

УДК 591

АНАЛИЗ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ¹

© 2009 г. П. В. Дмитриев*, Е. С. Васецкий**,**

**Университет Париж-11, Институт им. Гюстава Русси, Виллежюиф, Франция
CNRS UMR 8126*

***Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: vassetzky@igr.fr; dmitriev@igr.fr

Поступила в редакцию 01.07.08 г.

Терминальные участки линейных хромосом эукариотических организмов представлены теломерной ДНК и рядом ассоциированных с ней специфических белков. Длина, последовательность и структура теломерной ДНК являются одними из важнейших параметров теломер. Для анализа этих параметров используют набор специфических молекулярно- и клеточно-биологических, а также генетических методов, наиболее значимые из которых описаны в обзоре.

Ключевые слова: теломерная и субтеломерная ДНК, клонирование и секвенирование теломерной ДНК, измерение длины и визуализация теломерной ДНК, пространственная структура теломерной ДНК.

О специфических функциях концов хромосом было известно задолго до открытия молекулярной природы ДНК. Мюллер и Мак-Клинтон (Muller, 1938; McClintock, 1941) цитологически охарактеризовали терминальные участки хромосом дрозофилы и риса и предложили термин “теломера” (от греч. “telos” – конец и “meros” – часть). Позднее открытие структуры ДНК и механизма полуконсервативной репликации генома (Watson, Crick, 1953; Meselson, Stahl, 1958) позволило Оловникову высказать гипотезу об укорочении теломерной ДНК в результате каждого акта репликации хромосом (Olovnikov, 1971, 1973). Гипотеза Оловникова получила экспериментальное подтверждение в работах Харли с соавт. (Harley et al., 1990), более того, она легко объяснила существование лимита Хейфлика – феномена самоограничения клетками своего пролиферативного потенциала (Hayflick, Moorhead, 1961). Появление методов анализа первичной структуры ДНК позволило Блэкберн и Голлу (Blackburn, Gall, 1978) установить, что теломерная ДНК представляет собой серию tandemно повторяющихся коротких G/T-богатых последовательностей (рис. 1, а). Это в свою очередь позволило высказать предположение о существовании

терминальной трансферазы, проводящей циклическое удлинение теломер, необходимое для компенсации их неполной репликации (Shampay et al., 1984). Открытие фермента “теломеразы” (Greider, Blackburn, 1985) явилось подтверждением и этой гипотезы.

В настоящее время важнейшими функциями теломер считаются стабилизация концов хромосом и ограничение пролиферативного потенциала клеток. Концы хромосом, защищенные теломерами, не распознаются системой репарации двухцепочечных разрывов и не вызывают остановки клеточного цикла. Кроме того, теломеры играют важную роль в ходе мейоза, облегчая узнавание гомологичных хромосом и рекомбинацию между ними. Уровень экспрессии каталитической субъединицы теломеразы и длина теломер зависят от стадии развития и могут отличаться у разных тканей и клеток одного организма. Нарушения регуляции теломеразы могут приводить к различным порокам развития, например дефектам формирования нервной системы. Подробно о функциях теломер и их роли в развитии организма см. в обзорах: Dmitriev et al., 2003; Bekaert et al., 2004; Kuimov, 2004; Harrington, 2004; Gilson, Geli, 2007.

В настоящем обзоре мы рассматриваем методы анализа теломерной ДНК, включая клонирование и секвенирование, анализ пространственной структуры и визуализацию теломерной ДНК,

¹ Работа поддержана Французской ассоциацией против миопатий (Association française contre les myopathies, AFM), Фондом Франции (Fondation de France, FdF), а также Международным проектом научного сотрудничества (Project International de Cooperation Scientifique, PICS3207 (CNRS-РФФИ)).

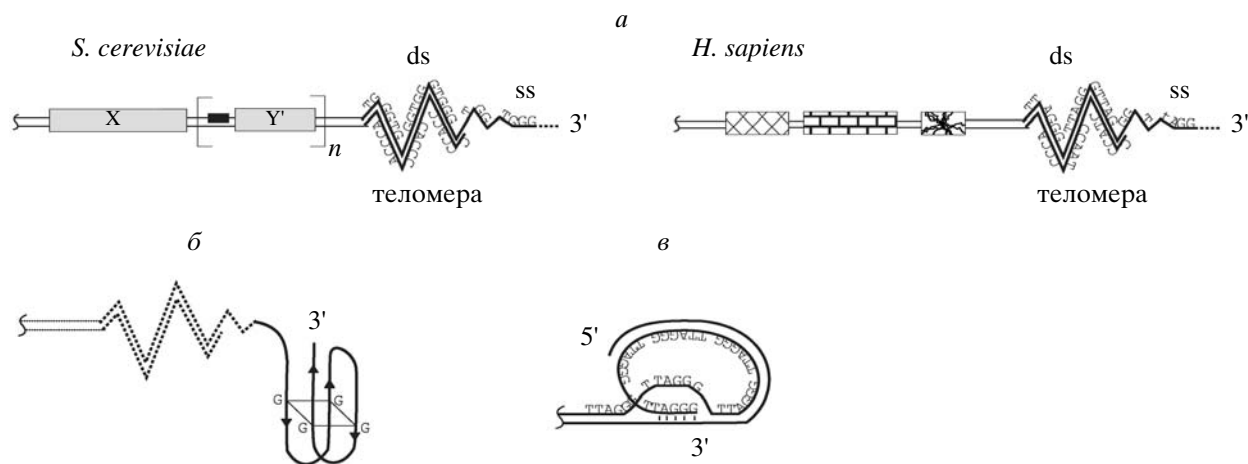


Рис. 1. Структура теломерной ДНК: *а* – сходное строение теломер различных организмов; *б* – одна из возможных структур одноцепочечного участка теломерной ДНК (G-квартетная шпилька); *в* – *t*-петля.

Теломерная ДНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae* состоит из двухцепочечного участка (ds) длиной 375 п.н., имеющего нерегулярную первичную структуру TG_{1-3}/AC_{1-3} , и одноцепочечного участка – продолжения G-богатой цепи; в субтеломерных участках хромосом дрожжей расположены повторяющиеся элементы X и Y'. Теломерная ДНК человека имеет регулярное строение (T_2AG_3/A_2TC_3) , длина двухцепочечного участка составляет от 3 до 50 т.п.н., одноцепочечный участок также является продолжением G-богатой цепи. Строение субтеломерных областей хромосом человека изучено не полностью.

а также методы селективного измерения длины одно- и двухцепочечных участков теломер.

КЛОНИРОВАНИЕ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ И СУБТЕЛОМЕРНОЙ ДНК

Впервые сведения о нуклеотидной последовательности теломерной ДНК были получены Блэкберн и Голлом при изучении хромосом макронуклеуса инфузории тетрахимены *Tetrahymena thermophila* (Blackburn, Gall, 1978). Тетрахимена предоставила ученым уникальный шанс определить первичную структуру теломер, не прибегая ни к клонированию, ни к секвенированию ДНК. Дело в том, что на одной из стадий развития тетрахимены гены рРНК существуют в виде 200 идентичных линейных мини-хромосом (Brown et al., 1990). В мини-хромосомах, которые можно легко отделить от обыкновенной геномной ДНК, заметную долю (около 3%) составляет теломерная ДНК. На начальном этапе Блэкберн и Голл обнаружили, что, благодаря наличию одноцепочечных разрывов (ников), теломеры тетрахимены можно специфически пометить методом никтрансляции, причем для этого достаточно лишь двух из четырех нуклеотидов (dATP и dCTP). Последнее возможно лишь в том случае, если комплементарная цепь теломерной ДНК содержит только остатки гуанина и тимина (T_xG_y). На следующем этапе авторы депуринизировали и гидролизали теломерную ДНК, а затем разделили полученные фрагменты с помощью тонкослойной хро-

матографии. Анализируя полученные фрагменты гидролиза теломерной ДНК, ученым удалось вычислить первичную структуру теломерного повтора тетрахимены – T_2G_4 (Blackburn, Gall, 1978). Позднее аналогичным методом удалось выяснить первичную структуру теломерного повтора трипаносомы *Trypanosoma brucei* – $(TTAGGG)_n$ (Blackburn, Challoner, 1984). Два года спустя после публикации пионерской работы Блэкберн и Голла в лабораторную практику был введен метод химического секвенирования ДНК Максама и Гилберта (Maxam, Gilbert, 1980). Это позволило другим ученым секвенировать терминальные участки мини-хромосом инфузорий *Euplotes aediculatus* и *Stylonychia pustulata* (Klobutcher et al., 1981).

Вскоре после определения первичной структуры теломерную ДНК тетрахимены удалось клонировать. Оказалось, что теломеры тетрахимены сохраняют свою функцию в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* – одном из наиболее удобных для генетических манипуляций эукариотическом организме. Это наблюдение позволило впервые создать линейную плазмиду, способную стабильно реплицироваться в дрожжах благодаря наличию на концах теломерных повторов тетрахимены (Szostak, Blackburn, 1982). С помощью этой принципиально новой плазмиды ученым удалось впервые клонировать, а затем и секвенировать теломеры самих дрожжей *S. cerevisiae*. Для этого оказалось достаточно заменить одну из теломер тетрахимены на различные фрагменты геномной ДНК дрожжей и отобрать те из них, которые способны

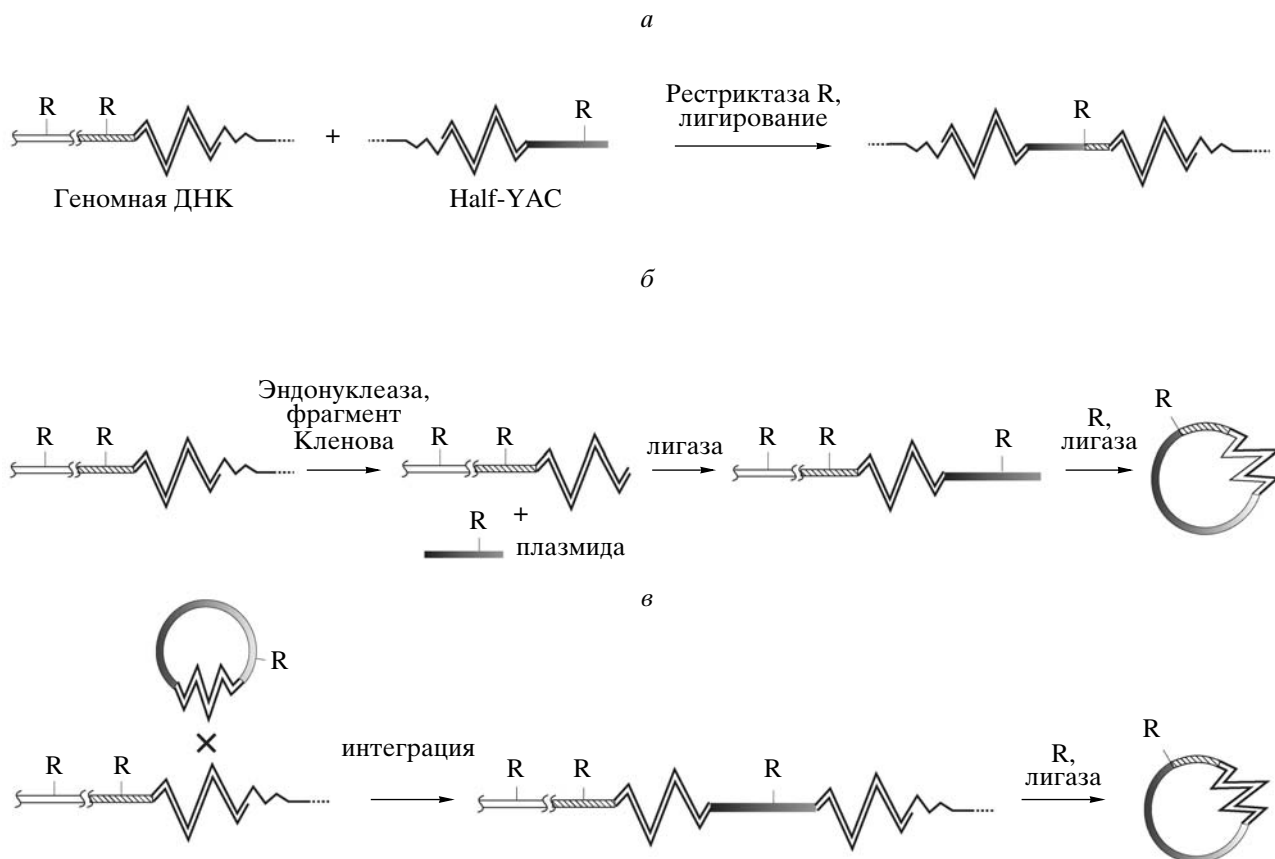


Рис. 2. Методы клонирования теломерной и субтеломерной ДНК.

а – способность теломерной ДНК человека выполнять свою функцию в клетках дрожжей: теломеры человека стабилизируют Half-YAC, благодаря чему их легко клонировать в дрожжах; б – возможность “маркировать” теломеры, лигируя с концами хромосомом линейаризованную плазмиду, благодаря тому, что теломерная ДНК расположена на конце хромосомы; в – создание штаммов, в которых одна из теломер маркирована при помощи интегрированной плазмиды; интеграцию плазмид проводили в двухцепочечный участок теломерной ДНК (Louis, Borts, 1995).

стабилизировать линейную плазмиду, т.е. выполнять функцию теломер (Szostak, Blackburn, 1982). Спустя два года удалось установить первичную структуру теломерной ДНК дрожжей – TG₁₋₃ (Shampay et al., 1984) (рис. 1, а). Позднее по методу Жостака удалось клонировать и теломеры других организмов, например, человека (Brown, 1989; Cross et al., 1989; Riethman et al., 1989) (рис. 1, а), мыши (Kipling et al., 1995), *Arabidopsis thaliana* (Richards, Ausubel, 1988), *Chlamidomonas reinhardtii* (Hails et al., 1995) и кукурузы (Gardiner et al., 1996).

