

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA



DOTTORATO IN GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE
XXII CICLO

ANALISI DEI MECCANISMI DI MANTENIMENTO DEI
TELOMERI IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

PRIMO RELATORE

PROF.

GIORGIO PRANTERA

SECONDO RELATORE

PROF.SSA.

FIorentina ASCENZIONI

DOTTORANDO

ENEA GINO DI DOMENICO

INDICE

INTRODUZIONE	PAG. 1
• I TELOMERI	2
• LA TELOMERASI: UNA TRASCRITTASI INVERSA CON UN TEMPLATO AD RNA	4
• PROTEINE ED ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DEI TELOMERI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE	7
• RUOLO DELLE REGIONI SUB-TELOMERICHE NEL MANTENIMENTO DEL TELOMERO	13
• LA PROTRUSIONE AL 3' A SINGOLO FILAMENTO DI DNA PARTECIPA ALL'OMEOSTASI DEI TELOMERI	14
• MECCANISMI DI MANTENIMENTO DEL TELOMERO TELOMERASI-DIPENDENTE	18
• MECCANISMO DI MANTENIMENTO DEL TELOMERO TELOMERASI-INDIPENDENTE	22
• PROTEINE PER IL RIPARO/RICOMBINAZIONE DEL DNA E PROTEINE PER IL CONTROLLO DEL DANNO AL DNA SONO COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL TELOMERO	24
• RISPOSTA AL DANNO AL DNA INDOTTA DA DSBs INTRACROMOSOMALI	26
• I TELOMERI POSSONO TEMPORANEAMENTE ATTIVARE LA RISPOSTA DI DANNO AL DNA	28
• BIBLIOGRAFIA	31
• ALLEGATO 1: BUDDING YEAST WITH HUMAN TELOMERASE: A PUZZLING STRUCTURE	43
 RISULTATI SPERIMENTALI	
• PRIMA PARTE	52
• <i>RUOLO DEI CHECKPOINT MEC1 E TEL1 NEL MANTENIMENTO DELL'INTEGRITÀ TELOMERICA IN CEPPI DI LIEVITO CON TELOMERI UMANIZZATI</i>	52
• <i>ALLEGATO 2: THE MEC1 AND TEL1 CHECKPOINT KINASES ALLOW HUMANIZED YEAST TO TOLERATE CHRONIC TELOMERE DYSFUNCTIONS BY SUPPRESSING TELOMERE FUSIONS</i>	54
• <i>MATERIALS AND METHODS</i>	57
• <i>RESULTS AND DISCUSSION</i>	59

•	<i>CONCLUSION</i>	70
•	<i>REFERENCES</i>	72
•	SECONDA PARTE	76
•	<i>EFFETTI DELL'ATTIVAZIONE DEI MECCANISMI DI AMPLIFICAZIONE DEL SUBTELOMERO Y' IN PRESENZA DI UNA TELOMERASI FUNZIONANTE</i>	76
•	<i>MATERIALI E METODI</i>	78
•	<i>RISULTATI</i>	79
•	<i>DISCUSSIONE</i>	97
•	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	101

INTRODUZIONE

I TELOMERI

Molto prima che venisse scoperta la struttura di base del DNA ed ancor prima che si riuscissero a chiarire i meccanismi di replicazione, le estremità dei cromosomi eucariotici, chiamate telomeri, furono individuate come regioni in possesso di speciali proprietà (Muller, 1941; McClintock, 1941). Studi pionieristici basati su metodi di genetica classica, svolti da Muller, sulla mosca della frutta *Drosophila* e da McClintock su *Zea Mays* misero in evidenza come le estremità cromosomiche native, a differenza di quelle originate da rotture nelle regioni interne, sono protette da reazioni di fusioni e da riarrangiamenti cromosomici. In assenza di queste regioni, i cromosomi sono privati di una funzione protettiva fondamentale rendendo le estremità cromosomiche indistinguibili dalle rotture a doppio filamento del DNA (Double Strand Breaks – DSBs), con conseguenze disastrose per la stabilità dell'intero genoma. La funzione di protezione delle estremità cromosomiche è generalmente definita “capping telomerico” ed è ormai unanimemente riconosciuta come una delle proprietà fondamentali dei cromosomi eucariotici, non soltanto importante per garantire la stabilità genomica ma anche per consentire la divisione cellulare, proteggere dall'invecchiamento e come difesa contro il cancro (Stewart e Weinberg, 2009; Aubert e Lansdrop, 2008; Deng *et al.* 2008; Jeyapalan e Sedivy, 2008).

In seguito alla scoperta della struttura del DNA a doppia elica ed al meccanismo di replicazione operato dalle DNA Polimerasi, sorse il problema di come venissero replicate per intero le estremità cromosomiche (end replication problem), senza perdere ad ogni ciclo cellulare porzioni di telomero. Analisi successive misero in evidenza che i telomeri, invece che terminare con estremità piatte, in realtà possedevano una regione di protrusione a singolo filamento al 3' prodotta attraverso la sintesi del filamento guida (Lingner *et al.* 1995). La scoperta che nel ciliato *Tetrahymena* le sequenze telomeriche di DNA sono formate da semplici ripetizioni in tandem di corte sequenze di DNA (Blackburn e Gall, 1978), indicarono che l'evoluzione aveva evidentemente trovato una soluzione differente al cosiddetto *end replication problem* (Szostak e Blackburn, 1982). In un lavoro, che costituisce una pietra miliare per lo studio dei telomeri, Szostak e Blackburn nel 1982 dimostrarono che questa soluzione, osservata in *Tetrahymena*, era evolutivamente conservata tanto che le ripetizioni telomeriche di ciliato potevano essere utilizzate e mantenute anche nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Queste scoperte permisero di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo completamente nuovo di sintesi del DNA adottato per la replicazione dei telomeri gettando le basi per quella che sarebbe stata da lì a pochi anni la scoperta della telomerasi (Greider e Blackburn, 1985). La telomerasi è una trascrittasi inversa che usa una specifica

molecola di RNA (Greider e Blackburn, 1987), parte integrante dell'oloenzima, come templatato per l'aggiunta di ripetizioni ricche in TG al filamento 3' sulla porzione terminale dei cromosomi. In seguito si è scoperto che l'uso della telomerasi è la soluzione all'*end replication problem* più largamente utilizzata dagli organismi eucarioti, con alcune eccezioni come per esempio in *Drosophila* il cui mantenimento telomerico è basato su un meccanismo di retrotrasposoni.

L'identificazione di mutanti difettivi nei vari componenti della telomerasi di lievito (Lundblad e Szostak, 1989; Singer e Gotteschling, 1994; Lendvay *et al.*, 1996) e la costruzione di ceppi knockout per il gene dell'RNA della telomerasi in topo (Blasco *et al.*, 1997), dimostrarono che la telomerasi è assolutamente indispensabile per prevenire la lenta erosione delle estremità cromosomiche e quindi per garantire la vitalità della cellula. In assenza di attività telomerasica, i telomeri di molte cellule somatiche umane, perdono ad ogni ciclo cellulare circa 50-100bp in seguito al processo di erosione. Quando la lunghezza telomerica declina al di sotto di una certa soglia, si innesca un irreversibile processo di arresto della proliferazione chiamato *senescenza*. La senescenza cellulare serve a prevenire il perpetuarsi di cellule in cui si sono verificati fenomeni di instabilità cromosomica ed eccessivo accorciamento dei telomeri. Poiché la maggior parte delle cellule somatiche di mammifero non esprime una telomerasi funzionante (Carroll e Ly, 2009, review), l'erosione dei telomeri si impone sul potenziale proliferativo cellulare che si pensa sia alla base della soppressione del processo di progressione tumorale (Hanahan e Weinberg, 2000). Molti tumori infatti, presentano cellule che sfuggono a questo processo di limitazione attraverso la riattivazione di meccanismi di mantenimento dei telomeri. Più comunemente questo si ottiene attraverso l'attivazione della telomerasi (Shay e Bacchetti, 1997) tuttavia, alcuni tipi di cancro, mantengono i telomeri attraverso meccanismi telomerasi indipendenti (Bryan e Reddel, 1997). Fu inizialmente osservato in lievito che in condizioni di assenza di telomerasi, una piccola frazione di cellule sfuggivano al processo di senescenza attraverso un meccanismo alternativo di mantenimento dei telomeri basato sulla ricombinazione (Lundblad e Blackburn, 1993). Questo meccanismo, denominato ALT (Alternative Lengthening of Telomere), è presente anche nell'uomo, associato ad alcune forme di cancro. Generalmente nell' 80-90% dei tumori vi è una riattivazione della telomerasi (Cesare e Reddel, 2008), tuttavia, in alcune forme (sarcomi), il mantenimento dei telomeri tramite ALT, può raggiungere percentuali che vanno oltre il 30% dei campioni tumorali (Matsuo *et al.*, 2009). In questo caso, nei pazienti in cui è stata osservata la presenza dei meccanismi ALT nelle cellule tumorali, la prognosi è sempre estremamente severa (Matsuo *et al.*, 2009).

Disordini nella struttura e funzionalità dei telomeri, dovute a difetti a carico della telomerasi o nelle proteine che ne regolano il metabolismo, sono anche la causa di numerose malattie umane, non sempre associate al cancro. In particolare patologie quali la Fibrosi Polmonare Idiomatica, la Sindrome di Cri du Chat e la sindrome di Werner, detta anche da invecchiamento precoce, oltre al gruppo delle patologie normalmente classificate come *Bone Marrow Failure Syndromes* (BMFS) (Discheratosi Congenita, Anemia Aplastica, Sindrome Mielodisplastica e Leucemia Mieloide Acuta), pur presentando sintomi diversi sono tutte caratterizzate dall'incapacità di preservare il corretto equilibrio del telomero. (Carrol e Ly, 2009).

LA TELOMERASI: UNA TRASCRITTASI INVERSA CON UN TEMPLATO AD RNA

Ad esclusione di alcuni organismi per lo più unicellulari, quali i ciliati e microbici, come i virus, la replicazione semi-conservativa del DNA inizia da origini interne alle ripetizioni telomeriche. Tale meccanismo di replicazione dei cromosomi è mediato dalle DNA polimerasi che determina la formazione di un'estremità 3' a singolo filamento non replicata.

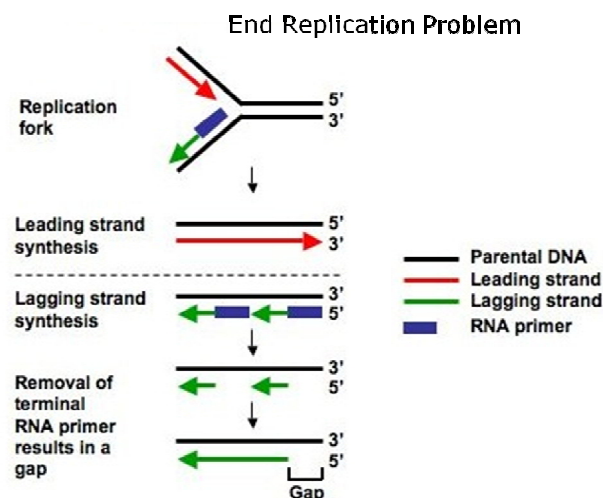


Fig. 1: La DNA polimerasi convenzionale sintetizza il DNA in direzione 5' – 3'. Il leading strand (rosso) può essere sintetizzato in maniera continua, mentre il lagging strand (verde) è sintetizzato a partire da corti frammenti di RNA di 8-12 bp (okazaki), utilizzati come inneschi (blu). Dopo la replicazione i frammenti di RNA vengono rimossi ed i buchi riempiti ad eccezione dell'ultimo frammento di RNA all'estremità cromosomica del lagging strand che non può essere replicato. Questo processo determina la formazione di una regione di DNA a singolo filamento al 3' ed una progressiva perdita di informazione nel lagging strand.

Questo fenomeno chiamato *end replication problem*, causato dall'unidirezionalità del processo replicativo (5'-3') e dal fatto che le DNA polimerasi necessitano di una

sequenza di innesco (Greider e Blackburn, 1985), fu inizialmente messo in luce da Olovnikov nel 1971 (Olovnikov, 1971) (Fig.1).

Nella maggioranza degli eucarioti tale problema viene risolto mediante specifici meccanismi di allungamento dei telomeri che bilanciano la graduale perdita di informazione (Blackburn, 1989) mediati dalla telomerasi, l'enzima che si occupa di garantire la completa replicazione del DNA (Greider e Blackburn, 1985). La telomerasi è una ribonucleoproteina con attività di trascrittasi inversa, che provvede ad allungare le estremità 3' del telomero sintetizzando nuove ripetizioni telomeriche (Greider, 1996). Questo enzima inizialmente identificato e purificato in *Tetrahymena* (Greider e Blackburn, 1985), possiede una struttura altamente conservata costituita da una subunità proteica con attività di trascrittasi inversa (Telomerase Reverse Transcriptase – TERT) ed una componente ad RNA (TER - Telomerase-RNA) oltre ad una serie di altre proteine coinvolte in vari processi specie-specifici. La TER contiene una corta sequenza, lunga circa 2 ripetizioni telomeriche, complementare al filamento ricco in G che funge da stampo per la sintesi del DNA telomerico. Il meccanismo di allungamento dei telomeri prevede quindi una fase di appaiamento della telomerasi, una di sintesi e una di traslocazione in cui il filamento neosintetizzato retrocede lasciando disponibile il template per la sintesi del modulo successivo (Fig.2).

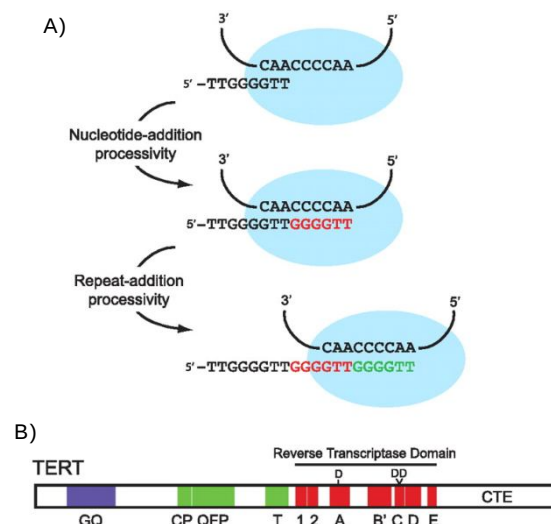


Fig.2: Modello schematico dell'attività della telomerasi. Il template ad RNA della telomerasi (filamento ricco in CA preso da *Tetrahymena*) è complementare alla protrusione 3' del telomero. La proteina TERT (ovale blu) aggiunge nucleotidi (rosso). La traslocazione ed il successivo riposizionamento della telomerasi danno il via ad un nuovo ciclo (verde). B) Struttura del dominio TERT. Residui di acido aspartico altamente conservati necessari per la catalisi sono indicati "D". Le regioni dell'N-terminale conferiscono alta affinità (verde) e bassa affinità (blu) al legame con l'RNA.

Subunità catalitica della Telomerasi: con poche eccezioni la TERT è caratterizzata da domini strutturali altamente conservati (Fig.2 B). La regione centrale della TERT presenta una notevole omologia con altre Trascrittasi Inverse (Reverse Transcriptase - RT) compresi sette motivi canonici che contribuiscono all'attività catalitica (Nakamura *et al.*, 1997). La porzione meno conservata della TERT si trova nella regione C-terminale del dominio (CTE). TERT di lievito in cui il CTE è stato rimosso mantengono telomeri corti ma stabili *in vivo* (Autexier e Lue, 2006). Al contrario nell'uomo mutazioni in questa regione compromettono il mantenimento del telomero senza tuttavia influire sull'attività catalitica della proteina (Autexier e Lue, 2006). La regione della TERT che contribuisce a conferire le proprietà uniche della telomerasi, compresa l'associazione con il templat ad RNA ed il legame con le proteine aggiuntive, si trova nella regione N-terminale. In particolare le regioni note come CP, QFP e T (Fig.2 B) conferiscono l'elevata affinità per la componente ad RNA. La regione GQ invece ha una bassa affinità per l'RNA ma media l'associazione con altri componenti della telomerasi (Autexier e Lue, 2006).

Componente ad RNA della Telomerasi: la componente TER è stata clonata da diversi organismi mostrando un'elevata variabilità, in lunghezza, sequenza e struttura (Theimer e Feigon, 2006). In comune tutte le TER condividono una corta sequenza templat complementare alle ripetizioni telomeriche (Fig3 A). Mutazioni introdotte nella componente ad RNA inducono la sintesi di un DNA telomerico mutato avente la stessa sequenza del corrispondente templat telomerico (Greider e Blackburn, 1985). La possibilità di variare il templat telomerico e quindi di cambiare le caratteristiche di sintesi della telomerasi è stata utilizzata da diversi ricercatori allo scopo di chiarire alcuni aspetti del metabolismo telomerico, quali ad esempio, quelli legati alle interazioni dirette del DNA telomerico con le sue proteine. Un approccio più estremo ha portato alla sostituzione dell'intero dominio-templat da 16 bp del gene TLC1, che codifica per l'RNA della telomerasi del lievito *S. cerevisiae*, con la sequenza del templat telomerico di mammifero (*umanizzato*); ceppi di lievito con il templat telomerico umanizzato sono in grado di aggiungere sequenze telomeriche umane all'estremità dei cromosomi di lievito. Tali ceppi di lievito con l'allele *tlc1-human* (*tlc1-h*) hanno il telomero più corto di circa 100 bp, rispetto al ceppo aploide isogenico che porta l'allele WT TLC1 (Henning *et al.*, 1998; Auriche *et al.*, 2008 review - Allegato 1). Questo indica che le sequenze telomeriche umane, pur essendo riconosciute dal lievito, non vengono correttamente regolate determinando un accorciamento telomerico durante la crescita cellulare.

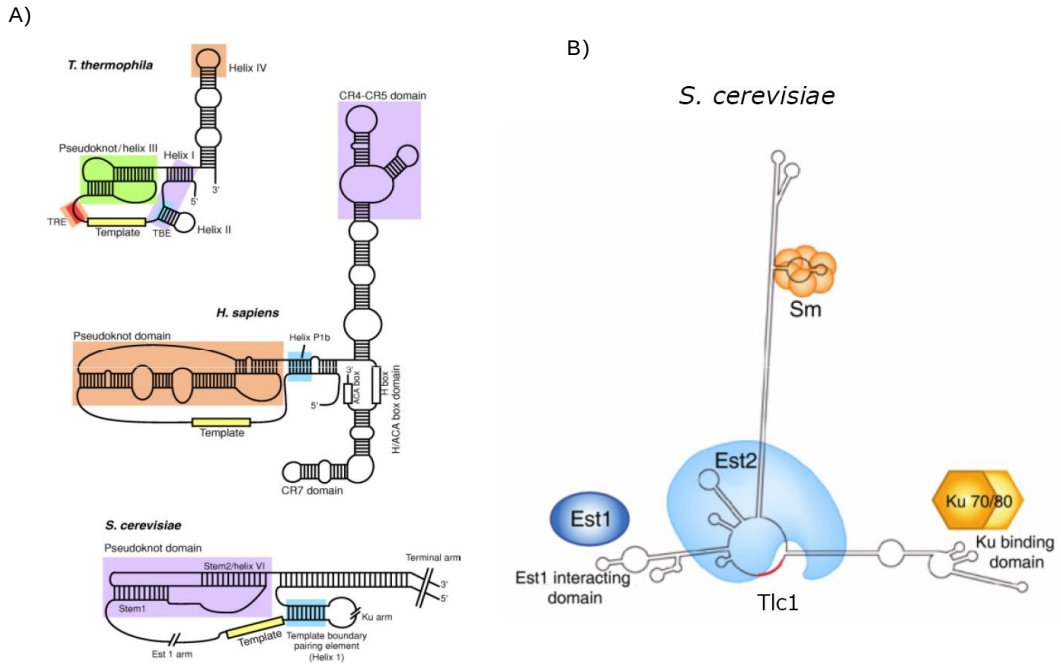


Fig.3: A) Rappresentazione schematica della struttura secondaria della componente ad RNA della telomerasi in *Tetrahymena thermophila*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*. B) Rappresentazione schematica della struttura della telomerasi in *S. cerevisiae*. Est1 ed Est2 sono la componente proteica della telomerasi mentre Tlc1 è la porzione ad RNA che contiene la sequenza template.

In *S. cerevisiae* e negli altri organismi in cui è stata studiata, la subunità catalitica Est2 della telomerasi forma un complesso con la componente ad RNA trascritta dal gene TLC1 (Fig.3 B). Sebbene questi due elementi siano sufficienti per ripristinare l'attività *in vitro*, Est2 *in vivo* si ritrova associata a diverse proteine tra cui Est1, Est3, che sono indispensabili per l'attività telomerasica *in vivo*. Mutanti est2 e tlc1 ma anche est1, est3 inducono uno stato di senescenza cui segue la morte cellulare in una vasta frazione della popolazione.

PROTEINE ED ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DEI TELOMERI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE

La lunghezza dei telomeri eucariotici è fissata in un intervallo che è specie specifico. In *S. cerevisiae* ad esempio i telomeri sono caratterizzata da ripetizioni di DNA eterogenee, comunemente abbreviate in TG₁₋₃, con una lunghezza che varia dalle 250 alle 350 paia di basi; nell'uomo i telomeri hanno una sequenza abbreviata in T₂AG₃ con una la lunghezza che varia tra 5 e 10 kb. Le estremità cromosomiche inoltre terminano con una regione di DNA a singolo filamento che sporge al 3' (G-Tail). In lievito questa regione è variabile ed è compresa tra 12-14

bp fino a 50-100 bp in tarda fase S (Larrivee *et al.*, 2004) mentre nell'uomo la regione di DNA telomerico a singolo filamento varia tra 100 e 280 nt (Wright *et al.*, 1997) (Fig.4).

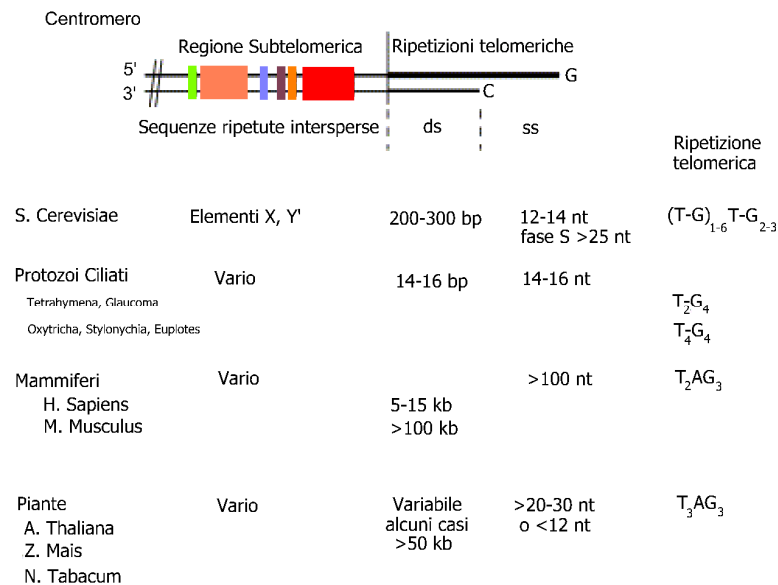


Fig.4: Organizzazione telomerica e subtelomerica in diversi organismi.

Il fatto che, anche in specie diverse, la lunghezza del telomero sia mantenuta costante, seppur all'interno di un intervallo di lunghezze, implica l'esistenza di un meccanismo di regolazione. Potenzialmente esistono due vie per regolare la lunghezza dei telomeri: 1) aggiunta dell'appropriato numero di ripetizioni telomeriche; 2) aggiunta di un numero fisso di ripetizioni telomeriche e successivo accorciamento mediante attività esonucleasica. I primi esperimenti per cercare di comprendere i processi coinvolti nella regolazione della lunghezza dei telomeri, evidenziarono da subito che il meccanismo non era il risultato dell'azione esonucleolitica a carico di ripetizioni telomeriche eccessivamente lunghe, ma al contrario dell'attività diretta della telomerasi che preferenzialmente allunga i telomeri più corti (Marcand *et al.*, 1999).

Molto prima che si chiarisse l'esistenza di un processo di controllo sul telomero telomerasi-dipendente, Murray *et al.*, (1988) avevano proposto l'esistenza di un meccanismo di feedback in grado di percepire la lunghezza del DNA telomerico e di ridurre la sintesi quando questo eccedeva una certa estensione. Questa proposta di regolazione operata dalla telomerasi necessitava tuttavia di ulteriori conferme.

In *Saccharomyces cerevisiae*, la regione di DNA telomerico a doppio filamento è legata direttamente dalla proteina **Rap1 (Repressor/Activator-site binding Protein)** tramite due domini Myb in tandem (Shore, 1994). Nel corso di studi sull'effetto di Rap1 sul silenziamento di geni telomerici, Marcand *et al.*,

(1997) notarono che, il legame specifico della regione C-terminale di Rap1 ad un tratto di sequenze TG in un singolo telomero, determinava una riduzione della lunghezza del telomero stesso, inoltre tale riduzione era direttamente proporzionale al numero di domini-C legati. Questi risultati furono la conferma dell'esistenza di un meccanismo di feedback per la regolazione dei telomeri che coinvolge la regione C-terminale di Rap1. Ancora prima che emergesse questo meccanismo di feedback, definito anche di “*counting* negativo”, analisi genetiche effettuate su mutanti puntiformi avevano suggerito che Rap1 era un regolatore negativo della lunghezza dei telomeri. Mutazioni puntiformi nella regione C-terminale di Rap1 avevano mostrato un allungamento telomerico fino al raggiungimento di un nuovo equilibrio (Sussel e Shore, 1991), mentre la completa delezione del dominio C-terminale determinava un eccessivo allungamento dei telomeri causati dalla perdita totale di regolazione (Kyrion *et al.*, 1992). Tuttavia, altri lavori suggerirono che Rap1 potesse avere un ruolo ben più complesso a causa del suo coinvolgimento in processi differenti dal metabolismo telomerico. Studi successivi, sempre volti a definire il ruolo della regione C-terminale, rivelarono che Rap1 interagisce direttamente, con altre due proteine chiamate **Rif1 (Rap1-Interacting Factor 1)** (Hardy *et al.*, 1992) e **Rif2 (Rap1-Interacting Factor 2)** (Wotton e Shore, 1997). Delezioni di RIF1 o di RIF2 causano allungamento telomerico, ~600 bp nel caso di rif1-Δ e ~150 per rif2-Δ ed i doppi mutanti presentano un fenotipo del tutto simile a quello dei mutanti privi della regione C-terminale di Rap1 (Wotton e Shore, 1997). Successivamente si dimostrò che i mutanti di delezione rif1 e rif2 mostravano un incremento della frequenza di allungamento dei telomeri telomerasi-dipendente (Teixeira *et al.*, 2004) evidenziando che quello che era considerato un counting mediato da Rap1 è in realtà un counting Rif1-Rif2 dipendente. Secondo questo modello quindi, il ruolo di Rap1 è quello di mediare il caricamento del complesso Rif1/2 al telomero che a sua volta opera la regolazione (Levy e Blackburn, 2004). Parte del meccanismo attraverso il quale Rif1 e Rif2 inibiscono l'allungamento telomerico passa attraverso il blocco del legame della proteina chinasi Tel1 al telomero (Hirano *et al.*, 2009).

La perdita di funzionalità di Tel1 determina l'instaurarsi di un nuovo equilibrio nella lunghezza delle ripetizioni telomeriche, che risultano essere più corte rispetto al ceppo selvatico. In oltre, in assenza di Tel1, la delezione della regione C-terminale di Rap1 così come l'eliminazione di Rif1 o Rif2 non hanno effetto sulla lunghezza media dei telomeri (Craven e Petes, 1999; Ray e Runge 1999a) suggerendo che il meccanismo di counting Rap1/Rif1/Rif2-dipendente necessita di Tel1 ed in assenza di questa proteina un meccanismo Rap1-indipendente è

responsabile della regolazione dei telomeri (Brevet *et al.*, 2003; Alexander e Zakian 2003).

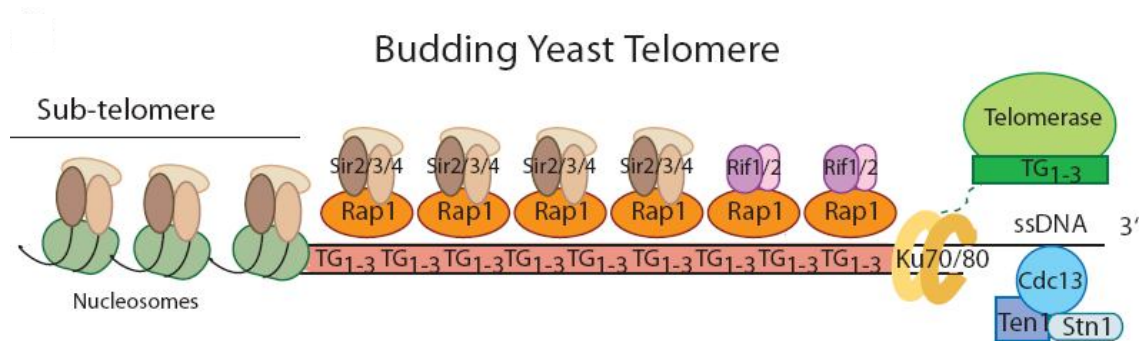


Fig.5: Struttura del telomere di *S.cerevisiae* e delle proteine ad esso associate: le proteine Rap1 (Repressor Activator Protein 1) si associano al DNA telomerico a doppio filamento e mediano il reclutamento delle proteine Sir2, Sir3 e Sir4 (Silent Information Regulator Protein) e del dimero Rif1 e Rif2 (Rap1 Interacting Factors) coinvolto nella regolazione della lunghezza del telomero. Il complesso eterodimerico Ku (Ku70/80) interagisce con la parte terminale del telomero ed attraverso l'interazione con la regione del *ku-loop* della componente ad RNA della telomerasi ne favorisce il caricamento al telomero. Cdc13 (Cell Division Control Protein 13) e le proteine ad esso associate (Stn1 e Ten1) si legano alla protrusione-3' telomerica a singolo filamento (complesso CST).

Come suggerito da esperimenti di “two-hybrid” il dominio C-terminale di Rap1 non solo è coinvolto nell'associazione con Rif1-2 ma recluta anche il complesso multiproteico **Sir2, Sir3, Sir4 (Silent Information Regulator proteins)** (Palladino *et al.*, 1993; Moretti *et al.*, 1994). Il complesso delle proteine Sir è coinvolto in numerose attività e nella regolazione di importanti processi come il silenziamento trascrizionale, la struttura della cromatina, la stabilità genomica, il riparo del DNA ed anche l'invecchiamento. Mediante una tecnica combinata di immunofluorescenza/ibridazione *in situ* (IF/FISH), è stato dimostrato che Rap1p, Sir3 e Sir4 co-localizzano con i domini telomerici e con l'elemento subtelomerico Y' (Gotta *et al.*, 1996). In particolare è stato osservato che Sir2, 3, e 4 si legano come un complesso, a livello dei nucleosomi subtelomerici, attraverso l'interazione con la coda amino terminale degli istoni H3 ed H4 (Strahl-Bolsinger, *et al.*, 1997). Questo legame sembra influire sul livello di acetilazione degli istoni in quanto il DNA subtelomerico risulta essere meno accessibile e più compatto rispetto al resto della cromatina (Gottschling, 1992). Un ruolo chiave è quello svolto dalla proteina istone-deacetilasi NAD-dipendente Sir2 (Smith *et al.*, 2000) che agisce sull'organizzazione del DNA (Chiani *et al.*, 2006) e collabora con diverse proteine Sir al silenziamento genico sia dei loci HML ed HMR (Rine *et al.*, 1987) che al silenziamento telomerico (Straight *et al.*, 1999).

Analisi di immunoprecipitazione, in cellule di lievito, evidenziano che anticorpi anti-Sir3 immunoprecipitano il DNA telomerico, tuttavia, se si inducono rotture a

doppio filamento nel DNA, si osserva una riduzione sostanziale dell'immunoprecipitazione della cromatina telomerica ed una rilocalizzazione delle proteine Sir ai siti di rottura (Mills *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999). Alcune osservazioni inoltre, indicano che le proteine Sir si associano direttamente a livello della giunzione delle estremità rotte durante la ricombinazione non omologa (NHEJ) (Tsukamoto *et al.*, 1997) e che questa redistribuzione è mediata dai geni checkpoint Mec1 e Rad9 (Mills *et al.*, 1999). In accordo con questi risultati si ipotizza che la localizzazione delle Sir ai telomeri possa servire da accumulo e riserva di tali proteine. Un meccanismo di riparo, organizzato sulla mobilitazione di proteine già sintetizzate, è certamente in grado di rispondere più rapidamente ad eventi di rottura rispetto ad un altro meccanismo che richieda l'induzione trascrizionale e la sintesi proteica.

Un altro complesso di proteine estremamente importante per la regolazione dei telomeri, si trova confinato in prossimità della zona di DNA a singolo filamento che costituisce la cosiddetta coda al 3'. Queste proteine hanno un duplice ruolo: proteggere le estremità cromosomiche (*capping*) dall'azione delle nucleasi e dai processi di degradazione del telomero; rendere il telomero accessibile all'azione della telomerasi (Nugent *et al.*, 1996). La proteina meglio caratterizzata, responsabile della protezione dell'estremità telomerica in *S. cerevisiae*, è codificata dal gene essenziale **CDC13 (Cell Division Control Protein 13)**. La proteina Cdc13 mostra un'elevata affinità e specificità per il DNA telomerico a singolo filamento *in vitro*, e nel legame con la protrusione al 3' *in vivo* (Nugent *et al.*, 1996; Lin e Zakian, 1996). Oltre a questo ruolo, Cdc13 è certamente coinvolta anche nell'allungamento del filamento ricco in G da parte della telomerasi. Infatti, la mutazione nel gene CDC13, chiamata *cdc13-2*, determina un fenotipo simile a quello osservabile in ceppi difettivi per la telomerasi (Lingner *et al.*, 1997). Inoltre fusioni geniche tra CDC13 ed EST1 (una delle subunità proteiche del complesso della telomerasi) inducono la formazione di telomeri particolarmente lunghi suggerendo che Cdc13 promuove il caricamento della telomerasi attraverso un'interazione diretta con l'enzima (Evans e Lundblad, 1999). Questo modello del reclutamento proposto da Lundblad e collaboratori ha ricevuto successive conferme attraverso studi di immunoprecipitazione. In particolare Taggart e collaboratori mostrarono che Cdc13 così come le proteine della telomerasi prese in esame in questo studio (Est1 ed Est2), hanno un picco di associazione con i telomeri in fase S (Taggart *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2004). Si è inoltre osservato che Est2, ma non Est1, è associata al telomero anche in G1 e questa associazione decresce, per poi raggiungere un massimo in tarda fase S. Lavori successivi evidenziarono che l'associazione G1 specifica di Est2 richiede la presenza dell'eterodimero **yKu70/yKU80 (DNA elicase II 70-80 kDa subunits)** (Fisher *et al.*, 2004). Il

complesso yKu70/80 interagisce con una regione del template ad RNA (TLC1) della telomerasi durante la fase S e questo favorisce il caricamento dell'oloenzima. Tuttavia il caricamento della telomerasi è legato anche alla presenza di Cdc13, poiché in assenza di questa proteina, l'efficienza dell'associazione della telomerasi al telomero si dimezza. L'inibizione completa del legame della telomerasi richiede l'eliminazione sia del complesso yKu70/80 che di Cdc13 (Chan *et al.*, 2008). Come dimostrato dai mutanti temperatura sensibili *cdc13-1*, al di sotto della temperatura ottimale, si osserva l'accumulo esteso di regioni di DNA a singolo filamento (Garvik *et al.*, 1995; Nugent *et al.*, 1996). Mutanti di delezione, *cdc13Δ*, possono sopravvivere in presenza di telomeri allungati tramite meccanismi ricombinazione-dipendenti, tuttavia questi mutanti risultano vitali soltanto in assenza anche dei geni preposti al controllo del danno al DNA. Questo suggerisce che nei ceppi *cdc13Δ*, così come nei mutanti Cdc13 temperatura sensibili, la presenza di estremità non protette potrebbe innescare l'attivazione dei checkpoint di danno al DNA che inducono l'arresto del ciclo cellulare e successivamente la morte (Larrivee *et al.*, 2006). Il fenotipo dei mutanti *cdc13-1* viene tuttavia soppresso anche dall'incremento nel dosaggio di altre due proteine telomeriche **STN1** e **TEN1** (Grandin *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2001). Queste tre proteine si associano insieme per formare il cosiddetto complesso **CST** (Cdc13-Stn1-Ten1) che ricorda molto il complesso RPA (Replication Protein A), coinvolto in numerose reazioni del metabolismo del DNA (Gao *et al.*, 2007). CST quindi, sembra essere un complesso simile all'RPA ma con funzioni telomero-specifiche. E' chiaro che il ruolo di CST non è soltanto quello di proteggere il telomero ma anche di regolare l'attività della telomerasi (Puglisi *et al.*, 2008).

