arnim, A.G., and Chamovitz, D.A. (2001). Arabidopsis eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7. J. Biol. Chem. *276*, 334–340.

Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., et al. (2009). SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. *23*, 1091–1105.

Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z., and Hanaoka, F. (2002). Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. J. Biol. Chem. *277*, 40871–40880.

Ye, J., Lenain, C., Bauwens, S., Rizzo, A., Saint-Léger, A., Poulet, A., Benarroch, D., Magdinier, F., Morere, J., Amiard, S., et al. (2010). TRF2 and apollo cooperate with

topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. Cell *142*, 230–242.

Ye, J.Z.-S., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. Genes Dev. *18*, 1649–1654.

Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R., and Reddel, R.R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. Cancer Res. *59*, 4175–4179.

Yen, H.C., and Chang, E.C. (2000). Yin6, a fission yeast Int6 homolog, complexes with Moe1 and plays a role in chromosome segregation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 14370–14375.

Yen, H.-C.S., and Chang, E.C. (2003). INT6--a link between the proteasome and tumorigenesis. Cell Cycle Georget. Tex *2*, 81–83.

Yen, H.-C.S., Gordon, C., and Chang, E.C. (2003). Schizosaccharomyces pombe Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. Cell *112*, 207–217.

You, Z., Ishimi, Y., Masai, H., and Hanaoka, F. (2002). Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. J. Biol. Chem. *277*, 42471–42479.

Zane, L., Sharma, V., and Misteli, T. (2014). Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence?. *14*, 114-117.

Zhang, X., Turnell, A.S., Gorbea, C., Mymryk, J.S., Gallimore, P.H., and Grand, R.J.A. (2004). The targeting of the proteasomal regulatory subunit S2 by adenovirus E1A causes inhibition of proteasomal activity and increased p53 expression. J. Biol. Chem. *279*, 25122–25133.

Zhao, X., McKillop-Smith, S., and Müller, B. (2004). The human histone gene expression regulator HBP/SLBP is required for histone and DNA synthesis, cell cycle progression and cell proliferation in mitotic cells. J. Cell Sci. *117*, 6043–6051.

Zhou, C., Arslan, F., Wee, S., Krishnan, S., Ivanov, A.R., Oliva, A., Leatherwood, J., and Wolf, D.A. (2005). PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. BMC Biol. *3*, 14.

Zhou, M., Sandercock, A.M., Fraser, C.S., Ridlova, G., Stephens, E., Schenauer, M.R., Yokoi-Fong, T., Barsky, D., Leary, J.A., Hershey, J.W., et al. (2008). Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18139–18144.

Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M., and Blackburn, E.H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 3723–3728.

Zhu, X.D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J.H., and de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. Nat. Genet. *25*, 347–352.

Zhu, X.-D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H.J., and de Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. Mol. Cell *12*, 1489–1498.