

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْ نِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَانْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و کرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر ما دهای رحمت را و بکستران کنج های دانشت را به امید رحمت
تو ای مهربان ترین مهربانان

کتاب جامع

تلومر و تلومراز تکنیک‌ها و روش‌ها

مترجمین:

دکتر آرزو صیاد

(استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

مهیا عطائی طالبی

(کارشناس ارشد بیولوژی)

فرزانه بهاری

(کارشناس ارشد ژنتیک)

مریم خلیلی اواتی

(کارشناس ارشد سلولی و مولکولی)

□ می‌انبر

□ IQ3

□ 

□ ☒ کتاب جامع

عنوان و نام پدیدآور	: تلومر و تلومراز؛ تکنیک‌ها و روش‌ها / [ویراستار جو سونگ یانگ]؛ ترجمه آرزو صیاد... [و دیگران].
مشخصات نشر	: تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۲.
مشخصات ظاهری	: ۱۸۸ ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	: ۱۶۰۰۰ ریال 2-61-6223-978-600
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: عنوان اصلی: Telomeres and telomerase: methods and protocols.
یادداشت	: ترجمه آرزو صیاد، مهیا عطائی طالبی، فرزانه بهاری، مریم خلیلی اواتی.
یادداشت	: واژه‌نامه.
موضوع	: تلومراز--دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	: تلومر--دستنامه‌های آزمایشگاهی
شناسه افزوده	: جو، سونگ یانگ
شناسه افزوده	: Zhou, songyang
شناسه افزوده	: صیاد، آرزو، ۱۳۶۲ - ، مترجم
رده بندی کنگره	: ۱۳۹۲ ۸ت۸ / ۶۰۶ QP
رده بندی دیویی	: ۵۷۲/۸۷
شماره کتابشناسی ملی	: ۳۲۷۳۶۸۴

نام کتاب: تلومر و تلومراز؛ تکنیک‌ها و روش‌ها

مترجمین: آرزو صیاد، مهیا عطائی طالبی، فرزانه بهاری و مریم خلیلی اواتی

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول ۱۳۹۳

شمارگان: ۵۰۰

چاپ: ندای ایران

لیتوگرافی و صحافی: راد

ناظر چاپ: اقبال شرقی

مدیر فنی و هنری: شیرین آرده

طراحی و صفحه آرایی: الهام عربی . مریم آرده

بهاء: ۱۶۰۰۰ تومان

Website: www.drKhaliligroup.ir

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- پاساژ پارس - طبقه اول

مرکز فروش: ۶۶۵۶۹۲۱۶ - ۰۲۱

مدیر فروش: ۵۵۰۸۵۸۹ - ۰۹۱۲

طلیحه سخن مؤلف؛

فاصله‌ی زمانی ۴۰ ساله‌ای میان شناسایی اولیه‌ی تلومرها و کشف تلومراز وجود دارد. اما واکنش‌ها در مورد تلومراز و چگونگی حفظ و نگهداری تلومرها از آن زمان به بعد رشد تصاعدی داشته است. هرچه نگاه ما نسبت به چگونگی حفظ و نگهداری تلومر و نقش حیاتی آن در رشد، تکثیر، پیری سلول و بیماری‌هایی نظیر سرطان عمیق‌تر و جامع‌تر می‌شود، تلومرها بیش‌تر مورد توجه قرار می‌گیرند. به عنوان مثال در اکثر سرطان‌های انسانی، معمولاً بقای تلومرها حفظ شده است و در بسیاری از انواع سلول‌های انسانی به نظر می‌رسد که فرسایش تلومری منجر به محدود شدن ظرفیت تکثیر سلول‌ها می‌شود. این کتاب پس از اعطای جایزه‌ی نوبل فیزیولوژی یا پزشکی به دکتر الیزابت. اچ. بلک‌برن، کارون. دبلیو. گریدر و جک. دبلیو. سزوستاک برای کارهای پیشگامانه آن‌ها در زمینه تلومرها و تلومراز، نوشته شد. پیشرفت‌های جدید و سریع تکنولوژی موجب شده است تا ما به ابزارهای متنوع و مختلفی مجهز شویم و هم‌چنین بسترهایی برای پاسخ به سوالات پایه‌ای در مورد تنظیم تلومر آماده شده است و به محققان اجازه انجام آزمایشات مختلف را با استفاده از سیستم‌های مدل مختلف داده است. به عنوان مثال دیدگاه‌های پروتئومیکس، ژنومیکس و روش‌های مولکولی بینش

بی‌سابقه‌ای نسبت به شبکه‌های پیچیده‌ی برهم‌کنش‌های پروتئینی که در کروماتین تلومر فعالیت دارند و هم‌چنین، اطلاعات جزئی راجع به پویایی تلومرها در پاسخ به استرس یا محرک فراهم کرده‌اند.