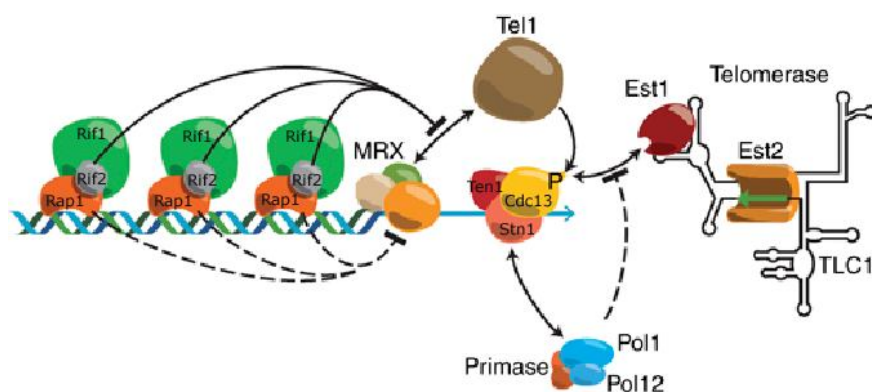


Fig.6: Proteine principali coinvolte nella regolazione della lunghezza del telomero. Il complesso Rap1-Rif genera dei segnali di inibizione dipendenti dalla lunghezza del telomero che regolano negativamente l'accesso della telomerasi. Rif2 compete con Tel1 per il legame con Xrs2 del complesso MRX, limitandone l'attività chinastica. Quando Tel1 è presente, questa proteina è in grado di fosforilare Cdc13 creando un segnale favorevole al caricamento della telomerasi mediato dall'interazione con la subunità Est1. La DNA polimerasi α /primasi interagisce con il complesso CST impedendo il reclutamento della telomerasi.

Altri elementi che caratterizzano la struttura delle estremità cromosomiche sono le sequenze subtelomeriche. Queste regioni sono composte da sequenze di DNA mediamente ripetute ed immediatamente adiacenti alle sequenze telomeriche. In molte specie i gruppi di ripetizioni terminali e le sequenze interne uniche sono separati da blocchi di DNA associato al telomero (TA DNA), solitamente specie-specifici, con elevata variabilità in lunghezza e nel grado di ripetitività. Le sequenze subtelomeriche sembrano essere coinvolte in numerosi processi: l'elevata variabilità delle ripetizioni può determinare interazioni specifiche telomero-telomero che facilitano l'appaiamento dei cromosomi alla meiosi; inoltre, sono coinvolte nei meccanismi di regolazione della lunghezza del telomero attraverso un'azione in parallelo tra il checkpoint Tel1 e Tbf1 (Arneric e Lingner, 2007), una proteina subtelomerica, evolutivamente molto simile a Rap1 (Hogues *et al.*, 2008); la presenza di ripetizioni telomeriche in posizione subtelomerica può portare a scambi telomerici e possono così contribuire al mantenimento dei telomeri, nel caso in cui il meccanismo principale di replicazione del telomero via telomerasi sia assente (cellule ALT - Alternative Lengthening of Telomeres).

Ripetizioni subterminali potrebbero anche salvaguardare i geni essenziali da processi dinamici di perdita e aggiunta di materiale genetico che avvengono alle estremità (Bryan *et al.*, 1995) agendo in tal modo da zone cuscinetto tra le estremità e la parte codogenica dei cromosomi. Gli elementi di DNA associato al telomero meglio caratterizzati appartengono alle famiglie Y' e X di *S. cerevisiae*, anche se ripetizioni simili sono state descritte per organismi quali *Plasmodium falciparum* e uomo (De Lange *et al.*, 1990). L'elemento Y' si trova circa la metà dei cromosomi, immediatamente adiacente alle ripetizioni terminali TG₁₋₃, è presente in un numero di copie che può variare da uno a quattro. Ordinamenti in tandem di 8-20 copie di sequenze ripetute di 36 paia di basi sono presenti all'interno dell'elemento Y', che inoltre contiene un altro ordinamento in tandem costituito da tre copie di una sequenza ripetuta di 10 paia di basi (T^T/GAGGGCTAT)₂₋₃ all'interno della quale sono riconoscibili due copie della sequenza telomerica di vertebrato TTAGGG. Gli elementi Y' sono esclusivi di *S. cerevisiae* e di *S. paradoxus*, non si ritrovano in altre specie di *Saccharomyces*; sono presenti in due classi di diversa lunghezza, 5.2 Kb e 6.7 Kb (Y'-short e Y'-long), che differiscono per la presenza/assenza di una sequenza interna di 1.5 Kb. Gli elementi genomici Y' possono ricombinare gli uni con gli altri così da potere essere trasferiti ad estremità mancanti inizialmente dell'elemento Y', viceversa, eventi ricombinativi possono privare un telomero dell'elemento Y'. La famiglia d'elementi subtelomerici Y' possiede una sequenza capace di replicarsi

autonomamente (ARS), che può fornire l'origine di replicazione quando l'elemento Y' si presenta all'interno della cellula come circolo in grado di replicarsi autonomamente. Infine l'elemento Y' presenta due fasi di lettura aperte (ORFs), una delle quali codifica per un polipeptide con omologia al fattore d'inizio della trascrizione di più elicasi di lievito, TIF1/2. Tra l'elemento Y' ed il restante braccio cromosomico è presente una famiglia di sequenze ripetute, ma meno conservate, chiamate X. L'elemento X ha dimensioni che possono variare da 0.3 a 3.7 kb (Chan e Tye, 1983); esso si presenta molto eterogeneo, con una regione altamente conservata di 475 paia di basi, definito 'core' X, all'interno della quale è presente un'origine di replicazione autonoma (ARS) e, in molti casi, il sito di legame per la proteina Abf1p, prodotto genico coinvolto sia nella regolazione trascrizionale sia nella replicazione. E' inoltre presente una ripetizione e mezza della sequenza telomerica di vertebrato TTAGGG, sito di legame per il prodotto proteico del gene essenziale di lievito Tbf1. Brevi ripetizioni telomeriche sono presenti come elementi di giunzione tra gli elementi X e Y' o tra l'elemento X ed il telomero. Il sequenziamento del genoma di *S. cerevisiae* rivela che regioni in prossimità degli elementi subtelomerici hanno una bassa densità di ORFs e contengono sequenze che sono ripetute anche altrove nel genoma. Tra le sequenze codificanti in posizione terminale vi sono i membri di famiglie multigeniche quali SUC, MAL e MEL che codificano enzimi necessari all'utilizzo di fonti di carbonio, quali glucosio e maltosio.

LA PROTRUSIONE AL 3' A SINGOLO FILAMENTO DI DNA PARTECIPA ALL'OMEOSTASI DEI TELOMERI

Tutti i tipi di cellule, dai batteri con cromosomi circolari, all'uomo con cromosomi lineari, hanno evoluto un meccanismo di risposta al danno al DNA (DDR – DNA Damage Response) che viene attivato a seguito di rotture a doppio filamento del DNA (DSB – Double Strand Break). I DSB infatti, sono probabilmente i più potenti induttori di DDR poiché, una singola rottura del DNA, potrebbe condurre alla perdita di materiale genetico al momento della segregazione dei cromosomi. L'importanza della risposta al danno del DNA è anche confermata dal fatto che molte proteine che controllano il DDR si sono conservate attraverso l'evoluzione dai batteri agli archea fino agli eucarioti. E' interessante osservare come in *S. cerevisiae*, molte delle proteine che regolano la fase precoce del DDR, sono anche coinvolte nel mantenimento fisiologico del telomero, mentre quelle che partecipano alla fase tardiva sembrano avere un ruolo secondario a livello telomerico. Le proteine tardive del DDR ricoprono invece, funzioni importanti in caso di presenza di alterazioni del telomero o nei meccanismi di mantenimento alternativo del

telomero (ALT) (Enomoto *et al.*, 2002; Lundblad, 2002; Iijima e Greider, 2003). In *S. cerevisiae* il cosiddetto complesso **MRX** è formato dalle tre proteine **Mre11/Rad50/Xrs** (Mre11/Rad50/Nbs1 in mammifero) è reclutato nelle rotture del DNA a doppio filamento e determina l'attivazione dei checkpoint coinvolti nella ricombinazione omologa (HR – Homologous Recombination) ed in quella non omologa (NHEJ – Non Homologous End Joining) (D'amours e Jackson, 2002; Sabourin e Zakian, 2008). Tuttavia, sia mammiferi che in *S. cerevisiae*, il complesso MRX ha un'importante funzione anche nel mantenimento del telomero. Per esempio, la perdita di Mre11 determina un accorciamento dei telomeri in *S. cerevisiae* e nell'uomo (Ritchie e Petes, 2000) ed un alto livello di fusioni telomeriche in *Drosophila* (Ciapponi *et al.*, 2004). Per attivare la via di segnalazione del danno al DNA, il complesso MRX, attraverso la regione C-terminale della componente Xrs2 (Nbs1), interagisce con le PI3-Kinase-like protein Kinase (PIKK) in particolare con Tel1 (ATM umano) (Nakada *et al.*, 2003). Tel1 ed il complesso MRX sembrano appartenere alla stessa via di segnalazione per il mantenimento del telomero poiché singoli e doppi mutanti hanno un fenotipo simile caratterizzato da telomeri corti (Ritchie e Petes, 2000). Tuttavia in altri contesti, come per esempio per il riparo dei DSB e nella meiosi, il complesso MRX lavora indipendentemente da Tel1 (Carballo *et al.*, 2008). Il complesso MRX contribuisce al mantenimento dei telomeri sia incrementando l'attività della telomerasi che contribuendo al capping telomerico (Ciapponi *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2006; Cenci 2009). Nelle cellule di lievito e di mammifero, il complesso MRX è coinvolto nel generare la protrusione al 3' all'estremità dei cromosomi (Larrivee *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2006). La formazione della regione di protrusione al 3' è utile per consentire il capping telomerico di fondamentale importanza per tre meccanismi: 1) il DNA a singolo filamento al 3', al contrario di un'estremità piatta, è il substrato ideale per l'associazione della telomerasi (Lingner e Cech, 1996); 2) favorisce l'associazione di proteine telomeriche essenziali come Cdc13-Stn1-Ten1 che si legano in maniera specifica al DNA telomerico a singolo filamento (Gao *et al.*, 2007); 3) favorisce la formazione di strutture secondarie del telomero (T-loop).

Oltre a questi ruoli il complesso MRX tramite l'azione di Mre11 è coinvolto anche nel reclutamento specifico di Tel1 ai telomeri corti e per favorirne quindi il successivo riallungamento. (Hector *et al.*, 2007; Sabourin *et al.*, 2007). Mre11 contiene quattro motivi fosfodiesterici, e sia nell'uomo che in lievito, questa proteina possiede un'attività endonucleasica per il DNA a singolo filamento ed attività esonucleasica 3'-5' per il DNA a doppio filamento suggerendo che Mre11 sia responsabile della formazione delle code sia nei DSB che ai telomeri (Williams *et al.*, 2007). Tuttavia ceppi di *S. cerevisiae* difettivi per l'attività nucleasica di Mre11

soffrono soltanto di una leggera sensibilizzazione alle radiazioni ionizzanti (IR) (Moreau *et al.*, 1999).

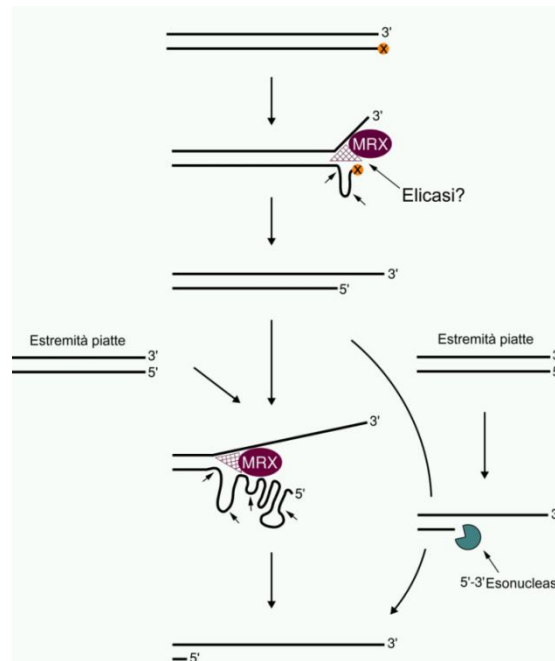


Fig.7: Modello d'azione del complesso MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) nella formazione della regione di DNA a singolo filamento.

Poichè la rimozione del complesso MRX in lievito non abolisce completamente i meccanismi di riparo del DSB né la formazione del G-Tail (Larrivee *et al.*, 2004; Clerici *et al.*, 2006) è stata ipotizzata l'esistenza altre nucleasi in grado di svolgere un ruolo analogo a quello di MRX. In *S. cerevisiae* l'esonucleasi Exo1 gioca un ruolo critico nella rimozione del filamento C in telomeri non protetti quali quelli dei mutanti *cdc13* o *yku70* (Maringele e Lydall 2002; Zubko *et al.*, 2004). Poiché per l'attività di Mre11 è importante anche la struttura secondaria che assume il DNA, la proteina Rad50 influisce in maniera determinante sull'efficienza del complesso MRX stesso (Trujillo KM *et al.*, 2003). In particolare il gene RAD50 di *S. cerevisiae* specifica per una proteina di 153 kDa con un'elevata omologia con la proteina SdcC di *E. coli* (Sharples e Leach, 1995), coinvolta nel mantenimento strutturale di cromosomi. Il terzo elemento del complesso, Xrs2 nel lievito (MRX) o Nbs1 nei vertebrati (MRN), (Carney *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1998) si unisce per mezzo di interazioni dirette con Mre11. Analisi cromatografiche e di sedimentazione suggeriscono che la stechiometria del complesso è $M_2R_2X_1$ (Anderson *et al.*, 2001; Usui *et al.*, 1998).

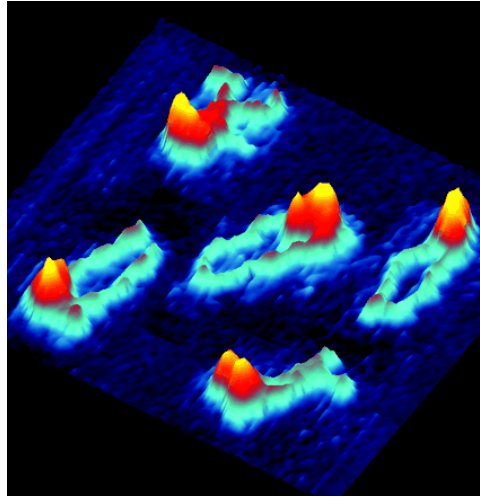


Fig.8: Il complesso Rad50/Mre11 visualizzato tramite microscopio a forza atomica. I domini globulari più voluminosi di Rad50 associato a Mre11 sono rappresentati in giallo ed arancio, mentre la lunga e sottile coda di Rad50 è in blu.

La coda di DNA a singolo filamento che si forma a seguito dell'azione del complesso MRX è il substrato per il legame di Rad51. Questo gene codifica per una proteina di 43-kDa con un'omologia strutturale e funzionale a RecA di *E. Coli* (Krejci *et al.*, 2003). Analogamente a Rad50, anche Rad51 è in grado di legare il DNA (Shinohara *et al.*, 1998). Il legame di Rad51 al DNA a singolo filamento è stimolato dal complesso proteico RPA. Il ruolo di RPA sembra quello di rimuovere le strutture secondarie che si formano durante la fase di presinapsi di Rad51 favorendone l'accesso al DNA. Per riuscire a scalzare il complesso RPA dal DNA sembra essenziale per Rad51 l'azione di Rad52. La proteina Rad52 interagisce direttamente sia con RPA che con Rad51 e media all'assemblaggio di Rad51 attraverso la rimozione di RPA da DNA a singolo filamento (Song e Sung, 2000). Anche se il meccanismo di ricombinazione Rad51-dipendente è sicuramente il più efficiente e quello maggiormente utilizzato nel riparare i DSB, tuttavia sono stati osservati significativi tassi di ricombinazione anche in mutanti difettivi per Rad51. Lo studio dei mutanti di Rad51 ha evidenziato come Rad52 sia in grado di promuovere efficacemente processi di ricombinazione intramolecolari e con una minore incidenza favorisce anche fenomeni di invasione di filamento intermolecolari. Sia nell'uomo che nel lievito Rad52 forma dei multimeri a forma di anello simili a quelli prodotti da Rad51 (Ranatunga *et al.*, 2001). La proteina Rad52 purificata lega preferenzialmente DNA a singolo filamento e promuove l'appaiamento a sequenze di DNA complementari (Mortensen *et al.*, 1996). L'appaiamento di lunghe molecole di DNA, da parte di Rad52, è favorito dalla presenza di RPA. Il possibile ruolo svolto da RPA sembra essere quella di rimuovere le strutture secondarie dal DNA a singolo filamento. Questo favorirebbe l'intervento

di Rad52 che fino ad ora risulta essere l'unico gene essenziale per i processi di ricombinazione Rad51-indipendenti.

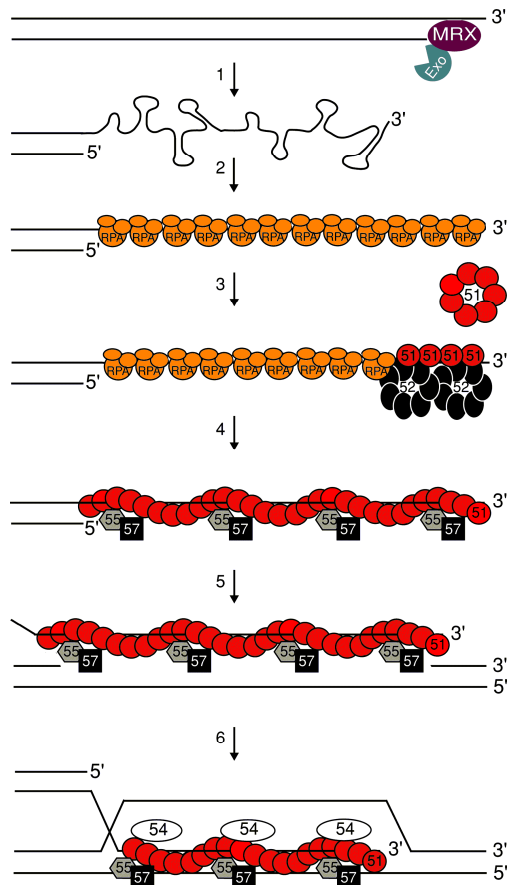


Fig.9: Meccanismo d'azione di Rad51. Inizialmente il filamento di DNA viene processato dall'azione del complesso MRX che porta alla formazione di una regione a singolo filamento al 3'. Successivamente il filamento che si genera viene coperto dall'associazione delle proteine RPA per stabilizzare la struttura. La fase successiva prevede l'azione di Rad52 che scalza RPA in favore di Rad51 e la ricerca dell'omologia. Una volta che l'omologo è stato individuato Rad51 opera l'invasione di filamento.

MECCANISMI DI MANTENIMENTO DEL TELOMERO TELOMERASI-DIPENDENTE

Il passaggio della forza di replicazione prepara il processamento delle estremità telomeriche che portano alla generazione (o all'estensione) di una regione di DNA a singolo filamento al 3' ricca in TG. La chinasi Tel1 ed il complesso MRX, che fanno parte della stessa via cui partecipa la telomerasi (Ritchie e Petes, 2000), potrebbero promuovere l'innesco di attività esonucleolitiche multiple. Evidenze sperimentali suggeriscono che l'attività di MRX/Tel1 è probabilmente inibita in *cis* dall'azione del complesso Rap1/Rif associato al telomero (Chan *et al.*, 2001). Il

filamento al 3' che viene generato promuove l'associazione di Cdc13 (Tsukamoto *et al.*, 2001). L'aumento del legame di Cdc13 conduce al reclutamento dell'oloenzima della telomerasi, attraverso l'interazione Cdc13-Est1 ed alla successiva estensione del filamento TG. L'interazione del complesso CST (Cdc13-Stn1-Ten1) con la DNA Polimerasi α /Primasi determinano l'arresto della telomerasi e promuovono la replicazione del filamento complementare ricco in CA. I primi chiarimenti riguardo al ruolo nella regolazione della lunghezza del telomero operata dalla regione di ripetizioni TG, furono offerti da Marcand *et al.*, 1999. In questi esperimenti si utilizzò un meccanismo di ricombinazione sito specifico, al fine di generare un telomero più corto. Il telomero così accorciato veniva allungato abbastanza rapidamente, ad un tasso di circa 15 bp per generazione, per poi decrescere in prossimità del raggiungimento dell'equilibrio (Marcand *et al.*, 1999). Tuttavia in assenza della telomerasi la lunghezza del telomero decresceva con un tasso costante. Questi dati supportano l'idea che la lunghezza del telomero è regolata attraverso una progressiva inibizione dell'azione della telomerasi che aumenta in relazione alla lunghezza della sequenza TG.

Ulteriori chiarimenti riguardo le dinamiche che regolano l'allungamento dei telomeri arrivarono da un ingegnoso lavoro di Lingner e collaboratori. Nel loro esperimento fu chiaramente dimostrato che non tutti i telomeri vengono allungati ad ogni ciclo cellulare ma questo l'allungamento avviene in maniera preferenziale nelle estremità con un tratto di ripetizioni TG più corto. (Teixeira *et al.*, 2004). Estendendo quest'esperimento in cellule che esprimono due tipi di templat, Chang *et al.*, (2007) sono riusciti a evidenziare che la telomerasi può andare incontro a cicli multipli di associazione/dissociazione su uno specifico telomero, durante un ciclo cellulare. In particolare si è anche visto che l'attività telomerasica diventa misurabile in telomeri estremamente corti (<125 bp) con un meccanismo che prevede la presenza di Tel1 (Arneric e Lingner, 2007). Queste analisi dimostrarono anche che delezioni in Rif1 e Rif2 aumentavano la frequenza degli eventi di allungamento, ma non l'estensione delle sequenze telomeriche aggiunte (Teixeira *et al.*, 2004) suggerendo chiaramente che il tratto di sequenze telomeriche presenti alle estremità cromosomiche, è direttamente responsabile del controllo dell'equilibrio tra lo stato estendibile e non estendibile del telomero.

Due gruppi di ricerca hanno recentemente adattato il sistema di accorciamento mirato di un telomero sviluppato da Marcand *et al.* (1999) per studiare l'associazione delle proteine al telomero in funzione della sua lunghezza (Sabourin *et al.*, 2007; Bianchi e Shore, 2007b).

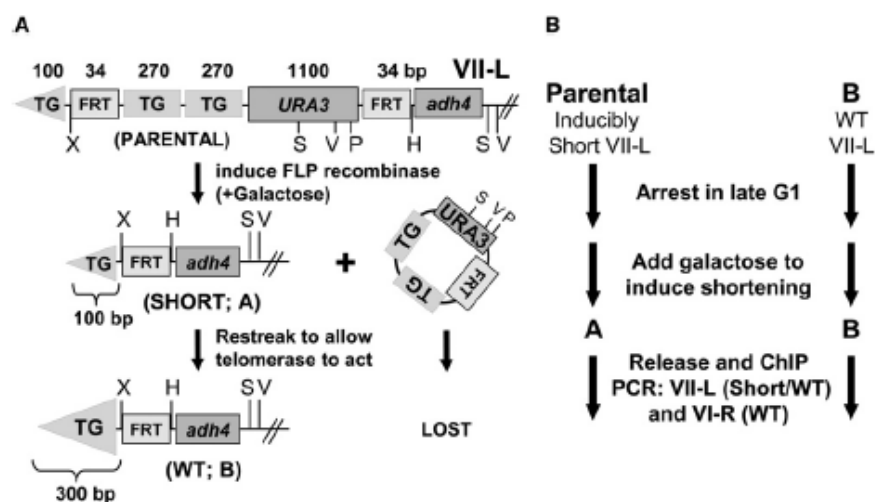


Fig. 10: Produzione di un singolo telomero corto: A) Il telomero endogeno VII-L è stato modificato come descritto da Marcand *et al.*, 1999. La ricombinasi FLP1, indotta dal galattosio, determina la rimozione della regione tra i due siti FRT ed il rilascio di un circolo non replicativo. Il telomero che ne risulta è costituito soltanto da 100 bp di ripetizioni $C_{1-3}A/TG_{1-3}$. B) Rappresentazione schematica dell'esperimento.

Entrambi i gruppi hanno misurato un aumento del legame di Est1 ed Est2 nei telomeri più corti rispetto al controllo oltre ad un arricchimento di Tel1 in telomeri più corti (Sabourin *et al.*, 2007; Bianchi e Shore, 2007b). Questo risultato è stato successivamente confermato anche su cellule prive di attività telomerasica (Hector *et al.*, 2007). Come ricordato in precedenza, la chinasi Tel1 è richiesta per la normale associazione della telomerasi al telomero che richiede la fosforilazione Tel1-mediata di Cdc13 che a sua volta promuove il legame di Est1 ed il reclutamento della telomerasi (Tseng *et al.*, 2006). Secondo questo modello quindi è facile ipotizzare che l'aumento nell'associazione di Tel1 ai telomeri corti determini anche un aumento nei livelli di fosforilazione di Cdc13 e di conseguenza un aumento dell'attività telomerasica. A questo punto è necessario comprendere perché il reclutamento di Tel1, che analogamente a quanto accade in un DSB dipende dalla regione C-terminale di Xrs2 (Sabourin *et al.*, 2007), è più efficiente in telomeri corti rispetto a telomeri lunghi. Marcand e collaboratori hanno evidenziato che Rif2 ha un ruolo diretto nei processi di protezione del telomero e questo potrebbe essere attuato mediante inibizione diretta del complesso MRX e/o dal legame di Tel1 (Marcand *et al.*, 2008). In un lavoro più recente Sugimoto e collaboratori hanno evidenziato il ruolo di Rif1/2 e di Rap1 nel controllo del reclutamento di Tel1 ai telomeri. Mediante una serie evidenze sperimentali sono stati ipotizzati due meccanismi: 1) Rif1 e Rif2 inibiscono il reclutamento di Tel1 al complesso MRX alle estremità telomeriche; 2) in assenza di Tel1, Rap1 attenua il legame di MRX al telomero. Entrambi questi meccanismi assicurano che il legame

di Tel1 al telomero diminuisce all'aumentare della lunghezza del telomero stesso (Hirano *et al.*, 2009).

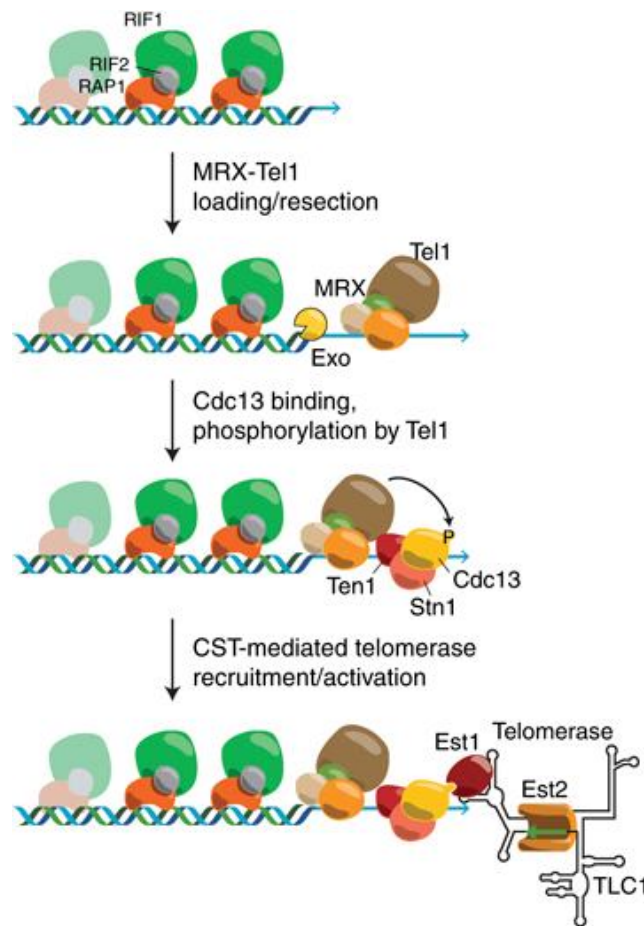


Fig.11: Rappresentazione schematica del processo di allungamento telomerico telomerasi dipendente in *S. cerevisiae*. Dopo il passaggio della forca di replicazione il complesso MRX (Mre11, Rad50, Xrs2) e la chinasi Tel1 vengono reclutate alle estremità telomeriche. Il complesso MRX insieme a Tel1 regolano la formazione della coda a singolo filamento insieme ad un esonucleasi ancora non ben caratterizzata. La protrusione che si forma serve per il legame del complesso CST (Cdc13, Stn1, Ten1). Tel1 a questo punto fosforila Cdc13 che recluta la telomerasi attraverso l'interazione con Est1.

Un effetto diretto di Tel1 su Cdc13 ed in seguito sul reclutamento della telomerasi, sembra non essere l'unico meccanismo in grado di favorire l'allungamento dei telomeri. In un esperimento di accorciamento del telomero basato sul sistema Cre/LoxP, Bianchi e Shore (2007a) hanno osservato che i telomeri più corti, a differenza di quanto ci si aspetta nel normale meccanismo di controllo della lunghezza, replicano precocemente (all'inizio della fase S) a causa dell'attivazione delle origini di replicazione subtelomeriche. Questo effetto ha come risultato un repentino allungamento di telomeri che hanno raggiunto una soglia di lunghezza critica, fornendo così un vantaggio a quelle cellule che hanno subito un collasso delle forche di replicazione telomeriche (Miller *et al.*, 2006) o una rapida delezione

del telomero (Li e Lustig, 1996). Il meccanismo che consente l'attivazione di questo meccanismo di controllo legato all'attività delle origini di replicazione non è ancora chiaro anche se potrebbero avere un ruolo le proteine Ku e/o Sir (Stevenson e Gottschling, 1999; Cosgrove *et al.*, 2002). Tuttavia non è ancora chiaro come la replicazione precoce del DNA telomerico sia in grado di accelerare l'allungamento telomerico, una possibilità potrebbe essere che questo incrementa il periodo di accessibilità della telomerasi al telomero, in particolare durante il periodo della fase S precoce quando il legame dell'inibitore Rif1 è minimo (Bianchi e Shore, 2007).

MECCANISMO DI MANTENIMENTO DEL TELOMERO TELOMERASI-INDIPENDENTE

I meccanismi di mantenimento dei telomeri in assenza della telomerasi sono presenti in natura negli organismi che non hanno telomerasi, così come nelle linee cellulari immortalizzate e nelle cellule tumorali che non esprimono la telomerasi. Negli organismi privi di telomerasi, le estremità cromosomiche vengono mantenute o attraverso la ricombinazione di sequenze ripetute in tandem come nel caso di *Allium cepa* (Pich & Schubert, 1992), *Anopheles gambiae* (Roth *et al.*, 1997) e *Chironomus* (Cohn & Edstrom, 1992; Saiga & Edstrom, 1985) oppure attraverso la trasposizione di retro-elementi come nel caso di *Drosophila melanogaster* (Biessmann *et al.*, 1990). Nelle cellule immortalizzate di mammifero telomerasi-negative si attiva un meccanismo di allungamento telomerico alternativo (ALT) mediato dalla ricombinazione omologa (Dunham *et al.*, 2000) analogamente a quanto osservato nei lieviti *S. cerevisiae* e *K. lactis* (Lundblad & Blackburn, 1993; Johnson *et al.*, 2001).

Molto importanti per la comprensione dei meccanismi ALT in lievito sono stati gli studi effettuati sui "survivors": colonie le cui cellule hanno recuperato la capacità replicativa una volta persa l'attività della telomerasi (Lundblad e Blackburn, 1993). I "survivors" possono essere distinti in due classi (Teng e Zakian, 1999) riconoscibili in base al loro diverso profilo di ibridazione telomerica e cariotipo elettroforetico:

- *Tipo I*, in cui vi è una notevole amplificazione dell'elemento subtelomerico Y' oltre alla presenza di una regione estremamente ridotta del tratto terminale TG₁₋₃/C₁₋₃A (Lundblad e Blackburn, 1993; Teng e Zakian, 1999). Questo meccanismo determina una variazione della grandezza dei cromosomi tale che essi non sono più risolti in bande discrete mediante elettroforesi in campo pulsato;
- *Tipo II*, rappresenta una frazione minore (~10%) dei "survivors" nei quali la lunghezza delle sequenze telomeriche varia da diverse centinaia di basi fino a

raggiungere, ed anche superare, le 10 kb (Teng e Zakian, 1999). Il cariotipo elettroforetico risulta invariato sia nel numero che nella grandezza dei cromosomi (Liti e Louis, 2003).

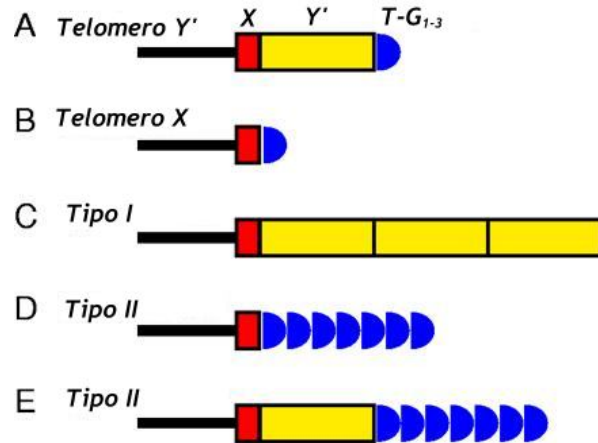


Fig.12: Schematizzazione dell'organizzazione dei telomeri nei survivors di Tipo I e Tipo II

Un modello classico per spiegare la formazione dei survivors sia di Tipo I che Tipo II implica l'instaurarsi di fenomeni di ricombinazione derivanti dall'allineamento intra- o inter-cromosomale del tratto TG_{1-3} o della porzione Y' , seguito da un processo di allungamento del DNA. Questo meccanismo può giustificare in maniera soddisfacente la formazione dei survivors di Tipo I ma non chiarisce completamente le dinamiche di formazione dei survivors di Tipo II. Il rapido e drammatico incremento della lunghezza delle sequenze telomeriche TG_{1-3} che accompagna la transizione verso il Tipo II è difficile da giustificare a causa della mancanza di un ovvio template su cui basare la ricombinazione. A partire da recenti studi si è osservata l'esistenza di circoli telomerici extracromosomali (circoli T) (McEachern, Krauskopf e Blackburn, 2000; Teng e Zakian, 2000) in un'ampia varietà di organismi incluso il lievito ma anche in piante, anfibi e mammiferi (Tomaska *et al.*, 2004). Originariamente i circoli T erano considerati il risultato dell'instabilità genomica ma nuovi studi hanno dimostrato che svolgono un ruolo attivo nel mantenimento dei telomeri (Nosek *et al.*, 2005) e sono in grado di fornire il substrato adatto alla formazione delle lunghe ripetizioni TG_{1-3} che si originano nei survivors di Tipo II. Anelli di DNA telomerico episomale possono generarsi spontaneamente da cellule difettive per la telomerasi ed il processo di ricombinazione telomero-anello telomerico sembra essere regolato da Rad52 e Rad50 oltre a dipendere dall'azione della polimerasi- δ (Teng *et al.*, 2004). Quello che emerge dall'analisi dei "survivors" di Tipo I e Tipo II è che, indipendentemente dal meccanismo o dal substrato che li origina, la

ricombinazione omologa è responsabile del mantenimento dei telomeri dopo la perdita della telomerasi ed è dipendente dal gene Rad52. Infatti in cellule prive della telomerasi e difettive del gene Rad52, sono incapaci di operare la ricombinazione omologa non sviluppavano “survivors”. Lavori successivi hanno mostrato che i survivors possono essere recuperati in mutanti privi del gene Rad50 e Rad51 ma non nei doppi mutanti Rad50-Rad51, indistinguibili dai mutanti Rad52. In assenza di Rad51 non sono stati recuperati survivors di Tipo I mentre nessun Tipo II si è prodotto in assenza di Rad50 (Nielsen e Edstrom, 1993) dimostrando che Rad51 è indispensabile per i survivors di Tipo I e Rad50 per quelli di Tipo II. Sono stati identificati anche altri geni coinvolti nella determinazione dei “survivors” di Tipo I quali l'elicasi Rad54, il complesso Rad55-Rad57 che stabilizza il filamento che opera la ricombinazione (Krogh e Symington, 2004) e l'esonucleasi 5'-3' Exo1 (Bertuch e Lundblad, 2004), mentre nei survivors di Tipo II sono richiesti Rad59 per l'invasione del filamento, Mre11 e Xrs2 che formano il complesso MRX con Rad50, ed il complesso Sgs1-Top3 coinvolto nella ricombinazione omologa (Chen *et al.*, 2001).