Наряду с клонированием функциональных теломер в дрожжевых линейных векторах были разработаны и другие методы (рис. 2), эксплуатирующие уникальные свойства теломерной ДНК, а именно ее расположение на физических концах хромосом. Если геномную ДНК обработать экзонуклеазой и фрагментом Кленова, а затем лигировать с линейаризованной плазмидой, то все терминальные участки хромосомом окажутся “сшиты” с плазмидой (разумеется, такая процедура не разли-

чает настоящий конец хромосомы от случайного двухцепочечного разрыва). После этого продукт лигирования обрабатывают ферментом рестрикции, переводят в кольцевую форму с помощью лигирования и трансформируют в клетки *E. coli* (рис. 2, б). С помощью такой стратегии удалось впервые клонировать теломеры *Trypanosoma brucei* (Blackburn, Challoner, 1984; Van der Ploeg, Cornelissen, 1984), *Plasmodium berghei* (Ponzi et al., 1985), *Arabidopsis thaliana* (Richards, Ausubel, 1988).

Принципиально похожий подход предполагает “пришивание” к концам хромосомом специального линкера, облегчающего клонирование в бактериальный вектор. Именно таким способом были впервые клонированы теломеры *Dicystostelium* (Emery, Weiner, 1981) и *Paramecium* (Baroin et al., 1987).

Отдельно хотелось бы упомянуть о принципиально иной стратегии. Как известно, для повторов, в отличие от уникальных последовательностей генома, характерна обратимая денатурация (Walker, 1968). Если фрагментированную геном-

ную ДНК сначала денатурировать, а затем после денатурации обработать нуклеазой S1, специфичной к одноцепочечной ДНК, то в виде ДНК-дуплексов, пригодных для клонирования, окажутся главным образом теломерная и центромерная ДНК. Именно таким методом была впервые клонирована теломерная ДНК человека (Moyzis et al., 1988).

Итак, последовательности теломер человека и дрожжей были получены к началу 90-х гг. прошлого века; это позволило сделать важнейший вывод о консервативности структуры теломерной ДНК, заняться поиском белков, взаимодействующих с теломерами, и сконцентрироваться на принципах функционирования теломер. В настоящее время все известные последовательности теломер собраны в единую базу данных (<http://www.bioinfostra.com/services/teck/index.html>; Gowthaman et al., 2007).

КЛОНИРОВАНИЕ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ СУБТЕЛОМЕРНОЙ ДНК

Если информация о первичной структуре теломерной ДНК важна главным образом для понимания фундаментальных принципов функционирования хромосом, то точные сведения о первичной структуре субтеломерной ДНК имеют большое значение не только для фундаментальной науки, но и для клинических исследований. Анализ первичной структуры терминальных участков хромосом различных организмов дает ценную информацию об эволюции генома (Mefford, Trask, 2002; Fajkus et al., 2005; Zhdanova et al., 2007). Кроме того, субтеломерная ДНК играет важную роль в физиологии клетки. Субтеломерные участки богаты генами (Saccone et al., 1992); повторяющиеся элементы и псевдогены, встречающиеся в субтеломерных областях, могут быть функционально значимы – в частности, некоторые из них способны экспрессировать специфические транскрипционные факторы (Dixit et al., 2007). Описанию структуры субтеломерной ДНК человека посвящен обзор (Riethman et al., 2005).

Перестройки терминальных участков хромосом характерны для некоторых раковых заболеваний, например миеломы (Finelli et al., 1999), кроме того, сложные теломерные перестройки или делеции сопровождают некоторые врожденные заболевания, например, лице-лопаточно-бедренную мышечную дистрофию Ландузи–Дежерина (facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD) (Wijmenga et al., 1992), синдром Миллера–Дикера (Masuno et al., 1995) и некоторые другие (De Vries et al., 2003).

Современные клинические и фундаментальные исследования субтеломерной ДНК невозможно представить без определенного набора экспериментальных подходов. Одним из наиболее

важных методов является анализ перестроек субтеломерных областей хромосом с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH) (рис. 3, а). Набор проб, специфичных к субтеломерной области каждой из теломер человека, позволяет легко детектировать транслокации, делеции или увеличение копий ДНК в субтеломерной области (Knight et al., 1997; рис. 3, б, в). Используя метод многоцветной FISH, такой анализ можно провести сразу для нескольких теломер (Brown et al., 2001) (подробнее см. ниже).

Охарактеризовать терминальные участки хромосом на субмикроскопическом уровне позволяет анализ *коротких tandemных повторов* (Short Tandem Repeats, STR) или *варьирующих по числу tandemных повторов* (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) с помощью ПЦР (Riethman, 1997; Rosenberg et al., 1997;) или Саузерн-блоттинга (Flint et al., 1995). В настоящее время широко применяются мультиплексные варианты ПЦР-анализа STR, позволяющие одновременно изучать несколько теломер, – гибридизация с мульти-плексно-амплифицируемой пробой (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization, MAPH) (Armour et al., 2000) и мультиплексная лигазозависимая амплификация пробы (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) (Schouten et al., 2002). В последнее время к этим методам добавился анализ перестроек субтеломерной ДНК с помощью сравнительной геномной гибридизации с применением биочипов (Ballif et al., 2007; Veltman et al., 2002).

Разработка этих методов была бы невозможной без детальной информации о первичной структуре субтеломерной ДНК, полученной в рамках проектов по секвенированию геномов человека и различных организмов. Первым этапом получения полной первичной структуры субтеломерной ДНК человека явилось создание полной библиотеки всех теломер. Именно ее использовали для приготовления набора проб для FISH, специфичных к субтеломерным областям заданных теломер (Knight et al., 2000). Учитывая, что теломеры, принадлежащие различным хромосомам, не отличаются друг от друга по первичной структуре, для сохранения “идентичности” (т.е. соответствия определенной хромосоме) каждая теломера должна присутствовать в библиотеке вместе с протяженным участком субтеломерной ДНК (порядка 300 т.п.н.). Обычно для клонирования фрагментов такого размера используют *искусственные хромосомы бактерий* – Bacterial Artificial Chromosomes, BAC. Однако по ряду причин BAC не подходят для клонирования теломер. Трудности с клонированием теломерной ДНК в BAC связаны с тем, что в теломерной ДНК отсутствуют сайты рестрикции (из-за этого теломерная ДНК исключается из библиотеки уже на этапе подготовки фрагментов геномной ДНК). Кро-

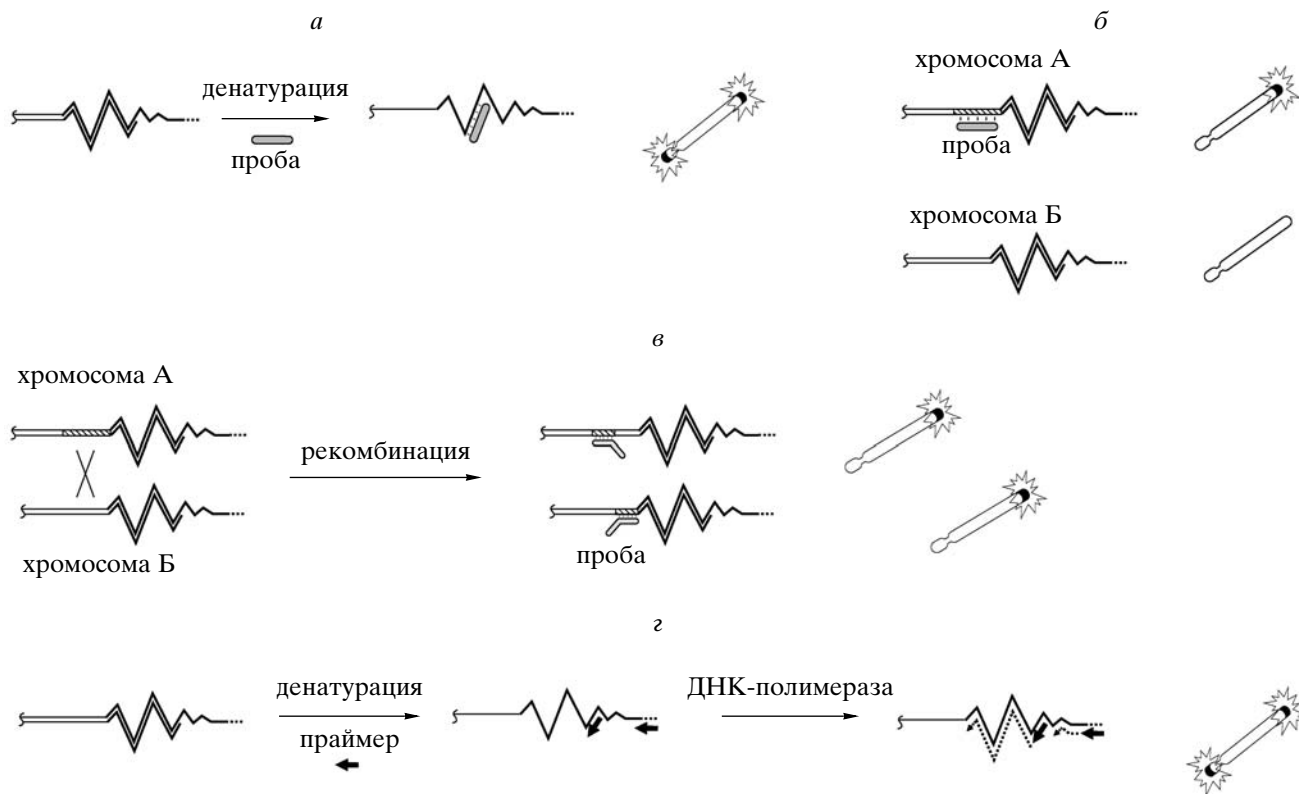


Рис. 3. Визуализация теломерной ДНК с помощью различных методов: *а* – FISH с использованием теломерной пробы (позволяет окрасить теломеры всех хромосом); *б* – FISH с использованием теломерной пробы, специфичной к уникальной последовательности в субтеломерной ДНК (можно окрасить определенную теломеру); *в* – использование FISH-пробы, специфичной к уникальной последовательности субтеломерной ДНК, выявляет несколько сигналов, что указывает на хромосомные перестройки; *г* – PRINS (пояснения см. в тексте).

ме того, теломерная ДНК человека нестабильна в клетках бактерий. Наконец, стандартные методы скрининга на основе Саузерн-блоттинга не позволяют отличить клоны, содержащие теломерную ДНК, от клонов, содержащих внутренние участки хромосом человека, которые имеют сходную первичную структуру (Riethman et al., 2001).

Учитывая особенности теломерной ДНК, было предложено клонировать библиотеку теломер человека в линейном векторе – *искусственной хромосоме дрожжей* (Yeast Artificial Chromosome, YAC), емкость которой соответствует требуемому 300 т.п.н. Для отбора клонов, содержащих теломерную ДНК, использовали YAC, лишенную одной из теломер – так называемую полухромосому, или Half-YAC. При этом только Half-YAC, получившие человеческую теломеру взамен недостающей, способны стабильно реплицироваться в клетках дрожжей (Riethman et al., 1989; рис. 2, *а*). Первая достаточно полная библиотека теломер человека была получена в конце XX в. (A complete ..., 1996).

Тем не менее, из-за наличия в составе субтеломерной ДНК повторяющихся последовательностей получить точную первичную структуру уда-

лось не для всех теломер. В базе данных генома человека NCBI присутствуют последовательности лишь 19 теломер (2p, 4p, 7q, 8p, 8q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 15q, 16p, 17p, 17q, 18p, 18q, 21q, Xp/Yp, Xq/Yq). В остальных случаях известная последовательность хромосом человека отделена от теломерных концов хромосомом TTAGGG неизвестными последовательностями длиной от 20 до 70 т.п.н. Еще хуже обстоят дела с теломерой 20q, для которой неизвестен даже примерный размер субтеломерного участка с р-плечами акроцентрических хромосом, последовательности которых вообще отсутствуют в базе данных генома человека (Riethman et al., 2004). Более того, в базе данных представлены далеко не все из возможных полиморфных вариантов субтеломерной ДНК (Ambrosini et al., 2007). Таким образом, мы видим, что информация о сиквенсе теломерных и субтеломерных участков хромосом человека далека от полноты. Наиболее исчерпывающая информация о первичной структуре субтеломерных участков хромосом человека находится в базе данных, созданной сотрудниками лаборатории Гарольда Ритмана (<http://www.wistar.upenn.edu/Riethman/>). В то же время иметь такую информацию очень

важно, так как известно, что определенные полиморфные варианты субтеломерной ДНК находятся в тесной ассоциации с различными заболеваниями, в частности с FSHD (Lemmers et al., 2002, 2007).

Гораздо лучше обстоят дела с первичной структурой теломер дрожжей *S. cerevisiae*. Во-первых, у них проще структура субтеломерной ДНК, меньше повторяющихся последовательностей, во-вторых, у дрожжей можно легко клонировать любую нужную теломеру. Специально для этого Луис и Бортс (Louis, Borts, 1995) создали набор штаммов, в каждом из которых одна из теломер содержит интегрированную плазмиду. Обработка геномной ДНК такого штамма рестриктазой и последующее восстановление кольцевой формы вектора с помощью лигирования приводит к тому, что вектор “захватывает” теломерную и субтеломерную ДНК (Louis, Borts, 1995; рис. 2, в). Набор таких штаммов был использован для получения первичной структуры теломер в рамках проекта по секвенированию генома *S. cerevisiae* (Cherry et al., 1997; Johnston et al., 1997).

ИЗМЕРЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК

Длина теломерной ДНК тесно связана как с параметрами жизнедеятельности отдельных клеток, так и с этапами развития организма в целом. Так, у млекопитающих длина теломер задается на стадии формирования blastocисты (Schaetzlein et al., 2004) и уменьшается с возрастом. На уровне отдельных клеток длина теломер связана с пролиферативным потенциалом, стабильностью генома и другими факторами (Beckaert et al., 2004). У человека укорочение теломер сопровождается рядом дегенеративных заболеваний, например, атеросклероз (Serrano, Andres, 2004), мышечную дистрофию Дюшенна (Oexle, Kohlschutter, 2001), а также ряд синдромов, связанных с преждевременным старением клеток, таких как врожденный дискератоз (Kirwan, Dokal, 2008), синдром Вернера, атаксия-телеангиэктазия, анемия Фанкони и др. (см. обзоры: Wong, Collins, 2003; Blasco, 2005). Укорочение теломерной ДНК может сопровождать и ряд раковых заболеваний, например лейкемию и лимфому (Davison, 2007). Интересно, что в других типах раковых опухолей, напротив, обнаружено аномальное удлинение теломер. Оно может происходить из-за выключения факторов, негативно регулирующих длину теломер, например белка Rb1 (этот белок также является опухолевым супрессором) (Garcia-Sao et al., 2002), изменения уровня метилирования ДНК (ДНК-метилтрансферазы также являются отрицательными регуляторами длины теломер (Gonzalo et al., 2006), а также и из-за включения рекомбинационного механизма удлинения теломер (Muntoni, Reddel, 2005).

Принимая во внимание, что ДНК теломер состоит из двух- и одноцепочечных участков (рис. 1, а), методы анализа длины теломерной ДНК разделяют на две группы.

Измерение длины двухцепочечного участка теломер. Для измерения средней длины теломер клетки было разработано несколько способов, наиболее распространенным из которых является анализ *терминальных фрагментов рестрикции* (ТФР) (Harley et al., 1990; Sedivy et al., 2003; Nakagawa et al., 2004; Baird, 2005; Lin, Yan, 2005). Суть метода заключается в обработке геномной ДНК часто щепящими ферментами рестрикции, например *RsaI* или *HinfI* (в составе теломерной ДНК нет сайтов узнавания рестриктаз), и анализе длины получившихся фрагментов методом Саузерн-блоттинга в денатурирующих условиях с использованием теломероспецифичной пробы. Длина каждой теломеры несколько варьирует от хромосомы к хромосоме и неодинакова у двух различных клеток. Таким образом, длина терминальных фрагментов рестрикции оказывается статистически распределена вокруг некоторого значения, принимаемого за среднюю длину теломерной ДНК. Благодаря этому свойству настоящей теломерной ДНК, показывающую на геле пятно (smear), можно легко отличить от внутренних фрагментов генома, окрашиваемых теломерной пробой, так как они представляют собой фрагменты строго определенной длины.

Отметим, что метод ТФР позволяет лишь приближенно оценить длину терминального участка теломерной ДНК. Например, в случае млекопитающих ошибка в измерении средней длины теломер может достигать 2.5–6 т.п.н. Это связано со сложным строением и полиморфизмом субтеломерных областей, в которых могут появляться или исчезать сайты рестрикции (Caron, 1992; Hultdin et al., 1998; Riethman et al., 2005; Britt-Compton, Baird, 2006; Britt-Compton et al., 2006).

В случае анализа теломер *S. cerevisiae* с помощью метода ТФР можно определить не только размер дистального участка теломерной ДНК ($TG_{(1-3)n}$), но и структуру ее проксимальных участков. Это обусловлено регулярной структурой субтеломерной ДНК дрожжей, состоящей лишь из двух типов повторяющихся элементов – X и Y' (Chan, Yue, 1983; рис. 1, а). Изменения в структуре проксимальных участков теломер дрожжей указывают на активизацию альтернативных (не связанных с теломеразой) механизмов удлинения теломер, изучение которых исключительно важно: известно, что как минимум в 15% из всех описанных типов раковых опухолей клеток человека теломераза неактивна, а теломеры поддерживаются за счет не связанных с теломеразой механизмов (Bollmann, 2007).

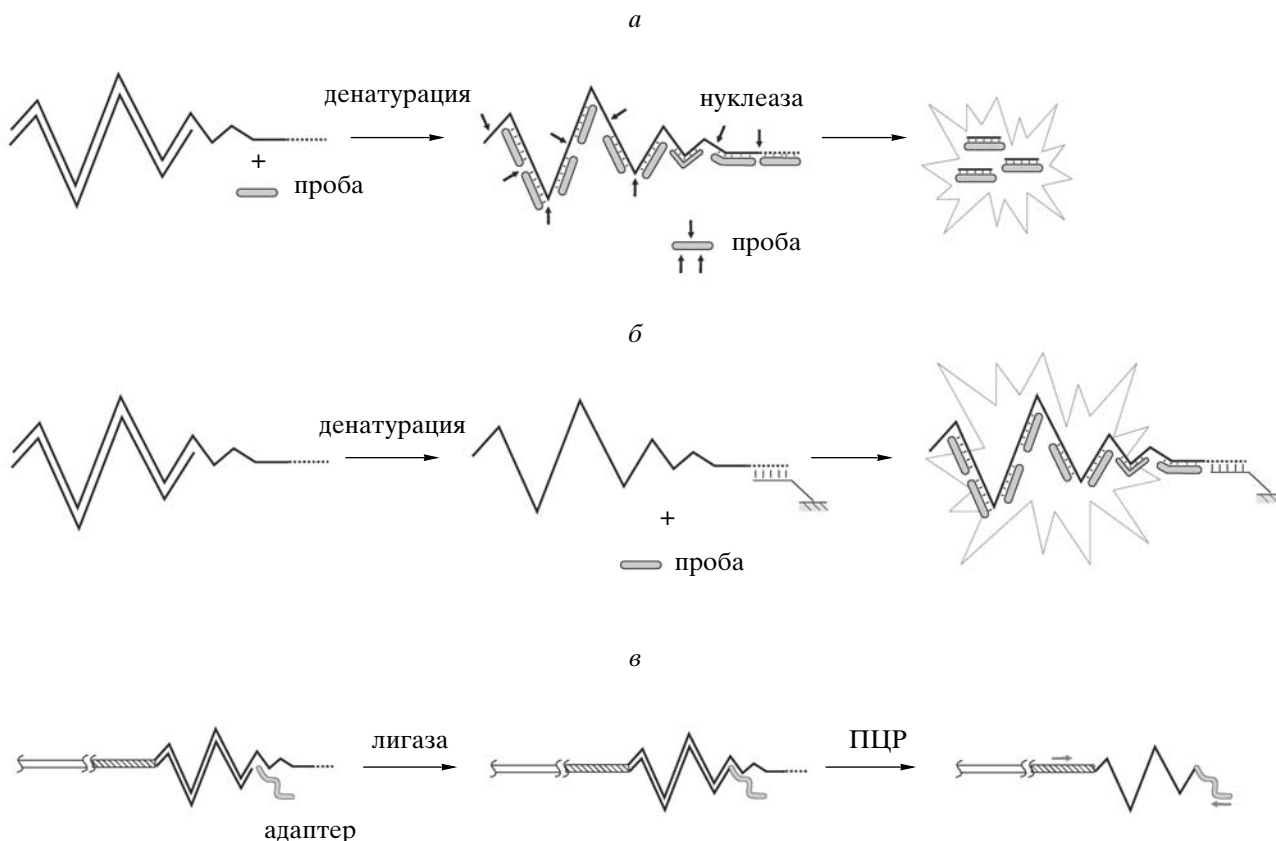


Рис. 4. Измерение длины теломерной ДНК с помощью: *a* – гибридизации в растворе без предварительной очистки (ДНК денатурируют, гибридизуют с теломероспецифичной пробой, избыток пробы гидролизуют с помощью специальной нуклеазы: Nakamura et al., 1999); *б* – гибридизации в растворе с предварительной очисткой (ДНК денатурируют, фрагментируют, теломерную ДНК очищают при помощи иммобилизованного олигонуклеотида; с очищенной таким образом теломерной ДНК гибридизуют теломероспецифичную пробу, избыток пробы устраняют промывкой: Freulet-Marriere et al., 2004); *в* – метод STELA (пояснения см. в тексте).

Клетки дрожжей способны компенсировать укорочение теломер за счет их рекомбинации друг с другом (тип II) либо с помощью транспозиции повторяющихся элементов Y' в теломерную область (тип I) (см. обзор: Kass-Eisler, Greider, 2000). Каждый из альтернативных механизмов удлинения теломерной ДНК приводит к изменениям в субтеломерной ДНК, которые можно легко детектировать с помощью метода ТФР (Teng, Zakian, 1999).

К недостаткам использования метода ТФР необходимо причислить трудоемкость и сложность автоматизации. Для решения этих проблем был разработан ряд новых подходов. В основе одного из них лежит измерение интенсивности флуоресценции меченых олигонуклеотидов, гибридованных с денатурированной теломерной ДНК в растворе. Несвязавшаяся проба гидролизует нуклеазой, специфичной к одноцепочечной ДНК (Nakamura et al., 1999; рис. 4, *a*). Другая группа ученых предложила использовать микроплашки с иммобилизованным олигонуклеотидом, компле-

ментарным G-богатой цепи теломерной ДНК. Денатурированная теломерная ДНК связывается со стенками плашек, затем с иммобилизованной теломерной ДНК гибридизуют пробу, меченную биотином, количество которой выявляют с помощью специальной ферментной реакции (Freulet-Marriere et al., 2004; рис. 4, *б*). В обоих случаях проводят нормализацию сигнала теломерной ДНК к сигналу повторяющихся последовательностей (например, Alu-повторов или альфоидной центромерной ДНК), число которых фиксировано. Описанные методы не так требовательны к количеству и качеству анализируемой ДНК, как метод ТФР, однако в отличие от него не слишком наглядны и не позволяют оценить гетерогенность длины теломер.

Для измерения средней длины теломерной ДНК человека и мыши было также предложено использовать количественную ПЦР (Cawthon, 2002). Для этого была подобрана специальная пара олигонуклеотидов, частично комплементарных теломерным повторам и не образующих ди-

меров. Результаты количественной ПЦР неплохо согласуются с таковыми, полученными с помощью метода ТФР (Epel et al., 2004; Callicott, Womack, 2006).

Особое место занимают цитологические методы анализа длины теломерной ДНК. Длина теломер метафазных хромосом отдельных клеток или тканей может быть определена методом количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Quantitative FISH, Q-FISH), в основе которого лежит количественное измерение флуоресценции пробы, связанной с теломерной ДНК (Lansdorp et al., 1996; Zijlmans et al., 1997; Slijepcevic, 2001). Модификация метода Q-FISH с использованием проточной цитометрии – флуоресцентная гибридизация *in situ* в потоке (Flow-FISH) (Rufer et al., 1998; Hultdin et al., 1998) – позволяет измерить длину теломер большой популяции клеток. Метод Flow-FISH незаменим при оценке длины теломерной ДНК клеток крови.

Описанные выше методы позволяют оценить среднюю длину теломерной ДНК клетки. Однако было показано, что для клетки важна не столько средняя длина теломерной ДНК, сколько размер самой короткой теломеры. Укорочения хотя бы одной теломеры до критического значения оказываются вполне достаточно для остановки клеточного старения (Неманн et al., 2001). Именно по этой причине были разработаны методы измерения длины отдельно взятой теломеры.

Измерить длину отдельно взятой теломеры можно методом Q-FISH, сочетая окраску хромосомспецифичной пробой (Schrock et al., 1996) с пробой, узнающей теломерную ДНК (Guan et al., 1996). Еще более точно определить длину индивидуальной теломеры позволяет метод анализа длины одиночных теломер (Single Telomere Length Analysis, STELA). Суть метода заключается в ПЦР амплификации нужной теломеры с использованием праймера, комплементарного субтеломерному участку заданной теломеры, и специального адаптера, “пришиваемого” к концу теломерной ДНК и служащего площадкой для отжига второго праймера (Baird et al., 2003; рис. 4, в). Теоретически любая нужная теломера генома может быть измерена методом STELA – для этого достаточно знать нуклеотидную последовательность субтеломерного участка (Britt-Compton, Baird, 2006; Britt-Compton et al., 2006). Важное преимущество метода STELA – возможность измерения сверхкоротких теломер. Так, в некоторых типах раковых клеток этим методом удалось детектировать теломеры, состоящие всего из семи теломерных повторов (t-stumps) (Britt-Compton, Baird, 2006; Britt-Compton et al., 2006; Xu, Blackburn, 2007). Подходы, аналогичные STELA, были разработаны и с

успехом применены для анализа длины одиночных теломер у растений (Heacock et al., 2004; Vespa et al., 2007).

Анализ одноцепочечного участка теломерной ДНК. Одноцепочечный участок теломерной ДНК можно измерить, используя описанный выше метод ТФР с несколькими незначительными модификациями. Во-первых, при этом исключается этап денатурации ДНК; во-вторых, гибридизацию с теломероспецифичной пробой проводят непосредственно в геле, не делая перенос на мембрану. Протяженность одноцепочечного участка определяют по интенсивности окрашенного с помощью теломероспецифичной пробы пятна (Dionne, Wellinger, 1996; Larrivee et al., 2004). Для того чтобы избежать технических сложностей, связанных с проведением гибридизации в геле, было предложено гибридизовать одноцепочечный участок теломерной ДНК с флуоресцентной пробой в растворе. Несвязавшуюся пробу гидролизуют с помощью специфической нуклеазы, а по интенсивности флуоресценции сохранившейся пробы оценивают размер одноцепочечного участка теломерной ДНК. Метод получил название реакции защитной гибридизации терминальных участков, богатых гуанином (Hybridization Protection Assay, G-tail HPA) (Tahara et al., 2005). К сожалению, и метод ТФР, и G-tail HPA позволяют оценить лишь усредненное количество одноцепочечной теломерной ДНК, не давая прямой информации о длине одноцепочечного участка теломерной ДНК.

Гораздо точнее измерить длину одноцепочечного участка теломерной ДНК можно при помощи метода содействия лигированию теломерных олигонуклеотидов (Telomeric Oligo Ligation Assistance, T-OLA). Суть подхода заключается в лигировании друг с другом цепочки олигонуклеотидов, гибридизованных с одноцепочечным участком теломеры. По длине продуктов лигирования делают вывод о протяженности одноцепочечного участка ДНК (Cimino-Reale et al., 2001; рис. 5, а). T-OLA очень удобен для определения наибольшей длины, но дает неверное представление о распределении длин одноцепочечных участков различных теломер (Zhao et al., 2008). С применением метода T-OLA можно ознакомиться в публикациях: Stewart et al., 2003; Hashimoto et al., 2005; Rahman et al., 2008.