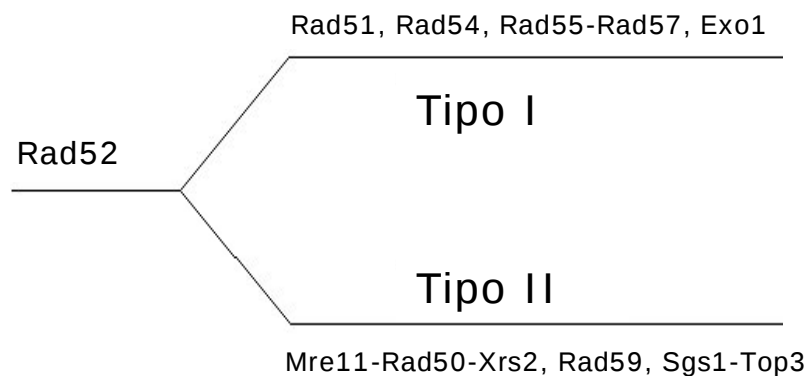


Fig.13: Le due distinte vie di ricombinazione Rad52-dipendente che portano alla formazione dei survivors di Tipo I e Tipo II governati rispettivamente da Rad51 e Rad50.

PROTEINE PER IL RIPARO/RICOMBINAZIONE DEL DNA E PROTEINE PER IL CONTROLLO DEL DANNO AL DNA SONO COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL TELOMERO

Una degli elementi più interessanti del meccanismo di regolazione dei telomeri è rappresentata dal vasto coinvolgimento delle proteine che hanno funzioni chiave sia nel controllo del riparo del danno al DNA (DNA Damage Checkpoint - DDC) che nei meccanismi di riparo delle rotture a doppio filamento (Double Strand Breaks).

Il crescente livello di associazione del complesso MRX e di Tel1 ai telomeri corti, analogamente a quanto si può osservare in presenza di DSB, pone il problema di un possibile riconoscimento di telomeri corti come DSB dalla cellula. Quello che si è visto è che in presenza di telomeri corti si verifica l'attivazione dei checkpoint di danno al DNA ed il conseguente arresto del ciclo cellulare. Una risposta precisa ancora non è possibile fornire anche se da diversi lavori si osserva una potente fosforilazione della chinasi checkpoint Rad53 (CHK2 in mammifero) in presenza di telomeri più corti (Viscardi *et al.*, 2007). Inoltre è stato osservato che l'allungamento del telomero, prodotto a partire da una corta sequenza TG fiancheggiante un DSB, in realtà esercita un'azione anti-checkpoint (Michelson *et al.*, 2005). Ancora prima dell'identificazione di Tel1, il gruppo di Hartwell aveva dimostrato che un mutante temperatura sensibile per Cdc17, successivamente identificato come codificante per la DNA polimerasi α (DNA Pol1), causa un severo allungamento telomerico alla temperatura semi permissiva (Carson e Hartwell, 1985). Il complesso della DNA polimerasi α /primasi è responsabile per la sintesi del primer ad RNA necessario per l'inizio della sintesi di DNA, questo fatto suggerisce che alcuni aspetti della sintesi del lagging-strand al telomero potrebbero avere un'importante funzione nell'allungamento mediato dalla telomerasi. Questo ruolo inibitorio della Pol1 sembra chiaramente connesso all'interazione di Cdc13 ed Est1 e di Stn1 con Pol12 (Subunità essenziale del complesso DNA polimerasi α /primasi) (Chandra *et al.*, 2001; Grossi *et al.*, 2004; Puglisi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Poiché né il legame di Cdc13 (Sabourin *et al.*, 2007; Bianchi e Shore 2007b) né quello di Stn1 (Puglisi *et al.*, 2008) sembrano essere influenzati dalla lunghezza della regione di TG, un effetto inibitorio, dipendente dalla lunghezza del telomero, potrebbe essere esercitato da Stn1 attraverso interazioni con Cdc13 e Pol12 a seguito di una modificazione della proteina stessa o di quelle ad essa associate dipendente dalla lunghezza del telomero (Li *et al.*, 2009). Alternativamente potrebbe essere che il complesso CST (Cdc13, Stn1, Ten1) eserciti una sorta di repressione di base sull'attività della telomerasi non modulato dalla lunghezza delle ripetizioni telomeriche. Uno studio recente ha evidenziato l'esistenza di uno sfasamento temporale tra la replicazione del leading-strand ed il lagging-strand al telomero di *Schizosaccharomyces pombe*, con il secondo considerevolmente in ritardo (Moser *et al.*, 2009). Studi su protozoi ciliati hanno mostrato l'esistenza di una associazione fisica tra la telomerasi ed il macchinario replicativo del lagging-strand (Ray *et al.*, 2002), unitamente alla presenza di omologhi di Stn1 in tutti gli eucarioti esaminati (Gao *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007), corrobora l'idea che il modello proposto in lievito possa avere una valenza molto più generale.

Il lavoro di Oza *et al.*, (2009) ha inaspettatamente rivelato che esiste un efficiente reclutamento del macchinario della telomerasi a DSB non telomerici. In

oltre sembrerebbe che con una certa frequenza, queste rotture vengano mascherate dalla formazione di telomeri *de novo* telomerasi dipendente (Stellwagen *et al.*, 2003). La quantità di Cdc13 e di Est2 presente a questi DSB risulta molto più elevata rispetto alla reale efficienza alla quale queste regioni di DNA rotte vengono riparate dall'azione della telomerasi. Presi insieme questi dati suggeriscono che deve esistere un potente meccanismo per limitare l'azione della telomerasi ai DSB, poiché potrebbe generare riarrangiamenti cromosomici importanti (Pennaneach *et al.*, 2006). Parte di questa inibizione è probabilmente fornita da Pif1, un elicasi che è in grado di rimuovere la telomerasi dal suo substrato sia *in vitro* che *in vivo* (Boulè *et al.*, 2005) ed è richiesta per reprimere l'accidentale formazione di telomeri a livello dei DSB (Myung *et al.*, 2001a).

RISPOSTA AL DANNO AL DNA INDOTTA DA DSBs INTRACROMOSOMALI

Quando si verifica una rottura al DNA questa deve essere prontamente riconosciuta come tale e dare origine all'attivazione dei meccanismi di riparo o ricombinazione. Il riparo dei DSB può avvenire attraverso la ricombinazione non omologa capace di legare due estremità cromosomiche prive di omologia nella regione di giunzione o attraverso la ricombinazione omologa passando per la formazione di DNA a singolo filamento al 3' (Krog e Symington 2004). Sia in lievito che nell'uomo la formazione accidentale di DSB innesca l'attivazione della via di segnalazione del danno al DNA, che come primo scopo ha quello di arrestare il ciclo cellulare e coordinare la progressione cellulare ed il riparo (Longhese *et al.* 2006). I protagonisti principali della risposta al danno al DNA appartengono ad una famiglia di proteine chinasi altamente conservate che includono in mammifero ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) e ATR (Ataxia Telangectasia and Rad3-related), Tel1 e Mec1 in *S. cerevisiae* e Tel1, Rad3 in *Saccharomyces pombe* (Longhese *et al.*, 2006). Mec1 e Rad3 sono più simili ad ATR, mentre Tel1 è più simile ad ATM. Sia Tel1 che ATM sono proteine in grado di legarsi al DNA attraverso l'interazione con il complesso MRX ed MRN rispettivamente (Falck *et al.*, 2005). La funzione di Mec1/ATR è quella di trasmettere ed amplificare il segnale di danno al DNA attraverso l'interazione con il complesso costituito da Ddc1-Rad17-Mec3 in *S. cerevisiae* e Rad9-Rad1-Hus1 in mammifero e *S. pombe* (Majka *et al.*, 2006). Numerose evidenze sperimentali inducono a ritenere che l'attivazione della cascata di segnalazione a seguito di DSB serva principalmente al reclutamento nel sito di danno del complesso MRX/MRN (Lisby *et al.*, 2004). Inoltre il riconoscimento del danno da parte di MRX/MRN determina il reclutamento di Tel1/ATM sul sito di DSB (Nakada *et al.*, 2003; You *et al.*, 2005). Poiché la segnalazione di Tel1/ATM aumenta

quando l'occupazione del sito di DSB da parte di MRX aumenta (Morales *et al.*, 2005; Clerici *et al.*, 2006), questo indica che il caricamento di MRX/MRN al sito di rottura determina l'attivazione dei checkpoint. Recenti evidenze sperimentali indicano che Tel1 è in grado di attivare la cascata dei checkpoint indipendentemente da Mec1, tuttavia la sua attività di segnalazione diventa evidente in presenza di DSB multipli. (Mantiero *et al.*, 2007). L'abilità di Tel1 di percepire e potenziare il segnale in presenza di DNA rotto è abolita se le regioni terminali del DSB sono soggette a degradazione esonucleolitica 5'-3' (Mantiero *et al.*, 2007). Questo suggerisce che Tel1/ATM e MRX/MRN sono reclutate alle estremità piatte o minimamente processate della regione di rottura e sono poi in grado, lavorando insieme, di propagare la segnalazione di DSB. Sia nell'uomo che in lievito i complessi MRN-ATM ed MRX-Tel1, una volta reclutati sul DSB, contribuiscono alla formazione di DNA a singolo filamento al 3' (Mantiero *et al.*, 2007) che rappresenta la struttura intermedia critica per il riconoscimento operato dal complesso Mec1-Ddc2 in lievito e ATR-ATRIP nell'uomo (Zou e Elledge, 2003). La formazione della regione a singolo filamento quindi, rappresenta il momento di transizione tra il controllo mediato da Tel1/ATM a quello dipendente da Mec1/ATR. Una volta che le perturbazioni a carico del DNA vengono percepite, la cascata del segnale viene propagata attraverso delle proteine chinasi evolutivamente molto conservate chiamate Rad53 e Chk1 in *S. cerevisiae* e Chk2 e Chk1 nell'uomo. E' importante aggiungere anche che l'attivazione di Rad53 e Chk1 non è governata semplicemente dalla loro interazione con Mec1 e Tel1 ma richiede un ulteriore passaggio. La proteina che agisce come primo adattatore nel mediare l'interazione tra Mec1 e Rad53 è Rad9 (Sweeney *et al.*, 2005) e successivamente fornisce anche il supporto per l'attivazione e l'autofosforilazione a Rad53 (Gilbert *et al.*, 2001).

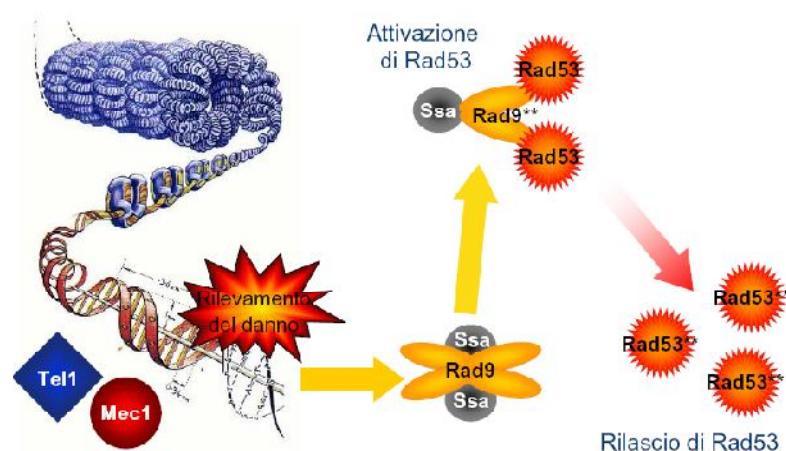


Fig.14: Rappresentazione schematica della cascata di segnalazione del danno al DNA mediata da Rad53. La via passa attraverso la fosforilazione di Rad9, che rappresenta il trasduttore del segnale, a sua volta fosforilato dai principali checkpoint per il controllo del danno al DNA Tel1 e Mec1.

I TELOMERI POSSONO TEMPORANEAMENTE ATTIVARE LA RISPOSTA DI DANNO AL DNA

E' ormai accertato che le estremità dei cromosomi naturali devono essere protette dall'attivazione di inappropriati meccanismi di riparo/ricombinazione e dall'azione dei rispettivi checkpoint. Sembra quindi paradossale che molte delle proteine coinvolte nella segnalazione del danno e del riparo del DNA partecipino anche alla regolazione della lunghezza dei telomeri. Questo fa ipotizzare che la differenza tra rotture al DNA e telomeri sia meno pronunciata di quanto si credesse in precedenza, suggerendo che possa anche esistere una limitata finestra temporale in cui i telomeri vengono percepiti come DSB. Poiché l'organizzazione strutturale e l'associazione di molte delle proteine con funzione di capping, può essere temporaneamente persa in seguito al passaggio della forza di replicazione e poiché i telomeri vanno incontro in tarda fase S/G2 ad un processo nucleolitico (Frank *et al.*, 2006; Vodenicharov e Wellinger 2006), potrebbe succedere che estremità cromosomiche integre vengano riconosciute come DNA rotto durante il processo di replicazione. E' stato recentemente dimostrato che telomeri di *S. cerevisiae* si comportano in maniera simile a DSB intracromosomali quando sono soggetti ad allungamento (Viscardi *et al.*, 2007). Infatti la presenza di uno o più telomeri corti causa l'attivazione di un checkpoint MRX-dipendente, evidenziando che i telomeri possono essere trattati esattamente come un DSB in una determinata finestra di tempo durante la loro replicazione. Il legame di MRX a telomeri corti è l'evento che segnala l'attivazione del checkpoint indipendentemente dall'allungamento del telomero stesso (Viscardi *et al.*, 2007).

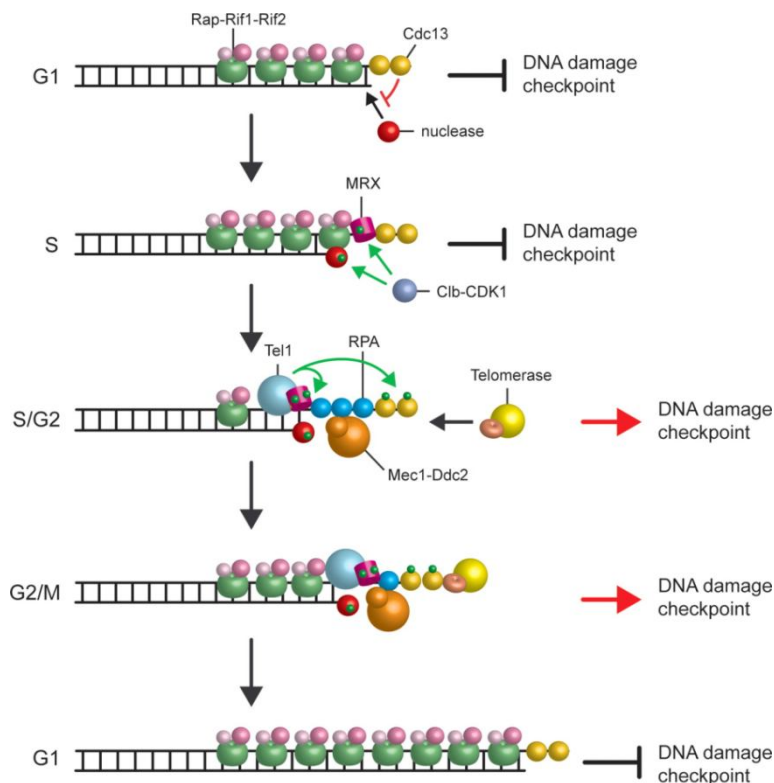


Fig.15 Rappresentazione del modello di segnalazione del danno al DNA in telomeri funzionanti. Durante la fase G1 i telomeri non sono suscettibili ad essere allungati dalla telomerasi e sono anche inaccessibili all'azione delle nucleasi. Dopo la replicazione del DNA in tarda fase S e durante la fase G2, i telomeri vengono processati (MRX) e la regione di DNA a singolo filamento viene legata dalle proteine RPA. Durante questo periodo i telomeri condividono molte proprietà con i DSB. I telomeri corti in questa fase possono attivare i checkpoint Mec1 e Tel1 promuovendo l'allungamento del telomero tramite la fosforilazione di Cdc13. L'allungamento del telomero incrementa la quantità di proteine legate al tratto TG e questo cambiamento blocca l'accesso di Mec1/Tel1 e della telomerasi. Le frecce verdi rappresentano eventi di fosforilazione.

Questi risultati implicano che soltanto quei telomeri che diventano suscettibili all'associazione del complesso MRX, e quindi disponibili ad essere allungati, possono essere riconosciuti come DSB dallo specifico complesso di controllo. Certamente il complesso MRX è associato ai telomeri nativi nella tarda fase S (Takata *et al.*, 2005), e solo telomeri con un corto tratto di sequenze TG vengono avidamente legate da MRX, così come dalla telomerasi (Negrini *et al.*, 2007), suggerendo che in condizioni normali solo i telomeri in fase S vengono potenzialmente riconosciuti come DSB dal macchinario di segnalazione dei checkpoint. Tuttavia la telomerasi in lievito agisce su telomeri corti all'interno di un unico ciclo cellulare ed il tasso di allungamento telomerico sembra essere limitato soltanto ad alcune paia di basi per generazione (Teixeira *et al.*, 2004).

Questa limitazione potrebbe servire a circoscrivere l'attivazione non programmata dei checkpoint durante la fase S.

La produzione di un segnale di attivazione dei checkpoint, in telomeri in fase S, sembra essere conservata anche nell'uomo (Verdun e Karlseder 2006). Da uno studio effettuato su fibroblasti umani, si è visto che la risposta al danno al DNA dipendente principalmente da ATR (MEC1 in *S. cerevisiae*) viene bloccata prima che la replicazione dei telomeri venga completata. Dopo la replicazione, i telomeri attraggono ATM (Tel1) ed il macchinario della ricombinazione omologa (Verdun e Karlseder 2006). Sia il reclutamento di ATR che di ATM seguono comunque la localizzazione di MRN. Poiché ATR riconosce DNA a singolo filamento prodotto a seguito dell'arresto e/o dallo stallo della forca di replicazione, mentre ATM si ritiene sia in grado di riconoscere DSB, questo suggerisce che esistono almeno due distinti segnali per il danno al DNA innescati dai telomeri durante e dopo la replicazione. E' da notare inoltre che alterazioni a carico del complesso MRN così come l'inibizione di ATM, determinano l'insorgenza di disfunzioni telomeriche, suggerendo che una risposta al danno al DNA localizzata ai telomeri dopo la replicazione è essenziale al fine di ristabilire l'integrità della regione cromosomica terminale (Verdun *et al.*, 2005). In fine, una volta che le proteine telomeriche si sono propriamente assemblate, queste potrebbero garantire l'inibizione del complesso MRN e la risposta dei checkpoint, in modo da generare una specifica identità telomerica.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander MK & Zakian VA. Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2)telomere in yeast. *EMBO J.* 2003, 22:1688-96.
2. Anderson DE, Trujillo KM, Sung P, Erickson HP. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem.* 2001, 76:37027-33.
3. Arnerić M, Lingner J. Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO Rep.* 2007, 8:1080-5.
4. Arnerić M, Lingner J. Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO Rep.* 2007, 11:1080-5.
5. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008, 88:557-79. Review.
6. Auriche C, Di Domenico EG, Ascenzioni F. Budding yeast with human telomeres: a puzzling structure. *Biochimie.* 2008, 90:108-15. Review.
7. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem.* 2006, 75:493-517. Review.
8. Bertuch AA, Lundblad V. EXO1 contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2004, 166:1651-9.
9. Bianchi A, Negrini S, Shore D. Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol Cell.* 2004, 16:139-46.
10. Bianchi A, Shore D. Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell.* 2007, 128:1051-62.
11. Bianchi A, Shore D. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev.* 2007, 21:1726-30.
12. Biessmann H, Carter SB, Mason JM. Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:1758-1761.
13. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol.* 1978, 120:33-53.
14. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997, 91:25-34.

15. Boulé JB, Vega LR, Zakian VA. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature*. 2005, 438:57-61.
16. Brevet V, Berthiau AS, Civitelli L, Donini P, Schramke V, Geli V, Ascenzioni F, Gilson E. The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. *EMBO J*. 2003, 22:1697-706.
17. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995, 14:4240-4248.
18. Bryan TM, Reddel RR. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer*. 1997, 33:767-73. Review
19. Carballo JA, Johnson AL, Sedgwick SG, Cha RS. Phosphorylation of the axial element protein Hop1 by Mec1/Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination. *Cell*. 2008, 132:758-70.
20. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*. 1998, 93:477-86.
21. Carroll KA, Ly H. Telomere dysfunction in human diseases: the long and short of it! *Int J Clin Exp Pathol*. 2009, 2:528-43.
22. Carson MJ, Hartwell L. CDC17: an essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell*. 1985, 42:249-57.
23. Cavalier-Smith T. Palindromic base sequences and replication of eukaryote chromosome ends. *Nature*. 1974, 250:467-70.
24. Cenci G. Drosophila cell cycle under arrest: uncapped telomeres plead guilty. *Cell Cycle*. 2009, 8:990-5.
25. Cesare AJ, Reddel RR. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev*. 2008, 29:99-108.
26. Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep*. 2006, 7:225-30.
27. Chan A, Boulé JB, Zakian VA. Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet*. 2008, 4:e1000236.
28. Chan CSM & Tye B-K. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* 1983, 33:563-573.
29. Chan SW, Chang J, Prescott J, Blackburn EH. Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol*. 2001, 11:1240-50.
30. Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev*. 2001, 15:404-14.

31. Chang M, Arneric M, Lingner J. Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2007, 21:2485-94.
32. Chen L, Trujillo K, Ramos W, Sung P, Tomkinson AE. Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell.* 2001, 8:1105-15.
33. Chiani F, Di Felice F, Camilloni G. SIR2 modifies histone H4-K16 acetylation and affects superhelicity in the ARS region of plasmid chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2006, 4:5426-37.
34. Ciapponi L, Cenci G, Ducau J, Flores C, Johnson-Schlitz D, Gorski MM, Engels WR, Gatti M. The *Drosophila* Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Curr Biol.* 2004, 14:136-6.
35. Clerici M, Mantiero D, Lucchini G, Longhese MP. The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J Biol Chem.* 2005, 280:38631-8.
36. Clerici M, Mantiero D, Lucchini G, Longhese MP. The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling. *EMBO Rep.* 2006, 7:212-8.
37. Cohn M & Edstrom JE. Telomere-associated repeats in *Chironomus* form discrete subfamilies generated by gene conversion. *J Mol Evol.* 1992, 35:114-122.
38. Cosgrove AJ, Nieduszynski CA, Donaldson AD. Ku complex controls the replication time of DNA in telomere regions. *Genes Dev.* 2002, 16:2485-90.
39. Craven RJ, Petes TD. Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1999, 152:1531-41.
40. D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, 3:317-27. Review.
41. De Lange T, Shiue L, Myers RM *et al.* Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10:518-527.
42. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genet.* 2000, 26:447-450.
43. Enomoto S, Glowczewski L, Berman J. MEC3, MEC1, and DDC2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2002, 13:2626-38.
44. Evans SK & Lundblad V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 1999, 286:117-120.

45. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 2005, 434:605-11.
46. Fisher TS, Taggart AK, Zakian VA. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol*. 2004, 11:1198-205.
47. Foster SS, Zubko MK, Guillard S, Lydall D. MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast *cdc13-1* mutants. *DNA Repair (Amst)*. 2006, 13;5:840-51.
48. Frank CJ, Hyde M, Greider CW. Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol Cell*. 2006 Nov 3;24(3):423-32.
49. Gao H, Cervantes RB, Mandell EK, Otero JH, Lundblad V. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol*. 2007, 14:208-14.
50. Garvik B, Carson M & Hartwell L. Single-strand DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol*. 1995, 15:6128-6138.
51. Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF. Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell*. 2001, 8:129-36.
52. Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H & Gasser SM. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 1996, 134:1349-1363.
53. Gottschling DE. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89:4062-5.
54. Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *EMBO J*. 2001, 20:6127-39.
55. Greider C. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem*. 1996, 65:337-365.
56. Greider CW & Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985, 43:405-413.
57. Greider CW & Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987, 51:887-898.
58. Grossi S, Puglisi A, Dmitriev PV, Lopes M, Shore D. Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev*. 2004, 18:992-1006.
59. Hanahan D, Weinberg RA. Retrospective: Judah Folkman (1933-2008). *Science*. 2008 319:1055.

60. Hardy CFJ, Sussel L & Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes & develop.* 1992, 6:801-814.
61. Hector RE, Shtofman RL, Ray A, Chen BR, Nyun T, Berkner KL, Runge KW. Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol Cell.* 2007, 27:851-8.
62. Henning KA, Moskowitz N, Ashlock MA, Pu PL, Humanizing the yeast telomerase template *Genetics* 1998, 95:5667-5671.
63. Hirano Y, Fukunaga K, Sugimoto K. Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol Cell.* 2009, 33:312-22.
64. Hogues H, Lavoie H, Sellam A, Mangos M, Roemer T, Purisima E, Nantel A, Whiteway M. Transcription factor substitution during the evolution of fungal ribosome regulation. *Mol Cell.* 2008, 29:552-62.
65. Ijpma AS, Greider CW. Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2003, 14:987-1001.
66. Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev.* 2008, 119:467-74.
67. Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Stewart SA, Hahn WC, Guarente L. The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog SGS1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J.* 2001, 20:905-913.
68. Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, Ellenberger T, Sung P. DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature.* 2003, 423:305-9.
69. Krogh BO, Symington LS. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* 2004, 38:233-71.
70. Kyrion G, Boakye K & Lustig A. C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12:5159-5173.
71. Larrivée M, LeBel C, Wellinger RJ. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev.* 2004, 18):1391-6.
72. Larrivée M, Wellinger RJ. Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. *Nat Cell Biol.* 2006, 8:741-7.
73. Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics.* 1996, 144:1399-412.
74. Levy DL, Blackburn EH. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length *Mol Cell Biol.* 2004, 24:10857-67.

75. Li B, Lustig AJ. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1996, 10:1310-26.
76. Li S, Makovets S, Matsuguchi T, Blethrow JD, Shokat KM, Blackburn EH. Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression. *Cell.* 2009, 136:50-61.
77. Lin JJ & Zakian VA. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG₁₋₃ telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:13760-13765.
78. Lingner J, Cech TR, Hughes TR & Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for *in vitro* yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:11190-11195.
79. Lingner J, Cech TR. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93:10712-7.
80. Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science.* 1995, 269:1533-4.
81. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell.* 2004, 118:699-713.
82. Liti G & Louis EJ. NEJ1 prevents NHEJ-dependent telomere fusions in yeast without telomerase. *Mol Cell.* 2003, 11:1373-8.
83. Longhese MP, Clerici M, Lucchini G. The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 2003, 532:41-58. Review.
84. Lundblad V & Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. *Cell* 1993, 73:347-360.
85. Lundblad V & Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 1989, 57:633-43.
86. Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene.* 2002, 21:522-31. Review.
87. Majka J, Niedziela-Majka A, Burgers PM. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell.* 2006, 24:891-901
88. Mantiero D, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep.* 2007, 8:380-7.

89. Marcand S, Brevet V, Gilson E. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J.* 1999, 18:3509-19.
90. Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science.* 1997, 275:986-90.
91. Marcand S, Pardo B, Gratias A, Cahun S, Callebaut I. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev.* 2008, 22:1153-8.
92. Maringele L, Lydall D. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev.* 2002, 16:1919-33.
93. Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M & Gasser SM. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 1999, 97:621-633.
94. Martín V, Du LL, Rozenzhak S, Russell P. Protection of telomeres by a conserved Stn1-Ten1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104:14038-43.
95. Matsuo T, Shimose S, Kubo T, Fujimori J, Yasunaga Y, Ochi M. Telomeres and telomerase in sarcomas. *Anticancer Res.* 2009, 29:3833-6. Review.
96. McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941, 26:234-282.
97. McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet.* 2000, 34:331-358.
98. Michelson RJ, Rosenstein S, Weinert T. A telomeric repeat sequence adjacent to a DNA double-stranded break produces an antieckpoint. *Genes Dev.* 2005, 19:2546-59.
99. Miller KM, Rog O, Cooper JP. Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature.* 2006, 440:824-8.
100. Mills KD, Sinclair DA & Guarente L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 1999, 97:609-620.
101. Morales M, Theunissen JW, Kim CF, Kitagawa R, Kastan MB, Petrini JH. The Rad50S allele promotes ATM-dependent DNA damage responses and suppresses ATM deficiency: implications for the Mre11 complex as a DNA damage sensor. *Genes Dev.* 2005, 19:3043-54.
102. Moreau S, Ferguson JR, Symington LS. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol.* 1999, 19:556-66.

103. Moretti P, Freeman K, Coodly L, Shore D. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* 1994, 8:2257-69.
104. Mortensen UH, Bendixen C, Sunjevaric I, Rothstein R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93:10729-34.
105. Moser BA, Subramanian L, Chang YT, Noguchi C, Noguchi E, Nakamura TM. Differential arrival of leading and lagging strand DNA polymerases at fission yeast telomeres. *EMBO J.* 2009, 28:810-20.
106. Muller HJ. Induced mutation in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1941, 9:151-167.
107. Murray AW, Schultes NP & Szostak JW. Chromosome length controls mitotic chromosome segregations in yeast. *Cell* 1986, 45:529-536.
108. Myung K, Chen C, Kolodner RD. Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2001, 6841:1073-6.
109. Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev.* 2003, 17:1957-62.
110. Nakada D, Shimomura T, Matsumoto K, Sugimoto K. The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31:1715-24.
111. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997, 277:955-9.
112. Negrini S, Ribaud V, Bianchi A, Shore D. DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes Dev.* 2007, 21:292-302.
113. Nielsen L, Edstrom JE. Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Mol Cell Biol.* 1993, 13:1583-9.
114. Nosek J, Rycovska A, Makhov AM, Griffith JD, Tomaska L. Amplification of telomeric arrays via rolling-circle mechanism. *J Biol Chem.* 2005, 280:10840-5.
115. Nugent CI, Hughes TR, Lue NF & Lundblad V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 1996, 274:249-252.

116. Olovnikov AM. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971, 201:1496-9. Russian.
117. Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev*. 2009;23:912-27.
118. Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell*. 1993, 75:543-55.
119. Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2006, 59:1357-68. Review.
120. Pich U & Schubert I. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Genetics* 1992, 131:559-574.
121. Puglisi A, Bianchi A, Lemmens L, Damay P, Shore D. Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J*. 2008, 27:2328-39.
122. Puglisi A, Bianchi A, Lemmens L, Damay P, Shore D. Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J*. 2008, 27:2328-39.
123. Ranatunga W, Jackson D, Flowers II RA 2nd, Borgstahl GE. Human RAD52 protein has extreme thermal stability. *Biochemistry*. 2001, 40:8557-62.
124. Ray A, Runge KW. The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Mol Cell Biol*. 1999, 19:31-45.
125. Ray S, Karamysheva Z, Wang L, Shippen DE, Price CM. Interactions between telomerase and primase physically link the telomere and chromosome replication machinery. *Mol Cell Biol*. 2002, 22:5859-68.
126. Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1987, 116:9-22.
127. Ritchie KB, Petes TD. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics*. 2000 May;155(1):475-9.
128. Roth CW, Kobeski F, Walter MF, Biessmann H. Chromosome and elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol. Cell. Biol*. 1997, 17:5176-5183.
129. Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA. Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*. 2007, 27:550-61.

130. Sabourin M, Zakian VA. ATM-like kinases and regulation of telomerase: lessons from yeast and mammals. *Trends Cell Biol.* 2008, 18:337-46 Review.
131. Saiga H & Edstrom JE. Long tandem arrays of complex repeat units in *Chironomus* telomeres. *EMBO J.* 1985, 4:799-804.
132. Sharples GJ & Leach DRF. Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of *Escherichia coli* and the Rad50 and Mre11 (Rad32) recombination and repair proteins of yeast. *Mol. Microbiol.* 1995, 17:1215-1217.
133. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997, 33:787-91.
134. Shinohara A, Shinohara M, Ohta T, Matsuda S, Ogawa T. Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells.* 1998, 3:145-56.
135. Shore D. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet.* 1994, 10:408-12. Review.
136. Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science.* 1994, 266:404-9.
137. Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97:6658-63.
138. Song B, Sung P. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem.* 2000, 275:15895-904.
139. Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 2003, 17:2384-95.
140. Stevenson JB, Gottschling DE. Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev.* 1999, 13:146-51.
141. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:531-57. Review.
142. Strahl-Bolsinger S, Hecht A, Luo K & Grunstein M. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes & develop.* 1997, 11:83-93.
143. Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RJ, Johnson AD, Moazed D. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell.* 1999, 97:245-56.
144. Sussel L & Shore D. Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of

- viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:7749-7753.
145. Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol.* 2005, 15:1364-75.
 146. Szostak JW & Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 1982, 29:245-255.
 147. Taggart AK, Teng SC, Zakian VA. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science.* 2002, 297:1023-6.
 148. Takata H, Tanaka Y, Matsuura A. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 2005, 17:573-83.
 149. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell.* 2004, 117:323-35.
 150. Teng SC & Zakian VA. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19:8083-8093.
 151. Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell.* 2000, 6:947-52.
 152. Teng SC, Chen YY, Su YN, Chou PC, Chiang YC, Tseng SF, Wu KJ. Direct activation of HSP90A transcription by c-Myc contributes to c-Myc-induced transformation. *J Biol Chem.* 2004, 279:14649-55.
 153. Theimer CA, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol.* 2006, 16:307-18. Review.
 154. Tomaska L, McEachern MJ, Nosek J. Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles. *FEBS Lett.* 2004, 567:142-6.
 155. Trujillo KM, Roh DH, Chen L, Van Komen S, Tomkinson A, Sung P. Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J Biol Chem.* 2003, 278:48957-64.
 156. Tseng SF, Lin JJ, Teng SC. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 2006,34:6327-36.
 157. Tsukamoto Y, Kato J & Ikeda H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 1997, 388:900-903.
 158. Tsukamoto Y, Taggart AK, Zakian VA. The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase- mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol.* 2001, 11:1328-35.

159. Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J, Ogawa H, Ogawa T. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell*. 1998, 95:705-16.
160. Verdun RE, Karlseder J. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*. 2006, 127:709-20.
161. Viscardi V, Bonetti D, Cartagena-Lirola H, Lucchini G, Longhese MP. MRX-dependent DNA damage response to short telomeres. *Mol Biol Cell*. 2007, 18:3047-58.
162. Vodenicharov MD, Wellinger RJ. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol Cell*. 2006, 24:127-37.
163. Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol*. 2007, 85:509-20. Review.
164. Wotton D & Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & develop*. 1997, 11:748-760.
165. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev*. 1997, 11:2801-9.
166. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol*. 2005, 25:5363-79.
167. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 2003, 300:1542-8.
168. Zubko MK, Guillard S, Lydall D. Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics*. 2004, 168:103-15.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Biochimie xx (2007) 1–8

BIOCHIMIE

www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Budding yeast with human telomeres: A puzzling structure

Cristina Auriche, Enea Gino Di Domenico, Fiorentina Ascenzioni*

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italy

Received 18 June 2007; accepted 13 September 2007

Abstract

Telomeres share some common features among eukaryotes, with few exceptions such as the fruit fly *Drosophila* that uses transposons as telomeres, they consist of G-rich repetitive DNA that is elongated by telomerase and/or alternative pathways depending on recombination. Telomere structure comprises both cis-acting satellite DNA (telomeric DNA) and proteins that interact directly and/or indirectly with the underlying DNA. Telomeric DNAs are surprisingly conserved among the vertebrates and very similar in most eukaryotes, but present some differences in yeast such as *Saccharomyces cerevisiae*. The telomeric proteins are more variable although the basic mechanisms which control telomere lengthening and capping are very similar, in fact orthologues of the yeast telomeric proteins, which have been studied first, have been identified in other organisms. Here we describe the structure of human telomeres in budding yeast as compared to canonical yeast and mammalian telomeres taking into consideration the more recent findings highlighting the mechanisms that are responsible for chromosome end protection and lengthening, and the role of chromatin organization in telomere function. This yeast represents a model for the study of mammalian telomeres that could be reconstituted step-by-step in all their components, moreover it could be useful for the assembly of mammalian artificial chromosome.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Budding yeast; Telomeric chromatin; Telomerase; Mammalian telomeres; Humanized telomeres

1. Introduction

The yeast *S. cerevisiae* has been used for many years as a model to isolate and study telomeres from different organisms including humans, more recently budding yeasts with human telomeres have been engineered. In fact, although telomeres were first isolated in ciliates [1], telomeres from different sources were successfully isolated in yeast by means of a functional assay based on the cloning of fragments that allow replication of a linear DNA molecule [2]; moreover by changing the telomerase telomeric template telomeres with variant telomeric repeats have been produced [3]. This was made possible by the ability of the telomerase, the reverse transcriptase that elongate telomeres, to tolerate mutations in the telomeric template and to add telomeric repeats to a number of different telomeric substrates ranging from protozoa to vertebrate. The

sequencing of telomeric DNA from different organisms showed some common features: telomeres consist of a string of G-rich repeats of variable length, from few nucleotides in ciliates to many kb in mammals; the G-rich strand is orientated 5'-3' toward the end of the molecule and terminates with a 3' single-stranded overhang. But telomeres are not simply DNA, they are organized in a complex nucleoprotein structure in which both the DNA and the protein components are essential for proper functioning. In fact, telomere dysfunctions can be ascribed either to mutations in the telomeric sequence repeats [3], or to mutations in telomeric proteins as demonstrated by the uncontrolled telomere lengthening in rap1p^{ΔC} (C-term deletion) mutants [4]. Overall the structure of telomeres in yeast and mammals is conserved (Fig. 1) and can be divided in two subdomains: (I) a domain consisting of double-stranded telomeric DNA and telomere-repeat-binding proteins which recruit additional proteins; and (II) a distal G-strand overhang, specifically bound by ssDNA-binding proteins, that participate to telomere capping; it may adopt particular conformations, such as t-loops or G-quadruplexes. In the t-loop formation

* Corresponding author. Tel.: +39 06 4991 7577.

E-mail address: fiorentina.ascenzioni@uniroma1.it (F. Ascenzioni).

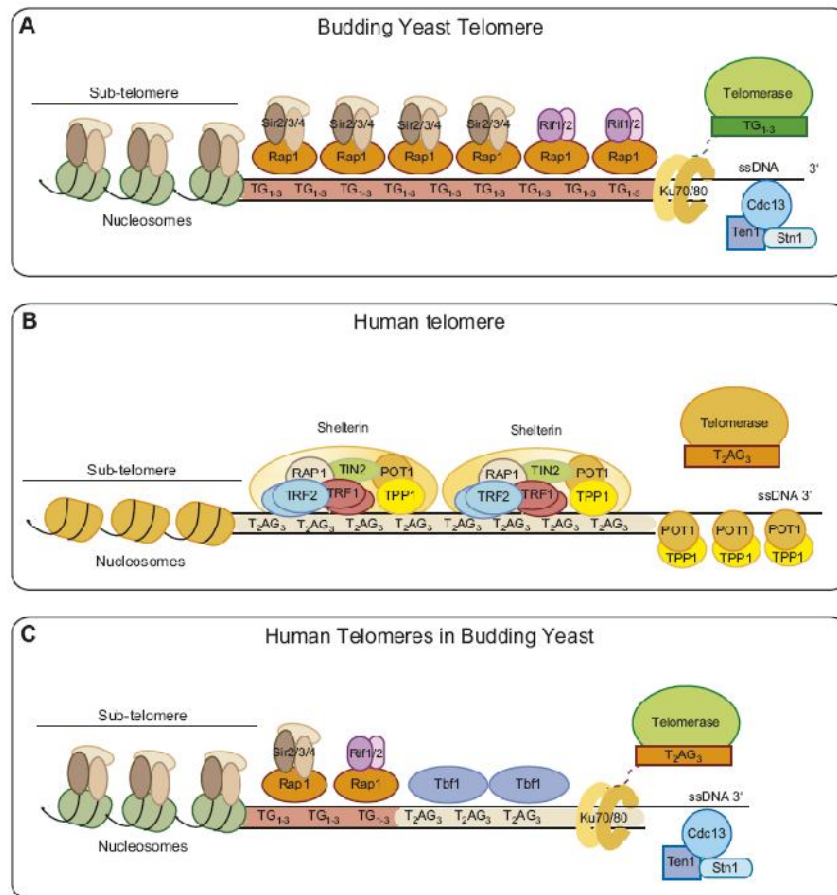


Fig. 1. Structure of telomeres in yeast and human. (A) Budding yeast telomeres and sub-telomeres. Rap1 (Repressor Activator Protein 1) binds the double-stranded telomeric sequences and recruits the Sir2, Sir3 and Sir4 proteins (Silent Information Regulator Protein) that spread over the subtelomeric region; it also binds Rif1 and Rif2 (Rap1 Interacting Factors) which regulate telomere length. The heterodimeric Ku complex (Ku70/80) interacts with the terminal part of the telomere and, depending on the cell cycle, with the ku loop of the telomerase RNA; Cdc13 (Cell Division Control Protein 13) and the Cdc13 interacting factors Ten1 and Stn1 bind to the single strand overhang. (B) Human telomeres. Double-stranded telomeric DNA are bound by Shelterin complex which is constituted by six subunits: TRF1 and TRF2 which bind directly the double-stranded telomeric DNA through the myb-like domain, POT1–TPP1 bind single-stranded DNA; hRap1 binds the telomere by interacting with TRF1 and TRF2; TIN2 tethers POT1–TPP1 to TRF1 and TRF2. Human telomeric chromatin is nucleosome-based but the interaction between nucleosomes and shelterin is at the present unknown. (C) Human telomere in budding yeast. Mixed yeast-human telomeres are produced by the human RNA template telomerase that adds human-like T₂AG₃ repeats to yeast canonical telomeres. Binding of Rap1/Sir and Rap1/Rif complexes is impaired by the reduced amounts of yeast telomeric repeats that remain confined in the internal yeast core region. The sub-telomeric protein Tbf1, which binds T₂AG₃, moved to the terminal part of the telomeres where it may compensate for Rap1 lost. Cdc13 and the interaction Stn1 and Ten1 bind to the G-tail as in the canonical yeast telomere. The T₂AG₃-only telomere is the same as the mixed telomere except for the absence of the internal TG_{1–3} core.

the telomere folds back on itself forming a large telomere loop (t-loop) and the 3' overhang invades the adjacent duplex telomeric repeat, forming the D-loop [5]. The G-rich 3' overhang can also form a variety of quadruplex structures based on four Hoogsteen-paired coplanar guanines; these structures can be assembled in either intramolecular or intermolecular configurations, which has been proposed to participate to telomere capping and to mediate chromosome alignment during meiotic prophase I respectively (reviewed in Ref. [6]). Adjacent to telomere a subtelomeric domain consisting of blocks of recent genomic duplications is thought to function as a chromatin

insulator that blocks heterochromatin spreading along the chromosome arms (reviewed in Ref. [7]).

2. Yeast telomere structure

Yeast telomeres have the unique feature of being composed of heterogeneous repeats abbreviated as TG_{1–3}, 250–400 bp long and terminating with a 3' short (12–14 nt) single-stranded G-overhang that is longer (50–100 nt) in late S-phase (Fig. 1A) [8]. The double-stranded part of the telomere is bound by Rap1 (repressor/activator-site binding protein)

through its Myb-like domain, which in turn causes nucleation of a protein complex by recruiting, through a C-terminal domain, the Rap1-interacting factors Rif1 and Rif2. These proteins act as negative regulators of telomere length as demonstrated by telomerase-dependent telomere elongation in *rif1* and *rif2* deletion mutants [9,10]. It has been recently demonstrated that *rif1* and *rif2* mutants show an increased frequency of telomerase-mediated telomere elongation suggesting that they downregulate the frequency of telomere elongation [11]. A human orthologue of Rif1 (hRif1) has been isolated and demonstrated to translocate to aberrant human telomeres moreover, when hRif1 was over-expressed in *S. cerevisiae* strains it caused significant telomere elongation suggesting a possible role in telomere maintenance [12]. The Rap1 C-terminal domain also recruits the silent information regulator proteins Sir2, Sir3 and Sir4, as suggested by two-hybrid assay and immunofluorescent microscopy which showed colocalization of the Sir proteins and Rap1 at telomeric foci [13,14]. The Sir complex spreads to nearby nucleosome-based subtelomeric chromatin by binding of the Sir3 and Sir4 to hypoacetylated amino terminal tails of histones H3 and H4 [15]. The Sir complex is mainly involved in transcriptional silencing at telomeres (reviewed in Ref. [16]) although mutations of Sir3 and Sir4 genes results in a slight decrease of telomere length [13].

A subset of telomeric proteins are confined to the single-stranded overhang which has a dual role: (i) protection of the chromosomal ends ("capping") from nuclease activities, such as those involved in the processing of DSB (double strand break); and (ii) making them accessible to telomerase activity [17]. The *S. cerevisiae* CDC13, which is an essential gene, is involved in both functions as demonstrated by temperature sensitive *cdc13-1* mutants which, at restrict temperature, accumulate ssDNA at telomeres, arrest the cell cycle and eventually die [17]; this phenotype is suppressed by increased dosage of STN1 and suppression is enhanced by TEN1 [18]. CDC13 encodes for a single-stranded TG1–3 binding protein which has been shown to interact with Est1, through a 15 kDa recruitment domain [19], this interaction is essential to deliver the catalytic core of telomerase to telomeres [20]. Cdc13 interacts also with Stn1 and Ten1 [18,21] and this interaction is essential for protection of chromosomal ends as demonstrated by temperature-sensitive *ten1* mutants that accumulate long ss-DNA tail and arrest at G(2)/M via activation of a Rad9-dependent DNA damage checkpoint [18]; additionally, it has been proposed a role in the synthesis of the C-rich strand by recruiting polymerase- α at telomeres [22]. But telomere stability and cell viability are not absolutely dependent by Cdc13 as recently demonstrated by the finding that *cdc13* deletion mutants can survive with telomeres elongated by the recombination-dependent pathways [23]. Interestingly these mutants showed loss of DNA-damage checkpoint function and increased sensitivity to DNA-damaging agents suggesting that *cdc13*-unprotected ends may activate DNA damage checkpoints which in turn lead to cell cycle arrest. Very recent experimental evidences highlight the existence of diverse telomere capping mechanisms, in addition to Cdc13, suggesting that telomere capping is accomplished by multiple pathways

more plastic than previously appreciated. It has been shown that Rad50, and thus the MRX complex, contribute to capping by inhibiting accumulation of ssDNA [24]; a truncated form of Stn1 (Stn1–186) and Ten1 were demonstrated to bypass the essential role of Cdc13 through interaction with Pol12, a polymerase α -primase regulatory subunit, by a mechanism that is coupled to conventional DNA replication resembling an archaic mechanism of end protection which uses replication [25]; finally stabilization of uncapped chromosomal ends was obtained by attenuation of nuclease activity and inactivation of DNA damage checkpoint pathways, as demonstrated by rescue of viability at restricted temperature of *cdc13 Δ exo1 Δ rad9 Δ* triple mutants [26].

3. Mammalian telomere structure

Mammalian and vertebrate telomeres consist of TTAGGG repeats having the same orientation as in yeast and terminating with a long G-tail (50–300 nt) that is present throughout the cell cycle (Fig. 1B). They are bound by a multiprotein complex, named shelterin, that contains six proteins that bind specifically to the double-stranded and single stranded TTAGGG repeats [27]. Mass spectrometry analysis of shelterin-associated factors failed to reveal additional proteins suggesting that the complex which forms mammalian telomeres is almost complete [28]. It contains the telomere binding factors TRF1 and TRF2, that bind double-stranded TTAGGG repeats through the Myb-like domain as dimers; hRap1 that, unlike its yeast counterpart, binds the telomere through interaction with TRF1 and TRF2; TIN2 (TRF1 interacting nuclear factors 2); finally the TIN2 interacting factors POT1 and TPP1. Although the stoichiometry of the shelterin subunits and their role in the complex have not been fully elucidated, experimental evidences suggests that TIN2 plays a key role in the complex by recruiting TPP1/POT1 to TRF1 and TRF2; moreover, it is also involved in the stabilization of TRF2 at the telomeres.

Shelterin is implicated in a number of activities such as the generation of t-loops, telomerase recruitment and formation and maintenance of the 3' overhang; it is also implicated in the activation of the DNA damage pathways by dysfunctional telomeres as demonstrated by activation of the ATM kinase pathway when TRF2 is inhibited by a dominant negative allele (TRF2 ^{Δ BM}) [29]. Shelterin complex has a DNA remodelling activity in vitro to which participates both TRF2 and TRF1: TRF2 has been demonstrated to remodel artificial telomeres into loops; TRF1 can loop, bend and pair telomeric arrays, TIN2 can affect TRF1 activity. Telomere remodelling could lead to formation of the t-loops which has been hypothesized to protect the 3' overhang and to regulate telomerase recruitment. Shelterin is also involved in the maintenance of the 3' overhang as demonstrated by inhibition of either TRF2 or POT1 which caused a significant length reduction of the G-tail due to ERCC1/XPF endonuclease activity. How the 3' tail is generated is still an open question, the finding that almost all telomeres end with the same sequence at the 5' end, suggests that 3' tails are generated by controlled 5' end resection [30]. Control of the telomere length is also accomplished

by shelterin complex: it requires POT1 and the POT1 interacting protein TPP1, which bind the single strand telomeric DNA and inhibit telomerase recruitment; their involvement in the telomere end protection has also been proposed [31,32]. Other factors are present at telomeres and play a role in telomere metabolism, such as TANK1 and TANK2 poly(ADP)-ribosylases, that interact with TRF1 [33].

4. Budding yeast with human telomeres

In the previous sections we have summarized the structures of yeast and mammalian telomeres taking into consideration the yeast *S. cerevisiae*, mouse and human as model organisms. Just by simply looking at the schematic representation of the yeast and mammalian telomere structures reported in Fig. 1A,B, it is evident that a number of differences distinguish telomeres starting from the underlying DNA sequences to the protein component of the telosome, although globally the two structures are very similar and the proteins underlying this structure have similar functions. Consistent with the finding that mutations in the telomeric template of the yeast telomerase RNA component led to synthesis of mutated telomeric repeats and that heterologous telomeric seeds can be efficiently converted to de novo telomeres in vivo, it was hypothesized that functional human telomeres could be obtained in yeast simply by reprogramming the telomerase enzyme. And in fact this was the case, since yeast cells harbouring the *tlc1*-human (*tlc1*-h) allele in which the yeast telomeric template has been modified to encode the vertebrate TTAGGG repeats, synthesize T2AG3 telomeres in vivo [34]. It was shown that yeast cells can survive with apparently fully functional hybrid yeast-human telomeres for many generations, up to 2500, with yeast telomeric repeats being progressively substituted by the T2AG3 human repeats, but maintaining an internal core of yeast repeats 30–50 bp long (mixed yeast-human telomere), probably fixed by replication through conventional DNA polymerase ([35], Di Domenico et al., unpublished results); interestingly we have found that the yeast telomeric core is shorter in *tel1* mutants [Di Domenico et al., unpublished results] suggesting that either the telomere turn over is faster and/or it is a consequence of activation of a telomere length regulating mechanism that takes into account both T2AG3 and TG1–3 repeats. The latter hypothesis being in agreement with the finding that T2AG3 repeats adjacent to a yeast telomere seed are properly taken into account for telomere length regulation in *tel1* deletion mutants [36].

By using homologous recombination the VII-L telomere of a *tlc1*-h strain was substituted with a fragment containing a marker (URA3) and a stretch of 10 T2AG3 repeats as a seed, terminal restriction fragment analysis and subsequent sequencing showed that a solo-vertebrate telomere (T2AG3-only telomere) was successfully assembled by in vivo addition of T2AG3 repeats. Telomere length analysis showed that the T2AG3-only telomere was about 100 bp shorter and more heterogeneous in size with respect to that obtained in otherwise isogenic *TLC1* strain (Ura-telomere), but length and heterogeneity were maintained over 800 generations [36], moreover

cell viability and Rad52-independent growth demonstrates that this telomere is properly maintained by telomerase in yeast cells [36,37]. Proper functioning of the T2AG3-only telomere was also demonstrated by analysis of the chromosome loss rate in a disomic strain for chromosome VII which showed no difference in the chromosome loss rate of the two chromosomes one of which contained the T2AG3-only telomere [37].

By ChIP it was shown that the T2AG3-only telomere is almost free of Rap1, confirming the telomere length data, and it is bound by the subtelomeric Tbf1, protein which has affinity for T2AG3 repeats; additionally Ku80p was shown to bind the T2AG3 telomere (Fig. 1C) [36,37]. Apparently yeast, mixed yeast-human, or T2AG3-only telomeres make no difference for the cells, this phenomenon is surprising since telomere functions cannot be attributed only to its sequence but mainly to the protein components that orchestrate the multiple activities of this chromosomal element. These data suggest that human-like telomeres possess at least the minimum set of telomere-associated activities that guarantee long term cell viability, these activities are sequence-independent and do not require the Rap1/Rif complex. It may be that some other telomere-associated activities, such as proper discrimination of telomere and DSB, checkpoints activation, adoption of secondary structures (t-loop, G-quadruplexes) are affected in yeast cells with human telomere. It would be interesting to analyze telomere dysfunctions other than telomere length and cells viability, such as telomere fusion, gross chromosomal rearrangements and DNA damage checkpoint activation. Nonetheless it seems that telomeres, at least in yeast, are a plastic structure that have evolved multiple regulatory mechanisms so as to be efficient with a wide range of repeated sequences.

5. Epigenetic modification of telomeric chromatin

That telomeric chromatin has some distinct features of heterochromatin is known since its ability to silence nearby genes [38–41], a phenomenon known as TPE (telomere position effect) was described. Silent chromatin assembling is similar in a number of biological systems and include two steps: sequence-specific recruitment of silencing proteins at silencing initiation regions; sequence non-specific spreading over large chromosomal region which occurs by interaction between one or more silencing factor and the conserved amino termini of histones H3 and H4 (reviewed in Ref. [42]). In budding yeast there is a transition between the subtelomeric region organized in canonical nucleosome-based chromatin and the telomere which is bound by Rap1/Rif1–2 complex and Sir proteins moreover the main feature of telomeric chromatin, which includes the nucleosome-based subtelomeric elements, is the lack of histone acetylation and methylation which is due, at least in part, to Sir2 NAD-dependent deacetylase activity and possibly to Jhd2p demethylase as suggested by a subtle enhancement of telomeric silencing in *jhd2*-deleted strains [43]. At yeast telomeres Sir2, Sir3 and Sir4 are recruited by yKu70/80 and Rap1, the spreading step requires deacetylation

of histone H4 K16 by Sir2 NAD-dependent deacetylase activity and synthesis of AAR (O-acetyl-ADP-ribose) which favour binding of Sir3 and Sir4 to hypoacetylated histone tails [44]; it has also been shown that the SIR complex can be recruited at telomeres via specific Sir4/Rap1 interaction independently from Sir2, Sir3, yKu70/80 and the histone H4 tail [14,45].

The higher-order level of chromatin organization established by Rap1/Sir and Sir/Sir interactions has been suggested to mediate folding-back of telomeres on the subtelomeric region and anchoring at the Sir-rich foci in the nuclear periphery [46,47]. That telomeric chromatin is involved in telomere maintenance is also supported by two recent papers demonstrating that in the absence of Tel1, when a Rap1-independent counting mechanism is responsible of telomere length regulation, subtelomeric transcriptional insulators Tbf1 and Reb1 inhibit telomere lengthening and antagonize telomere anchoring at the nuclear periphery [48,49].

Unlike yeast, mammalian telomeres and subtelomeres are assembled in nucleosome-based chromatin although nucleosome spacing is altered as compared to non-telomeric DNA, and present distinct epigenetic modifications similar to those found in pericentromeric chromatin. Accordingly trimethylation of H3K9 and H4K20 [50,51] as well as low levels of histone H3 and H4 acetylation [52] have recently been identified in mammalian telomeric and subtelomeric domains. The mechanism that regulates chromatin at mammalian telomeres remains to be discovered: shelterin may be involved, as suggested by the observation that TPE is reversed by overexpression of TRF2, whereas it is enhanced in overelongated telomeres; DNA methylation, an important chromatin remodelling factor in mammals, may also be involved, as suggested by the finding that decreased DNA methylation at telomeres correlates with increased telomere length and increased homologous recombination at telomeres [53]; short telomeres lead to modification of the telomeric chromatin by increasing the level of histone H3 and H4 acetylation, decreasing histone methylation and increasing DNA methylation at subtelomeric domains, marking the subtelomeric and telomeric domains as open chromatin [52]. These data suggest that changes in the epigenetic status of telomeric chromatin may either regulate the preferential elongation of short telomeres by telomerase and activate the ALT (alternative lengthening of telomeres) mechanism of elongation when telomerase is inactive (reviewed in Ref. [54]).

6. Telomere maintenance and length homeostasis

The telomeres are maintained by two lengthening pathways, one that is telomerase-dependent and the other, used mainly by proliferating telomerase-minus cells, based on recombination; these mechanisms are mutually exclusive although activation of both has been documented in immortalized human cells. A third mechanism (PAL) has been described in telomerase- and recombination defective yeast [55].

Telomerase-mediated telomere lengthening consists of a 3' end extension of the chromosome by reverse transcription of the RNA template tightly associated to the telomerase which

occurs during late S phase. This restriction may be achieved through cell cycle-restricted activation of telomerase and cell cycle-dependent changes in telomere structure; moreover it requires mechanisms to measure telomere length in cis so that to preferentially promote elongation of short telomere (reviewed in Ref. [56]). Accordingly, it was demonstrated that telomere elongation is a stochastic process that does not involve all the telomeres in every cell cycle, but that shorter telomeres have a higher probability to be elongated, although the number of added nucleotides does not seem to correlate with telomere length [11]; moreover telomere length homeostasis depend on telomerase concentration [57]. This finding led to the postulation of a three states model for telomere homeostasis: 1, non-extendible telomeres (long); 2, extendible telomeres (short); 3, extending telomeres. The equilibrium between states 1 and 2 is regulated by telomere length, while the one between states 2 and 3 by telomerase concentration [57].

The differential processing of short and long telomeres in yeast has recently been investigated by Negri and colleagues [58] who demonstrated that short telomeric arrays became avidly bound by Cdc13 and Mre11, the latter being involved in resection of the 5' ends, as well as by Rpa1 (alias Rfa1, subunit of the heterotrimeric Replication Protein A) and Mec1 involved in the induction of a DNA damage checkpoint response; in contrast long TG1–3 array are only poorly bound by Mre11 and Cdc13 and are also refractory to Rpa1 and Mec1 binding. This differential processing requires the Rap1 C terminal domain but not Rif1/Rif2 and Cdc13 suggesting that differential elongation of short and long telomeres may be controlled at a step upstream the Cdc13-mediated telomerase recruitment, namely the resection step that generates the single-stranded Cdc13-binding site. The same step may be crucial to elicit a checkpoint response when telomeres are short.

In human cells there isn't a direct proof of the correlation between the telomere length and extendible status of the telomere but a number of indirect evidences, such as the t-loop structure which may represent the non-extendible status, and the activity of POT1 which inhibits telomerase, suggest that the model for telomere length regulation is applicable. Accordingly, longer telomeres allow the presence of more shelterin and higher amount of POT1–TPP1 at the 3' overhangs blocking telomerase recruitment [56,59]; It has been hypothesized that the loading of POT1–TPP1 on the overhang of short telomeres is reduced due to the diminished amount of shelterin, thus leading to increased probability of telomere elongation by telomerase [31].

The mechanisms that are involved in telomere length measurement have been extensively studied in budding yeast. Rap1, which is the major component of the yeast telomeric chromatin, participates to telomere length control by establishing a negative feedback loop that takes into account the overall number of Rap1 molecules bound at telomeres: targeting additional Rap1 C domain, via heterologous DNA binding domain, at telomeres causes telomere shortening roughly proportional to the number of targeted molecules [60]; telomeric repeats inserted adjacent to a telomere seed, even miss-oriented

contribute to the total length of telomere [60,61]; measurements of reelongation kinetics of an artificially truncated telomeres demonstrated that short telomeres progressively return to equilibrium [62]; mutations in the template telomerase RNA moiety in *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* that affect Rap1 binding cause uncontrolled telomere elongation [63,64]. Interestingly alternative Rap1-independent mechanism/s has been identified in tel1 mutants and in yeast with vertebrate telomeres which are unaffected by Rap1 mutations [36,61]. Moreover it has recently been shown that subtelomeric proteins contribute to telomere length regulation as well [48]. Although the precise mechanism by which the Rap1/Rif1/Rif2 complex regulates telomere length is not known yet, it may be that long arrays of this complex may favour the formation of secondary structures, such as t-loop [16] and/or parallel tetrameric G-quadruplexes thus limiting the availability of free 3' ends [65].

The length of human telomere in budding yeast is properly controlled although the mean length at the equilibrium is about 100 bp shorter than that of wt yeast telomere. Detailed analysis of telomere length in tel1-h strains showed that either the mixed yeast-human and the T2AG3-only telomeres were not over-elongated in rap1 and rif mutants, as expected for yeast telomeres, but slightly shorter suggesting that the Rap1/Rif1–2 complex may act as a positive regulator of telomere length; moreover tel1 mutants showed even shorter but more homogeneous in size telomeres suggesting that the counting capacity of the internal core TG1–3 is very potent, and/or that an alternative Rap1-independent control mechanism is active.

Telomerase assembly at telomeres is cell cycle-dependent and preferentially directed at short telomeres: in *S. cerevisiae* the single-stranded binding protein Cdc13 peaks in S phase but it was not enriched at the short telomeres; RPA (Replication Protein A), a single-stranded binding protein involved in multiple processes, is present at yeast telomeres maximally in S phase and is involved in telomerase activation by recruiting Est1 [66]; Est1 and Est2 preferentially bind short telomeres in late S/G2 phase of the cell cycle as well as the PIKK kinase Tel1, which defines a pathway of telomerase-mediated telomere elongation, a second being mediated by Mec1 [67,68]; the MRX complex, which is required for efficient binding of Cdc13 and Est1, binds also in late S phase. Accordingly it was proposed that Tel1 binds preferentially to short telomeres facilitating directly and/or indirectly, i.e. by mediating phosphorylation of one or more telomere binding proteins, telomerase-mediated telomere elongation. A second mechanism responsible for telomerase recruitment is active in G1 and requires the telomere-binding protein Ku which interacts with a specific stem-loop domain of the TLC1 telomerase RNA. A further mechanism that contributes to control telomerase activity requires the Pif1 helicase which is a negative regulator of telomere length that acts by removing telomerase from telomeres and whose concentration is low in G1 and early S phase and peaks late in the cell cycle [69]. In human the semiconservative replication of telomere occurs throughout the S-phase and direct proof of telomerase activity restriction is missing

although recent evidences of S-phase specific assembly of human telomerase at telomeres have been provided by cytological studies [70,71]. Very recently it was published that in budding yeast the bulk of telomeric DNA is replicated late in S phase while shortened telomeres replicate early in the S phase, due to early firing of origins of DNA replication in sub-telomeric regions suggesting an epigenetic effect of the telomeric chromatin on the nearby origins of replication [72].

7. Conclusion

The conserved features of telomeres from different organisms allowed in the recent past functional and molecular analysis of this essential chromosomal element in model organisms, mainly yeast and mouse. More recently budding yeast with human telomeres has been engineered and proved to offer new opportunities to study mammalian telomeres and telomerase in an organism more amenable to genetic manipulation. Yeast with human telomeres was used to reconstitute human telomerase activity; the reconstituted enzyme was shown to be active in vitro but not in vivo suggesting that the activity was not sufficient to guarantee telomere lengthening and/or that other human telomerase-associated factors were required [36]. Interestingly, it has been demonstrated that yeast chromosomes ending with mixed yeast-human telomeres comprise a relatively long 3' overhang that the authors claim to be a suitable substrate for the reconstituted human telomerase. One important aspect to be considered is that the 3'-overhang is capable to form G-quadruplexes that depending on its length can mediate intermolecular (short G-tail) or intramolecular (long G-tail) structures which would differentially affect telomere lengthening [73,74]. These data suggest that the structure of the most distal domain may be not suitable to be extended by the reconstituted human telomerase. Yeast with human telomeres could be a useful tool to study the effect of human telomeric non-Watson-Crick structure on telomere capping and lengthening. We believe that this model organism could contribute to highlight some of the many aspects of telomere biology that are technically difficult to approach in complex organisms and may have important biotechnological application in the field of artificial chromosome assembly [75].

Acknowledgement

We thank P. Donini for critical reading of the manuscript. This work was funded by Ricerche di Ateneo and partially by Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti.

References

- [1] E.H. Blackburn, J. Gall, A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena, *J. Mol. Biol.* 120 (1978) 33–53.
- [2] J.W. Szosiak, E.H. Blackburn, Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors, *Cell* 29 (1982) 245–255.
- [3] J. Lin, D.L. Smith, E.H. Blackburn, Mutant telomere sequences lead to impaired chromosome separation and a unique checkpoint response, *Mol. Cell Biol.* 15 (2004) 1623–1634.

- [4] G. Kyrion, K.A. Boakye, A.J. Lustig, C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability and function in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 5159–5173.
- [5] J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell* 97 (1999) 503–514.
- [6] L. Oganessian, T.M. Bryan, Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target, *Bioessays* 29 (2007) 155–165.
- [7] S.K. Mewborn, C. Lese Martin, D.H. Ledbetter, The dynamic nature and evolutionary history of subtelomeric and pericentromeric regions, *Cytogenet. Genome Res.* 108 (2005) 22–25.
- [8] M. Larrivee, C. LeBel, R.J. Wellinger, The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex, *Genes Dev.* 18 (2004) 1391–1396.
- [9] C.F.J. Hardy, L. Sussel, D. Shore, A RAP1-interacting protein involved in silencing and telomere length regulation, *Genes Dev.* 6 (1992) 801–814.
- [10] D. Wotton, D. Shore, A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.* 11 (1997) 748–760.
- [11] M.T. Teixeira, M. Arneric, P. Sperisen, J. Lingner, Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states, *Cell* 30 (2004) 323–335.
- [12] L. Xu, E.H. Blackburn, Human Rif1 protein binds aberrant telomeres and aligns along anaphase midzone microtubules, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 819–830.
- [13] F. Palladino, T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, S.M. Gasser, SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres, *Cell* 75 (1993) 543–555.
- [14] P. Moretti, K. Freeman, L. Coodly, D. Shore, Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1, *Genes Dev.* 8 (1994) 2257–2269.
- [15] A. Hecht, T. Laroche, S. Strahl-Bozinger, S.M. Gasser, M. Grunstein, Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast, *Cell* 80 (1995) 583–592.
- [16] W.H. Tham, V.A. Zakian, Transcriptional silencing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: implications for other organisms, *Oncogene* 21 (2002) 512–521.
- [17] C.I. Nugent, T.R. Huges, N.F. Lue, V. Lundblad, Cdc13: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, *Science* 274 (1996) 249–252.
- [18] N. Grandin, C. Damon, M. Charbonneau, Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13, *EMBO J.* 20 (2001) 1173–1183.
- [19] E. Pennock, K. Buckley, V. Lundblad, Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication, *Cell* 104 (2001) 387–396.
- [20] A. Bianchi, S. Negrini, D. Shore, Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1, *Mol. Cell* 16 (2004) 139–146.
- [21] N. Grandin, S.L. Reed, M. Charbonneau, Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13, *Genes Dev.* 11 (1997) 512–527.
- [22] H. Qi, V.A. Zakian, The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13 interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase α and the telomerase-associated Est1 protein, *Gen. Dev.* 14 (2000) 1777–1778.
- [23] M. Larrivee, R.J. Wellinger, Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 741–747.
- [24] S.S. Foster, M.K. Zubko, S. Guillard, D. Lydall, MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast cdc13-1 mutants, *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 840–851.
- [25] R.C. Petreaca, H.C. Chiu, H.A. Eckelhoefer, C. Chuang, L. Xu, C.I. Nugent, Chromosome end protection plasticity revealed by Stn1p and Ten1p bypass of Cdc13p, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 748–755.
- [26] M.K. Zubko, D. Lydall, Linear chromosome maintenance in the absence of essential telomere-capping proteins, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 734–740.
- [27] T. de Lange, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev.* 19 (2005) 2100–2110.
- [28] D. Liu, A. Safari, M.S. O'Connors, D.W. Chan, A. Laegerler, J. Quin, Z. Songyang, PTOPI interacts with POT1 and regulates its localization at telomeres, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 673–680.
- [29] B. van Steensel, A. Smogorzewska, T. de Lange, TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions, *Cell* 92 (1998) 401–413.
- [30] A.J. Sfeir, W. Chai, J.W. Shay, W.E. Wright, Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes, *Mol. Cell* 18 (2005) 131–138.
- [31] F. Wang, E.R. Podell, A.J. Zaugg, Y. Yang, P. Baciuc, T.R. Cech, M. Lei, The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, *Nature* 445 (2007) 506–510.
- [32] D. Hockemeyer, W. Palm, T. Else, J.P. Daniels, K.K. Takai, J.Z. Ye, C.E. Keegan, T. de Lange, G.D. Hammer, Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 754–761.
- [33] S. Smith, I. Giriat, A. Schmitt, T. de Lange, Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres, *Science* 282 (1998) 1484–1487.
- [34] K.A. Henning, N. Moskowicz, M.A. Ashlock, P.P. Liu, Humanizing the yeast telomerase template, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 5667–5671.
- [35] A. Bah, F. Bachand, E. Clair, C. Autexier, R.J. Wellinger, Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1917–1927.
- [36] V. Brevet, A.S. Berthiau, L. Civitelli, P. Donini, V. Schramke, V. Geli, F. Ascenzioni, E. Gilson, The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms, *EMBO J.* 22 (2003) 1697–1706.
- [37] M.K. Alexander, V.A. Zakian, Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast, *EMBO J.* 22 (2003) 1688–1696.
- [38] R. Levis, T. Hazelrigg, G.M. Rubin, Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the white gene of *Drosophila*, *Science* 229 (1985) 558–561.
- [39] D.E. Gottschling, O.M. Aparicio, B.L. Billington, V.A. Zakian, Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription, *Cell* 4 (1990) 751–762.
- [40] J.A. Baur, Y. Zou, J.W. Shay, W.E. Wright, Telomere position effect in human cells, *Science* 292 (2001) 2075–2077.
- [41] C.E. Koering, A. Pollice, M.P. Zibella, S. Bauwens, A. Puisieux, M. Brunori, C. Brun, L. Martins, L. Sabatier, J.F. Pulitzer, E. Gilson, Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity, *EMBO Rep.* 3 (2002) 1055–1061.
- [42] C.B. Millar, M. Grunstein, Genome-wide patterns of histone modifications in yeast, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 657–666.
- [43] G. Liang, R.J. Klose, K.E. Gardner, Y. Zhang, Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 243–245.
- [44] G.G. Liou, J.C. Tanny, R.G. Kruger, T. Walz, D. Moazed, Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation, *Cell* 121 (2005) 515–527.
- [45] K. Luo, M.A. Vega-Palas, M. Grunstein, Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast, *Genes Dev.* 16 (2002) 1528–1539.
- [46] S. Strahl-Bolsinger, A. Hecht, K. Luo, M. Grunstein, SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast, *Genes Dev.* 11 (1997) 83–93.
- [47] D. de Bruin, S.M. Kantrow, R.A. Liberatore, V.A. Zakian, Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7991–8000.
- [48] A.S. Berthiau, K. Yankulov, A. Bah, E. Revardel, P. Luciano, R.J. Wellinger, V. Geli, E. Gilson, Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast, *EMBO J.* 25 (2006) 846–856.
- [49] F. Hediger, A.S. Berthiau, G. van Houwe, E. Gilson, S.M. Gasser, Subtelomeric factors antagonize telomere anchoring and Tel1-independent telomere length regulation, *EMBO J.* 25 (2006) 857–867.

Please cite this article in press as: C. Auriche et al., Budding yeast with human telomeres: A puzzling structure, *Biochimie* (2007), doi:10.1016/j.biochi.2007.09.009

- [50] M. García-Cao, R.O'Sullivan, A.H. Peters, T. Jenuwein, M.A. Blasco, Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases, *Nat. Genet.* 36 (2004) 94–99.
- [51] S. Gonzalo, M. García-Cao, M.F. Fraga, G. Schotta, A.H. Peters, S.E. Cotter, R. Eguia, D.C. Dean, M. Esteller, T. Jenuwein, M.A. Blasco, Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 420–428.
- [52] R. Benetti, M. García-Cao, M.A. Blasco, Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres, *Nat. Genet.* 39 (2007) 243–250.
- [53] S. Gonzalo, I. Jaco, M.F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, M.A. Blasco, DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 416–424.
- [54] M.A. Blasco, The epigenetic regulation of mammalian telomeres, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 299–309.
- [55] L. Maringe, D. Lydall, The PAL-mechanism of chromosome maintenance: causes and consequences, *Cell Cycle* 4 (2005) 747–751.
- [56] N. Hug, J. Lingner, Telomere length homeostasis, *Chromosoma* 115 (2006) 413–425.
- [57] G. Cristofari, J. Lingner, Telomere length homeostasis requires that telomeres levels are limiting, *EMBO J.* 25 (2006) 565–574.
- [58] S. Negrini, V. Ribaud, A. Bianchi, D. Shore, DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation, *Genes Dev.* 21 (2007) 292–302.
- [59] C. Wei, M. Price, Protecting the terminus: t-loops and telomere end-binding proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 2283–2294 (Review).
- [60] S. Marcand, E. Gilson, D. Shore, A protein-counting mechanisms for telomere length regulation in yeast, *Science* (1997) 986–990.
- [61] A. Ray, K.W. Runge, Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in tel1Δ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 15044–15049.
- [62] S. Marcand, V. Brevet, E. Gilson, Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation, *EMBO J.* 18 (1999) 3509–3519.
- [63] M.J. McEachern, E.H. Blackburn, Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations, *Nature* 376 (1995) 403–409.
- [64] S.W. Chan, J. Chang, J. Prescott, E.H. Blackburn, Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1240–1250.
- [65] R. Giraldo, D. Rhodes, The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA, *EMBO J.* 13 (1994) 2411–2420.
- [66] V. Schramke, P. Luciano, V. Brevet, S. Guillot, Y. Corda, M.P. Longhese, E. Gilson, V. Geli, RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends, *Nat. Genet.* 36 (2004) 46–54.
- [67] A. Bianchi, D. Shore, Increased association of telomerase with short telomeres in yeast, *Genes Dev.* 21 (2007) 1726–1730.
- [68] M. Sabourin, C.T. Tuzon, V.A. Zakian, Telomerase and Telp preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*, *Mol. Cell* 27 (2007) 550–561.
- [69] J.B. Boule, L.R. Vega, V.A. Zakian, The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA, *Nature* 438 (2005) 57–61.
- [70] B.E. Jady, P. Richard, E. Bertrand, T. Kiss, Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 944–954.
- [71] R.L. Tomlinson, T.D. Ziegler, T. Supakorndej, R.M. Terns, M.P. Terns, Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 955–965.
- [72] A. Bianchi, D. Shore, Early replication of short telomeres in budding yeast, *Cell* 128 (2007) 1051–1062.
- [73] I.M. Pedrosa, L.F. Duarte, G. Yanez, K. Burkewitz, T.M. Fletcher, Sequence specificity of inter- and intramolecular G quadruplex formation by human telomeric DNA, *Biopolymers* 87 (2007) 74–84.
- [74] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures, *Nature* 350 (1991) 718–720.
- [75] K.A. Henning, E.A. Novotny, S.T. Compton, X.Y. Guan, F.P. Liu, M.A. Ashlock, Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 592–597.