Пожалуй, наиболее наглядные результаты можно получить с помощью электронной микроскопии. Для того чтобы маркировать одноцепочечную теломерную ДНК, используют белок, узнающий одноцепочечную ДНК, например sSSB. Размер одноцепочечного участка легко вычислить, умножая размер сайта связывания данного белка на число наблюдаемых молекул белка (Wright et al., 1997; Munoz-Jordan et al., 2001). Спе-

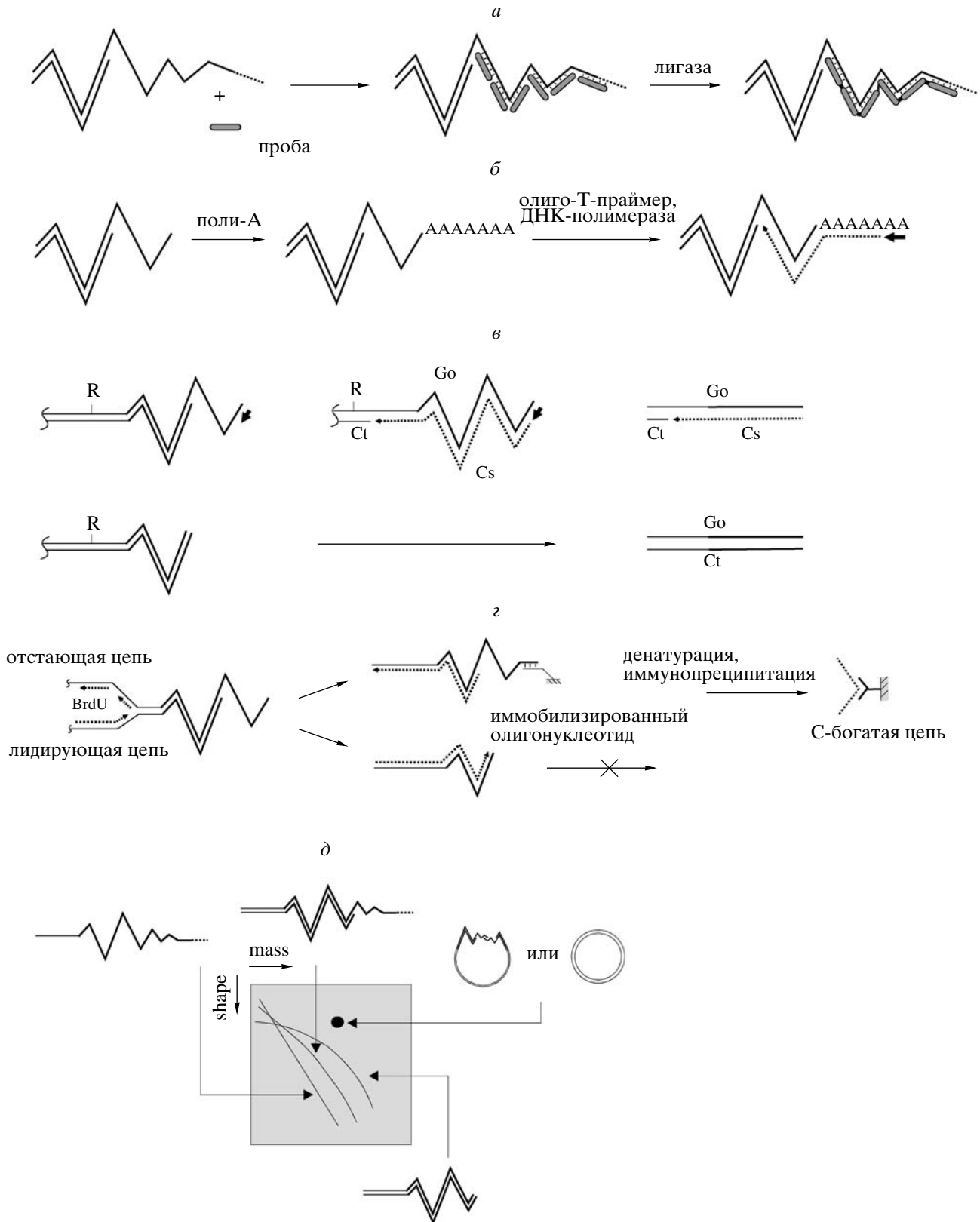


Рис. 5. Анализ одноцепочечного участка теломерной ДНК с помощью методов (пояснения см. в тексте): *a* – T-OLA; *б* – мечения 3'-конца теломерной ДНК с использованием полиаденилирования; *в* – PENT; *г* – определения соотношения “тупых” и “липких” теломер по Шею и Райту (Wright et al., 1997); *д* – двумерного электрофореза в агарозном геле (позволяет разделить разнообразные формы теломерной ДНК: теломеру с выступающим концом, “тупоконечную” теломеру, одноцепочечную теломеру и теломерную ДНК, замкнутую в кольцо).

цифические белки используются и в других методах. Например, метод защиты оверхэнга² (Overhang Protection Assay, OPA) предполагает использование белков, специфичных к одноцепочечной ДНК, для защиты одноцепочечного участка теломерной ДНК от гидролиза неспецифическими нуклеазами *in vitro*. Двухцепочечный участок теломеры при этом гидролизует, а длину одноцепочечного участка определяют методом Саузерн-блоттинга (Chai et al., 2006).

К сожалению, описанные выше методы не пригодны для детекции коротких (порядка 10 нуклеотидов) выступающих одноцепочечных участков теломерной ДНК: метод электронной микроскопии имеет лимит в ~75 нуклеотидов, а OPA – в ~45 нуклеотидов (Zhao et al., 2008). Специально для этой цели было предложено использовать новую нуклеазу DSN, впервые выделенную российскими учеными и способную специфически гидролизовать двухцепочечную ДНК (Anisimova et al., 2006). После обработки теломерной ДНК нуклеазой DSN длину одноцепочечного участка определяют методом Саузерн-блоттинга. Использование DSN позволяет детектировать выступающие концы теломерной ДНК размером до 12 нуклеотидов (Zhao et al., 2008).

Для анализа коротких одноцепочечных участков теломерной ДНК пригоден и другой метод, использующий реакцию удлинения олигонуклеотидного праймера ДНК полимеразой T4. На начальном этапе к выступающим 3'-концам теломерной ДНК пришивают поли-А-“хвост” (poly(A)-tailing), затем модифицированную теломерную ДНК гибридизуют с олиго-Т-праймером, который и удлиняется ДНК-полимеразой на заключительном этапе. Реакция удлинения проводится в условиях, минимизирующих вытесняющую активность ДНК-полимеразы, при этом количество нуклеотидов, присоединенных к олиго-Т-праймеру оказывается равно размеру одноцепочечного участка теломерной ДНК (Lattivee et al., 2004; рис. 5, б).

Итак, выше мы рассмотрели методы, подходящие для анализа одноцепочечных участков теломерной ДНК с размерами от 75 нуклеотидов и менее. Однако известно, что для некоторых мутаций в теломероассоциированных факторах *S. cerevisiae* характерно наличие одноцепочечных участков теломерной и субтеломерной ДНК длиной порядка 30 т.п.н. Специально для детекции таких сверхпротяженных одноцепочечных участков ДНК был разработан метод количественной амплификации одноцепочечной ДНК (Quantitative Amplification Of Single-stranded DNA, QAOS). На начальном этапе в неденатурирующих условиях с геномной ДНК гибридизуют специальный химерный праймер и удлиняют его с помощью ДНК-полимеразы. По-

сле этого ДНК денатурируют и проводят ПЦР-амплификацию с помощью хромосомоспецифичного и универсального праймеров (Booth et al., 2001).

Отдельная группа методов анализа теломерной ДНК посвящена определению соотношения теломер с выступающим 3'-концом с теломерами с тупым концом. В соответствии с моделью репликации ДНК Уотсона и Крика (Watson, Crick, 1953) одноцепочечный участок теломеры возникает после гидролиза терминального олигонуклеотида-затравки, необходимого для репликации G-богатого участка теломерной ДНК отстающей цепью. Репликация С-богатого участка ведущей цепью должна при этом давать тупоконечную теломеру, т.е. соотношение количества тупоконечных теломер и теломер с выступающим 3'-концом должно быть 1 : 1. Для того чтобы выяснить, так это на самом деле или нет, ученым пришлось разработать несколько оригинальных экспериментальных подходов.

Одним из методов, разработанных специально для решения этой задачи, является комбинированная реакция удлинения праймера и ник-трансляции (Primer-Extension-Nick Translation, PENT) (Makarov et al., 1997). Олигонуклеотид, комплементарный G-богатой цепи теломеры, гибридизуют с фрагментами рестрикции геномной ДНК, не прошедшими предварительную денатурацию. С помощью ДНК-полимеразы заполняют промежуток (gap) между праймером и 5'-концом С-богатой цепи, а затем проводят реакцию ник-трансляции в направлении 5'–3'. Продуктами реакции являются три фрагмента разной длины – Cs, Ct и Go. Если выступающего конца нет, то фрагмент Cs отсутствует. По относительному количеству получаемых при этом фрагментов разной длины судят о соотношении “липких” и “тупых” теломер (Makarov et al., 1997; рис. 5, в). Используя метод PENT, авторы не нашли подтверждения первоначальной гипотезы, обнаружив, что более 80% теломер человека имеют выступающий 3'-конец (Makarov et al., 1997). В то же время анализ теломерной ДНК растений *Silene latifolia* и *Arabidopsis thaliana* с помощью этого метода показал, что лишь у половины теломер присутствует выступающий 3'-конец (Riha et al., 2000).

Альтернатива методу PENT была разработана Шеем и Райтом (Wright et al., 1997). Делящиеся клетки выращивали на среде с бромдезоксипридином (BrdU) в течение времени, достаточного для завершения одного клеточного цикла. При этом BrdU-метка включалась в дочернюю цепь ДНК (в том числе и теломерной ДНК), но не в состав ДНК-матрицы. Меченую геномную ДНК выделяли и фрагментировали, а затем, используя колонку с иммобилизованным теломерным олигонуклеотидом, проводили аффинную очистку теломер с выступающим 3'-концом (рис. 5, г). Усло-

² Оверхэнг – выступающий одноцепочечный участок теломерной ДНК.

вия аффинной очистки были подобраны так, чтобы с колонкой связывались только теломеры, одноцепочечный участок которых превышает 12 нуклеотидов. После этого ДНК денатурировали и осаждали меченную BrdU цепь специфическими антителами. Оказалось, что таким образом удается осадить только С-богатую цепь теломерной ДНК. В соответствии с моделью Уотсона–Крика дочерняя теломера с выступающим 3'-концом образуется при репликации G-богатой цепи теломеры-матрицы (BrdU-метку несет С-богатая цепь дочерней теломеры). Только такая теломера должна связаться с аффинной колонкой и только С-богатая цепь, меченная BrdU, должна оказаться в иммунопреципитате. Таким образом, эксперимент Шея и Райта послужил свидетельством в пользу первоначальной гипотезы Уотсона и Крика (Wright et al., 1997; рис. 5, з). Позднее та же группа исследователей предложила другой принцип разделения лидирующей и отстающей цепей теломерной ДНК. Учитывая, что при репликации G-богатая цепь дочерней теломеры (TTAGGG) получает в два раза больше BrdU (включается вместо dTTP), чем С-богатая цепь (AATCCC), и отличается от нее по плавучей плотности, авторы предложили разделять дочерние теломеры в градиенте хлорида цезия (Chai et al., 2006).

В противовес результатам, полученным при изучении теломер человека и растений, исследования теломер *S. cerevisiae* показали, что у дрожжей выступающие 3'-концы имеются на всех теломерах (Wellinger et al., 1996). Это наблюдение было сделано с использованием принципиально иного подхода. Изучая линейные плазмиды, концы которых были стабилизированы теломерной ДНК дрожжей, авторы обнаружили, что плазмиды способны находиться в кольцевой форме благодаря нековалентным взаимодействиям между одноцепочечной теломерной ДНК. Кольцевую форму линейных плазмид детектировали при помощи двухмерных гелей агарозы (Wellinger et al., 1992, 1993a, b, 1996). Сходная методика используется для анализа репликационных интермедиатов (Dijkwel, Hamlin, 1997). Двухмерные гели агарозы получили широкое распространение для анализа точек начала репликации, расположенных в субтеломерной ДНК дрожжей (Makovets et al., 2004), кроме того, с помощью этого метода изучают влияние теломеросвязывающих белков на движение репликационной вилки через теломерную ДНК человека *in vitro* (Ohki, Ishikawa, 2004) и *in vivo* (Deng et al., 2007), а также теломерную ДНК дрожжей *S. cerevisiae* (Ivessa et al., 2002) и *K. lactis* (Miller et al., 2006). С помощью двухмерных гелей агарозы анализируют также рекомбинационные интермедиаты, например кольцевые фрагменты теломерной ДНК (Cesare, Griffith, 2004; рис. 5, д).

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК

В этом разделе мы рассмотрим методы визуализации (окраски) теломерной ДНК на хромосоме и определение ее локализации в ядре.

Анализ локализации теломерной ДНК является необходимым этапом ряда фундаментальных исследований – изучения расположения хромосом внутри ядра (Nagele et al., 1999, 2001); анализа перемещения хромосом в процессе мейоза (Scherthan et al., 2000) и митоза (Cornforth, Eberle, 2001); изучения перемещения белков, взаимодействующих с теломерами (Laroche et al., 2000). Кроме того, локализация теломерной ДНК может иметь значение при диагностике раковых заболеваний. Совместная локализация теломерной ДНК с PML-тельцами (особыми внутриядерными образованиями, описанными у больных промиелоцитарным лейкозом) указывает на механизм удлинения теломер, не связанный с теломеразой (Henson et al., 2005; Fujiwara et al., 2006). Этот аспект, несомненно, должен учитываться при выборе стратегии лечения (Bollmann, 2007).

Визуализацию теломерной ДНК в составе выделенных метафазных хромосом используют для определения длины теломер, детекции перестроек субтеломерной ДНК, картирования клонированных фрагментов субтеломерной ДНК и др.

Первым методом селективной окраски теломерной ДНК (Т-полос в составе метафазных хромосом) было окрашивание с помощью акридинового оранжевого – Т-бэндинг (T-banding) (Dutrillaux, 1973). Современные способы окраски теломер используют метод FISH (рис. 3, а).

Первоначальный вариант теломероспецифичной FISH предполагал использование ДНК-пробы (TTAGGG)_n, меченной биотином (Moyzis et al., 1988). Позднее ДНК-пробу было предложено заменить на более эффективную пробу на основе пептидо-нуклеиновой кислоты (Peptido-Nucleic Acid, PNA) (Nielsen et al., 1991). Впервые метод FISH с использованием теломероспецифичной PNA-пробы был проведен Лансдорпом (Lansdorp et al., 1996). Если теломерная ДНК-проба из-за невысокой эффективности гибридизации может дать “качественную” картину локализации теломер, то использование PNA-пробы позволяет оценить количественные параметры теломер, например их длину (с помощью метода Q-FISH). Позднее были предприняты попытки ввести в лабораторную практику окраску теломер с помощью модифицированных олигонуклеотидов (Nacia et al., 1999) и полиамидных соединений (Maeshima et al., 2001), однако они не получили широкого распространения (подробнее об этом см.: Riou et al., 2002).

Окраска теломерной ДНК на стадии метафазы позволяет по геометрии метафазных хромосом легко определить, какой из них принадлежит та или иная теломера. Окраска выделенных мета-

фазных хромосом широко применяется для определения длины теломерной ДНК методом Q-FISH (см. выше).

Очевидно, что окраска метафазных хромосом не дает информации об естественной локализации теломерной ДНК в контексте ядра. В то же время окраска теломерной ДНК в интерфазном ядре не дает сведений о ее принадлежности к той или иной хромосоме. Более того, иногда теломерная проба окрашивает внутренние участки генома из-за наличия протяженных участков теломерной ДНК во внутренних участках генома (Meune et al., 1990).

Задача идентификации теломер в интерфазном ядре решается за счет использования проб, специфичных для субтеломерной области заданной теломеры (см. выше; рис. 3, б). Используя такие пробы, удалось показать, что пространственное положение данной теломеры относительно других участков генома коррелирует с вероятностью рекомбинации между ними. Например, теломера 12q (рядом с ней расположен V-регион IgH – тяжелой цепи иммуноглобулинов) сближена с DJ-кластером IgH только в В-лимфоцитах, т.е. именно там, где происходит рекомбинационная перестройка IgH-локуса (Sayegh et al., 2005).

Сближение теломерных участков хромосом происходит во время мейоза. Это объясняет высокую вероятность рекомбинации между субтеломерной ДНК (Harper et al., 2004).

Наконец, важное значение имеет расположение теломер и других компонентов ядра – ядерной мембраны (Masny et al., 2004), ядерной поры (Galy et al., 2000; Scherthan et al., 2000), участков гетерохроматина (Tam et al., 2004), ядерного матрикса (Weipoltshammer et al., 1999). Например, в то время как в интерфазных ядрах соматических клеток человека большинство теломер расположены во внутренних участках ядра возле районов высокой транскрипционной активности (Quina, Parreira, 2005), теломера 4q находится на периферии, где совместно локализуется с участками гетерохроматина (Masny et al., 2004; Tam et al., 2004). Необычная локализация теломеры 4q может играть важную роль в этиологии мышечной дистрофии FSHD, так как в этом заболевании нарушена экспрессия генов, расположенных в субтеломерном участке хромосомы 4 (Tupler, Gabellini, 2004).

Часто возникает необходимость локализации одноцепочечной теломерной ДНК, для этого из процедуры FISH с использованием теломерной PNA-пробы исключают этап денатурации ДНК (Grudic et al., 2007). Однако результаты такого эксперимента могут оказаться трудно интерпретируемыми. Недавно было показано, что теломерная ДНК транскрибируется, причем теломерный транскрипт можно также детектировать с помощью теломерной пробы (Schoeftner, Blasco, 2008).

В качестве альтернативы методу FISH был разработан метод затравки *in situ* (Primed *in situ*, PRINS) (Koch et al., 1989). В нем с геномной ДНК гибридизуют олигонуклеотид-затравку и проводят его удлинение *in situ* с помощью ДНК-полимеразы в присутствии меченых дезоксирибонуклеотидов (Koch et al., 1989). Позднее метод PRINS был адаптирован для анализа теломерной ДНК за счет использования теломероспецифичного олигонуклеотида-затравки (CCCTAA)₇ (Therkelsen et al., 1995). Было предложено увеличить специфичность PRINS, добавляя в реакционную смесь только три из четырех дезоксирибонуклеотидов (синтез CCCTAA-повторов не нуждается в G), чтобы исключить тем самым мечение ДНК за пределами теломерных участков (дидезокси-PRINS) (Krejci, Koch, 1998; Koch, 2006; рис. 3, з).

К сожалению, использование в качестве затравки олигонуклеотида (CCCTAA)₇ не позволяет проводить селективную окраску заданной теломеры. Для этого окраску теломер с помощью PRINS приходится сочетать с окраской хромосомоспецифичных областей методом FISH (Krejci et al., 1999).

По мнению одних исследователей, методы FISH и PRINS дают практически идентичные результаты при анализе теломерной ДНК (Serakinci, Koch, 1999). Другие исследователи считают, что, хотя PRINS требует меньших затрат реагентов и обладает более высокой специфичностью по сравнению с FISH, он страдает низкой эффективностью гибридизации (можно легко “потерять теломеру”) и дает сигнал меньшей интенсивности (Yan et al., 2004).

Для большей эффективности метода был предложен вариант PRINS с мечением сразу двух цепей теломерной ДНК (Yan et al., 2004). В то же время необходимо отметить, что PRINS обладает важными преимуществами по сравнению с FISH: например, внося изменения в первичную структуру олигонуклеотида-затравки, с его помощью можно добиться специфичного окрашивания заданного участка внутрихромосомной теломерной ДНК (Yan et al., 2007) или специфически детектировать теломероподобные последовательности, расположенные в субтеломерных участках хромосом (Krejci, Koch, 1999).

Неплохой альтернативой методу FISH служит локализация теломерной ДНК при помощи иммунофлуоресценции. Известно, что в клетках различных организмов есть несколько белков, связанных исключительно с теломерной ДНК. Например, в клетках человека и мыши теломеросвязывающий белок TRF1 *de facto* служит специфичной пробой для окраски теломерной ДНК (Hockemeyer et al., 2005).

Все описанные выше методы касались изучения локализации теломер в ядрах зафиксированных клеток (*in situ*). Исследование динамики теломерной ДНК *in vivo* требует особого подхода. Наиболее отлажена техника локализации тело-

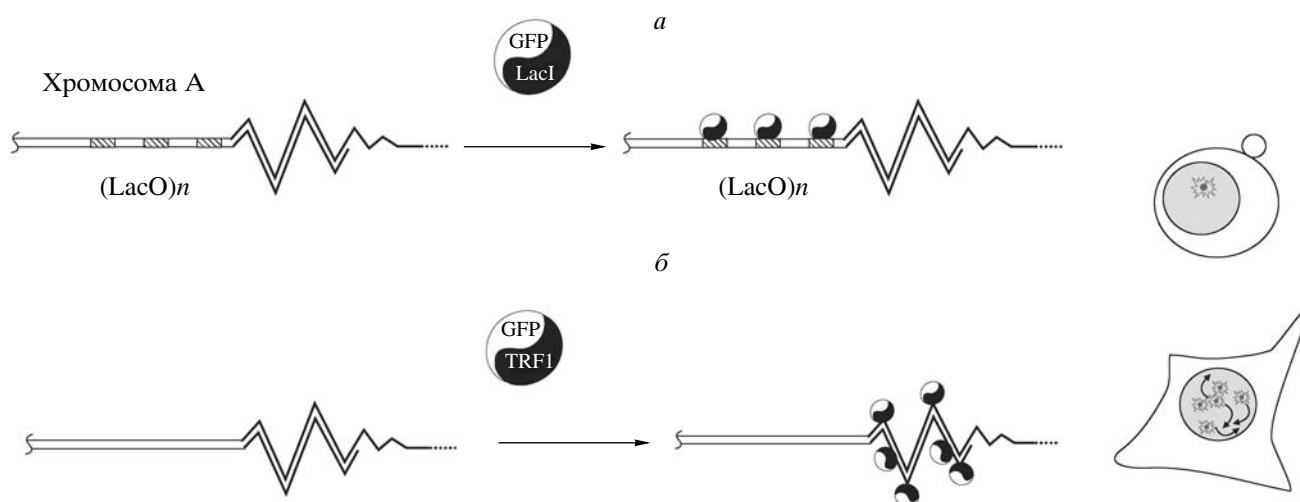


Рис. 6. Визуализация перемещений теломерной ДНК *in vivo*: *a* – при помощи связывания химерного белка GFP-LacI с маркированным Лас-оператором субтеломерным участком заданной теломеры; *б* – при помощи химерного белка TRF1-CFP в клетках млекопитающих (этот способ не позволяет локализовать определенную теломеру).

мерной ДНК *in vivo* в дрожжевой системе. Штамм дрожжей, подходящий для отслеживания перемещений теломерной ДНК в живой клетке, должен экспрессировать химерный Лас-репрессор белка GFP-LacI и содержать в субтеломерном участке нужной хромосомы серию Лас-операторов. Химерный Лас-репрессор связывается с Лас-операторами, что позволяет отследить перемещение маркированного локуса по сигналу белка GFP с помощью флуоресцентной микроскопии в реальном времени (Hediger et al., 2002; см также обзор: Taddei, Gasser, 2004; рис. 6, *a*). Аналогичный подход, не предусматривающий искусственную модификацию хромосом, был использован в клетках млекопитающих: там перемещение теломер отслеживали с помощью химерного белка TRF1-CFP (Molenaar et al., 2003; рис. 6, *б*). Очевидно, что при этом идентифицировать, к какой хромосоме относится та или иная теломера, не представляется возможным.

Неплохой заменой таким методам является использование окраски теломерной ДНК *in vivo* с помощью PNA-пробы. Доставка пробы внутрь клеток производится с помощью стеклянных шариков. Этот метод был опробован на клеточных линиях человека (Molenaar et al., 2003).

Итак, мы рассмотрели основные методы локализации теломерной ДНК *in situ* и *in vivo*. Перейдем к рассмотрению методов визуализации теломерной ДНК на хромосоме без привязки к ее локализации в ядре.

Одним из них является метод цепеспецифичной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Chromosome-Oriented FISH, CO-FISH) (рис. 7, *a*), позволяющий селективно окрасить теломеры, синтезированные ведущей и отстающей цепями репликационной вилки.

CO-FISH был изначально разработан для анализа центромерной ДНК человека (Goodwin, Meune, 1993) и впоследствии адаптирован для анализа теломерной ДНК (Bailey et al., 2001, 2004b). На начальном этапе клетки в течение времени, достаточного для прохождения лишь одного клеточного цикла, выращивают на среде, содержащей BrdU, при этом BrdU включается только в состав дочерних цепей ДНК. На следующем этапе проводят селективный гидролиз дочерних цепей хромосом, содержащих BrdU, за счет последовательного воздействия ультрафиолетового излучения (это вносит одноцепочечные разрывы в месте включения BrdU) и экзонуклеазы III (гидролизует никированную цепь ДНК). На заключительном этапе геномную ДНК гибридизуют с теломерной пробой. При этом TTAGGG-проба пометит только теломеры, синтезированные лидирующей цепью репликационной “вилки”, а проба CCCTAA - только теломеры, синтезированные отстающей цепью репликационной вилки.