RISULTATI SPERIMENTALI

PRIMA PARTE

RUOLO DEI CHECKPOINT MEC1 E TEL1 NEL MANTENIMENTO DELL'INTEGRITÀ TELOMERICA IN CEPPI DI LIEVITO CON TELOMERI UMANIZZATI

INTRODUZIONE: I telomeri sono un complesso nucleoproteico localizzato alle estremità dei cromosomi lineari eucariotici, costituiti da sequenze ripetute ricche in G sul filamento orientato 5'-3'. In *S. cerevisiae* questa regione comprende circa 350 bp di ripetizioni di DNA caratterizzate da un motivo comunemente abbreviato in $C_{1-3}A/TG_{1-3}$, mentre in tutti i vertebrati, compreso l'uomo, le sequenze telomeriche sono indicate con il motivo C_3TA_2/T_2AG_3 . Oltre questa regione si estende una porzione di DNA a singolo filamento che sporge al 3' detta G-Tail (Larrivee *et al.*, 2004). La completa replicazione delle estremità cromosomiche avviene a seguito dell'azione di una specifica trascrittasi inversa chiamata telomerasi (Greider e Blackburn, 1985). L'attività della telomerasi è essenziale per mantenere un numero appropriato di ripetizioni in modo da contrastare la continua erosione dei telomeri osservata nelle cellule prive di quest'enzima. La perdita di un numero critico di ripetizioni di DNA telomerico conduce all'arresto del ciclo cellulare, mediato dai checkpoint di danno al DNA (DNA Damage Checkpoint-DDC) con importanti implicazioni per la stabilità ed il mantenimento dei cromosomi in molti eucarioti compreso l'uomo.

A garantire l'integrità del telomero e la funzionalità della telomerasi, collaborano numerosi fattori con un elevato grado di conservazione tra uomo e lievito. Infatti, proteine specie specifiche che legano il DNA telomerico a doppio filamento (scRap1, hRap1, TRF1, TRF2) sono in grado di regolare la lunghezza del telomero sia in lievito che nell'uomo (Lundblad, 2000; deLange, 2002). La proteina hPOT1, che ha un'elevata affinità per il DNA telomerico a singolo filamento, ha il suo analogo funzionale nella proteina di *S. cerevisiae* Cdc13 (Lundblad, 2003).

Poiché la struttura e l'organizzazione del telomero, è essenzialmente conservata tra uomo e lievito, è possibile studiare i telomeri umani in un sistema modello come *S. cerevisiae*. A questo scopo è stato utilizzato un ceppo di lievito con una telomerasi modificata che aggiunge ripetizioni tipiche di mammifero (T_2AG_3) al posto di quelle di lievito (TG_{1-3}). Questo ceppo è stato ottenuto sostituendo il gene TLC1, che codifica per la componente ad RNA della telomerasi, con l'allele *tlc1-h*. I ceppi *tlc1-h*, definiti "umanizzati" (Humanized Yeast – HY), sono vitali ed hanno telomeri stabili anche se più corti rispetto al ceppo selvatico (Hanning *et al.*, 1998).

RISULTATI: Utilizzando come modello un lievito con telomerasi “umanizzata”, abbiamo recentemente dimostrato che questi ceppi soffrono dell’ attivazione cronica del checkpoint di danno al DNA Rad53, tale attivazione è associata ad un ritardo nel ciclo cellulare in G2. In aggiunta, abbiamo osservato che in assenza dei geni *TEL1/ATM* o *MEC1/ATR*, che fanno parte della famiglia delle chinasi PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases), la formazione di fusioni telomeriche. La formazione di queste fusioni correla con una riduzione della vitalità cellulare ed un elevato tasso di instabilità genomica. L’osservazione che nei ceppi HY è presente una coda telomerica a singolo filamento più lunga rispetto al ceppo selvatico, lascia ipotizzare che questa regione possa essere l’innescò per l’attivazione della cascata di segnalazione del danno Rad53-dipendente. La fosforilazione di Rad53 nei ceppi HY è presente fin dalle generazioni più precoci, tuttavia si è visto che soltanto quando vengono rimossi i checkpoint legati alla sorveglianza del danno al DNA quali Tel1, Mec1 ma anche Rad9, Rad17 è possibile osservare la formazione di fusioni telomeriche. Il clonaggio ed il successivo sequenziamento delle fusioni, ha permesso di individuarne la struttura e di riconoscere i cromosomi coinvolti. Dall’analisi dei risultati è emerso che l’elemento comune a tutti i cromosomi che sono andati incontro a fusioni è l’estrema corrosione della regione telomerica terminale, ad indicare che in assenza dei checkpoint di danno al DNA si accumulano un certo numero cromosomi con telomeri eccessivamente corti che vanno incontro a fenomeni di ricombinazione.

CONCLUSIONI: Questi risultati rivelano che i telomeri “umanizzati” in lievito, attivano un segnale cronico di danno al DNA Rad53-dipendente. Tuttavia, l’integrità dei telomeri è la vitalità cellulare non vengono compromesse fin quando sono presenti i checkpoint di danno al DNA. In assenza dei checkpoint si accumulano invece cellule che presentano disfunzioni telomeriche. (Questi risultati sono riportati per esteso nell’allegato 2)



The Mec1p and Tel1p checkpoint kinases allow humanized yeast to tolerate chronic telomere dysfunctions by suppressing telomere fusions

Enea Gino di Domenico^a, Cristina Auriche^a, Valeria Viscardi^b, Maria Pia Longhese^b, Eric Gilson^c, Fiorentina Ascenzioni^{a,*}

^a Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italy

^b Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Milano, Italy

^c Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR5239, UCBL1, IFR128, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Telomeres are the physical ends of linear chromosomes and contribute to genome integrity. Due to their terminal position, telomeres require a special mechanism to distinguish them from DSBs. Thus, telomeres are either hidden from DNA damage checkpoints or they are detected as DSBs but processed differently [1].

In both yeasts and mammals, several factors involved in DNA damage response also have roles in telomere metabolism. For example, the Ku70/Ku80 heterodimer and the Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) complex are positive regulators of telomere length as demonstrated by telomere shortening in null mutants [2, 3]. In particular, Tel1 is required for the maintenance of the steady state telomere length and for the activity of the Rap1-dependent counting mechanism [4, 5]. Mec1 also contributes to regulation of telomere length but acts in a different epistasis group from that of MRX and Tel1. In fact, *mec1 tel1* cells, as well as *mec1* cells lacking any of the MRX proteins, have a defect in telomerase-mediated telomere lengthening [6, 7].

Phosphoinositide 3-kinase (PIKK proteins) family members are primary sensors of DNA damage. This family includes the *Saccharomyces cerevisiae* Mec1p and Tel1p and the mammalian ATR and ATM proteins. These checkpoint kinases activate a protein kinase cascade to regulate downstream effector kinases such as Rad53 and Chk1. Sensing and signalling to downstream effectors are coupled by the Rad9 adaptor, which activates Rad53 and Chk1 by distinct and independent mechanisms [8, 9]. In *S. cerevisiae* DNA damage is mainly sensed by Mec1p, whereas Tel1p seems to play a secondary role [10]. Both Mec1p and Tel1p are important for telomerase-mediated telomere maintenance, with Tel1p playing the major role. In fact, although *mec1-21* allele is synthetically senescent with *tel1*

[6], *tel1* cells have much shorter telomeres than *mec1-21* cells, whose telomeres are only slightly shorter than WT. Interestingly it has been shown that Tel1p can phosphorylate Cdc13 *in vitro* [11] suggesting a role for it in telomerase recruitment. Consistent with this hypothesis is the finding that Tel1p helps recruitment of telomerase in late S/G2 whereas Mec1p does not appear to be involved in this process [12] and that short telomeres, which are preferentially elongated with respect to full-length telomeres [13, 14, 15] are more avidly bound by Est1p, Est2p and Tel1p [16, 17, 18]. Moreover, it has recently shown that the preferential elongation of short telomeres require Tel1p, although a Tbf1p-mediated backup mechanism has been described in *tel1* mutants [19].

Baker's yeast telomeres are organized into a complex nucleoprotein structure consisting of a terminal tract of ~300 bps of duplex TG₁₋₃ repeats and a short 3' single strand overhang. This overhang, which is present throughout the cell cycle, increases in length in late S phase and is bound *in vivo* by Cdc13p, a TG₁₋₃ sequence specific binding protein. All yeast telomeres also have the subtelomeric X element and about half have up to 4 tandem copies of the Y' subtelomeric element distal to X. Short tract of telomeric repeats are often found between the Y' and X elements. Telomeric DNA is assembled into a non nucleosomal structure, whose main component is Rap1p, a duplex, sequence specific DNA binding protein that binds telomeric DNA with its Myb-like binding domain and tethers Rif1 and Rif2 by interactions with the C-terminal domain [20]. Deletion of the C-terminal part of Rap1p or of Rif1p and/or Rif2p, causes telomerase-dependent telomere lengthening, suggesting that Rap1p and its associated proteins act negatively on telomere length [21, 22]. The amount of telomeric DNA and therefore of Rap1 and the Rif proteins negatively regulates telomerase-mediated lengthening as short telomeres are preferentially elongated. Many yeast telomeric proteins are conserved in evolution such as the human factors hRap1, TRF1 and TRF2 are part of human telomeres and act as negative regulators of telomere length [23].

Conservation of telomere structure and associated factors between human and yeast opens a new possibility to study human telomeres in a more amenable genetic system such as budding yeast, which may allow the discovery of unknown mechanisms related to telomere replication, protection and maintenance. Yeast telomeres that have the same sequence as human telomeres, can be generated by using a "humanized" version of TLC1, the *tlc1-h* allele, in which the template region is altered so that it encodes T₂AG₃ repeats [24]. By using this strain *de novo* telomere formation approach was used to generate a telomere composed solely of T₂AG₃ repeats and devoid of Rap1p and the Rif proteins [25, 26]. Since this "humanized" telomere has normal mitotic stability and a properly regulated length, , *RAP1* is not essential for the maintenance of the yeast telomeres and to

regulate their length [25, 26]. It was shown that the insertion of all 63 mutant combinations of telomeric template of the RNA component of yeast telomerase caused incorporation or misincorporation of the template mutations within telomeres [27]. Although mutants exhibited a variety of growth and telomeric defects, all of them showed aberrant chromosome separation and segregation, suggesting activation of the DNA damage checkpoint response. However, deletion of the *DDC1*, *MEC3* or *DDC2* checkpoint genes failed to rescue this defect, suggesting that telomeres activate alternative checkpoint responses [27]. We and others have previously demonstrated that yeast cells containing the human telomerase RNA template have telomeres that are a hybrid of yeast and human telomeric DNA that apparently protect the chromosomal ends accurately [25, 26], even in the absence of any residual yeast telomeric repeat (solo-vertebrate telomere). By ChIP analysis, it has been demonstrated that the solo-vertebrate telomeres are almost free of Rap1p, whereas the hybrid yeast-human telomeres are still bound by Rap1p due to the presence of an internal core of yeast repeats. Both the solo-vertebrate and the hybrid telomeres are bound by the normally subtelomeric protein Tbf1 that binds T₂AG₃ repeats *in vitro* [26]. These telomeres also bind Cdc13p, consistent with the *in vitro* binding properties of this protein [28, 29]. In fact, by ChIP analysis, there is more Cdc13p associated with humanized telomeres than with wt telomeres. This result in addition to the detection of single-stranded T₂AG₃ at the ends of HY chromosomes by non-denaturing hybridization analysis [30] suggested that G-tails on HY telomeres are likely longer and/or present throughout a larger fraction of the cell cycle than in WT cells. Moreover, since both the Cdc13p ChIP and the non-denaturing Southern analysis show increases over time, telomeric G-tails are likely to increase in length with growth. Thus, the chromatin structure of telomeres in *tlc1-h* cells is very different from that in WT yeast. In the present work, we show that yeast cells with humanized telomeres were delayed in their progression through the cell cycle, often exhibiting a G2/M delay. In addition, the checkpoint kinase Rad53p was chronically active, and this activation was *RAD9*, *MEC1* and *TEL1* dependent. Moreover, the absence of either Mec1p or Tel1p triggered the formation of telomere fusions between ultrashort telomeres and reduced cell viability. These findings reveal that humanized telomeres in yeast cells are sensed as a chronically damaged DNA but do not greatly impair cell viability as long as the cells have a functional DNA damage checkpoint .

MATERIALS AND METHODS

YEAST STRAINS

The yeast strains (Supplementary Table 1) used in this work derive from C6.1 [31] by standard yeast genetics; TLC1 (Y) and *tlc1-h* (HY) strains have been selected by PCR as described in Brevet *et al* [25]; null HY and Y *ctf8*, *ddc1*, *dun1*, *lif1*, *mec1*, *rad17*, *rad50*, *rad51*, *rad9*, *sml1* and *tel1* mutants were obtained by KanMX, CloNat and Hyg inserting cassettes as described in Goldstein and McCusker [32]. The inserting fragments were amplified from plasmids containing the corresponding markers (kindly provided by EUROSCARF; <http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>). All disruptions have been controlled by specific upstream and downstream PCR reactions. To account for telomeric sequence variation during growth, null mutants were obtained from HY clones at two stages: P5 (5 plate passage after sporulation) and P30 (30 plate passages from sporulation) except for HY *tel1* mutants which derived from sporulation of an heterozygous diploid (*TLC1/tlc1-h*, *TEL1/tel1::KanMX*) and subsequent plate passages. Null mutants were re-streaked 5 times prior analysis to adapt telomere length to the new genotype. Plates have been incubated 2-4 days at 30°C until colonies reached 2-3 mm, each plate passage was estimated to correspond to about 20 generations.

TELOMERE FUSION DETECTION

Telomere fusions (TFs) were detected by PCR as describe in Mieczkowsky *et al* [33]. 10-25 independent cultures for each strain have been tested. First, each DNA preparation was amplified with actin primers to account for DNA quality. Limiting dilution PCR [34]: the relevant genomic DNA, diluted with genomic DNAs from a WT strain (W303) to maintain the total amount of DNA constant to 50 ng, was amplified with primers X and Y; the PCR products were run on agarose gels and the intensity of the TFs bands was determined. TFs quantification: the intensity of the TF bands, obtained from PCR reactions with 50 ng genomic DNA, was normalized to that of the endogenous actin gene from the same reaction. TF positive control consists of a cloned telomeric fusion 400 bp in size. PCR products were separated by electrophoresis using standard agarose gels and high sensitive FlashGels (Cambrex). The intensity of the bands was determined by Kodak1D software.

TELOMERE AND TFs CLONING

Hybrid yeast-human telomeric fragments were amplified by PCR with primers matching the X and Y' elements (1L and 5R) and the human telomeric repeat (A₂TC₃); primers are provided in supplementary Table 2. DNA extracts from three independent cultures (each inoculated with a single colony) for each strain, were analysed. Telomeric and TF PCR products were purified from preparative agarose gels and cloned in the TOPO vector (Invitrogen) for sequencing.

DETECTION OF TELOMERIC G-TAILS

Genomic DNA from non synchronized culture of HY and control Y strains were digested with *Xho*I and hybridised in-gels under non-denaturing conditions as described in Dionne and Wellinger [35]. Detection of single-stranded DNA in HY and Y strains was performed with (C₃TA₂)₃ and (C₁₋₃A)₃ probes, respectively. ExoI (New England BioLabs) digestion was performed after *Xho*I according to the suppliers' specifications.

MICROCOLONY ASSAY

Samples of yeast cultures were diluted in complete medium and grown for 4-6 hr to exponential phase. After sonication (20-30 seconds) to disrupt cell clumps, serial dilutions were spotted (5 µl/spot) on glass slides containing thin layer of solid complete medium, the slides were examined under the microscope after 16-18 hr incubation at 30°C and again after additional 24 hr of growth. The growth of the cells fell into three classes: cell aggregates (> 20 cells) that divided continuously throughout the observation period (CFU); cell aggregates (up to 5-20 cells) that stopped growing after 16-18 hr (microcolonies); cells (single and doublets) that failed to divide (NGC, non growing cells). At least 500 cells for each strain were scored. Images of representative colonies have been recorded by CCD camera.

CAN^R /CANΔ ASSAY

The mutation rate to *canR* was measured by standard methods: in a typical experiment 25 single colonies for each strain were picked up and resuspended in 100 µl medium; 5 µl aliquots were diluted and plated for cell counting; the remaining 95 µl were distributed on canavanine plates. The experiment was repeated three times to allow recovery of a sufficient number of *canR* colonies for further analysis. *canR* colonies was counted after 3 day of incubation at 30°C; the

rate of *canR* forward mutation was calculated by fluctuation test. For each *canR* clone we determined the fraction that were due to deletion by PCR as described in Mieczkowski [33], PCR reactions for the actin gene were performed as a positive control. The *canD/canR* ratio was determined for all the strains analysed.

OTHER TECHNIQUES

Flow cytometric DNA analysis was determined on a Becton-Dickinson FACScan. For western blot analysis, protein extracts were prepared by TCA precipitation as previously described [36]. Rad53p was detected using anti-Rad53 polyclonal antibodies kindly provided by J. Diffley (Clare Hall, London, UK) and C. Santocanale (Nerviano Medical Sciences-Oncology, Milano, Italy) and Rad9 was detected using anti-Rad9 polyclonal antibodies kindly provided by N. Lowndes (University of Ireland, Galway, Ireland). Secondary antibodies were purchased from Amersham and proteins were visualized by an enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer.

Sequence analysis has been done by using BioEdit; sequences of WT telomeres were from SGDB and from control strain W303.

Statistical analysis: telomere length of TG₁₋₃ and T₂AG₃ tracts have been reported as SEM +/- standard deviation of at least 10 telomeric fragments. P value was calculated by T test 10 elements per groups at least.

RESULTS AND DISCUSSION

TELOMERIC SEQUENCE TURN OVER IN YEAST CELLS WITH HUMANIZED TELOMERES

Yeast strains with humanized telomeres (herein referred to as HY) were derived from tetrad dissection of a *TLC1/tlc1-h* heterozygous diploid strain, where the *tlc1-h* telomerase RNA allele encodes T₂AG₃ repeats. Growth of *tlc1-h* yeast cells is expected to give rise to telomeres with two distinct domains, the distal T₂AG₃ domain representing the dynamic region where telomeres have shortened and then been extended by the humanized telomerase, and the more internal TG₁₋₃ centromere-proximal domain which represents the non-variable portion of telomeres [25, 30]. We followed the sequence content of these two domains, at various times of outgrowth, in HY and HY *mec1* cells, which have telomeres of similar length, and in HY *tel1* cells, which have shorter telomeres. The hybrid yeast-human telomeres were amplified by PCR using primer pairs matching the

subtelomeric Y' or X elements and the vertebrate repeats as shown in Fig. 1. PCR performed with these primers on DNA from a W303 control TLC1 strain (herein referred as Y) gave rise to a very short discrete band that is probably due to non-specific amplification. In contrast, PCR amplification from HY DNAs contained a smeared band typical of terminal fragments (Fig. 1A). Moreover, the size range of the PCR products reflected the mean telomere length as determined by hybridization of *Xho*I-digested DNAs with a human telomeric probe (Fig. 1A; Supplementary Fig. 1). The PCR fragments were cloned and sequenced, representative sequences are shown as Supplementary Information.

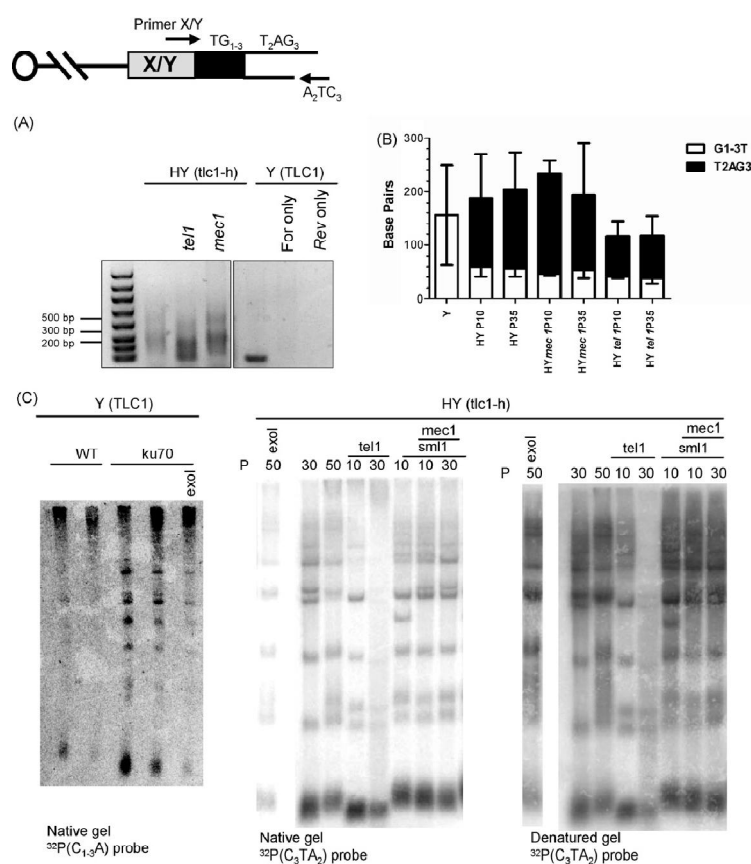


Fig. 1- Sequence composition and single-stranded overhang of telomeres in HY cells. Top left, a schematic representation of the PCR reaction used to amplify telomeric fragments. (A) genomic DNA samples from the indicated HY and Y strains were amplified with the sub-telomeric primer Y and the telomeric primer A₂TC₃; samples For only and Rev only, with only one primer, primer Y and primer A₂TC₃ respectively. (B) Sequence analysis of telomeres in the indicated strains; each strain was analysed after growing for 10 (P10) and 35 (P35) serial plate passages; the bar graph reports the average length of yeast (TG₁₋₃, empty bar) and human-like (T₂AG₃, black bar) telomeric repeats of 10 telomeric fragments from each sample (mean length +/- standard deviation). (C) G-tail detection in Y and HY cells. Genomic DNA samples were digested with *Xho*I and analysed by non-denaturing in-gel hybridization with the indicated probes. Control samples were further digested with the exonuclease I (ExoI) prior to analysis. Left panel, genomic DNA from Y and Y *ku70* cells; central panel, genomic DNA from HY, HY *tel1* and HY *mec1* after the indicated number of streaks (P); right panel, the same gel shown in the central panel, was denatured and rehybridized to the C₃TA₂ telomeric probe.

The average length of yeast and human telomeric tracts in HY, HY *mec1* and HY *tel1* clones after 200 (P10) and 700 (P35) cell divisions is shown in Fig. 1B. All telomeres from HY cells, had T₂AG₃ repeats (50-100 bp) that formed the very end of the chromosome. These tracts were ~50-100 bps in length in *tel1* cells and somewhat longer (150-200 bp) in WT and *mec1* cells.

As expected from previous work in WT [37, 38] and *tlc1-h* [30] yeast strains, even after prolonged growth (P35), HY telomeres contained as internal core of TG₁₋₃ repeats. The TG₁₋₃ were always internal to the T₂AG₃ tracts and there was no interspersation of the two repeat types. The average length of the TG₁₋₃ tracts (55 bp) was similar in HY and HY *mec1* cells and shorter in HY *tel1* cells (37 pb) (Fig. 1A and 1B). The lengths of the two telomeric sequence blocks did not change too much over time, confirming the ability of yeast cells to count both yeast and human telomeric repeat.

Cdc13p binding and non-denaturing hybridization demonstrate that HY telomeres bear G-tails that are likely longer and/or present throughout a larger fraction of the cell cycle than in WT cells [26, 30]. Since *yku70* or *yku80* mutants accumulates long single-stranded G-rich tails throughout the cell cycle [39, 40], we set up non-denaturing in-gel hybridization with Y WT and *ku70* DNAs extracted from non synchronized cultures. As expected, G-tails were rare in Y WT and abundant in Y *ku70* cells (Fig 1C, left panel). Similarly to Y *ku70* mutants, we detected single-stranded overhang in non synchronized HY WT, *mec1* and *tel1* cells (Fig 1C). These results confirmed that the structure of hybrid yeast-humanized telomeres is abnormal and maintains G-tails throughout the cell cycle.

DNA DAMAGE CHECKPOINTS PROTECT AGAINST LIF1-DEPENDENT TELOMERE FUSIONS

To determine if *tlc1-h* telomeres have defects in end protection, we used the PCR method described by Mieczkowski and collaborators [33] to determine if telomere fusions (TF) occur in HY strains. We analysed 25 independent cultures of HY cells that had been grown for ~100 (P5) to ~1000 (P50) generations with the *tlc1-h* allele. None of these clones had the fuzzy PCR band indicative of TFs (Fig. 2A and data not shown). The absence of TFs in otherwise WT *tlc1-h* cells was confirmed by using different primer pairs, [34], in representative HY clones at the last plate passage (P50) (data not shown).

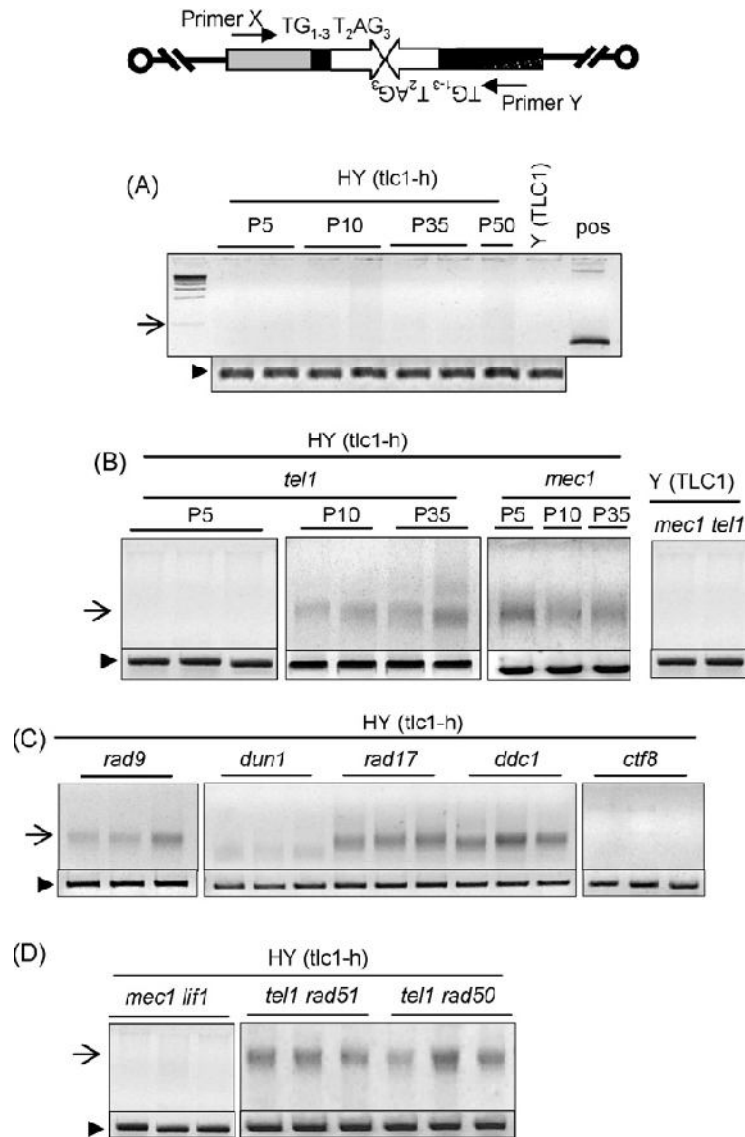


Fig. 2- Telomere fusion (TF) in *tlc1-h* yeast strains as detected by PCR. Top of the figure, schematic representation of the PCR strategy used to detect TF. (A and B) TF detection in genomic DNA samples from HY, HY *tel1* and HY *mec1* strains at the indicated number of streaks; genomic DNA samples from Y, Y *mec1* and Y *tel1* strains were also included as controls; (C and D) TF detection in indicated HY mutants after 35 streaks. Each sample refers to an independent culture; P, indicates the total number of streaks prior to analysis; Y control strain (W303); +, positive controls; arrowheads point to control PCRs for the actin gene; arrows point to 500 bp marker.

Next we asked if TFs were detectable in HY cells that lacked either *TEL1* or *MEC1*. TFs were not detected in Y *mec1* and *tel1* cells in contrast, they were detected in 20 of 25 P10 cultures and in 26 of 30 P35 cultures, but not at early stage of growth (Fig. 2B and data not shown). Likewise, TFs were detected in almost all *mec1 sml1* HY cultures, even at early growth stages (10/10 at P5, 10/10 at P10 and 9/10 at P35; Fig. 2B). Thus, TF formation was not due solely to the shorter telomeres in HY *tel1* cells since TFs were abundant in HY *mec1* cells whose

telomeres were similar in length to HY cells, in which TFs were not detected. The presence of the *sm1* mutation, which was introduced to suppress the lethality due to *MEC1* deletion, did not cause TFs by itself either in *TLC1* or in *tlc1h* cells (data not shown).

The level of TF formation was analyzed in more detail using a quantitative PCR approach similar to that described in Pardo and Marcand [34]. First, we demonstrated that the PCR used to detect TFs was quantitative by a limiting dilution experiment that confirmed that the intensity of the TF bands was proportional to the amount of input DNA (Fig 3A). Subsequently TFs and the endogenous actin gene were amplified from 50 ng genomic DNA; following quantitative analysis of the ethidium-bromide stained gels, the relative amount of TF in each sample was determined by normalizing the TF band intensity to that of the actin gene. By this analysis, TF formation was most frequent in HY *tel1* mutants (Fig. 3B) with respect to HY *mec1* ($P=0,046$) and this increase in fusion formation could be explained by a decrease in the mean telomere length in the former cells. However, the mean telomere length per se cannot explain TF formation as demonstrated by the finding that TFs were detected in HY *mec1* cells but not in HY cells that have telomeres of the same length. Overall telomere fusions are observed exclusively in HY cells compromised for *MEC1* or *TEL1*.

Since *MEC1* and *TEL1* are the two major DNA damage sensors, we asked whether other checkpoint proteins affect TF formation. To this purpose we deleted *DUN1*, which acts downstream of Rad53 [41] and a number of genes acting upstream of Rad53, including *RAD9*, *DDC1* and *RAD17*. The latter genes have been grouped, by global genetic analysis of synthetic fitness or lethality interactions [42], in a DNA damage checkpoint signalling (DDC) module [43, 44, 45]. We also determined TF formation in *ctf8* HY cells, where *CTF8* belongs to the DNA replication checkpoint signalling pathway (DRC) [42]. TFs were not detected in control Y *rad9*, Y *dun1*, Y *rad17*, Y *ddc1* and Y *ctf8* strains (data not shown) but we found TFs in HY *rad9*, HY *ddc1* and HY *rad17* mutants (Fig 2C and 3B). TFs were rare in HY *dun1* mutants (very faint PCR band in 6 out of 15 cultures), and not detected in HY *ctf8* cells (Fig. 2C and Fig. 3B). Quantitative analysis of TFs in HY *rad9* cells showed a lower frequency of TF formation in these cells with respect to either HY *tel1* ($P=0,026$) and HY *mec1* ($P=.0,046$) (Fig. 3B). Overall these results indicate that factors belonging to the DDC module are involved in protection from telomere fusion, whereas the DNA–replication checkpoint module does not appear to be involved in this process.

Telomere fusions are usually generated by non homologous end joining (NHEJ) [33, 34, 46], which requires Mre11, Rad50, Xrs2, Yku70/80, Lig4, Lif1 and Nej1

(reviewed in 47]. We analysed 20 independent cultures from HY *mec1 lif1* cells at P35; none had the amplification band characteristic of TFs (Fig. 2D).

Surprisingly, TFs were detected in HY *tel1 rad50* clones (8 out of 10), although their amount was lower than in HY *tel1* mutants (Fig. 2D and Fig. 3B, $P=0,018$). This result suggests that the MRX complex is not absolutely required for telomere fusions. Likewise, TFs were detected in HY *tel1 rad51* cells (8 out of 10 had TFs), although at lower level than in *tel1* mutants (Fig. 2D and Fig. 3B, $P=0,026$). Thus, homologous recombination was also not essential for TF formation. Overall these results demonstrate that telomere fusions can occur in the absence of either *RAD50* or *RAD51* but are absolutely dependent upon *LIF1*.

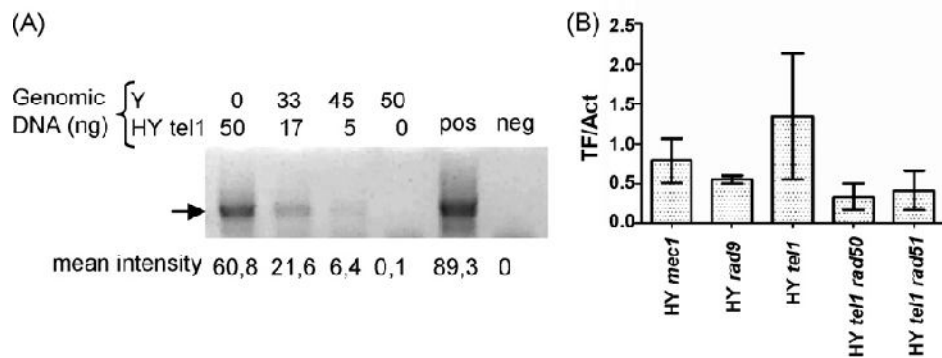


Fig. 3- Quantitative analysis of TFs. (A) PCR reactions performed by diluting HY *tel1* DNA with genomic control DNA (W303) as indicated; pos, cloned telomeric fusion; neg, without DNA. The mean intensity of the TF bands in each sample is reported below the gel image. (B) Relative amount of TFs, as determined by TF/actin ratio. The data reported refer to three independent experiments for each strain. P values from T test analysis: HY *tel1* vs HY *mec1*, $P=0,046$; HY *tel1* vs HY *rad9*, $P=0,026$; HY *tel1* vs HY *tel1 rad50*, $P=0,018$; HY *tel1* vs HY *tel1 rad51*, $P=0,026$.

TELOMERE FUSIONS INVOLVE ULTRA-SHORT TELOMERES

To determine the structure of telomeres that underwent fusion, we cloned and sequenced TFs from the different strains. A schematic representation of the structure of TFs in HY *tel1* and HY *mec1* cells is shown in Fig. 4A. We found 3 classes of TFs: class 1) 50-60% of telomeric fusions (7/11 and 8/15 in *mec1* and *tel1* cells, respectively) occurred between terminal T_2AG_3 repeats; class 2) 18-6% of TFs (2/11 and 1/15 in *mec1* and *tel1* cells, respectively) occurred between terminal TG_{1-3} repeats; class 3) 10-20% (1/11 in HY *mec1* and 3/15 in HY *tel1* cells) occurred between one subtelomeric element and one terminal telomeric repeats (either TG_{1-3} and T_2AG_3 repeats). Classes 1 and 2 are palindromes with T_2AG_3 and TG_{1-3} repeats fused to poly A_2TC_3 and AC_{1-3} respectively. Since palindromic fusions could be sequenced at completion only in 10% of the TF fragments, we confirmed the presence of inverted telomeric repeats by PCR. For

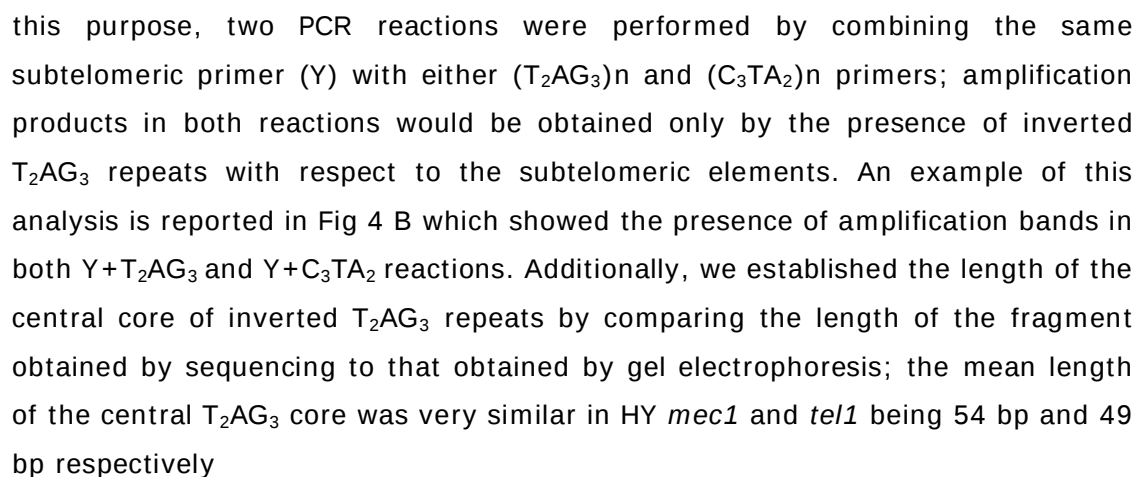


Fig. 4- Sequence analysis of telomere fusions cloned from HY *mec1* and HY *tel1* cells after 35 streaks. (A) Top, schematic representation of the fused telomeres in *tlc1-h* strains, left and right panels, TFs from HY *tel1* and HY *mec1* cells respectively. The subtelomeric elements at both side of TFs were identified by BLAST analysis and are indicated in the Y axis; X axis, the length (bp) of the various elements that formed the TFs; vertical bar, indicated the junction point between the two telomeres. (B) Top, schematic representation of the PCR reactions performed to confirm the presence of inverted T₂AG₃ repeats in cloned TFs. Two different TF fragments (a and b) were amplified with the indicated pair of primers; v, vector only; -, without DNA. (C) TFs fell into five classes based on combination of: hybrid TG₁₋₃-T₂AG₃ telomeres ; TG₁₋₃ only telomeres ; completely eroded telomere . For each class of fusion we reported the number of TF belonging to that class and the total number analysed. The symbols are as in A with the exception that the grey bar indicates the subtelomeric elements, either X or Y'.

Overall telomeres undergoing fusion in HY *tel1* and HY *mec1* mutants (Fig 4C) were composed of an internal blocks of yeast repeats (16-18 bp) and a terminal block of vertebrate repeats (24-27 bp) both of which were shorter than those in intact telomeres (38-51 bp of TG₁₋₃, 157-81 of T₂AG₃). Moreover, some chromosomal ends were completely free of telomeric DNA suggesting that they derived from completely eroded telomeres or from the breakage of a telomere fusion that occurred in the previous cell cycle. These results suggest that TF formation is independent from the telomeric sequence (TG₁₋₃ or T₂AG₃) at the distal ends and occurs between extremely short telomeres (<40-45 bp telomeric repeats).

DNA DAMAGE CHECKPOINT ACTIVATION IN HUMANIZED YEAST

The checkpoint proteins might have a direct protective role at humanized telomere than they do at WT telomeres. For example, they may act by preventing the formation of abnormal telomeres which then have a propensity to fuse. Alternatively, their role in TF might be a consequence of their checkpoint functions. That is, when cells contain abnormal telomeres, checkpoint mediated arrest provides time for their structure to be corrected. In the second scenario, *tlc1-h* cells might constitutively express a DNA damage response. To analyze this possibility, we monitored Rad53p phosphorylation, which is a pre-requisite for its activation as a kinase. Haploid HY and Y spore clones were isolated from the same diploid strain, grown for the same number of generations, and then assayed by an electrophoretic mobility shift assay for Rad53 phosphorylation. As shown in Fig. 5A, even after only one generation of growth, all HY yeast clones contained phosphorylated Rad53p. In contrast, phosphorylated Rad53p was not detected in the control Y clones. The HY clones also contained phosphorylated Rad9p, consistent with the known requirement of Rad9p to activate Rad53p, (Fig. 5A, bottom). Moreover, Rad53p phosphorylation was not detected in HY *rad9* (Fig. 5B) or HY *mec1* cells. Although phosphorylated Rad53p was present in HY *tel1* mutants, its amount was lower than in HY cells (Fig. 5A). This indicates that both Mec1p and Tel1p are involved in Rad53p phosphorylation in cells with humanized telomeres, with Mec1p playing the major role.

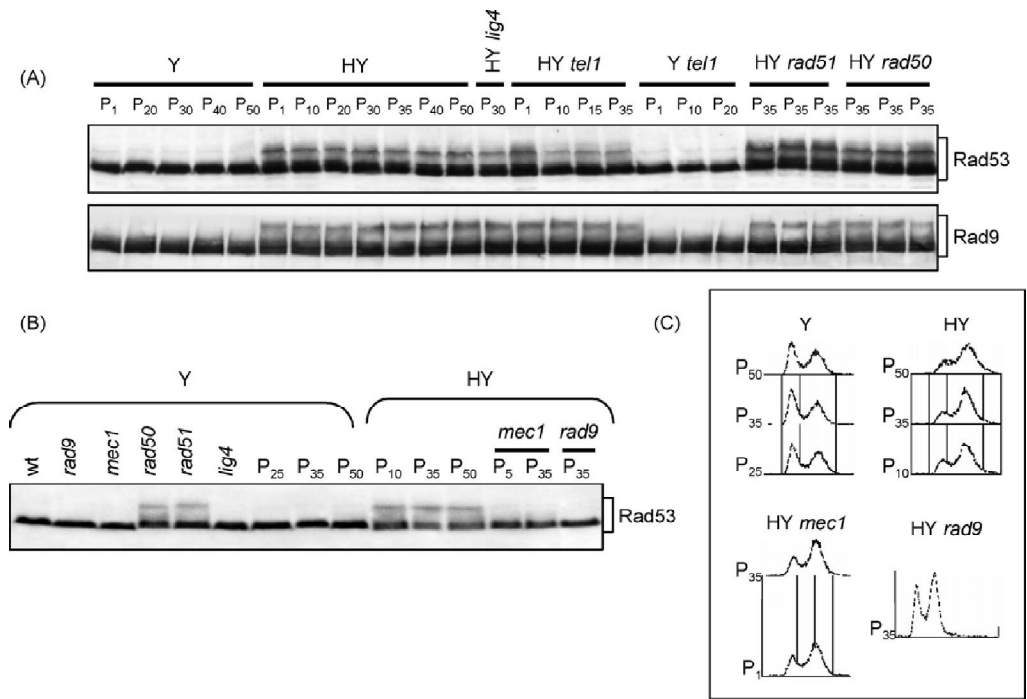


Fig. 5- DNA damage checkpoint activation in HY yeast cells. (A and B) Protein extracts prepared from cell samples collected at the indicated plate passage were subjected to western blot analysis with anti-Rad53 and anti-Rad9 antibodies. (C) Cell samples in A and B were analysed by FACS to determine the DNA contents.

Conversely, neither Rad50 nor Rad51 reduced Rad53p phosphorylation in HY cells (Fig. 5A), indicating that they are not required to generate and/or to sense checkpoint signals at humanized telomeres. We conclude that humanized telomeres constitutively activate Mec1 Rad9 dependent Rad53p phosphorylation, suggestive of a DNA damage checkpoint response.

Samples of the same cultures used for Western blot analysis were also analysed by FACS to monitor cell cycle progression. HY cells accumulated as budded cells with a 2C DNA content (Fig. 5C) and undivided nuclei (data not shown). The fraction of G2-arrested cells decreased slightly in HY *mec1* and HY *rad9* mutants compared to HY (Fig. 5C). Therefore, activation of the DNA damage checkpoint was not solely responsible for the cell delay in HY cells since deletion of *MEC1* or *RAD9* only partially relieved the G2/M cell cycle arrest of HY cells. A similar DNA damage checkpoint-independent response has been observed in other TLC1 template mutants [27], suggesting that changes in telomere sequence and/or structure can elicit a checkpoint that is genetically different from that activated by DNA damage.

TEL1 AND MEC1 ARE REQUIRED FOR CELL VIABILITY IN HUMANIZED YEAST

In order to assess whether *MEC1* and *TEL1* are involved in supporting cell viability in HY yeast cells, we measured the division potential of HY *mec1* and HY *tel1* cells by microscopic inspection of the growth rate of individual cells. HY and Y cells (P35) were spread on microscope slides and observed after 16-18 hr at 30°C, and again after additional 20-24 hr incubation. Cells were placed in one of three categories: non growing cells, which failed to divide (NGC), cells that had formed a small group of cells by ~17 hrs but did not divide further in the next 24 hrs (labelled microcolonies), and cells that divided continuously throughout the observation period (CFU). Representative images (Fig 6A) of NGC (single and double cells, arrowheads), microcolonies (arrows), and CFUs and their relative abundance (Fig. 6B) are presented. Cell viability was similar between *TLC1* (Y) and *tlc1h* cells (HY) cells. As expected for checkpoint mutants, the *mec1* and *tel1* cells had more NGC than wild type cells and this number was even higher in the HY cells (Y *mec1* vs HY *mec1*, $P=0,048$; Y *tel1* vs HY *tel1*, $P=0,0014$). Although microcolonies were more abundant in *mec1* and *tel1* cells, there was no significant differences in these categories between *TLC1* and *tlc1h* cells (3-5% and 5-8% respectively).

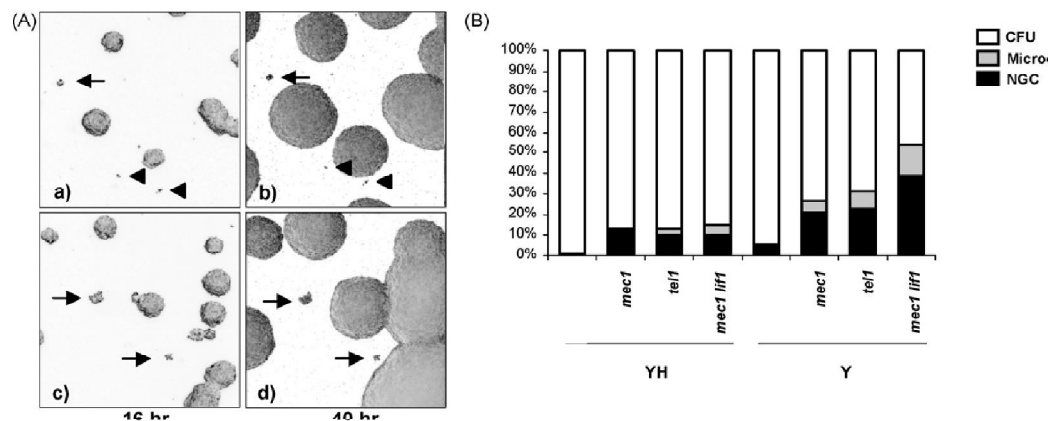


Fig. 6- Cell viability in HY and Y strains. (A) Microphotographs of HY *mec1* (panels a and b) and HY *tel1* (panels c and d) cells after 16 hr (panels a and c) and 40 hr (panels b and d) incubation; arrows point to microcolonies, arrowheads point to non-growing cells (NGC). (B) Percentage of growing cells (CFU), microcolonies and NGC in the indicated strains. All the strains were analysed after 35 streaks; the data refer to the average (+/- standard deviation) of three independent determinations. P values were determined by T-Test and referred to NGC in HY *mec1* vs Y *mec1*. $P=0,048$ and in HY *tel1* vs Y *tel*, $P=0,0014$.

The overall ability to form colonies (Fig. 6B) was lower in HY *mec1* and HY *tel1* (68,6% and 73,6% respectively) compared to Y *mec1* and Y *tel1* cells (87% and 89% respectively). Taken together, these data suggest that the absence of either

Mec1p or Tel1p affects cell division in both Y and HY cells but the viability of HY cells is more *MEC1* and *TEL1*- dependent.

MEC1 PROTECTS AGAINST GROSS CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS

Next we analysed the effects of the *tlc1-h* allele in the presence or absence of Mec1p on genome stability by determining the frequency of gross chromosomal rearrangements (GCR) in the different backgrounds. For this assay, we use the fraction of *can1* mutants that are due to *CAN1* deletion to monitor GCR as in Miecczkowski [33]. We analysed the following strains: HY *mec1* (TF positive), HY *mec1 lif1* (TF negative) and the TF negative control strains Y and Y *mec1* (TF negative). The bar graph in Fig. 7 shows the *canΔ/canR* ratio for all the strains analysed with the exception of the Y cells that did not show deletion of the *CAN1* gene in any of the 75 *canR* mutants analysed. As expected, *CAN1* deletion was absent in control Y cells, but it increased substantially in Y *mec1* mutants; similarly HY *mec1* cells had a significantly higher fraction of *CAN1* deletion events relative to either HY and HY *mec1 lif1* strains ($P=0,0022$ and $P=0,023$ respectively). This result suggests that the genomic instability observed in HY *mec1* cells is not simply due to the lack of Mec1p but rather to the appearance of telomere fusion, which are Lif1-dependent.

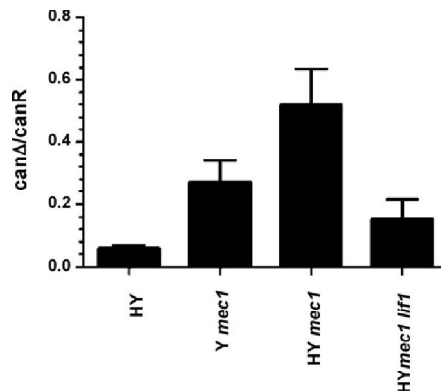


Fig. 7- Genome stability analysis in HY mutants and control strains. *canΔ/canR* ratio represents the fraction of canavanine resistant mutants that are due to deletion of the *CAN1* gene. Y cells did not showed the appearance of *canΔ* mutants in none of the 75 *canR* cultures analysed. The significance was determined by T test analysis: Y *mec1* vs HY *mec1*, $P=0,062$; HY vs HY *mec1*, $P=0,0022$; HY *mec1* vs HY *mec1 lif1*, $P=0,023$.

CONCLUSION

Dysfunctional telomeres propagated in telomerase minus and/or checkpoint-deficient cells have a propensity to fuse, initiating a period of chromosome instability and impaired growth [33, 46]. We report here that yeast cells expressing a telomerase that synthesizes vertebrate telomeric DNA showed a chronic activation of the Rad53-dependent DNA damage checkpoint pathway. In addition, these cells were prone to generate telomere fusions in the absence of either *TEL1* or *MEC1*. Sequence analysis reveals that these fusions involve ultrashort telomeres, even in HY *mec1* cells, where the mean length was similar to that in *MEC1* HY cells. One possibility is that these ultrashort telomeres contain too few Rap1 binding site to protect against end to end fusions [34]. Alternatively the presence of Tbf1p or altered Cdc13p affinity at HY telomeres might promote telomere fusions in HY cells. This situation seemingly contrasts with the one in normal yeast cells, which have elevated rates of telomere fusions only when both PIKK genes are deleted, i.e. when important defects in telomere length regulation are combined with checkpoint failure [33].

Yeast cells with humanized telomeres showed a chronic activation of the Rad53 DNA damage checkpoint which is independent from the number of cell duplications in the presence of the *tlc1-h* allele. This activation is unlikely to result from the occasional occurrence of telomere fusions for the following reasons: i) Rad53 phosphorylation is observed in HY cells that do not exhibit a detectable rate of telomere fusions; ii) telomere fusions are detected in HY *tel1* cells, where the Rad53 pathway is still activated, albeit at a lower level; iii) *lif1* cells are unable to generate telomere fusion, although they still activate the Rad53 pathway and show an elevated rate of gross chromosomal rearrangements upon checkpoint inactivation. Alternatively, it is possible that humanized yeast telomeres generate chronic signals, such as long 3' overhangs [30] and/or an increased number of stalled replication forks [48, 49], that activate the checkpoint machinery and elicit a checkpoint response.

How do the PIKKs protect HY telomeres from fusion? They might act to arrest or slow the growth of cells that have acquired a threshold number of telomere fusions. This model would predict that in the absence of Mec1 or Tel1, HY cells harbouring telomere fusions would be able to undergo a limited number of divisions before arresting and thus form microcolonies. However, we were unable to detect a difference in microcolony formation between HY and Y cells. Moreover, Rad53 phosphorylation was abolished in *mec1* but not in *tel1* cells, suggesting that the Rad53 activation is not required for fusion inhibition. Overall, these results argue against the possibility that fusion-containing cells are eliminated in checkpoint-proficient cells.

It is unclear if Mec1p and Tel1p act in the same or in separate pathways to protect ultrashort telomeres from fusion. Since Tel1p is telomere-bound and controls the structure of telomeric chromatin [50], it is possible that Tel1p specifically recognises and caps ultrashort telomeres. Consistent with this hypothesis, Tel1p is preferentially associated with short telomeres [16, 17, 18]. Mec1 may participate to protect short telomeres in a sub fraction of the cell cycle and/or after telomeres are critically short and cells are stopping growth.

The quantity of telomere dysfunction in HY cells must be sufficient to activate Rad53 yet not enough to exceed a level that is incompatible with cell viability. Indeed, HY yeast grew for up to 700 generation in the presence of activated Rad53 without loss of viability owing to the presence of a functional PIKK-dependent checkpoint pathway. These results suggest that PIKK kinases are important for the ability of HY cells to tolerate a certain amount of chronic telomere damage, even though in other contexts, they prevent the proliferation of cells with acute telomere damage. Paradoxically, this could constitute a threat to genome stability by allowing long term proliferation of cells harbouring partially dysfunctional telomeres. Indeed, gross chromosomal rearrangements can be detected at late passages of humanized yeasts. Overall, our results highlight the variety of DNA damage responses to telomere structural changes.

The situation in humanized yeast is reminiscent of the one in cancer cells, which are facing at early stages long periods of telomere dysfunction, coincidently with a chronic activation of the DNA damage response [51, 52]. A striking implication of this work is that a functional DNA damage checkpoint pathway may promote clonal expansion of cells containing mild telomere injuries eventually leading to genetic instability and oncogenic mutations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank: VH Zakian, S. Bacchetti and P. Donini for helpful discussion and critical reading of the manuscript; C. Santocanale, J. Diffley, N. Lowndes for antibodies; Ascenzioni Lab members, E Fanella, P Fradiani, L Pirone, L Rocchi for discussion; Work in the laboratory of F. Ascenzioni was funded by University of Rome "La Sapienza" C26A06Y8EB and partially by Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognietti. Work in the laboratory of M.P. Longhese was supported by grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro. Work in the laboratory of E. Gilson lab was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée). V.V. was supported by the fellowship Ninni Gattuso from Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. M.P. Longhese, DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres, *Genes & Dev.* 22 (2008) 125-140.
2. S.J. Boulton, S.P. Jackson, Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 4639-4648.
3. Y. Tsukamoto, A.K. Taggart, and V.A. Zakian, The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1328-1335.
4. A.J. Lustig, T.D. Petes, Identification of yeast mutants with altered telomere structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 1398-1402.
5. A. Ray, K.W. Runge, Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in tel1Delta cells, *Proc Natl. Acad. Sci.* 96 (1999) 15044-15049.
6. K.B. Ritchie, J.C. Mallory, T.D. Petes, Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 6065-6075.
7. K.B. Ritchie, T.D. Petes, The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast, *Genetics* 155 (2000) 475-479
8. C.S. Gilbert, C.M. Green, N.F. Lowndes, Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine, *Mol. Cell.* 8 (2001) 129-136.
9. R.T. Blankley, D. Lydall, A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast, *J. Cell. Sci.* 117 (2004) 601-608.
10. M.P. Longhese, D. Mantiero, M. Clerici, The cellular response to chromosome breakage, *Mol. Microbiol.* 60 (2006) 1099-1108.
11. S.F. Tseng, J.J. Lin, S.C. Teng, The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 6327-6336.
12. L.K. Goudsouzian, C.T. Tuzon, V.A. Zakian, *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association, *Mol. Cell.* 24 (2006) 603-610.
13. S. Marcand, V. Brevet, E. Gilson, Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation, *EMBO J.* 18 (1999) 3509-3519.
14. S. Marcand, V. Brevet, C. Mann, E. Gilson, Cell cycle restriction of telomere elongation, *Curr. Biol.* 10 (2000) 487-490.

15. M.T. Teixeira, M. Arneric, P. Sperisen, J. Lingner, Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states, *Cell* 117 (2004) 323-335.
16. M. Sabourin, C.T. Tuzon, V.A. Zakian, Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*, *Mol. Cell.* 27 (2007) 550-561.
17. A. Bianchi, D. Shore, Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes & Dev.* 21 (2007) 1726–1730.
18. R.E. Hector , R.L. Shtofman , A. Ray , B.R. Chen , T. Nyun , K.L. Berkner , K.W. Runge, Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation, *Mol Cell.* 27 (2007) 851-858.
19. M. Arnerić, J. Lingner, Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast, *EMBO Rep.* 11 (2007) 1080-1085.
20. D. Wotton, D. Shore, A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.* 11 (1997) 748-760.
21. G. Kyrion, K.A. Boakye, A.J. Lustig, C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1992) 5159-73.
22. S. Marcand, E. Gilson, D. Shore, A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast, *Science* 5302 (1997) 986-990.
23. T. de Lange, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev.* 19 (2005) 2100-2110. Review
24. C. Auriche, E.G. Di Domenico, F. Ascenzioni, Budding yeast with human telomeres: a puzzling structure, *Biochimie* 90 (2008) 108-115.
25. V. Brevet, A.S. Berthiau, L. Civitelli, P. Donini, V. Schramke, V. Geli, F. Ascenzioni, E. Gilson, The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms, *EMBO J.* 22 (2003) 1697-1706.
26. M.K. Alexander , V.A. Zakian, Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C₃TA₂ telomere in yeast, *EMBO J.* 22 (2003) 1688-1696.
27. J. Lin, D.L. Smith, E.H. Blackburn, Mutant telomere sequences lead to impaired chromosome separation and a unique checkpoint response, *Mol. Biol. Cell.* 15 (2004). 1623-1634.
28. J.J. Lin, V.A. Zakian, The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1±3 telomeric DNA binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 13760-13765.

29. C.I. Nugent, T.R. Hughes, N.F. Lue, V. Lundblad, Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, *Science* 274 (1996) 249-252.
30. A. Bah, F. Bachand, E. Clair, C. Autexier, R.J. Wellinger, Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1917-1927.
31. K.A. Henning, N. Moskowitz, M.A. Ashlock, P. L. Pu, Humanizing the yeast telomerase template *Genetics* 95 (1998) 5667-5671.
32. A.L. Goldstein, J.H. McCusker, Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 15 (1999) 1541-1553.
33. P.A. Mieczkowski, J.O. Mieczkowska, M. Dominska, T.D. Petes, Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 10854-10859.
34. B. Pardo, S. Marcand, Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining, *EMBO J.* 24 (2005) 3117-3127.
35. I. Dionne, R.J. Wellinger, Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 24 (1996) 13902-13907
36. V. Paciotti, M. Clerici, G. Lucchini, M.P. Longhese, The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast, *Genes Dev.* 14 (2000) 2046-2059.
37. S. Wang, V.A. Zakian, Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains, *Mol Cell Biol.* 8 (1990) 4415-9.
38. K. Förstemann, M. Höss, J. Lingner, Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres, *Nucleic Acids Res.* 14 (2000) 2690-2694
39. S. Gravel, M. Larrivee, P. Labrecque, R.J. Wellinger, Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure, *Science* 280 (1998) 741-744
40. R.M. Polotnianska, J. Li, A.J. Lustig, The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities, *Curr. Biol.* 8 (1998) 831-834.
41. S.H. Chen, M.B. Smolka, H. Zhou, Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 986-995.
42. X. Pan, P. Ye, D.S. Yuan, X.Wang, J.SBader, J.D. Boeke, A DNA integrity network in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*, *Cell* 124 (2006) 1069-1081

43. M.P. Longhese, V. Paciotti, R. Frascini, R. Zaccarini, P. Plevani, G. Lucchini, The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast, *EMBO J.* 16 (1997) 5216-5326.
44. V. Paciotti, G. Lucchini, P. Plevani, M.P. Longhese, Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p, *EMBO J.* 14 (1998) 4199-4209.
45. M.A. de la Torre-Ruiz, C.M. Green, N.F. Lowndes, RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation, *EMBO J.* 17 (1998) 2687-2698.
46. S.W. Chan, E.H. Blackburn, Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining, *Mol. Cell.* 11 (2003) 1379-1387.
47. J.M. Daley, P.L. Palmbo, D. Wu, and T.E. Wilson, Nonhomologous end joining in yeast, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 431-451.
48. D. Brnzei, M. Foiani, The DNA damage response during DNA replication, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6 (2005) 568-75.
49. K.M. Miller, O. Rog, J.P. Cooper. Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1, *Nature* 7085 (2006) 824-828.
50. A.S. Berthiau, K. Yankulov, A. Bah, E. Revardel, P. Luciano, R.J. Wellinger, V. Geli, E. Gilson, Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast, *EMBO J.* 25 (2006) 846-856.
51. T.A. Mochan, M. Venere, R.A. Jr DiTullio, T.D. Halazonetis, 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage, *DNA Repair* 8-9 (2004) 945-952.
52. S.M. Bailey, J.P. Murnane, Telomeres, chromosome instability and cancer, *Nucleic Acids Res.* 8 (2006) 2408-2417.

SECONDA PARTE

EFFETTI DELL'ATTIVAZIONE DEI MECCANISMI DI AMPLIFICAZIONE DEL SUBTELOMERO Y' IN PRESENZA DI UNA TELOMERASI FUNZIONANTE

INTRODUZIONE: Il DNA telomerico è associato a specifiche proteine che distinguono le estremità naturali dei cromosomi eucariotici dal DNA che si produce a seguito di rotture. La telomerasi è una trascrittasi inversa associata ad una componente ad RNA, specializzata nella sintesi del DNA telomerico e responsabile del mantenimento dell'integrità delle estremità cromosomiche (Autexier e Lue 2006). Nella maggior parte delle cellule somatiche di mammifero, la telomerasi è normalmente inibita, e questo causa un progressivo accorciamento dei telomeri, un irreversibile arresto del ciclo cellulare chiamato senescenza ed infine la morte (Lundblad e Szostak, 1989; Finkel *et al.*, 2007). In alcuni casi tuttavia, si assiste ad una riattivazione della telomerasi che rappresenta un passaggio fondamentale verso l'immortalizzazione nella maggior parte dei tumori. In alcune forme tumorali, principalmente sarcomi, osteosarcomi ed astrocitomi, le cellule tumorali recuperano dalla fase di senescenza attivando una via alternativa al mantenimento dei telomeri telomerasi-indipendente (Alternative Lengthening of Telomeres - ALT) (Bryan *et al.*, 1997; Henson *et al.*, 2005). Queste cellule, dette "survivors", insorgono in seguito all'amplificazione, di sequenze telomeriche o subtelomeriche mediata dalla ricombinazione omologa Rad52-dipendente. In *Saccharomyces cerevisiae* i *survivors* utilizzano due distinte vie di ricombinazione ed entrambe richiedono Rad52, la principale proteina nei processi di ricombinazione omologa. La prima classe di *survivors*, detta *Type I*, è dipendente oltre che da Rad52, dall'azione di Rad51 e porta all'amplificazione del subtelomero Y' mentre le regioni delle ripetizioni telomeriche terminali risultano corte. La seconda classe di *survivors* detta *Type II*, è Rad50 dipendente e porta all'amplificazione delle sequenze TG₁₋₃ terminali, senza apparenti riarrangiamenti a livello del subtelomero (Lundblad e Blackburn, 1993; Le *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 1999).

RISULTATI: Come precedentemente evidenziato (Bah *et al.*, 2004; Di Domenico *et al.*, 2009) ceppi di lievito con telomeri umanizzati (HY) presentano una protrusione 3' più lunga rispetto al ceppo selvatico oltre ad un arricchimento della proteina Cdc13 specifica nel riconoscere DNA telomerico a singolo filamento (Alexander e Zakian, 2003). Attraverso un saggio *G-Tail* abbiamo evidenziato che la protrusione-3' nel ceppo HY, pur se più lunga rispetto al ceppo selvatico, viene

regolata durante il ciclo cellulare e raggiunge la massima estensione in G2 mentre è più corta in G1. L'analisi della protrusione-3' ha rivelato che, nella maggior parte dei casi in cellule HY proliferanti, è presente una coda con lunghezza compresa tra 24 e 48 nt. Il successivo studio dei mutanti ha anche rivelato che per la regolazione della protrusione-3' è determinante la presenza della proteina checkpoint Tel1 e che in assenza del gene Rad50, che fa parte del complesso MRX, la regione di DNA telomerico a singolo filamento si riduce notevolmente, quasi a scomparire. Abbiamo inoltre osservato nei ceppi in cui la coda a singolo è più corta anche un accorciamento del telomero rispetto al ceppo di riferimento HY.

Un evento inatteso, osservato in questi ceppi, è l'esistenza di fenomeni di amplificazione del subtelomero Y' pur in presenza di una telomerasi attiva. L'amplificazione del subtelomero Y' è presente nei ceppi HY ed aumenta con il passare delle generazioni; si osserva amplificazione anche nei ceppi HY rad50 ma non nei mutanti rad51 suggerendo che queste cellule hanno le caratteristiche dei *survivors Type I*. Questo fenomeno è abbastanza insolito, perché avviene in presenza di una telomerasi attiva ed in cellule che non sono state interessate da una fase di senescenza. Inoltre, abbiamo evidenziato un ruolo di Tel1 nella regolazione di questo processo. Infatti nei doppi mutanti HY tel1, rad50 e HY tel1 rad51, il fenotipo precedentemente descritto tipico dei *survivors Type I* si inverte suggerendo l'esistenza di un meccanismo di amplificazione del Y' Rad51-indipendente che opera in assenza di Tel1.

L'importanza di Tel1, nel regolare i telomeri umanizzati, è evidenziata dai saggi di immunoprecipitazione della cromatina, che rivelano un arricchimento significativo di questa proteina al telomero umanizzato rispetto al ceppo selvatico.

CONCLUSIONI: L'attivazione dei meccanismi ALT normalmente insorge dopo una fase di senescenza che segue la perdita di attività telomerasica, sia in cellule di lievito che di mammifero (Lendvay *et al.*, 1996). Nei ceppi di lievito con telomeri umanizzati si osserva un'amplificazione del subtelomero Y' anche in presenza di attività telomerasica, suggerendo che questo processo possa essere attivato da una inappropriata regolazione e/o struttura del telomero. La presenza di una coda a singolo filamento più lunga rispetto al ceppo selvatico potrebbe indurre ad ipotizzare un suo ruolo positivo nell'innescare per l'attivazione del processo di ricombinazione ALT; tali meccanismi sono infatti attivati da fattori come Rad51 che potrebbero competere con le proteine che regolano il caricamento della telomerasi come Cdc13 per l'accesso al DNA telomerico a singolo filamento.

MATERIALI E METODI

CEPPI DI LIEVITO

I ceppi di lievito utilizzati in questo lavoro derivano dal diploide C6.1 (TLC1/tlc1-h) (Henning *et al.*, 1998); i ceppi aploidi TLC1 (Y) e tlc1-h (HY) sono stati selezionati tramite PCR come descritto in Brevet *et al.*, 2003. I mutanti HY tel1, HY rad50, HY rad51, i doppi mutanti ed i rispettivi controlli sono stati ottenuti come descritto in Di Domenico *et al.*, 2009. Per tutti gli esperimenti ChIP è stato utilizzato il ceppo HY tel1-HA ottenuto tramite un tag interno con tre epitopi HA come descritto in Sabourin *et al.* 2007.

CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (ChIP)

L'analisi ChIP è stata effettuata come descritto in Alexander e Zakian (2003), la proteina Tel1-3HA è stata immunoprecipitata utilizzando un anticorpo monoclonale α -HA (Santa Cruz) e biglie magnetiche A Dinabeads (Invitrogen). I campioni sono stati analizzati tramite PCR e normalizzati rispetto al DNA presente nella reazione (input); i dati sono espressi come arricchimento rispetto alla quantità di DNA non telomerico (gene endogeno ARO1) immunoprecipitato. I valori sono presentati come la media più o meno la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. Dove applicabile è stato utilizzato un t-test di Student ad una coda per determinare il livello di significatività ($p \leq 0,05$).

ANALISI DELLA CODA A SINGOLO FILAMENTO (G-Tail)

Il DNA genomico a partire da colture sincronizzate è stato digerito con l'enzima di restrizione *XhoI* (New England BioLabs) ed ibridato in condizioni non denaturanti come descritto in Dionne and Wellinger (Dionne e Wellinger, 1996). L'analisi della regione di DNA a singolo filamento è stata effettuata con sonda $(C_3TA_2)_3$. Come controllo negativo il DNA è stato digerito tramite l'enzima *ExoI* (New England BioLabs) dopo la digestione con *XhoI*.

TELOMERIC OLIGONUCLEOTIDE LIGATION ASSAY (t-OLA)

Il t-OLA è stato preparato come descritto in Cimino-Reale *et al.*, 2001, con modifiche minori. In breve, gli oligonucleotidi sono stati fosforilati tramite la T4 polinucleotide chinasi. Una mix composta da 30 μ l contenenti 5 pmol di oligonucleotidi e 50 pmol di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 70 mM Tris, pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM dithiothreitol e 20 unità di T4 polinucleotide chinasi sono stati incubati per 40 minuti a 37°C.

ANALISI DEL CARIOTIPO ELETTROFORETICO

I cromosomi di *S. cerevisiae* sono stati separati tramite **PFGE** (Pulsed Field Gel Electrophoresis) utilizzando l'apparato CHEF MAPPER (BioRad) nelle seguenti condizioni di corsa: 1% agarosio in 0.5X TBE, 6V/cm ad una temperatura di 14°C. La direzione del campo elettrico è variata tra -60° e +60°, rispetto alla direzione di migrazione del DNA, ogni 60 secondi per le prime 15 ore ed ogni 90 secondi per le successive 9 ore.

IBRIDAZIONE SU FILTRO

Il gel, dopo la corsa elettroforetica, è denaturato per 30 min. in 0.5 M NaOH, 0.5 M NaCl e neutralizzato due volte per 30 min. in 0.5 M Tris-HCl pH7.4, 10X SSC. Successivamente il gel è assemblato per il trasferimento in 10X SSC. Dopo 16-18 ore, il filtro viene lavato in 2X SSC e lasciato ad asciugare all'aria per 10 min. Il DNA è fissato al filtro mediante incubazione per 1 ora e mezza in forno ad 80°C. L'ibridazione viene effettuata a 60-65°C in 6X SSC, 0.1% SDS, 1% latte scremato in polvere. Dopo aver aggiunto la sonda radioattiva denaturata, il filtro è incubato per 16-18 ore a 60-65°C e successivamente lavato come segue: due lavaggi di 20-30 min. ciascuno a 45°C in 4X SSC, 0.1% SDS; due lavaggi di 20-30 min. ciascuno in 2X SSC, 0.1% SDS. La marcatura incorporata è rivelata mediante esposizione ad una speciale lastra impressionabile, che viene successivamente letta da un apposito strumento (Phosphorimager, Molecular Dynamics; Typhoon Amersham Pharmacia Biotech). L'immagine che ne risulta è fornita in un formato digitale compatibile con i più comuni programmi grafici. In alternativa il gel viene posto in una cassetta schermata a contatto con una lastra autoradiografica che viene poi sviluppata e fissata con gli opportuni reagenti fotografici.

RISULTATI

LA LUNGHEZZA DELLA REGIONE DEL DNA TELOMERICO A SINGOLO FILAMENTO È REGOLATA DURANTE IL CICLO CELLULARE

La proteina Cdc13 si associa alla protrusione telomerica terminale svolgendo un ruolo di capping e collaborando, insieme a Tel1, al caricamento della telomerasi tra la fase S/G2 (Sabourin *et al.*, 2007). L'attività di sintesi della telomerasi provvede ad aggiungere ripetizioni telomeriche determinando un allungamento della coda a singolo filamento normalmente corta in lievito durante tutto il ciclo cellulare (Lin e Zakian, 1996; Tseng *et al.*, 2006). In un lavoro precedente (Alexander e Zakian, 2003), tramite ChIP, è stato evidenziato un aumento del legame di Cdc13 al

telomero nei ceppi di lievito umanizzati rispetto al ceppo selvatico. In accordo con questo studio, è stata successivamente evidenziata nei ceppi HY la presenza di una protrusione-3' (G-tail) più lunga rispetto al WT in colture asincrone (Bah *et al.*, 2004; Di Domenico *et al.*, 2009).