Селективное мечение “лидирующих” и “отстающих” теломер позволило сделать вывод о том, что при отсутствии ряда теломеросвязывающих белков теломеры, синтезируемые ведущей цепью, имеют тенденцию образовывать межхромосомные сшивки (telomere-telomere fusions) (Bailey et al., 2001). Кроме того, CO-FISH использовали для детекции митотической рекомбинации между сестринскими хроматидами. При рекомбинации часть материнской цепи теломерной ДНК оказывается замещена на дочернюю (меченную BrdU), в результате чего теломероспецифичная проба узнает теломеры, синтезированные как лидирующей, так и отстающей цепями (Cornforth, Eberle, 2001; Bailey et al., 2004a; рис. 7, *б*). Наконец, метод CO-FISH можно исполь-

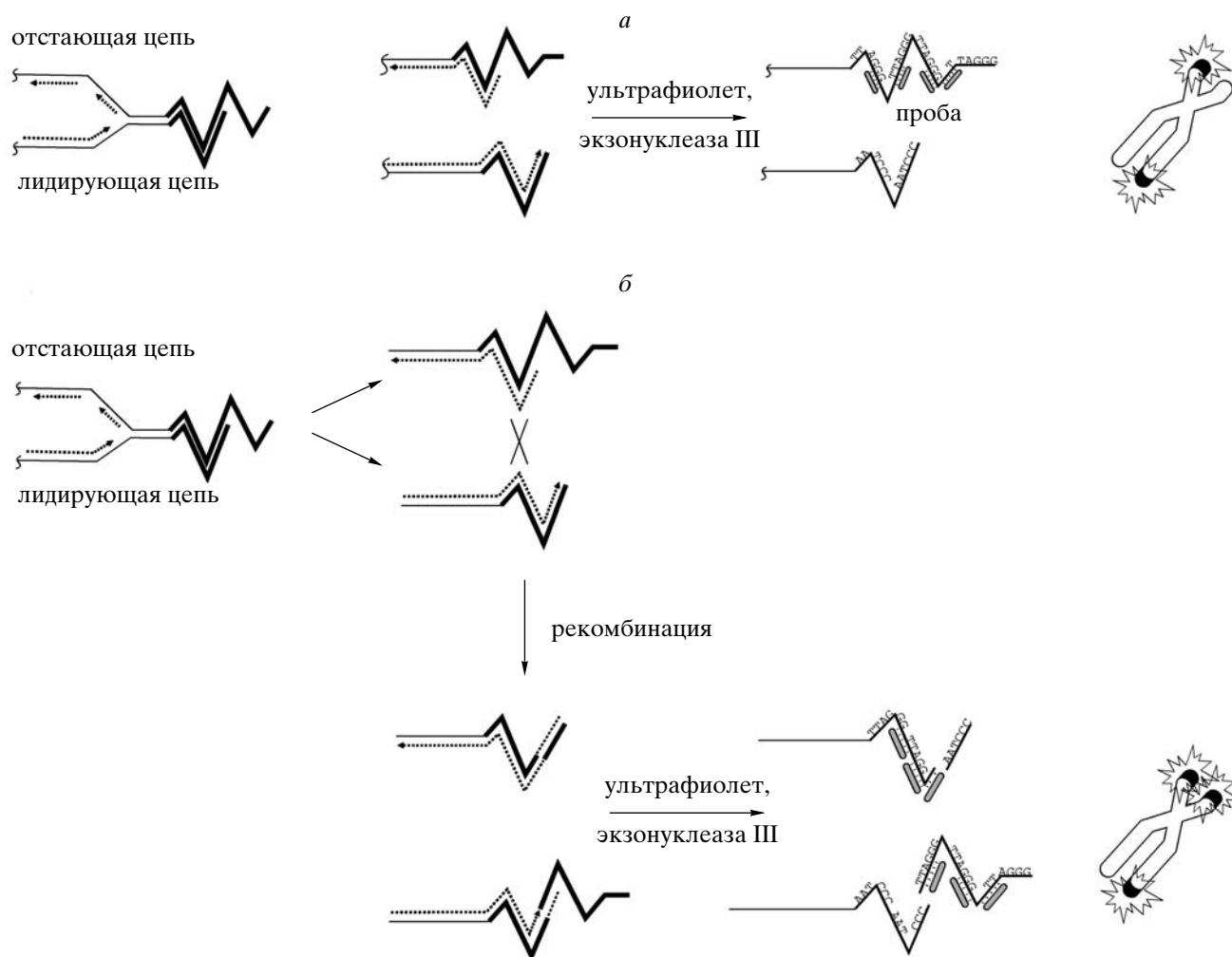


Рис. 7. Визуализация теломерной ДНК с помощью метода CO-FISH (пояснения см. в тексте): *а* – использование FISH-пробы, специфичной к G-богатой цепи теломерной ДНК, позволяет детектировать только теломеры, реплицированные отстающей цепью; *б* – регистрация рекомбинации между теломерной ДНК дочерних хромосом; FISH-проба, специфичная к G-богатой цепи теломерной ДНК, окрашивает теломеры на обеих дочерних хромосомах.

зовать для определения времени репликации данной теломеры. Узнавание CCCTAA-пробой лишь одной из двух хроматид означает полное прохождение репликационной вилки через теломеру. Если сигнал присутствует на обеих хроматидах, значит, репликационная вилка еще не достигла конца теломерной ДНК (часть ДНК оказалась свободной от BrdU) (Zou et al., 2004).

Как уже говорилось, использование метафазных хромосом позволяет легко идентифицировать принадлежность теломерной ДНК к той или иной хромосоме. Но при этом есть и недостатки. Разрешение методов FISH и PRINS для метафазных хромосом составляет 1–2 млн п.о. Использование интерфазных хромосом позволяет увеличить разрешение метода до 50–500 т.п.о. (Buckle, Kearney, 1993). К сожалению, этого недостаточно для составления точной физической карты хромосом. Для решения этой проблемы был разра-

ботан метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с декомпактизованными цепочками ДНК (fiber-FISH) (Parra, Windle, 1993; Rosenberg et al., 1995). Отличием fiber-FISH от классического метода FISH является наличие этапов декомпактизации и растягивания ДНК, позволяющих увеличить разрешение метода до 1–300 т.п.о. Для декомпактизации хроматина было предложено использовать гипотонический буфер в сочетании с растягиванием ДНК за счет гидродинамических сил (Parra, Windle, 1993) или механически (Haaf, Ward, 1994). Метод прецизионного визуального картирования fiber-FISH оказался очень полезным для анализа строения теломерной и субтеломерной ДНК различных организмов (Jackson et al., 1998; Garagna et al., 2002). Кроме того, эта техника была с успехом использована для картирования хромосомоспецифичных FISH-проб человека, узнающих субтеломерные участки ДНК, и для определения расстоя-

яния до TTAGGG-повторов (Knight et al., 2000). Подробнее об этом методе см. в обзоре: Heng, Tsui, 1998.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК

Свойства теломерной ДНК не ограничиваются ее первичной структурой, размерами и положением в ядре. Теломерная ДНК способна образовывать богатый набор пространственных структур, изучение которых исключительно важно для поиска путей воздействия на телосомный комплекс.

Первые сведения о пространственной структуре теломерной ДНК были получены в 1987 г. в лаборатории Э. Блэкберн. Ученые обнаружили, что фрагменты одноцепочечной теломерной ДНК инфузорий *Oxytricha* и *Tetrahymena* формируют компактные структуры, обладающие повышенной подвижностью в неденатурирующих полиакриламидных гелях (Henderson et al., 1987). Электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях до сих пор остается самым простым и распространенным методом анализа компактизации теломерной ДНК (Zaug et al., 2005).

Анализ компактных структур теломерной ДНК с помощью метода ЯМР выявил наличие у нее неклассических пар G-G (Henderson et al., 1987). Данные ЯМР, дополненные результатами анализа межнуклеотидных сшивок во фрагментах теломерной ДНК, которые индуцировали ультрафиолетовым облучением (Williamson et al., 1989), а также результаты химической модификации (Sundquist, Klug, 1989; Williamson et al., 1989; Panyutin et al., 1990) позволили впервые предположить, что вероятной структурой одноцепочечной теломерной ДНК *Oxytricha* и *Tetrahymena* являются G-квартетные шпильки. Структуры теломерной ДНК, похожие на эти модели, были позднее получены с помощью метода кристаллографии (Kang et al., 1992). Именно методы кристаллографии и ЯМР впоследствии получили наибольшее распространение для анализа структуры двухцепочечной (Phan, Mergny, 2002) и одноцепочечной (Wang, Patel, 1993; Parkinson et al., 2002) теломерных ДНК человека и дрожжей *S. cerevisiae* (Patel, Hosur, 1999; рис. 1, б). Из оригинальных подходов анализа конформации теломерной ДНК, по понятным причинам не нашедших широкого применения, необходимо упомянуть метод, использующий радиоактивный ^{125}I . Принцип метода основан на анализе разрывов ДНК, вносимых в теломерную ДНК радиоактивным изотопом йода, которым помечена заданная позиция во фрагменте теломерной ДНК. Чем ближе данный нуклеотид к изотопу, тем выше вероятность возникновения разрыва (He et al., 2004).

О типах структур, образуемых теломерной ДНК, недавно подробно описано (Burge et al., 2006; Bates et al., 2007). Однако не стоит забывать, что структуры, которые способна образовывать теломерная ДНК, не связанная с белками, могут иметь мало общего с таковыми, существующими *in vivo*.

Не удивительно, что ученые всегда уделяли большое внимание методам анализа структуры комплекса теломерной ДНК с белком. Первый анализ такого ДНК-белкового комплекса был осуществлен с помощью метода химической модификации (Price, Cech, 1987) и с тех пор широко используется (Paeschke et al., 2005). Однако реальные пространственные структуры комплексов теломерной ДНК с белком были получены позднее методами кристаллографии (Konig et al., 1996) и ЯМР (Nishikawa et al., 2001). С их помощью удалось получить структуры комплексов теломерной ДНК с основными теломеросвязывающими белками – Rap1 (Konig et al., 1996), TRF1 (Nishikawa et al., 2001), TEBP α/β (Horvath et al., 1998), Cdc13 (Mitton-Fry et al., 2004; Eldridge, Wuttke, 2008), Pot1 (Lei et al., 2004). В этом списке пока отсутствует, пожалуй, самый главный комплекс – теломерная ДНК с теломеразой. Знание структуры такого комплекса сильно облегчило бы задачу поиска ингибитора теломеразы. Между тем сама теломераза, активность которой повышается в более чем 80% раковых опухолей, давно является объектом исследований для разработчиков лекарственных препаратов.

Однако пока такая структура не получена, для поиска ингибиторов теломеразы используют структуры G-квартетных шпилек, о которых накоплено огромное количество информации. Известно, что теломераза не способна удлинять теломерную ДНК, образующую G-квартетную шпильку (Zahler et al., 1991), поэтому соединения, стабилизирующие такие шпильки, могут служить ингибиторами теломеразы. Более того, G-квартетные шпильки являются препятствием для ДНК-полимеразы, осуществляющей репликацию ДНК (Weitzmann et al., 1996), и различных хеликаз (Fletcher et al., 1998), т.е. стабилизация G-квартетных шпилек теломерной ДНК является одним из перспективных методов терапии не только теломеразоположительных (Yegorov et al., 1999), но и теломеразонегативных опухолей (см. обзор: Rezler et al., 2002). Используя свойство ДНК-полимеразы останавливаться при “прочтении” G-квартетной шпильки, был создан простой метод оценки стабильности шпилечных структур, образуемых теломерной ДНК – реакция остановки ДНК-полимеразы (DNA-polymerase stop assay) (Weitzmann et al., 1996; Han et al., 1999). ДНК-полимеразу используют для копирования матрицы, содержащей G-квартетную шпильку. Вероятность остановки при копировании определяют методом электрофореза в денатурирующем геле по длине синтезированного продукта. Очевидно,

что таким методом сложно провести скрининг больших библиотек химических соединений.

Для этой цели лучше адаптирован метод плавления комплекса теломерной ДНК с лигандом. Конформационную перестройку ДНК контролируют с помощью резонансного переноса энергии флуоресценции (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) (Riou et al., 2002; De Cian et al., 2007). Разумеется, идеальным вариантом было бы измерение стабильности G-квартетных структур *in vivo*, однако соответствующих методов пока не разработано. О теоретически возможных методах анализа стабильности G-квартетных структур *in vivo* можно прочитать в обзоре, посвященном этой проблеме (Johnson et al., 2008).

Все описанные методы анализа пространственной структуры теломерной ДНК имеют биологический смысл только в том случае, если теломерная ДНК образует G-квартетные шпильки *in vivo*. Так ли это? Ответа на этот вопрос пока нет, но ученые вплотную подошли к его решению. При помощи антител, способных узнавать G-квартетные шпильки, сотрудникам группы Д. Роудс и И. Липса удалось зарегистрировать существование теломерных шпилек в клетках инфузории (Paeschke et al., 2005). Использование антител, узнающих G-квартетные шпильки, – отличный метод для изучения структуры теломерной ДНК *in vivo*.

Еще одним типом специфических структур, образуемых теломерной ДНК, являются *теломерные петли* (*t*-петли) (рис. 1, в), которые формируются за счет интеграции одноцепочечного выступающего 3'-конца в двухцепочечную область теломеры (de Lange, 2004). Лабильность *t*-петель и низкое разрешение флуоресцентной микроскопии не позволяют детектировать их с помощью FISH, поэтому основным методом анализа таких структур, прошедших предварительную фиксацию *in vivo* и процедуру обогащения, является электронная микроскопия (Griffith et al., 1999; Munoz-Jordan et al., 2001).

Теломерная ДНК может существовать в виде петлеобразных структур и без интеграции одноцепочечного выступающего конца в двухцепочечный участок. В этом случае стабилизация теломеросвязывающими белками. Петли такого типа, напоминающие петли, образуемые энхансерами, характерны для дрожжевых теломер (Dmitriev et al., 2003). Существование такого типа петель можно зарегистрировать с помощью использования транскрипционных репортеров (de Bruin et al., 2000, 2001).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, как уже отмечалось, изучение процессов, в которых принимает участие теломерная

ДНК и ассоциированные с ней факторы, является не только важнейшим этапом на пути понимания принципов развития организмов, механизмов точной трансформации и репарации ДНК, но и ключом к разработке методов лечения ряда заболеваний.

В нашей работе рассмотрены основные методы изучения теломерной ДНК – важнейшего компонента теломеры. Если проследить историю развития методов анализа теломерной ДНК, то станет ясно, что они эволюционируют от подходов, позволяющих грубо оценить средний размер теломерной ДНК, к методам селективного измерения заданной теломеры. Попытаемся заглянуть в будущее. Вероятно, будут созданы методы на основе биочипов, позволяющие в одном эксперименте измерить длину каждой отдельно взятой теломеры генома на молекулярном уровне. Дальнейшее развитие техники секвенирования ДНК, вероятно, позволит определить структуру теломерной и субтеломерной ДНК каждого индивидуума. В то же время с уверенностью можно утверждать, что ставшие уже классическими методы анализа теломерной ДНК, например ТФР и Q-FISH, не утратят своей роли: за несколько десятилетий они уже доказали свою надежность и эффективность.

Авторы благодарят Е.Е. Егорова и А.Н. Куимова за дискуссию и ценные замечания по тексту обзора, а также всех сотрудников лаборатории за поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- A complete set of human telomeric probes and their clinical application. National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine collaboration // *Nat. Genet.* 1996. V. 14. P. 86–89.
- Ambrosini A., Paul S., Hu S., Riethman H. Human subtelomeric duplicon structure and organization // *Genome Biol.* 2007. V. 8. P. R151.
- Anisimova V.E., Rebrikov D.V., Zhulidov P.A. et al. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab // *Biochemistry.* 2006. V. 71. P. 513–519.
- Armour J.A., Sismani C., Patsalis P.C., Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 605–609.
- Bailey S.M., Cornforth M.N., Kurimasa A. et al. Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres // *Science.* 2001. V. 293. P. 2462–2465.
- Bailey S.M., Breneman M.A., Goodwin E.H. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells // *Nucl. Acids Res.* 2004a. V. 32. P. 3743–3751.
- Bailey S.M., Goodwin E.H., Cornforth M.N. Strand-specific fluorescence in situ hybridization: the CO-FISH family // *Cytogenet. Genome Res.* 2004b. V. 107. P. 14–17.

- Baird D.M.* New developments in telomere length analysis // *Exp. Gerontol.* 2005. V. 40. P. 363–368.
- Baird D.M., Rowson J., Wynford-Thomas D., Kipling D.* Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 203–207.
- Ballif B.C., Sulpizio S.G., Lloyd R.M. et al.* The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH // *Am. J. Med. Genet.* 2007. V. 143. P. 1850–1857.
- Baroin A., Prat A., Caron F.* Telomeric site position heterogeneity in macronuclear DNA of *Paramecium primaurelia* // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 1717–1728.
- Bates P., Mergny J.L., Yang D.* Quartets in G-major. The first international meeting on quadruplex DNA // *EMBO Rep.* 2007. V. 8. P. 1003–1010.
- Bekaert S., Derradji H., Baatout S.* Telomere biology in mammalian germ cells and during development // *Devel. Biol.* 2004. V. 274. P. 15–30.
- Blackburn E.H., Challoner P.B.* Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei* // *Cell.* 1984. V. 36. P. 447–457.
- Blackburn E.H., Gall J.G.* A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena* // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 33–53.
- Blasco M.A.* Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 611–622.
- Bollmann F.M.* Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer // *Cancer Treatment Rev.* 2007. V. 33. P. 704–709.
- Booth C., Griffith E., Brady G., Lydall D.* Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13–1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 4414–4422.
- Britt-Compton B., Baird D.M.* Intra-allelic mutation at human telomeres // *Biochem. Soc. Transact.* 2006. V. 34. P. 581–582.
- Britt-Compton B., Rowson J., Locke M. et al.* Structural stability and chromosome-specific telomer // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. 725–733.
- Brown J., Saracoglu K., Uhrig S. et al.* Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL) // *Nat. Med.* 2001. V. 7. P. 497–501.
- Brown W.R.* Molecular cloning of human telomeres in yeast // *Nature.* 1989. V. 338. P. 774–776.
- Brown W.R., Dobson M.J., MacKinnon P.* Telomere cloning and mammalian chromosome analysis // *J. Cell Sci.* 1990. V. 95. Pt. 4. P. 521–526.
- Buckle V.J., Kearney L.* Untwirling dirvish // *Nat. Genet.* 1993. V. 5. P. 4–5.
- Burge S., Parkinson G.N., Hazel P. et al.* Quadruplex DNA: sequence, topology and structure // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5402–5415.
- Callicott R.J., Womack J.E.* Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres // *Comp. Med.* 2006. V. 56. P. 17–22.
- Caron F.* A high degree of macronuclear chromosome polymorphism is generated by variable DNA rearrangements in *Paramecium primaurelia* during macronuclear differentiation // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 225. P. 661–678.
- Cawthon R.M.* Telomere measurement by quantitative PCR // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. e47.
- Cesare A.J., Griffith J.D.* Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 9948–9957.
- Chai W., Du Q., Shay J.W., Wright W.E.* Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands // *Mol. Cell.* 2006. V. 21. P. 427–435.
- Chan C.S., Tye B.K.* Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres // *Cell.* 1983. V. 33. P. 563–573.
- Cherry J.M., Ball C., Weng S. et al.* Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature.* 1997. V. 387. P. 67–73.
- Cimino-Reale G., Pascale E., Battiloro E. et al.* The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. E35.
- Cornforth M.N., Eberle R.L.* Termini of human chromosomes display elevated rates of mitotic recombination // *Mutagenesis.* 2001. V. 16. P. 85–89.
- Cross S.H., Allshire R.C., McKay S.J. et al.* Cloning of human telomeres by complementation in yeast // *Nature.* 1989. V. 338. P. 771–774.
- Davison G.M.* Telomeres and telomerase in leukaemia and lymphoma // *Transfus. Apher. Sci.* 2007. V. 37. P. 43–47.
- de Bruin D., Kantrow S.M., Liberatore R.A., Zakian V.A.* Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 7991–8000.
- de Bruin D., Zaman Z., Liberatore R.A., Ptashne M.* Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast // *Nature.* 2001. V. 409. P. 109–113.
- de Cian A., Guittat L., Kaiser M. et al.* Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands // *Methods.* 2007. V. 42. P. 183–195.
- de Lange T.* T-loops and the origin of telomeres // *Nat. Rev.* 2004. V. 5. P. 323–329.
- de Vries B.B., Winter R., Schinzel A., van Ravenswaaij-Arts C.* Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes // *J. Med. Genet.* 2003. V. 40. P. 385–398.
- Deng Z., Dheekollu J., Broccoli D. et al.* The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 1989–1995.
- Dijkwel P.A., Hamlin J.L.* Mapping replication origins by neutral/neutral two-dimensional gel electrophoresis // *Methods.* 1997. V. 13. P. 235–245.
- Dionne I., Wellinger R.J.* Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 13902–13907.
- Dixit M., Anseaeu E., Tassin A. et al.* DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a

- transcriptional activator of PITX1 // *Ibid.* 2007. V. 104. P. 18157–18162.
- Dmitriev P.V., Petrov A.V., Dontsova O.A.* Yeast telosome complex: components and their functions // *Biochemistry.* 2003. V. 68. P. 718–734.
- Dutrillaux B.* New system of chromosome banding: the T-bands // *Chromosoma.* 1973. V. 41. P. 395–402.
- Eldridge A.M., Wuttke D.S.* Probing the mechanism of recognition of ssDNA by the Cdc13-DBD // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 1624–1633.
- Emery H.S., Weiner A.M.* An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in *Dictyostelium discoideum* // *Cell.* 1981. V. 26. P. 411–419.
- Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J. et al.* Accelerated telomere shortening in response to life stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 17312–17315.
- Fajkus J., Sykorova E., Leitch A.R.* Telomeres in evolution and evolution of telomeres // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 469–479.
- Finelli P., Fabris S., Zagano S. et al.* Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by double-color fluorescent *in situ* hybridization // *Blood.* 1999. V. 94. P. 724–732.
- Fletcher T.M., Sun D., Salazar M., Hurley L.H.* Effect of DNA secondary structure on human telomerase activity // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 5536–5541.
- Flint J., Wilkie A.O., Buckle V.J. et al.* The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 132–140.
- Freulet-Marriere M.A., Potocki-Veronese G., Deverre J.R., Sabatier L.* Rapid method for mean telomere length measurement directly from cell lysates // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 314. P. 950–956.
- Fujiwara M., Kamma H., Wu W. et al.* Alternative lengthening of telomeres in the human adrenocortical carcinoma cell line H295R // *Internat. J. Oncol.* 2006. V. 29. P. 445–451.
- Galy V., Olivo-Marin J.C., Scherthan H. et al.* Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin // *Nature.* 2000. V. 403. P. 108–112.
- Garagna S., Zuccotti M., Capanna E., Redi C.A.* High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 96. P. 125–129.
- Garcia-Cao M., Gonzalo S., Dean D., Blasco M.A.* A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length // *Nat. Genet.* 2002. V. 32. P. 415–419.
- Gardiner J.M., Coe E.H., Chao S.* Cloning maize telomeres by complementation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genome (Canada).* 1996. V. 39. P. 736–748.
- Gilson E., Geli V.* How telomeres are replicated // *Nat. Rev.* 2007. V. 8. P. 825–838.
- Gonzalo S., Jaco I., Fraga M.F. et al.* DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 416–424.
- Goodwin E., Meyne J.* Strand-specific FISH reveals orientation of chromosome 18 alphoid DNA // *Cytogenet. Cell Genet.* 1993. V. 63. P. 126–127.
- Gowthaman R., Krishnamoorthy S., Nandakumar R.D., Ayyarappan V.* TeCK Database: A comprehensive collection of telomeric and centromeric sequences with their associated proteins // *Bioinformatics.* 2007. V. 2. P. 73–75.
- Greider C.W., Blackburn E.H.* Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts // *Cell.* 1985. V. 43. P. 405–413.
- Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S. et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop // *Ibid.* 1999. V. 97. P. 503–514.
- Grudic A., Jul-Larsen A., Haring, S.J. et al.* Replication protein A prevents accumulation of single-stranded telomeric DNA in cells that use alternative lengthening of telomeres // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 7267–7278.
- Guan X.Y., Zhang H., Bittner M. et al.* Chromosome arm painting probes // *Nat. Genet.* 1996. V. 12. P. 10–11.
- Haaf T., Ward D.C.* Structural analysis of alpha-satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes // *Hum. Mol. Genet.* 1994. V. 3. P. 697–709.
- Hacia J.G., Novotny E.A., Mayer R.A. et al.* Design of modified oligodeoxynucleotide probes to detect telomere repeat sequences in FISH assays // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 4034–4039.
- Hails T., Huttner O., Day A.* Isolation of a *Chlamydomonas reinhardtii* telomere by functional complementation in yeast // *Curr. Genet.* 1995. V. 28. P. 437–440.
- Han H., Hurley L.H., Salazar M.* A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 537–542.
- Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature.* 1990. V. 345. P. 458–460.
- Harper L., Golubovskaya I., Cande W.Z.* A bouquet of chromosomes // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 4025–4032.
- Harrington L.* Those dam-aged telomeres! // *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2004. V. 14. P. 22–28.
- Hashimoto M., Kyo S., Masutomi K. et al.* Analysis of telomeric single-strand overhang length in human endometrial cancers // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 2959–2964.
- Hayflick L., Moorhead P.S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585–621.
- He Y., Neumann R.D., Panyutin I.G.* Intramolecular quadruplex conformation of human telomeric DNA assessed with ¹²⁵I-radioprobe // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 5359–5367.
- Heacock M., Spangler E., Riha K. et al.* Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 2304–2313.
- Hediger F., Neumann F.R., Van Houwe G. et al.* Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. P. 2076–2089.
- Hemann M.T., Strong M.A., Hao L.Y., Greider C.W.* The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability // *Cell.* 2001. V. 107. P. 67–77.
- Henderson E., Hardin C.C., Walk S.K. et al.* Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures con-

- taining guanine-guanine base pairs // *Ibid.* 1987. V. 51. P. 899–908.
- Heng H.H., Tsui L.C. High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent *in situ* hybridization // *J. Chromatogr.* 1998. V. 806. P. 219–229.
- Henson J.D., Hannay J.A., McCarthy S.W. et al. 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. V. 11. P. 217–225.
- Hockemeyer D., Sfeir A.J., Shay J.W. et al. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 2667–2678.
- Horvath M.P., Schweike, V.L., Bevilacqua J.M. et al. Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA // *Cell.* 1998. V. 95. P. 963–974.
- Hultdin M., Gronlund E., Norrback K. et al. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3651–3656.
- Ivessa A.S., Zhou J.Q., Schulz V.P. et al. Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA // *Genes Devel.* 2002. V. 16. P. 1383–1396.
- Jackson S.A., Wang M.L., Goodman H.M., Jiang J. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana* // *Genome (Canada).* 1998. V. 41. P. 566–572.
- Johnson J.E., Smith J.S., Kozak M.L., Johnson F.B. *In vivo* veritas: Using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes // *Biochimie.* 2008. V. 90. P. 1250–1263.
- Johnston M., Hillier L., Riles L. et al. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII // *Nature.* 1997. V. 387. P. 87–90.
- Kang C., Zhang X., Ratliff R. et al. Crystal structure of four-stranded *Oxytricha* telomeric DNA // *Ibid.* 1992. V. 356. P. 126–131.
- Kass-Eisler A., Greider C.W. Recombination in telomere-length maintenance // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. P. 200–204.
- Kipling D., Wilson H.E., Thomson E.J., Cooke H.J. YAC cloning *Mus musculus* telomeric DNA: physical, genetic, *in situ* and STS markers for the distal telomere of chromosome 10 // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. P. 1007–1014.
- Kirwan M., Dokal I. Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces // *Clin. Genet.* 2008. V. 73. P. 103–112.
- Klobutcher L.A., Swanton M.T., Donini P., Prescott D.M. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 3015–3019.
- Knight S.J., Horsley S.W., Regan R. et al. Development and clinical application of an innovative fluorescence *in situ* hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres // *Eur. J. Hum. Genet.* 1997. V. 5. P. 1–8.
- Knight S.J., Lese C.M., Precht K.S. et al. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. P. 320–332.
- Koch J. Detection and sizing of telomeric and other simple repeats by dideoxy-PRINS // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 334. P. 81–88.
- Koch J.E., Kolvraa S., Petersen K.B. et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ* // *Chromosoma.* 1989. V. 98. P. 259–265.
- Konig P., Giraldo R., Chapman L., Rhodes D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA // *Cell.* 1996. V. 85. P. 125–136.
- Krejci K., Koch J. Improved detection and comparative sizing of human chromosomal telomeres *in situ* // *Chromosoma.* 1998. V. 107. P. 198–203.
- Krejci K., Koch J. An *in situ* study of variant telomeric repeats in human chromosomes // *Genomics.* 1999. V. 58. P. 202–206.
- Krejci K., Stentoft J., Koch J. Molecular cytogenetics investigation of the telomeres in a case of *Philadelphia positive* B-ALL with a single telomere expansion // *Neoplasia.* 1999. V. 1. P. 492–497.
- Kuimov A.N. Polypeptide components of telomere nucleoprotein complex // *Biochemistry.* 2004. V. 69. P. 117–129.
- Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M. et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. P. 685–691.
- Laroche T., Martin S.G., Tsai-Pflugfelder M., Gasser S.M. The dynamics of yeast telomeres and silencing proteins through the cell cycle // *J. Struct. Biol.* 2000. V. 129. P. 159–174.
- Larrivee M., LeBel C., Wellinger R.J. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex // *Genes Devel.* 2004. V. 18. P. 1391–1396.
- Lei M., Podell E.R., Cech T.R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 1223–1229.
- Lemmers R.J., de Kievit P., Sandkuijl L. et al. Facioscapulo-humeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere // *Nat. Genet.* 2002. V. 32. P. 235–236.
- Lemmers R.J., Wohlgenuth M., van der Gaag K.J. et al. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulo-humeral muscular dystrophy // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. P. 884–894.
- Lin K.W., Yan J. The telomere length dynamic and methods of its assessment // *J. Cell. Mol. Med.* 2005. V. 9. P. 977–989.
- Louis E.J., Borts R.H. A complete set of marked telomeres in *Saccharomyces cerevisiae* for physical mapping and cloning // *Genetics.* 1995. V. 139. P. 125–136.
- Maeshima K., Janssen S., Laemmli U.K. Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 3218–3228.
- Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening // *Cell.* 1997. V. 88. P. 657–666.