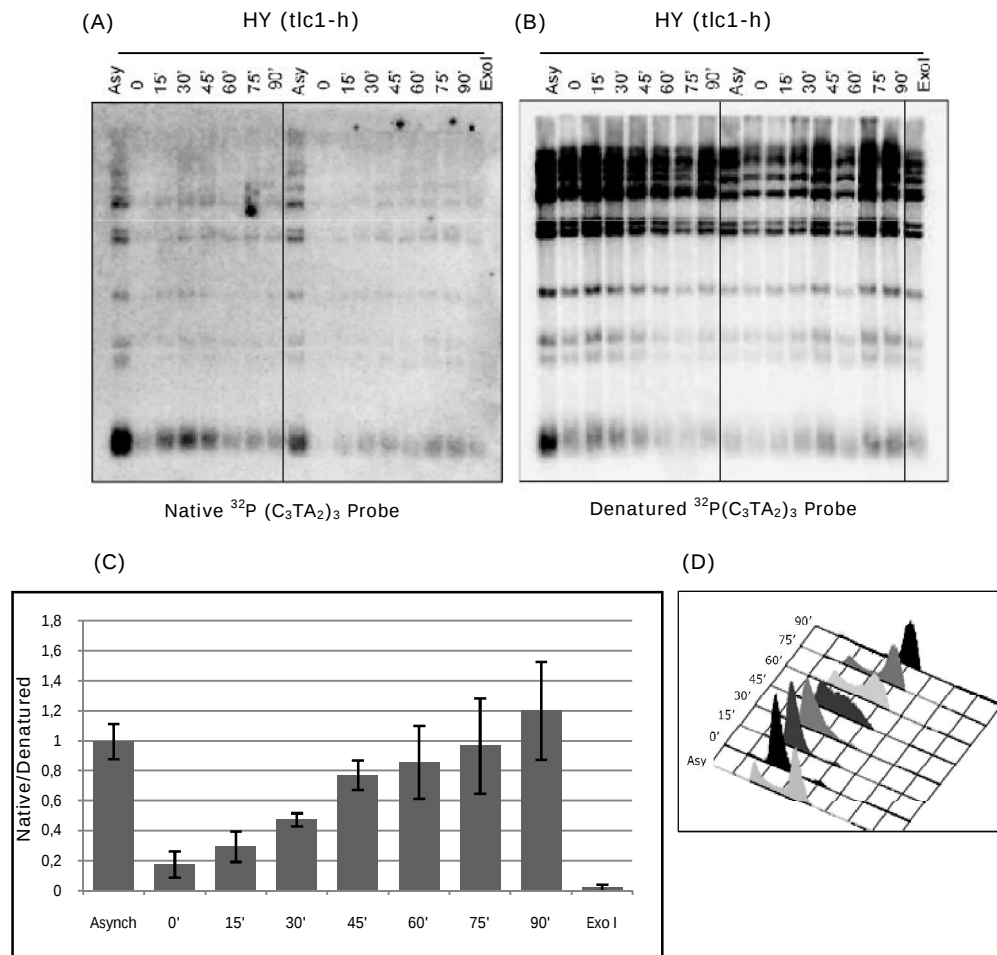


Fig.8: Analisi della protrusione telomerica a singolo filamento nei ceppi di lievito HY che esprimono il gene *Tlc1-h*. I ceppi HY sono stati sincronizzati in G1 tramite α -factor e dopo essere stati rilasciati in terreno di crescita, sono stati effettuati prelievi a distanza di 15 minuti. Il DNA genomico è stato estratto e digerito con *XhoI*; un campione è stato trattato con *Exo I*. (A) Il DNA genomico nel gel Nativo è stato marcato terminalmente con sonda telomerica umana [^{32}P] (C_3TA_2)₃. (B) Il gel mostrato nella figura (A) è stato denaturato e successivamente ibridato con la stessa sonda. (C) Il grafico a barre rappresenta il rapporto tra l'intensità delle bande nella regione telomerica nel gel Nativo verso quello Denaturato. I dati riportati nel grafico fanno riferimento a tre diversi esperimenti. Il valore dell'intensità delle bande è stato ricavato tramite il software Scion Image (Copyright 1997-2005 Scion Corporation). (D) Analisi al FACS del ceppo HY ad intervalli di 15' dopo il rilascio da α -factor.

Per determinare se nei ceppi HY, la protrusione-3', è costitutivamente presente nella sua forma più lunga oppure modulata durante il ciclo cellulare, abbiamo analizzato l'andamento della coda telomerica, tramite un saggio *G-Tail*. A tale scopo, i ceppi di lievito sono stati sincronizzati in G1, utilizzando α -factor, successivamente rilasciati e monitorati a distanza di 15 minuti per un totale di 90 minuti. Ogni campione è stato prima analizzato tramite citofluorimetria, per verificare lo stadio del ciclo cellulare ed in seguito la lunghezza della coda a singolo filamento è stata stimata tramite il rapporto delle intensità di ibridazione tra il gel nativo (Fig.8 A) e quello denaturato (Fig.8 B) con il software Scion Image Quant®. Il controllo negativo, indicato come *ExoI*, è stato ottenuto tramite digestione del DNA genomico del ceppo HY in fase asincrona (Asy), con l'enzima esonucleasi I che rimuove la protrusione-3'. Nella Fig.8 C è rappresentato il grafico risultante dall'analisi quantitativa che riporta la variazione della lunghezza della G-tail durante il ciclo cellulare, nel ceppo HY. La protrusione telomerica a singolo filamento risulta essere estremamente corta durante l'inizio della fase G1 (15'-30') per poi aumentare gradualmente fino ad raggiungere un picco tra la fine della fase S e G2. Questo meccanismo è analogo a quanto osservato in ceppi di lievito selvatici, suggerendo che il meccanismo che regola la lunghezza della G-tail è attivo anche nei ceppi HY.

Rad50 E' INDISPENSABILE PER LA FORMAZIONE DELLA CODA A SINGOLO FILAMENTO

La formazione della protrusione-3' in fase S precoce è indipendente dall'attività della telomerasi sia in lievito che nell'uomo (Frank *et al.*, 2006; Vodenicharov e Wellinger, 2006) ed è dovuta all'attività di un processo esonucleolitico ancora poco chiaro. Un complesso trimetrico altamente conservato chiamato MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) nell'uomo ed MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) in *S. cerevisiae*, è estremamente importante per la generazione della G-tail telomerica (Chai *et al.*, 2006). MRX sembra avere anche un ruolo indiretto nella regolazione del telomero, infatti in ceppi con mutazioni a carico del gene XRS2, non è possibile rilevare l'associazione di Tel1 al telomero e la lunghezza dei telomeri stessi risulta essere ridotta (Shima *et al.*, 2005). Sia il complesso MRX che Tel1 si legano non solo al telomero ma anche ai siti di rottura a doppio filamento del DNA per attivare i meccanismi di riparo e garantire la formazione di una regione a singolo filamento al 3' (Lisby *et al.*, 2004; Shroff *et al.*, 2004). Quando si forma la protrusione, durante l'attivazione dei meccanismi di ricombinazione omologa, il DNA a singolo

filamento viene riconosciuto dal gene RAD51 in grado di operare l'invasione della doppia elica in cerca dell'omologia di sequenza (Krogh e Symington 2004).

Avendo osservato che la protrusione-3', anche se più lunga rispetto al ceppo selvatico, è modulata durante il ciclo cellulare, abbiamo analizzato il ruolo di geni potenzialmente coinvolti in questo processo. In particolare ci siamo concentrati su: ceppi difettivi per il complesso MRX, a seguito della rimozione del gene RAD50; ceppi privi del gene TEL1, poiché è noto che questa chinasi interagisce con il complesso MRX; doppi mutanti *rad50*, *tel1*. Inoltre poiché il DNA a singolo filamento, indipendentemente dal tipo di sequenza, è il sito di legame preferenziale per il gene RAD51 abbiamo anche esaminato i mutanti *rad51* ed i doppi mutanti *rad51*, *tel1*.

Per ottenere una misura della lunghezza della protrusione-3', è stato utilizzato il *telomeric-Oligonucleotide Ligation Assay* (t-OLA) la cui sensibilità e specificità è stata largamente dimostrata in lavori precedenti (Cimino-Reale *et al.*, 2001; 2003). Questa tecnica consente di misurare la lunghezza della protrusione telomerica attraverso l'uso di corti primers di 12 nucleotidi, disegnati per ibridare nell'esatta giustapposizione, la sequenza di DNA bersaglio ed uniti tramite DNA ligasi. Per ottenere la completezza della reazione vengono anche aggiunti, in una fase successiva, primers da 6 nucleotidi per colmare gli eventuali spazi che potrebbero rimanere durante il processo di appaiamento al DNA telomerico. Successivamente l'estensione della protrusione-3' viene calcolata in base alla lunghezza e quindi al numero di primers legati al telomero, mediante elettroforesi su gel di acrilamide.

Per incrementare e validare le informazioni relative al t-OLA viene utilizzato il saggio di ibridazione in liquido (Fig.9 E). Il segnale d'ibridazione totale, che rappresenta la quantità complessiva di protrusione-3', normalizzato rispetto alla quantità di DNA caricata su gel permette l'analisi quantitativa della protrusione-3'.

Come esperimento preliminare è stato utilizzato un ceppo di lievito (W303) con telomeri canonici per verificare la specificità della reazione ed il ceppo HY a diverse concentrazioni di DNA, per analizzare la linearità del segnale d'ibridazione rispetto alla quantità di DNA (Fig.9 A). In Fig.9 A si può notare che il segnale d'ibridazione è totalmente assente nei ceppi W303, poiché i primers utilizzati sono specifici per la sequenza del telomero di mammifero. Al contrario, il segnale è presente nei ceppi HY come bande discrete che rappresentano la distribuzione della lunghezza della protrusione-3' (Fig.9 A). Il campione digerito con l'esonucleasi I (ExoI) non presenta alcun segnale dimostrando che l'ibridazione ottenuta è riconducibile alla presenza di una protrusione telomerica.

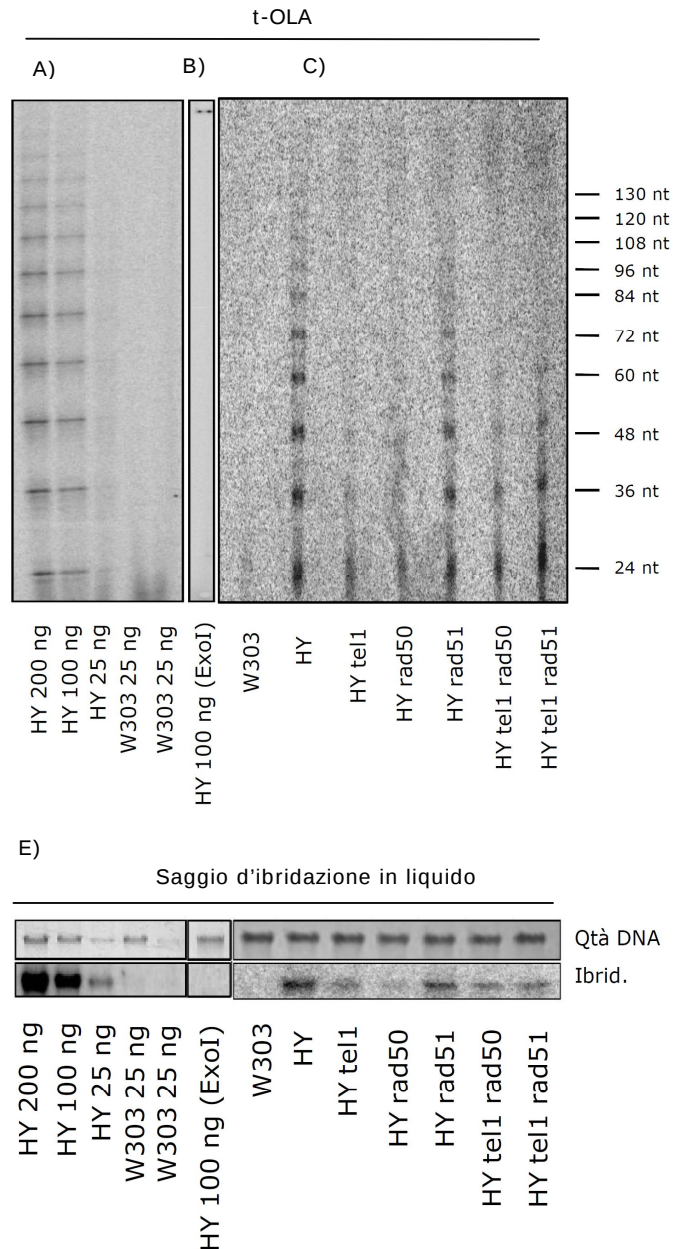


Fig. 9: Analisi della regione di DNA telomerico a singolo filamento tramite t-OLA: A) prodotti di t-OLA su gel denaturante di acrilamide con sonda (AATCCC)₂, nel ceppo di controllo W303 e del ceppo HY. B) Come controllo negativo sono stati utilizzati 200 ng del DNA del ceppo HY, digeriti con l'esonucleasi I (ExoI) prima dell'analisi. C) Prodotti di t-OLA ottenuti sui ceppi HY, HY tel1; HY rad51; HY rad50; HY tel1, rad50; HY tel1, rad51; oltre al controllo negativo W303, con sonda (AATCCC)₂. I ceppi sono stati sincronizzati in G2 tramite nocodazolo. (E) Saggio d'ibridazione in liquido: validazione dei risultati ottenuti tramite t-OLA. La stessa quantità di DNA utilizzato per il t-OLA è stato caricato su gel d'agarosio 1% e colorato con Bromuro d'Etidio per stimare la quantità totale di DNA utilizzata nella reazione. Il gel è stato successivamente essiccato, trasferito su membrana di nylon (Stratagene) ed esposto su pellicola autoradiografica. La quantità totale della protrusione-3' per ogni campione è stata ricavata normalizzando il segnale d'ibridazione rispetto alla quantità di DNA caricato su gel d'agarosio. Le immagini sono state analizzate tramite il software Scion Image (Copyright 1997-2005 Scion Corporation).

La lunghezza della protrusione-3', stimata tramite t-OLA, è stata ottenuta nel ceppo HY e nei mutanti HY tel1; HY rad50; HY rad51; HY tel1, rad50 e HY tel1, rad51 (Fig.9 C) a partire da cellule bloccate in G2 tramite nocodazolo. La scelta di bloccare le cellule in G2 è motivata dal fatto che la lunghezza della coda è modulata durante il ciclo cellulare ed è massima nella fase G2, quindi soltanto utilizzando cellule sincronizzate possiamo ottenere dei risultati confrontabili. Come controllo della distribuzione della lunghezza della coda telomerica è stato utilizzato il saggio d'ibridazione in liquido. Il saggio d'ibridazione in liquido conferma che l'intensità dell'ibridazione è proporzionale alla quantità di DNA presente nella reazione (Fig.9 E, HY 200-25 ng), è specifica per telomeri umani (Fig.9 E, cfr HY/W303) e dipende dalla presenza di una coda 3' (Fig.9 E, ExoI)

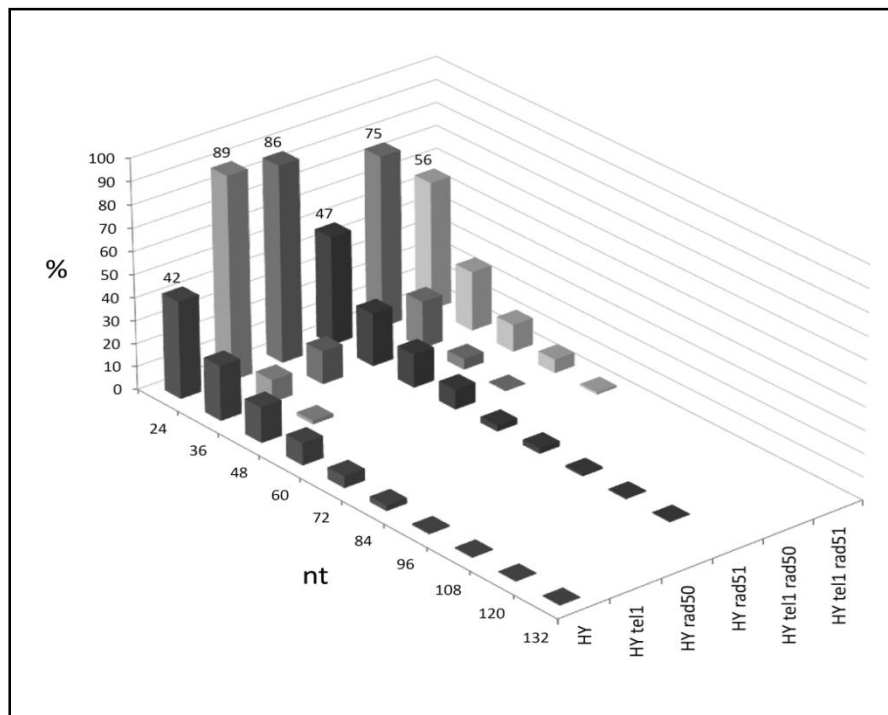


Fig. 10: Analisi dei prodotti di t-OLA di Fig.9, ricavati tramite il software Scion Image (Copyright 1997-2005 Scion Corporation), relativi all'intensità delle singole bande di ibridazione. Il grafico rappresenta la distribuzione percentuale dei valori della lunghezza della protrusione-3'.

La lunghezza della protrusione-3' è riportata come una distribuzione percentuale di prodotti a partire da 24 nt fino circa 132 nt (Fig.10 A). In tutti i campioni esaminati la protrusione-3' di 24 nt (corrispondente a 2 primers legati tra loro), è la più rappresentata. Per il ceppo HY la coda di 24 nt rappresenta circa il 40% del segnale totale d'ibridazione e questa, anche se con una bassa frequenza (meno dell'1%), si estende fino a 132 nt. Nel ceppo HY rad51 i valori relativi alla protrusione-3' sono simili a quelli appena descritti per il ceppo HY, infatti

osserviamo che nel 47% è presente una coda di 24 nt, che arriva fino a 120 nt in una percentuale intorno all'1% della popolazione. Nei mutanti HY tel1 invece, la protrusione-3' di 24 nt rappresenta l'89% con un estensione massima di 48 nt, mentre nel mutante HY rad50 la coda telomerica pari a 24 nt rappresenta l'86% del segnale totale con una lunghezza massima che non supera i 36 nt. Il doppio mutante HY tel1, rad50 mostra protrusioni telomeriche più lunghe sia rispetto ad HY tel1 che ad HY rad50; il doppio mutante HY tel1 rad51 presenta un fenotipo intermedio rispetto ai singoli mutanti mostrando infatti, protrusioni più lunghe rispetto al ceppo HY tel1 ma più corte del mutante HY rad51 (Fig.10).

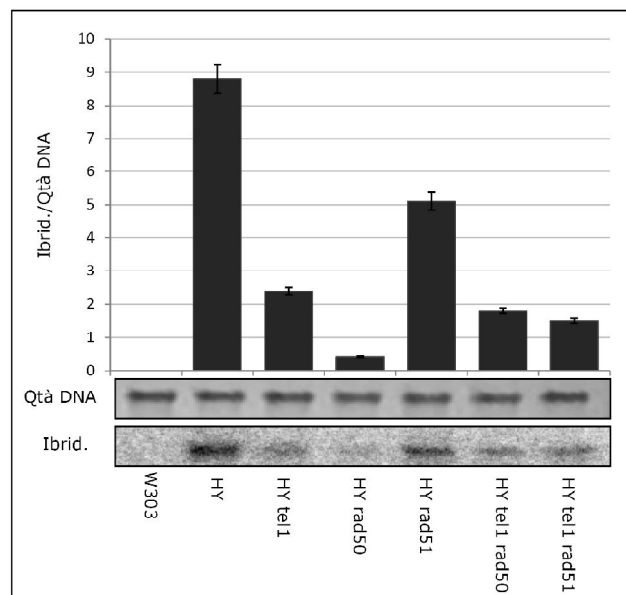


Fig. 11: Segnale totale di ibridazione relativo alla protrusione-3'. I valori sono stati ottenuti tramite software Scion Image (Copyright 1997-2005 Scion Corporation) normalizzando il livello d'ibridazione totale e la quantità di DNA. Il ceppo HY è stato preso come riferimento. I dati si riferiscono a tre diversi esperimenti effettuati su cellule sincronizzate in G2.

In aggiunta all'analisi della lunghezza della protrusione-3' mediante t-OLA, è stato analizzato il grado d'ibridazione totale della sonda complementare alla protrusione a singolo filamento tramite il saggio di ibridazione in liquido. Questi dati, normalizzati per la quantità di DNA genomico presente nella reazione, forniscono una stima complessiva della presenza di protrusione telomerica. I risultati ottenuti tramite questa analisi dimostrano che i ceppi HY ed HY rad51 mostrano i maggiori livelli di ibridazione rispetto agli altri ceppi, a conferma di quanto precedentemente osservato con il t-OLA. Il ceppo HY rad50 mostra un segnale d'ibridazione estremamente debole, mentre il ceppo HY tel1 ed i relativi doppi mutanti HY tel1,

rad50 ed HY tel1, rad51 evidenziano livelli d'ibridazione simili tra loro ed intermedi rispetto ad HY e HY rad50 (Fig.11).

LA TELOMERASI E' ATTIVA E COESISTE CON L'AMPLIFICAZIONE DEL SUBTELOMERO Y'

Dalle analisi di sequenziamento è emerso che la telomerasi umanizzata funziona ed aggiunge ripetizioni telomeriche di mammifero all'estremità dei telomeri di lievito. Anche se questi telomeri risultano essere di lunghezza inferiore rispetto a quelli selvatici vengono propagati e mantenuti correttamente anche per molte generazioni (~ 1000) (Di Domenico *et al.*, 2009) e la protrusione-3', anche se più lunga rispetto ad un telomero canonico, sembra essere regolata. Inoltre abbiamo osservato che mutanti rad50 presentano una coda estremamente corta rispetto al ceppo parentale HY. Al fine di analizzare l'effetto delle diverse lunghezze della G-Tail sull'estensione del telomero abbiamo effettuato una serie di *Telo-Blot*, utilizzando la sonda telomerica $(C_3TA_2)_3/(G_3TA_2)_3$. Poiché nei ceppi umanizzati è stata osservata la fosforilazione di Rad53 (Di Domenico *et al.*, 2009) e questo evento, in ceppi selvatici, è stato associato anche a fenomeni ALT (*Type I*) (Lin *et al.*, 2009), gli stessi campioni sono stati ibridati con una sonda specifica per analizzare l'amplificazione del subtelomero Y'. In questi esperimenti il DNA genomico viene digerito con l'enzima di restrizione *XhoI* che taglia, in cromosomi con telomeri Y', frammenti terminali compresi tra 1-1.3 kb. L'elemento subtelomerico Y' di 5,2 o 6,7 kb di lunghezza si trova, in circa due terzi dei telomeri (Fig.12 A). Il DNA ristretto con *XhoI*, viene prima ibridato con la sonda telomerica e successivamente, dopo aver rimosso dal filtro la sonda, ibridato nuovamente con la sonda subtelomerica. Dall'immagine radiografica in Fig.12 B sono riconoscibili i frammenti telomerici come bande diffuse nella regione compresa tra 1-1.3 Kb. La successiva ibridazione con la sonda subtelomerica evidenzia in aggiunta ai frammenti terminali, i frammenti del subtelomero Y'. Nel primo pannello in Fig.12 B si può notare che tutti i ceppi HY mantengono i telomeri umanizzati come dimostrato dal segnale d'ibridazione con la sonda telomerica e che la loro lunghezza rimane costante con il passare delle generazioni (P_{10} , P_{35} , P_{50}). Analogamente al ceppo con telomeri canonici (W303) privo del gene rad50 anche i ceppi HY rad50 presentano dei telomeri estremamente corti (Fig. 12 B – Box rosso). Comportamento opposto si osserva nei ceppi HY rad51 nei quali il telomero si allunga e supera la lunghezza del ceppo parentale HY tanto da essere paragonabile a quella del ceppo di *S. cerevisiae* selvatico anche se risulta più eterogeneo (Fig.10 B, linee rosse). Tale fenomeno è tipico del ceppo umanizzato e

non si riscontra nel corrispondente mutante (W303 rad51) con telomeri canonici (Fig.12 B pannello destro). Come atteso il profilo d'ibridazione ottenuto con la sonda Y' è analogo a quello ottenuto con la sonda telomerica per quanto riguarda i frammenti terminali. I frammenti subtelomerici mostrano invece un graduale aumento di ibridazione del subtelomero Y' nei ceppi HY con il progredire delle generazioni.

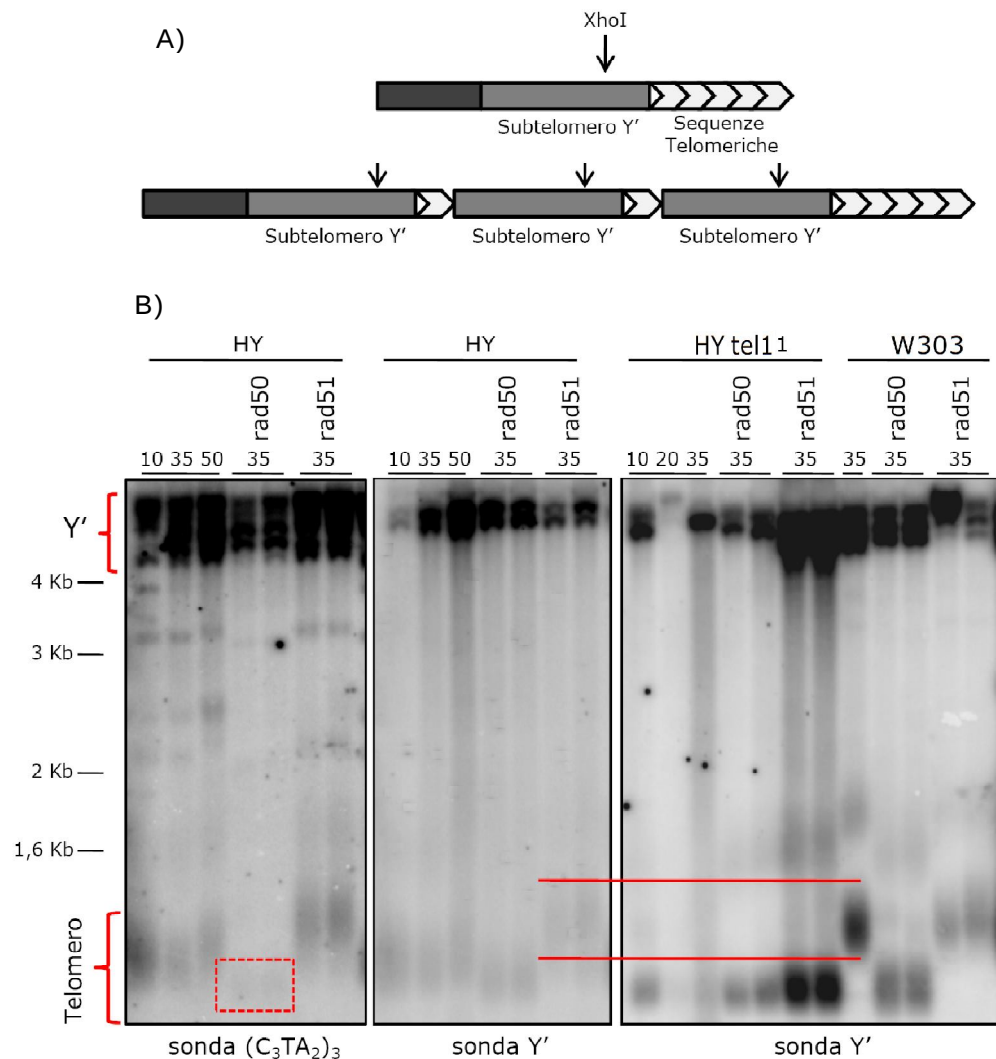


Fig. 12: A) Rappresentazione schematica del telomero di lievito umanizzato e della regione del subtelomero Y'. B) Primo pannello: analisi autoradiografica dell'ibridazione con la sonda T_2AG_3 . Secondo pannello: analisi autoradiografica dell'ibridazione con la sonda subtelomerica Y' sui ceppi HY, a diversi passaggi su piastra (P₁₀, P₃₅, P₅₀) e sui ceppi HY rad50 (P₃₅), HY rad51 (P₃₅). Terzo pannello: ibridazione con la sonda subtelomerica Y' sui ceppi HY tel1 (P₁₀, P₂₀, P₃₅), HY tel1, rad50 HY tel1, rad51 oltre ai ceppi W303 di controllo. La parentesi nella parte superiore della figura (Y') ed in quella inferiore (Telomere) rappresentano rispettivamente la regione del subtelomero Y' ed i frammenti telomerici terminali che si ottengono dopo digestione del DNA genomico con l'enzima di restrizione *XhoI*. Con il quadrato tratteggiato in rosso sono indicati i telomeri del ceppo HY rad50 mentre tra le due linee rosse sono indicati i telomeri del ceppo HY rad51 in relazione a quelli del ceppo selvatico di controllo.

Anche nei mutanti HY rad50 è possibile osservare un elevato livello d'ibridazione del subtelomero mentre, il ceppo HY rad51 a parità di passaggi su piastra mostra bande di ibridazione per il subtelomero Y' di minore intensità rispetto agli altri ceppi. Questi risultati suggeriscono che i ceppi HY vanno incontro ad un processo di amplificazione del subtelomero Y', pur essendo caratterizzati dalla presenza di una telomerasi attiva. E' importante ricordare che, l'analisi delle sequenze telomeriche di ceppi HY (Di Domenico *et al.*, 2009), la formazione di un telomero solo vertebrato (Brevert *et al.*, 2003; Alexander e Zakian 2003) e l'analisi di vitalità dei ceppi in assenza di Rad52 (Alexander e Zakian 2003) dimostrano la presenza di una telomerasi attiva nei ceppi HY.

Nel terzo pannello della Fig.12 B sono riportati i ceppi HY tel1 ed i doppi mutanti HY tel1, rad50 e HY tel1, rad51. Analogamente a quanto ampiamente dimostrato per i ceppi di lievito con telomeri canonici, i telomeri in assenza di Tel1 sono più corti. I primi tre campioni corrispondono al ceppo HY tel1 a diversi passaggi su piastra che presentano telomeri più corti rispetto al ceppo parentale HY, tuttavia la lunghezza di questi telomeri si mantiene inalterata per 35 passaggi su piastra (~700 generazioni). La presenza di telomeri più corti è evidente anche nei doppi mutanti a suggerire un effetto dominante di Tel1 nella regolazione delle estremità cromosomiche. Per quanto riguarda l'amplificazione del subtelomero Y' nel ceppo HY tel1 sembra essere inferiore rispetto a quella del ceppo HY agli stessi passaggi su piastra mentre abbiamo osservato un fenotipo totalmente inatteso nei doppi mutanti HY tel1, rad50 e HY tel1, rad51. In questi ceppi osserviamo che l'assenza di Tel1 determina una inversione dello schema di amplificazione precedentemente osservato nei singoli mutanti. Nel ceppo HY tel1, rad50 infatti il segnale di amplificazione del subtelomero Y' è debole mentre risulta essere molto intenso nei ceppi HY tel1, rad51. Questo risultato è inatteso in quanto, non è stato descritto un processo di amplificazione del subtelomero Y' Rad51-indipendente.

Come ulteriore analisi abbiamo effettuato uno studio del cariotipo elettroforetico ibridando i cromosomi con la stessa sonda Y' utilizzata nel *Telo-Blot*. Sono stati utilizzati tre differenti sub-cloni per ogni ceppo in aggiunta al ceppo di riferimento W303 (Fig.13). Come atteso, tutti i sub-cloni del ceppo HY tel1, rad51 presentano un alterato cariotipo elettroforetico ed un forte segnale d'ibridazione con la sonda Y' (Fig.13). Al contrario il doppio mutante HY tel1, rad50 non mostra alterazioni del profilo elettroforetico sia nell'immagine del gel colorato con bromuro d'etidio (Fig.13 pannello di sinistra) sia nell'immagine radiografica risultante dall'ibridazione con sonda Y' (Fig.13 pannello di destra).

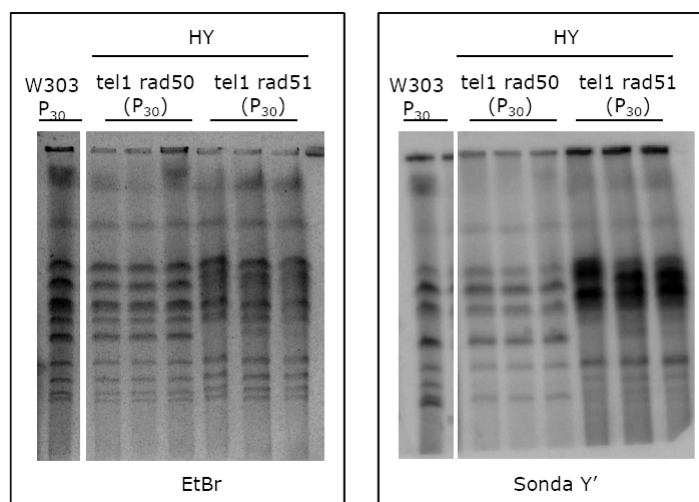
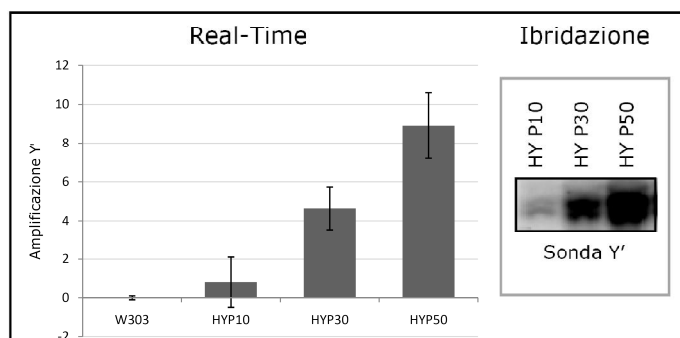


Fig.13: Analisi del cariotipo elettroforetico dei ceppi HY tel1, rad50 e HY tel1 rad51 tramite Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Il ceppo W303 è utilizzato come controllo negativo.

Per confermare questi risultati ed ottenere un valore quantitativo di amplificazione del subtelomero Y' abbiamo determinato il numero relativo di copie di Y' mediante Real-Time PCR normalizzando i valori ottenuti per il gene endogeno dell'actina ed utilizzando come calibratore il ceppo selvatico W303. Dopo aver settato i parametri per la Real-Time PCR mediante costruzione delle curve di calibrazione per Y' e per l'actina, è stato effettuato il monitoraggio del numero di copie di Y' in ceppi HY a diversi passaggi su piastra. In Fig.14 A è riportata l'analisi effettuata su HY P10, P30 e P50 dove P rappresenta il numero di passaggi su piastra (P1 = 20 generazioni). Come si nota nel grafico in Fig.14 A il numero di copie del subtelomero Y' aumentano progressivamente al passare delle generazioni fino ad arrivare, dopo 50 passaggi su piastra (~1000 generazioni) a circa 9 volte il livello del ceppo di riferimento. E' interessante notare che i livelli di Y' a P10 sono molto simili a quelli del ceppo di riferimento. Questo risultato è in accordo con il dato ottenuto mediante ibridazione come mostrato nel riquadro di Fig.14 A. Successivamente abbiamo analizzato i seguenti ceppi tutti propagati per 30 passaggi su piastra (P30): HY tel1; HY rad50; HY rad51; HY tel1 rad50; ed HY tel1 rad51 (Fig.14 B). Il ceppo HY tel1 mostra livelli di amplificazione inferiori rispetto da quelli osservati nel ceppo parentale allo stesso passaggio su piastra anche se questa riduzione non è significativa. Al contrario, la riduzione dell'amplificazione del subtelomero Y' che si osserva nel mutante HY rad51 risulta essere significativa se confrontata con il livello di amplificazione del ceppo HY. Un altro dato che emerge da questo studio è l'elevato livello di amplificazione osservato nel ceppo HY rad50, significativamente maggiore rispetto ad HY.