- Makovets S., Herskowitz I., Blackburn E.H.* Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 4019–4031.
- Masny P.S., Bengtsson U., Chung S.A. et al.* Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease? // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. P. 1857–1871.
- Masuno M., Imaizumi K., Nakamura M. et al.* Miller-Dieker syndrome due to maternal cryptic translocation t(10;17)(q26.3;p13.3) // *Am. J. Med. Genet.* 1995. V. 59. P. 441–443.
- Maxam A.M., Gilbert W.* Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages // *Methods Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499–560.
- McClintock B.* The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays* // *Genetics.* 1941. V. 26. P. 234–282.
- Mefford H.C., Trask B.J.* The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. P. 91–102.
- Meselson M., Stahl F.W.* The Replication of DNA in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1958. V. 44. P. 671–682.
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H. et al.* Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes // *Chromosoma.* 1990. V. 99. P. 3–10.
- Miller K.M., Rog O., Cooper J.P.* Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1 // *Nature.* 2006. V. 440. P. 824–828.
- Mitton-Fry R.M., Anderson E.M., Theobald D.L. et al.* Structural basis for telomeric single-stranded DNA recognition by yeast Cdc13 // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 338. P. 241–255.
- Molenaar C., Wiesmeijer K., Verwoerd N.P. et al.* Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 6631–6641.
- Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S. et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 6622–6626.
- Muller H.J.* The remaking of chromosomes // *Collecting Net.* 1938. V. 13. P. 181–198.
- Munoz-Jordan J.L., Cross G.A., de Lange T., Griffith J.D.* t-Loops at trypanosome telomeres // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 579–588.
- Muntoni A., Reddel R.R.* The first molecular details of ALT in human tumor cells // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 2 (Spec.). P. R191–196.
- Nagele R.G., Freeman T., McMorro L. et al.* Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. Pt. 4. P. 525–535.
- Nagele R.G., Velasco A.Q., Anderson W.J. et al.* Telomere associations in interphase nuclei: possible role in maintenance of interphase chromosome topology // *Ibid.* 2001. V. 114. P. 377–388.
- Nakagawa S., Gemmell N.J., Burke T.* Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. P. 2523–2533.
- Nakamura Y., Hirose M., Matsuo H. et al.* Simple, rapid, quantitative, and sensitive detection of telomere repeats in cell lysate by a hybridization protection assay // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. P. 1718–1724.
- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O.* Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide // *Science.* 1991. V. 254. P. 1497–1500.
- Nishikawa T., Okamura H., Nagadoi A. et al.* Solution structure of a telomeric DNA complex of human TRF1 // *Structure.* 2001. V. 9. P. 1237–1251.
- Oexle K.* Telomere length distribution and Southern blot analysis // *J. Theor. Biol.* 1998. V. 190. P. 369–377.
- Oexle K., Kohlschutter A.* Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging // *Neuropediatrics.* 2001. V. 32. P. 123–129.
- Ohki R., Ishikawa F.* Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1627–1637.
- Olovnikov A.M.* Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1971. V. 201. P. 1496–1499.
- Olovnikov A.M.* A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. V. 41. P. 181–190.
- Paeschke K., Simonsson T., Postberg J. et al.* Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo* // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. P. 847–854.
- Panyutin I.G., Kovalsky O.I., Budowsky E.I. et al.* G-DNA: a twice-folded DNA structure adopted by single-stranded-oligo(dG) and its implications for telomeres // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 867–870.
- Parkinson G.N., Lee M.P., Neidle S.* Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA // *Nature.* 2002. V. 417. P. 876–880.
- Parra I., Windle B.* High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization // *Nat. Genet.* 1993. V. 5. P. 17–21.
- Patel P.K., Hosur R.V.* NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2457–2464.
- Phan A.T., Mergny J.L.* Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix // *Ibid.* 2002. V. 30. P. 4618–4625.
- Ponzi M., Pace T., Dore E., Frontali C.* Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei* // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 2991–2995.
- Price C.M., Cech T.R.* Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA // *Genes Devel.* 1987. V. 1. P. 783–793.
- Quina A.S., Parreira L.* Telomere-surrounding regions are transcription-permissive 3D nuclear compartments in human cells // *Exp. Cell Res.* 2005. V. 307. P. 52–64.
- Rahman R., Forsyth N.R., Cui W.* Telomeric 3'-overhang length is associated with the size of telomeres // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. P. 258–265.

- Rezler E.M., Bearss D.J., Hurley L.H. Telomeres and telomerases as drug targets // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002. V. 2. P. 415–423.
- Richards E.J., Ausubel F.M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana* // *Cell*. 1988. V. 53. P. 127–136.
- Riethman H. Closing in on telomeric closure // *Genome Res.* 1997. V. 7. P. 853–855.
- Riethman H.C., Moyzis R.K., Meyne J. et al. Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial-chromosome vector // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 6240–6244.
- Riethman H.C., Xiang Z., Paul S. et al. Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence // *Nature*. 2001. V. 409. P. 948–951.
- Riethman H., Ambrosini A., Castaneda C. et al. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies // *Genome Res.* 2004. V. 14. P. 18–28.
- Riethman H., Ambrosini A., Paul S. Human subtelomere structure and variation // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 505–515.
- Riha K., McKnight T.D., Fajkus J. et al. Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures // *Plant. J.* 2000. V. 23. P. 633–641.
- Riou J.F., Guittat L., Mailliet P. et al. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 2672–2677.
- Rosenberg C., Florijn R.J., Van de Rijke F.M. et al. High resolution DNA fiber-fish on yeast artificial chromosomes: direct visualization of DNA replication // *Nat. Genet.* 1995. V. 10 P. 477–479.
- Rosenberg M., Hui L., Ma J. et al. Characterization of short tandem repeats from thirty-one human telomeres // *Genome Res.* 1997. V. 7. P. 917–923.
- Rufer N., Dragowska W., Thornbury G. et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 743–747.
- Saccone S., De Sario A., Della Valle G., Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 4913–4917.
- Sayegh C., Jhunjhunwala S., Riblet R., Murre C. Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells // *Genes Devel.* 2005. V. 19. P. 322–327.
- Schaetzlein S., Lucas-Hahn A., Lemme E. et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 8034–8038.
- Scherthan H., Jerratsch M., Li B. et al. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores // *Mol. Biol. Cell*. 2000. V. 11. P. 4189–4203.
- Schoeftner S., Blasco M.A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II // *Nat. Cell Biol.* 2008. V. 10. P. 228–236.
- Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. e57.
- Schrock E., du Manoir S., Veldman T. et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes // *Science*. 1996. V. 273. P. 494–497.
- Sedivy J.M., Shippen D.E., Shakirov E.V. Surprise ending // *Nat. Genet.* 2003. 33. P. 114–116.
- Serakinci N., Koch J. Detection and sizing of telomeric repeat DNA *in situ* // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 200–201.
- Serrano A.L., Andres V. Telomeres and cardiovascular disease: does size matter? // *Circulat. Res.* 2004. V. 94. P. 575–584.
- Shampay J., Szostak J.W., Blackburn E.H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast // *Nature*. 1984. V. 310. P. 154–157.
- Slijepcevic P. Telomere length measurement by Q-FISH // *Methods Cell Sci.* 2001. V. 23. P. 17–22.
- Stewart S.A., Ben-Porath I., Carey V.J. et al. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 492–496.
- Sundquist W.I., Klug A. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops // *Nature*. 1989. V. 342. P. 825–829.
- Szostak J.W., Blackburn E.H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors // *Cell*. 1982. V. 29. P. 245–255.
- Taddei A., Gasser S.M. Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1677. P. 120–128.
- Tahara H., Kusunoki M., Yamanaka Y. et al. G-tail telomere HPA: simple measurement of human single-stranded telomeric overhangs // *Nat. Methods*. 2005. V. 2. P. 829–831.
- Tam R., Smith K.P., Lawrence J.B. The 4q subtelomere harboring the FSHD locus is specifically anchored with peripheral heterochromatin unlike most human telomeres // *J. Cell Biol.* 2004. V. 167. P. 269–279.
- Teng S.C., Zakian V.A. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 8083–8093.
- Therkelsen A.J., Nielsen A., Koch J. et al. Staining of human telomeres with primed *in situ* labeling (PRINS) // *Cytogenet. Cell Genet.* 1995. V. 68. P. 115–118.
- Tupler R., Gabellini D. Molecular basis of facioscapulo-humeral muscular dystrophy // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. P. 557–566.
- Van der Ploeg L.H., Cornelissen A.W. The contribution of chromosomal translocations to antigenic variation in *Trypanosoma brucei* // *Philosop. Transact. Royal Soc. L.* 1984. V. 307. P. 13–26.
- Veltman J.A., Schoenmakers E.F., Eussen B.H. et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. P. 1269–1276.
- Vespa L., Warrington R.T., Mokros P. et al. ATM regulates the length of individual telomere tracts in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 18145–18150.

- Walker P.M.B. How different are the DNAs from related animals? // *Nature*. 1968. V. 219. P. 228–232.
- Wang Y., Patel D.J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex // *Structure*. 1993. V. 1. P. 263–282.
- Watson J.D., Crick F.H. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid // *Nature*. 1953. V. 171. P. 964–967.
- Weipoltshammer K., Schofer C., Almeder M. et al. Intranuclear anchoring of repetitive DNA sequences: centromeres, telomeres, and ribosomal DNA // *J. Cell Biol.* 1999. V. 147. P. 1409–1418.
- Weitzmann M.N., Woodford K.J., Usdin K. The development and use of a DNA polymerase arrest assay for the evaluation of parameters affecting intrastrand tetraplex formation // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 20958–20964.
- Wellinger R.J., Wolf A.J., Zakian V.A. Use of non-denaturing Southern hybridization and two dimensional agarose gels to detect putative intermediates in telomere replication in *Saccharomyces cerevisiae* // *Chromosoma*. 1992. V. 102. P. S150–156.
- Wellinger R.J., Wolf A.J., Zakian V.A. Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid // *Mol. Cell. Biol.* 1993a. V. 13. P. 4057–4065.
- Wellinger R.J., Wolf A.J., Zakian V.A. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase // *Cell*. 1993b. V. 72. P. 51–60.
- Wellinger R.J., Ethier K., Labrecque P., Zakian V.A. Evidence for a new step in telomere maintenance // *Ibid.* 1996. V. 85. P. 423–433.
- Wijmenga C., Hewitt J.E., Sandkuijl L.A. et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy // *Nat. Genet.* 1992. V. 2. P. 26–30.
- Williamson J.R., Raghuraman M.K., Cech T.R. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model // *Cell*. 1989. V. 59. P. 871–880.
- Wong J.M., Collins K. Telomere maintenance and disease // *Lancet*. 2003. V. 362. 983–988.
- Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E. et al. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end // *Genes Devel.* 1997. V. 11. P. 2801–2809.
- Xu L., Blackburn E.H. Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres // *Mol. Cell*. 2007. V. 28. P. 315–327.
- Yan J., Chen B.Z., Bouchard E.F., Drouin R. The labeling efficiency of human telomeres is increased by double-strand PRINS // *Chromosoma*. 2004. V. 113. P. 204–209.
- Yan J., Bouchard E.F., Samassekou O., Chen B.Z. Identification of a human chromosome-specific interstitial telomere-like sequence (ITS) at 22q11.2 using double-strand PRINS // *Cytogenet. Genome Res.* 2007. V. 116. P. 29–37.
- Yegorov Y.E., Akimov S.S., Akhmalisheva A.K. et al. Blockade of telomerase function in various cells // *Anti-cancer Drug Design*. 1999. V. 14. P. 305–316.
- Zahler A.M., Williamson J.R., Cech T.R., Prescott D.M. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures // *Nature*. 1991. V. 350. P. 718–720.
- Zaug A.J., Podell E.R., Cech T.R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 10864–10869.
- Zhao Y., Hoshiyama H., Shay J.W., Wright W.E. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. e14.
- Zhdanova N.S., Rubtsov N.B., Minina Iu. M. Terminal regions of mammal chromosomes: plasticity and role in evolution // *Genetika*. 2007. V. 43. P. 873–886.
- Zijlmans J.M., Martens U.M., Poon S.S. et al. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7423–7428.
- Zou Y., Gryaznov S.M., Shay J.W. et al. Asynchronous replication timing of telomeres at opposite arms of mammalian chromosomes // *Ibid.* 2004. V. 101. P. 12928–12933.

Analysis of Telomeric DNA: Current Approaches and Methods

P. V. Dmitriev^a and E. S. Vassetzky^{a,b}

^a Paris-South 11 University, Gustave Roussy Institute, CNRS UMR 8126

^b Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

e-mail: vassetzky@igr.fr; dmitriev@igr.fr

Abstract—Terminal parts of linear chromosomes in eukaryotes are represented by telomeric DNA and associated proteins. Length, sequence and structure are the major parameters of telomeric DNA. The present review describes a set of molecular, cellular and genetic methods used to study the parameters of telomeric DNA.

Key words: Telomeric and subtelomeric DNA, cloning and sequencing of telomeric DNA, size changes and visualization of telomeric DNA, three-dimensional organization of telomeric DNA.