A)



B)

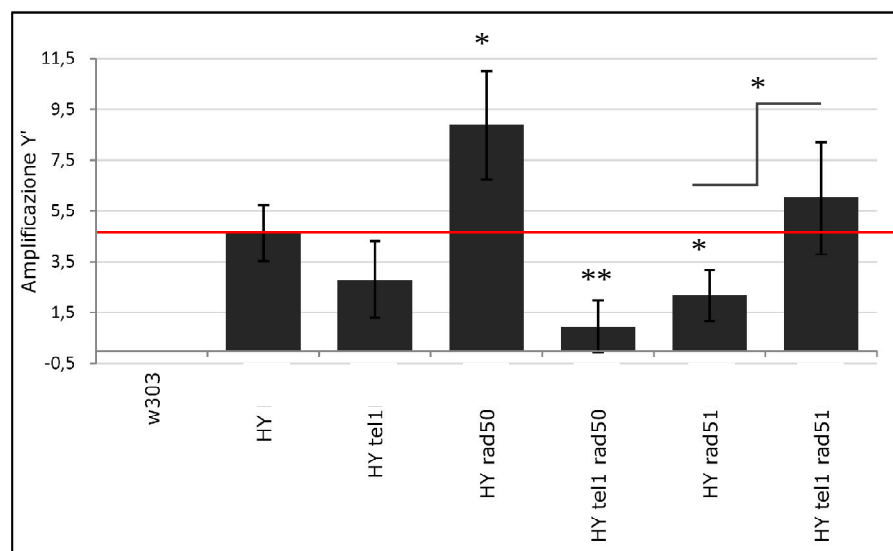


Fig. 24: Real Time PCR per l'analisi dell'amplificazione del subtelomero Y'. A) Pannello di sinistra: Real-Time sui ceppi HY (P₁₀, P₃₀, P₅₀); pannello di destra: ibridazione con sonda Y' utilizzando gli stessi campioni del ceppo con telomeri umanizzati, analizzati tramite Real-Time. B) Nel grafico sono rappresentati i valori relativi all'amplificazione del subtelomero Y'. L'asterisco indica i livelli di significatività: * significativo ($p < 0,05$); ** altamente significativo ($p < 0,01$). I dati fanno riferimenti a 5 esperimenti indipendenti. La linea rossa indica il livello di amplificazione del subtelomero Y' nel ceppo HY P₃₀ utilizzato come riferimento.

Anche se in presenza di alcune differenze rispetto ai survivors canonici come la presenza della telomerasi e l'assenza di una fase di senescenza, il meccanismo che regola l'amplificazione del subtelomero Y' in questi ceppi sembra riflettere quello classico dei *Type I* Rad51-dipendente. Questo meccanismo, che richiede la presenza di Rad51 per l'amplificazione del subtelomero Y', scompare nel mutante HY rad51 ma non nel doppio mutante HY tel1, rad51. Al contrario, i livelli elevati di amplificazione dell'Y' osservati nel ceppo HY rad50 diventano estremamente bassi nel ceppo HY tel1, rad50. Questi risultati lasciano ipotizzare che: 1) l'amplificazione

del subtelomero Y' rad51 dipendente richiede Tel1. 2) In assenza di Tel1 esiste un meccanismo di amplificazione del subtelomero Y' nuovo, che non richiede l'attività di Rad51.

I dati fin qui mostrano che nei ceppi HY l'amplificazione del subtelomero Y' è indipendente dalla lunghezza del telomero e dall'attività della telomerasi. La lunghezza della protrusione-3' sembra influire sull'estensione del telomero in quanto i ceppi in cui la protrusione è più corta mostrano anche una riduzione della lunghezza dei telomeri. Tuttavia la lunghezza della protrusione-3' non sembra essere direttamente collegata con il meccanismo di amplificazione Y' (Tabella 1).

Ceppo	Lunghezza telomero	Protrusione-3'	Amplificazione Y'
HY	**	***	***
HY tel1	*	**	**
HY rad50	*	*	***
HY rad51	***	***	*
HY tel1 rad50	*	**	*
HY tel1 rad51	*	**	***

Tabella 1: schema riassuntivo relativo delle diverse caratteristiche osservate nei ceppi HY in questo studio a P30, (***) elevata, (**) media, (*) corta

NEI CEPPI RAD52 NON SI OSSERVANO FENOMENI DI AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE SUBTELOMERICA Y'

Abbiamo precedentemente documentato che l'insorgenza dei survivors di *Type I* non canonici, nei ceppi umanizzati, avviene in presenza di attività telomerasica. Questo suggerisce che l'amplificazione del subtelomero Y' è causata, non da una mancata attività telomerasica, ma più probabilmente da alterazioni nella funzione di capping del telomero che normalmente bloccano i fenomeni di ricombinazione omologa (Grandin *et al.*, 2001). Se questo è vero ci aspettiamo che la rimozione di Rad52, che regola tutti gli eventi di ricombinazione omologa, non porti a morte cellulare, come osservato nei lieviti privi di attività telomerasica, ma impedisca soltanto il processo di amplificazione. A questo scopo abbiamo costruito il mutante HY rad52, fatto crescere su YPD per circa 600 generazioni (P30) e analizzato tramite *Telo-Blot* per monitorare i livelli di amplificazione del subtelomero Y' (Fig.15).

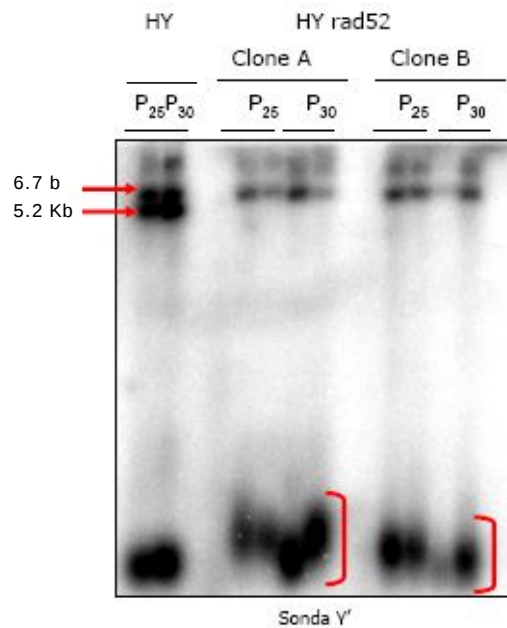


Fig.15: Analisi autoradiografia dell'ibridazione con la sonda subtelomerica Y'. I ceppi sono stati analizzati a 25 e 30 passaggi su piastra. La parentesi indica i frammenti telomerici terminali; le frecce puntano sui frammenti subtelomerici Y'. Per il ceppo HY rad52 sono stati analizzati due cloni (A e B).

Tutti i ceppi rad52 prodotti si sono dimostrati vitali oltre 30 passaggi su piastra senza mostrare fenomeni di senescenza. I cloni sono stati analizzati rispettivamente a P25 e P30, quando normalmente nei ceppi HY inizia ad emergere chiaramente l'amplificazione dell'elemento Y'. Il loro profilo d'ibridazione non mostra le variazioni del subtelomero Y' tipiche dei survivors *Type I*, tuttavia si osserva una maggiore variabilità clonale, con telomeri leggermente più lunghi, rispetto al rispetto al parentale HY (Fig. 15). L'assenza di fenomeni di senescenza e di amplificazione dell'elemento Y' dimostra che in questi ceppi i telomeri vengono mantenuti attraverso l'attività della telomerasi e non è richiesta l'attivazione dei meccanismi ALT.

I CEPPI HY PRESENTANO UNA ALTERATA CAPACITA' DI RIPARO DELLE ROTTURE DEL DNA A DOPPIO FILAMENTO

E' stato dimostrato che i ceppi di lievito umanizzato soffrono dell'attivazione di Rad53 che rappresenta il principale sensore di danno al DNA (Di Domenico *et al.*, 2009). Inoltre è stato osservato, che questi ceppi vanno incontro ad amplificazione dell'subtelomero Y' pur in presenza della telomerasi. Poiché l'amplificazione del Y' è un fenomeno che dipende dall'attivazione della ricombinazione omologa a carico delle regioni telomeriche e subtelomeriche, ci siamo chiesti se in questi ceppi fossero presenti delle anomalie nei meccanismi di ricombinazione omologa tali da

spiegare questi fenomeni. Se ciò fosse vero ci aspettiamo un cambiamento della sensibilità ad agenti genotossici che causano danni al DNA. Le rotture del DNA a doppio filamento (Double Strand Breaks – DSB) rappresentano la principale lesione citotossica causata dalla Fleomicina e vengono preferenzialmente riparate attraverso la ricombinazione omologa (Haber, 2000). Per questo abbiamo allestito dei saggi di resistenza alla fleomicina ed abbiamo analizzato la crescita di mutanti nei geni RAD50, RAD51 e TEL1.

I saggi di sopravvivenza alla fleomicina sono stati ripetuti in triplicato e condotti come segue:

- Per ogni ceppo studiato sono state allestite colture da 5 ml coltivate in agitazione a 30° per tutta la notte. Il giorno seguente, è stata misurata la densità ottica (OD) a 600nm e tutte le colture portate ad un pari a 0.5 ($\approx 1 \times 10^7$ cellule/ml) in un volume di 1 ml; sono state quindi rimesse in crescita per due ore. Questa procedura ci ha permesso di avere colture nella fase di crescita esponenziale.
- E' stato misurato nuovamente l'OD₆₀₀ (tutte le colture risultavano avere OD simili) ed abbiamo allestito quattro diluizioni decimali seriali
- Infine abbiamo posto 5 µl di ogni diluizione su piastre di terreno completo (YPD) e su piastre di YPD con aggiunta di fleomicina (0,5 µg/ml). Le piastre sono state incubate a 30° per due giorni e fotografate con il software Kodak 1D Image Analysis.

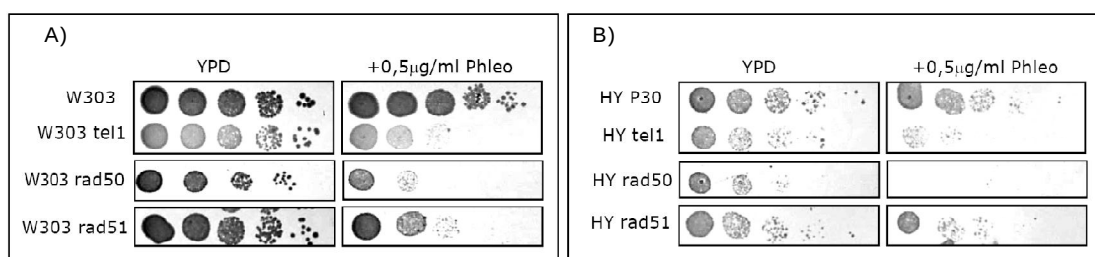


Fig.15 A) Singoli mutanti del ceppo selvatico dopo due giorni di incubazione a 30°C. B) Foto delle piastre dei singoli mutanti del ceppo con telomeri umanizzati dopo due giorni di incubazione a 30°C.

Analizzando le piastre YPD senza fleomicina, dopo due giorni di incubazione (Fig.15 A-B) abbiamo osservato una vitalità inferiore dei i ceppi HY rispetto ai corrispondenti ceppi con telomeri selvatici. L'inattivazione di TEL1 non provoca una sensibile riduzione della crescita nel ceppo W303 mentre è più evidente la ridotta crescita nei ceppi HY. La rimozione del gene RAD50 determina una riduzione della crescita in W303, mentre la rimozione di RAD51 sembra non influire. Analogamente nel ceppo HY la crescita dei mutanti rad50 è ridotta rispetto al

parentale mentre non lo è quella di rad51. Questi risultati confermano il ruolo importante di RAD50 nella vitalità di *S. cerevisiae* ed inoltre evidenziano un ruolo di TEL1 nella crescita del lievito con telomeri umanizzati.

Per quanto riguarda il comportamento dei doppi mutanti (Fig.16) abbiamo osservato che l'eliminazione di TEL1 determina un recupero della ridotta vitalità del ceppo W303 rad50, mentre la vitalità del ceppo W303 rad51 tel1 non è diversa da quella dei rispettivi singoli mutanti. Analogamente il doppio mutante HY tel1 rad50 ha una vitalità maggiore dei rispettivi singoli mutanti mentre, diversamente da W303, il ceppo HY tel1 rad51 mostra un recupero rispetto ai singoli mutanti seppure in misura minore. Questi risultati suggeriscono che, indipendentemente dal tipo di telomeri, i ceppi di lievito sono dipendenti per la vitalità da Rad50 e quindi dal complesso MRX, e che tale dipendenza è regolata dalla presenza di Tel1. La dipendenza da Rad51 è invece assente nel W303 mentre è rivelabile nel ceppo HY.

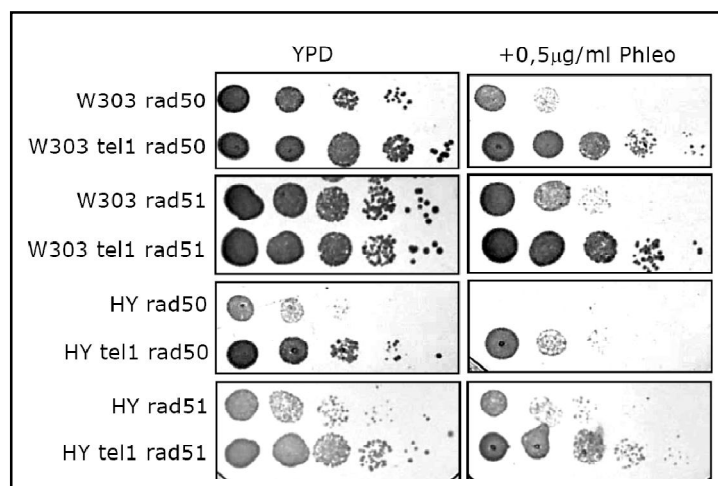


Fig.16 Doppi mutanti su piastre di YPD (parte sinistra) e su YPD con fleomicina (parte destra) dopo due giorni di incubazione a 30°.

La vitalità dei doppi mutanti in presenza di fleomicina ha evidenziato un fenomeno inatteso, ovvero il recupero della sopravvivenza rispetto ai singoli mutanti. Tale fenomeno è stato riscontrato sia nei ceppi W303 che in quelli HY. In particolare possiamo osservare che in assenza di TEL1 sia il ceppo W303 rad50 che W303 rad51 recuperano vitalità suggerendo un ruolo chiave di questo checkpoint nel regolare l'attivazione dei meccanismi di riparo del DNA indipendentemente dalla struttura del telomero. Lo stesso recupero di sopravvivenza è stato osservato anche nei ceppi HY. In particolare, come evidenziato dai precedenti saggi di amplificazione del subtelomero Y', nei ceppi umanizzati questo recupero di vitalità

è anche associato all'attivazione di un meccanismo di ricombinazione omologa Rad51-indipendente, controllato da Tel1.

I risultati degli esperimenti di crescita su fleomicina hanno messo in evidenza una compromessa capacità del ceppo HY, rispetto al selvatico, di riparare i danni al DNA. Nei ceppi HY oltre alla fosforilazione di Rad53 è stata osservata anche l'attivazione dei meccanismi di ricombinazione omologa Rad51-dipendenti che causano l'amplificazione del subtelomeroY'. Questo porta ad ipotizzare che la presenza di proteine che mediano la ricombinazione al telomero le rende meno disponibili per il riparo delle rotture al DNA in altre regioni del genoma. Infatti la ridotta vitalità del ceppo HY rad50 su fleomicina potrebbe essere dovuta ad un maggiore reclutamento Rad51 al telomero che risulta così meno disponibile nei siti di danno al DNA che si formano a seguito dell'esposizione alla fleomicina. L'altro elemento messo in luce attraverso questi saggi è il recupero di vitalità in assenza di Tel1p che suggerisce un ruolo chiave di questo checkpoint nel regolare l'attivazione dei meccanismi di riparo del DNA indipendentemente dalla struttura del telomero.

L'ASSOCIAZIONE DI Tel1 AUMENTA IN CEPPI DI LIEVITO CON TELOMERI UMANIZZATI

In *S. cerevisiae*, la chinasi Tel1 è necessaria al mantenimento della lunghezza dei telomeri (Mallory e Petes, 2000) telomerasi dipendente (Goudsouzian *et al.*, 2006; Sabourin *et al.*, 2007). Tel1 interagisce con il complesso MRX e successivamente fosforila Cdc13. Una volta che Cdc13 viene attivato si associa al DNA telomerico a singolo filamento e favorisce il caricamento della telomerasi tramite il legame con Est1 (Tseng *et al.*, 2006). Saggi ChIP, hanno evidenziato che Tel1 ha un picco di associazione al telomero tra la fase S/G2 (Sabourin *et al.*, 2007). Sempre tramite ChIP è stato osservato un incremento di Cdc13 al telomero di ceppi umanizzati, probabilmente a causa della protrusione 3' più lunga (Alexander e Zakian, 2003).

Anche nei ceppi di lievito umanizzati Tel1 sembra avere un ruolo chiave come regolatore della lunghezza dei telomeri. Ceppi HY tel1 presentano telomeri più corti (Fig.10 B), rispetto al ceppo di riferimento HY ed in oltre, in questo lavoro, abbiamo evidenziato anche un coinvolgimento di Tel1 nella regolazione dei processi di ricombinazione omologa e nei meccanismi alternativi di mantenimento del telomero (ALT).

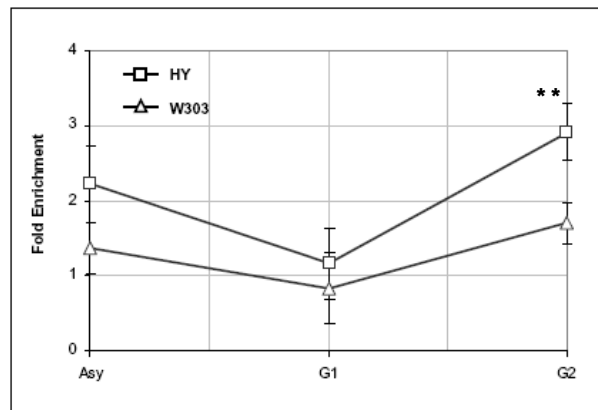


Fig. 15: Il ceppo HY Tel1HA ed il suo controllo W303 Tel1HA sono stati sincronizzati in fase G1 tramite α -factor ed in G2 con Nocodazolo per analisi ChIP. La barra d'errore indica la deviazione standard fornita per ogni punto ed ogni valore fa riferimento a tre esperimenti indipendenti. Il simbolo (**) per i valori ottenuti in G2 indica il p value altamente significativo ($p=0,0056$).

Per poter seguire il legame di Tel1 al telomero nei ceppi umanizzati, è stato allestito un esperimento di ChIP. Il Tag per Tel1 è stato preparato come descritto in Sabourin *et al.* (2007), ed i campioni sono stati analizzati nella fase di crescita esponenziale in colture asincrone ed in colture sincronizzate in G1 ed in G2, sia nel ceppo umanizzato HY che nel selvatico W303 utilizzato come controllo. A partire da un'unica coltura di partenza i ceppi sono stati sincronizzati a in G1 con α -factor (10 $\mu\text{g/ml}$) ed in G2 tramite nocodazolo (15 $\mu\text{g/ml}$) oltre ai ceppi presi in fase asincrona. Il profilo di legame di Tel1 al telomero nel ceppo W303 è concorde con quanto precedentemente mostrato da Sabourin *et al.*, (2007), infatti rispetto alle colture asincrone, il legame di Tel1 è basso in G1 ed aumenta leggermente in G2. Il profilo di legame di Tel1, evidenziato nel ceppo HY, è del tutto simile a quello del ceppo selvatico, tuttavia in fase G2, si osserva un aumento di legame statisticamente significativo ($p=0,0056$) rispetto al ceppo selvatico W303.

DISCUSSIONE

Il mantenimento della stabilità dei cromosomi eucariotici è assicurato dalle regioni terminali dette telomeri e dall'equilibrio che si instaura tra il processo di allungamento ed accorciamento delle estremità telomeriche (Blasco *et al.*, 1999). Numerose proteine collaborano a garantire il corretto funzionamento del telomero e ad evitare che esso venga riconosciuto come DNA rotto o danneggiato. I principali sensori preposti alla sorveglianza del telomero sono Tel1 e Mec1 che controllano la cascata di segnalazione del danno Rad53-dipendente (Sabourin e Zakian, 2008). E' stato precedentemente dimostrato che ceppi di lievito, con telomeri umanizzati mostrano una fosforilazione cronica di Rad53, il principale checkpoint di danno al DNA, probabilmente a causa di una protrusione-3' a singolo filamento più lunga rispetto al ceppo selvatico (Di Domenico *et al.*, 2009).

Nella seconda parte del lavoro di dottorato è stata analizzata più in dettaglio la protrusione-3', come viene modulata durante il ciclo cellulare e quali geni sono coinvolti nel processo. L'analisi della protrusione-3' in cellule sincronizzate e rilasciate in terreno di crescita completo ha dimostrato che nei ceppi di lievito umanizzati questa struttura non è costitutivamente presente durante tutto il ciclo cellulare ma è soggetta ad un processo di regolazione simile a quello che si osserva nel ceppo selvatico. Il saggio *G-Tail* ha mostrato che nel ceppo HY, la coda telomerica è corta durante la fase G1 del ciclo cellulare, si allunga all'inizio della fase S fino a raggiungere il massimo tra la fine della fase S e la G2. La successiva analisi tramite t-OLA ha evidenziato che questa regione in G2 ha un'estensione che nella maggior parte dei casi (~60%) risulta compresa tra 24 e 48 nt, anche se in una ridotta minoranza di cellule (<1%) raggiunge una lunghezza pari a 132 nt. L'analisi dei mutanti ha permesso di dimostrare inoltre, che Rad50, e di conseguenza il complesso MRX svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della protrusione-3' poiché nei ceppi HY rad50 la coda telomerica è estremamente corta e raramente supera i 24 nt. Una sensibile riduzione della protrusione-3' è stata osservata anche nei mutanti HY tel1, tuttavia il fenotipo risulta essere meno severo rispetto al mutante rad50. Al contrario nei ceppi HY rad51 è stata frequentemente osservata una protrusione simile per estensione a quella del ceppo di riferimento HY, con una lunghezza massima intorno ai 120 nt. Poiché la regolazione della protrusione-3' è fondamentale per garantire il corretto caricamento della telomerasi ed in generale per l'integrità del telomero stesso, abbiamo analizzato tramite *Telo-Blot* la lunghezza dei telomeri umanizzati nei diversi mutanti. Dall'analisi dei frammenti di restrizione è emerso che il ceppo HY rad50, che ha una protrusione-3' molto corta, possiede anche telomeri estremamente corti. Analogamente, nel ceppo HY tel1, che ha una coda telomerica corta, si osservano dei telomeri poco estesi. Questa associazione tra protrusione-3'

limitata e telomeri corti è stata riscontrata anche nei doppi mutanti HY tel1, rad50 ed HY tel1, rad51. Diversamente dai mutanti HY tel1 ed HY rad50 il ceppo HY possiede una protrusione-3' lunga e telomeri più estesi. Un discorso diverso è quello relativo al mutante HY rad51 nel quale, in presenza di una protrusione-3' simile per estensione a quella del ceppo di riferimento HY, osserviamo dei telomeri molto più lunghi, paragonabili a quelli del ceppo selvatico W303. Questa osservazione suggerisce l'esistenza di un coinvolgimento da parte di Rad51 nella regolazione della lunghezza dei telomeri umanizzati. Per giustificare questo fenomeno abbiamo ipotizzato l'esistenza di una competizione per il DNA a singolo filamento tra Rad51 e Cdc13, infatti è noto che Cdc13 lega *in vitro* DNA telomerico a singolo filamento sia TG₁₋₃ che T₂AG₃, ma con una minore affinità per le sequenze di mammifero (Lin e Zakian, 1996; Nugent *et al.*, 1996). Poiché Rad51 ha elevata affinità per il DNA a singolo filamento, senza specificità di sequenza, potrebbe rappresentare un competitore di Cdc13 per l'accesso al DNA telomerico a singolo filamento, mascherando così la protrusione-3' e riducendo l'efficienza di associazione della telomerasi al telomero. Ulteriore conferma a questo dato è fornita anche dall'evidenza che ceppi HY pur con una telomerasi funzionante presentano fenomeni di amplificazione del subtelomero Y' mentre questo fenomeno è assente nel mutante HY rad51. Il livello di amplificazione del subtelomero Y' osservato nel ceppo HY aumenta con il passare delle generazioni. Questo è plausibile se si accetta l'ipotesi della competizione per la protrusione-3' tra Cdc13 e Rad51 come già ipotizzato anche da Teng e collaboratori (Lin *et al.*, 2009). Nei ceppi umanizzati quando prevale Cdc13 la telomerasi si associa al telomero ed esso viene allungato, quando prevale Rad51 viene promossa la ricombinazione omologa che mediante *strand invasion* porta all'amplificazione del subtelomero Y'. Una conferma a questa ipotesi potrebbe arrivare da esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro Rad51 ed osservare se nei ceppi umanizzati si osserva un effettivo arricchimento di questa proteina al telomero rispetto al ceppo selvatico. In aggiunta sia l'attività della telomerasi che la ricombinazione omologa (che coinvolge Rad51) agiscono nello stesso intervallo di tempo, compreso tra la fine della fase S e la G2 del ciclo cellulare. E' stato precedentemente dimostrato che il meccanismo che porta all'amplificazione del subtelomero Y' (*Type I*) è un evento dipendente da Rad51 (Teng *et al.*, 2000; McEachern e Haber 2006) e Rad50-indipendente. In accordo con questi dati, abbiamo osservato che i mutanti HY rad50 presentano un elevato livello di amplificazione del subtelomero Y'. Per spiegare questo fenomeno abbiamo ipotizzato che in presenza di una coda telomerica estremamente corta, quale quella dei mutanti HY rad50, Cdc13 potrebbe essere svantaggiato rispetto a Rad51 favorendo i fenomeni ALT *Type I* a scapito dell'attività della telomerasi.

Un discorso a parte va fatto per i risultati ottenuti nei doppi mutanti HY tel1, rad50 ed HY tel1, rad51. Anche in questi ceppi la regolazione della coda sembra risentire dell'assenza del complesso MRX tuttavia il telomero si riduce alla stessa lunghezza misurata nel ceppo HY tel1, confermando che l'assenza della chinasi Tel1 ha un ruolo fondamentale nel regolare l'associazione della telomerasi al telomero ed un effetto dominante rispetto alle singole mutazioni rad50 e rad51. Il comportamento più insolito dei doppi mutanti è legato alla scoperta di un meccanismo ALT *Type I* totalmente nuovo, che in assenza di TEL1 risulta essere Rad51-indipendente e Rad50-dipendente. Per spiegare questo fenomeno abbiamo ipotizzato che la presenza del checkpoint Tel1 possa regolare l'attivazione dei meccanismi di ricombinazione che in condizioni fisiologiche sono bloccati. Il processo di amplificazione del subtelomero Y' è regolato da Rad51 attraverso un meccanismo di ricombinazione omologa detto BIR (Break-Induced Recombination) che si attiva quando l'omologia di sequenza esiste soltanto ad un estremità del DSB, come nel caso dei telomeri (Davis e Symington 2004; Smith *et al.*, 2007). Questo meccanismo è accurato nel riparo e nel riconoscimento dell'omologia di sequenza tuttavia, quando è più complicato rintracciare le regioni omologhe, si attiva un altro meccanismo di ricombinazione Rad51-indipendente detto SSA (Single Strand Annealing) che necessita dell'azione di MRX nella formazione della protrusione-3 (McDonald e Rothstein, 1994; Ivanov *et al.*, 1996). Si è ipotizzato che la scelta del tipo di riparo, avviene prima della reale sintesi del DNA, probabilmente ad opera di un REC (Recombination Execution Checkpoint), non ancora individuato, che sembra monitorare come le estremità del DSB vengono ingaggiate in termini di orientamento e distanza una rispetto all'altra, una serie di dati sperimentali escludono Mec1 (Jain *et al.*, 2009) da questo ruolo tuttavia, da quanto emerge dal nostro studio, Tel1 potrebbe rappresentare un valido candidato per ricoprire il ruolo di regolatore in questi processi. In aggiunta l'anomalo comportamento dei ceppi HY in assenza di TEL1 si manifesta anche nella ricombinazione omologa di tipo ripartivo, in seguito ad esposizione a fleomicina. Infatti sia nel ceppo HY tel1, rad50 che HY tel1 rad51 si osserva un recupero di vitalità rispetto ai singoli mutanti HY rad50 ed HY rad51. Questo fenomeno non è ristretto ai ceppi con telomeri umanizzati ma è stato osservato anche nei ceppi selvatici. In ultimo, l'importanza che questo checkpoint ricopre a livello dei telomeri umanizzati è suggerita anche dai risultati ottenuti tramite ChIP che indicano un arricchimento di Tel1 ai telomeri umanizzati in misura maggiore rispetto al ceppo con telomeri canonici.

Il mantenimento della lunghezza e dell'integrità dei telomeri è un processo fondamentale per la cellula. La maggior parte delle cellule somatiche umane possiede una attività telomerasica bassa, se non completamente assente, che

determina un progressivo ed irreversibile accorciamento del telomero che passando attraverso una fase di senescenza conduce alla morte cellulare (Cesare e Reddel, 2008). Le cellule tumorali umane possono superare la fase di senescenza riattivando la telomerasi in circa 80-90% dei casi. Tuttavia nei rimanenti casi si osserva l'attivazione dei meccanismi ALT (Bryan *et al.*, 1997). In maniera analoga le cellule di lievito possono sfuggire alla senescenza causata dalla mancanza di telomerasi, attraverso un meccanismo di mantenimento dei telomeri dipendente dalla ricombinazione omologa molto simile a quello osservato nelle cellule umane (Lundblad e Szostak, 1989; Teng e Zakian, 1999). Nel mio lavoro di tesi ho accumulato evidenze che testimoniano che l'attività della telomerasi ed i meccanismi ALT possono coesistere e che un ruolo chiave per la gestione di entrambi è svolto dal checkpoint Tel1/ATM. Questo dato conferma l'ipotesi corrente che vede Tel1, insieme a Mec1, a guardia delle estremità che si creano a seguito delle rotture al DNA che devono essere riparate, ed allo stesso tempo prevede che questi checkpoint siano in grado di preservare l'integrità delle estremità telomeriche escludendole da inappropriati meccanismi di riparo.

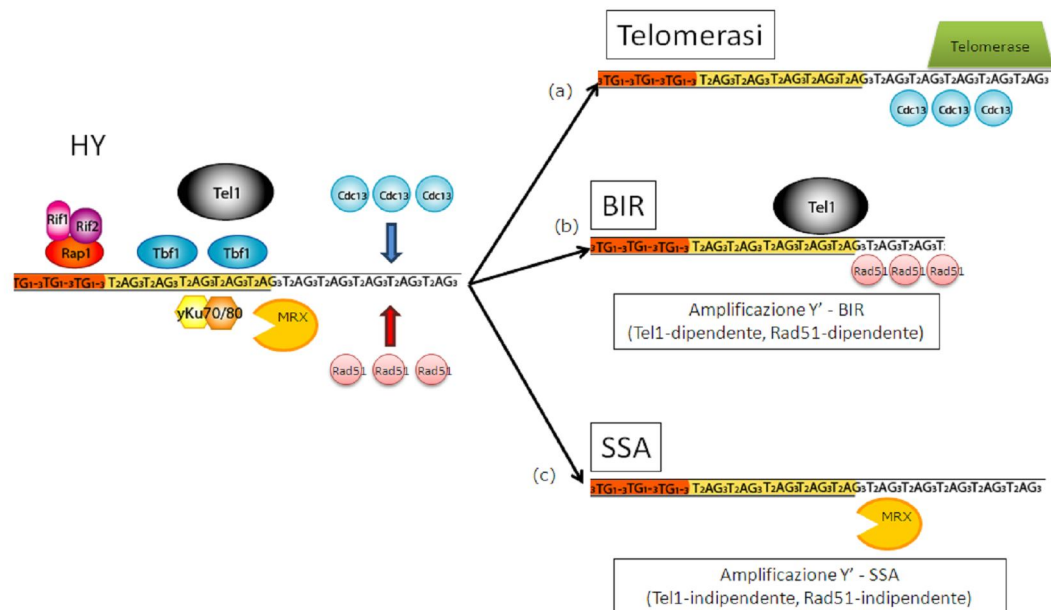


Fig.16: Modello proposto per il mantenimento dei telomeri umanizzati nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Le estremità telomeriche possono essere mantenute mediante un meccanismo di allungamento delle telomero telomerasi-dipendente (a), un meccanismo di amplificazione del subtelomero Y' mediata da BIR (break-induced replication) (b), un meccanismo di amplificazione del subtelomero Y' mediato da SSA (single-strand annealing) (c); questi meccanismi non sono esclusivi e possono essere attivi nella stessa cellula ed agire su telomeri con diversa struttura. La scelta di uno dei tre potrebbe essere operata dalle proteine Cdc13p e Rad51p, entrambi in grado di legare le protrusioni a singolo filamento (G-tail), e dalla lunghezza della protrusione. In condizioni normali e con telomeri canonici prevale il legame di Cdc13 che a sua volta media il caricamento della telomerasi, poiché Cdc13 ha una minore affinità per le sequenze T₂AG₃ è possibile che si stabilisca una competizione con Rad51 per il legame alla G-tail. Abbiamo pertanto ipotizzato il seguente scenario: a) prevale Cdc13 che media l'allungamento telomerasi-dipendente; b) prevale il legame di Rad51 e si innesca BIR che amplifica Y', questo meccanismo richiede Tel1; c) in assenza di Rad51 e di Tel1, il complesso MRX (Rad50) promuove l'amplificazione di Y' mediante SSA.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander MK, Zakian VA, Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C₃TA₂ telomere in yeast, *EMBO J.* (2003) 22:1688-1696.
2. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem.* (2006) 75:493-517. Review.
3. Bah A, Bachand F, Clair E, Autexier C, Wellinger RJ, Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast, *Nucleic Acids Res.* (2004) 32:1917-1927.
4. Blasco MA, Gasser SM, Lingner J. Telomeres and telomerase. *Genes Dev.* (1999) 13:2353-9.
5. Brevet V, Berthiau AS, Civitelli L, Donini P, Schramke V, Geli V, Ascenzioni F, Gilson E, The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms, *EMBO J.* (2003) 22:1697-1706.
6. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* (1997) 3:1271-4.
7. Cesare AJ, Reddel RR. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev.* (2008) 29:99-108.
8. Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep.* (2006) 7:225-30.
9. Cimino-Reale G, Pascale E, Alvino E, Starace G, D'Ambrosio E. Long telomeric C-rich 5'-tails in human replicating cells. *J Biol Chem.* (2003) 278:2136-40.
10. Cimino-Reale G, Pascale E, Battiloro E, Starace G, Verna R, D'Ambrosio E. The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29:E35.
11. Davis AP, Symington LS. RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol Cell Biol.* (2004) 24:2344-51
12. Di Domenico EG, Auriche C, Viscardi V, Longhese MP, Gilson E, Ascenzioni F. The Mec1p and Tel1p checkpoint kinases allow humanized yeast to tolerate chronic telomere dysfunctions by suppressing telomere fusions. *DNA Repair (Amst).* (2009) 8:209-18.

13. Dionne, Wellinger R.J., Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 24 (1996) 13902-13907.
14. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature.* (2007) 448:767-74. Review.
15. Frank CJ, Hyde M, Greider CW. Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol Cell.* 2006 Nov 3;24(3):423-32.
16. Goudsouzian LK, Tuzon CT, Zakian VA, *S.cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association, *Mol. Cell.* (2006) 24:603-610.
17. Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *EMBO J.* (2001) 20:6127-39.
18. Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* (2000) 16:259-64. Review.
19. Henning KA, Moskowitz N, Ashlock MA, Pu PL, Humanizing the yeast telomerase template *Genetics* (1998) 95:5667-5671.
20. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, Wharton SB, Jellinek DA, Arbuckle SM, Yoo J, Robinson BG, Learoyd DL, Stalley PD, Bonar SF, Yu D, Pollock RE, Reddel RR. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res.* (2005) 11:217-25.
21. Jain S, Sugawara N, Lydeard J, Vaze M, Tanguy Le Gac N, Haber JE. A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* (2009) 23:291-303.
22. Krogh BO, Symington LS. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* (2004) 38:233-71.
23. Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics.* (1996) 144:1399-412.
24. Lin JJ, Zakian VA, The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1±3 telomeric DNA binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, (1996) 93:13760-13765.
25. Lin YH, Chang CC, Wong CW, Teng SC. Recruitment of Rad51 and Rad52 to short telomeres triggers a Mec1-mediated hypersensitivity to double-stranded DNA breaks in senescent budding yeast. *PLoS* (2010) 4:e8224.

26. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*. (2004) 118:699-713.
27. Lundblad V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*. (1993) 73:347-60.
28. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*. (1989) 57:633-43.
29. McEachern MJ, Haber JE. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem*. (2006) 75:111-35.
30. Moreau S, Ferguson JR, Symington LS. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol*. (1999) 19:556-66.
31. Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V, Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, *Science* (1996) 274 249-252.
32. Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA, Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S.cerevisiae*, *Mol. Cell*. (2007) 27:550-561.
33. Sabourin M, Zakian VA. ATM-like kinases and regulation of telomerase: lessons from yeast and mammals. *Trends Cell Biol*. (2008) 18:337-46.
34. Shima H, Suzuki M, Shinohara M. Isolation and characterization of novel xrs2 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. (2005) 170:71-85.
35. Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol*. (2004) 14(19):1703-11.
36. Smith CE, Llorente B, Symington LS. Template switching during break-induced replication. *Nature*. (2007) 447:102-5.
37. Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell*. (2000) 6:947-52.
38. Teng SC, Zakian VA. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. (1999) 19:8083-93.
39. Tseng SF, Lin JJ, Teng SC, The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation, *Nucleic Acids Res*. (2006) 34:6327–6336.
40. Vodenicharov MD, Wellinger RJ. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol Cell*. (2006) 24:127-37.