درحالی‌که اولین کتاب تلومرها و تلومراز: روش‌ها و دستورالعمل‌ها (MiMB.Vol 19) غالباً بر روی آزمایش تلومراز متمرکز شده است. این کتاب حوزه‌ی وسیع‌تری، شامل آزمایشات متفاوت بسیار زیادی را دربرمی‌گیرد که برای محقق اجازه بررسی و جستجو در مورد عملکرد پروتئین‌های تلومری و پاسخ‌های DNA تلومری را فراهم می‌کند. در این کتاب دیدگاه‌های بیوشیمیایی، مولکولی و پرتئومیکسی به‌طور دقیق مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بنابراین محققان به آسانی می‌توانند از این دستورالعمل‌ها استفاده کنند. ما بر این اعتقادیم که این کتاب بسیار مفید و آموزنده است.

Zhou songyang
Houston, TX



مقدمه مترجم:

اولین بار جمله‌ی «جای بسی تأسف است، بازماندگان نسل بوعلی‌سینا را ترجمه کتب نسل شاگردان او» را در مقدمه کتاب‌های دکتر خلیلی دیدیم و چه جمله‌ی عمیقی. به حقیقت که این جمله در ابتدای کتاب‌هایی از تبار ترجمه‌ای باید حک گردد. بگذریم، این کتاب برای نخستین بار در سال ۲۰۰۲ میلادی به چاپ رسید. مزیت اصلی این کتاب، علاوه بر بررسی تکنیک‌های مختلف سنجش تلومر و پروتئین‌های تلومرازی، همراهی آن با ذکر نکات عملی مهم در روند آزمایش است که بر آنانی که روپوش پوشیده و کار آزمایشگاهی کرده‌اند، ارزش تبیین چنین نکاتی پوشیده نیست. خلأ موجود در میان منابع فارسی با موضوعیت روش‌های عملی و بیان تکنیک‌ها به صورت تخصصی، علی‌رغم سرمایه‌گذاری‌های کلان در تألیف یا ترجمه کتاب‌های مبانی، اصول و مفاهیم تئوری در علوم پایه پزشکی علی‌الخصوص در حیطه‌ی ژنتیک کاملاً محسوس بوده است. وجود چنین کمبودی، انگیزه اصلی ما شد برای ترجمه‌ی کتاب پیش رو که البته کتابی کاملاً تخصصی است و مخاطبان اصلی آن اساتید ارجمند، دانش‌پژوهان محترم و دانشجویان تحصیلات تکمیلی گرانقدر می‌باشند. از آن جایی که نسخه حاضر چاپ اول کتاب می‌باشد، احتمالاً دارای مشکلات و نقایصی است که پیشاپیش با تشکر از تمامی خوانندگان عزیز، تقاضا می‌شود به منظور ارائه هرچه بهتر کتاب در چاپ‌های بعدی از طریق پست الکترونیکی ar.sayad@yahoo.com ما را یاری رسانید.

گروه مترجمین

فروردین ۱۳۹۳

فهرست مطالب

صفحه

فصل و عنوان

فصل ۱: مقدمه‌ای بر تلومرها و تلومراز.....	۹
فصل ۲: آنالیز طول متوسط تلومر در سلول‌های کشت داده شده انسانی.....	۲۱
فصل ۳: آنالیز طول تلومر توسط هیبریداسیون در جای فلورسنت کمی.....	۲۹
فصل ۴: آنالیز طولی اختصاصی رشته‌ای تلومر توسط هیبریداسیون در جای فلورسنت.....	۴۱
فصل ۵: روش ۱: اندازه‌گیری طول انتهای آزاد دارای گوانین در تلومر (G-Overhang): روش DSN.....	۵۴
فصل ۶: روش ۲: اندازه‌گیری طول انتهای آزاد غنی از گوانین در تلومر: HPA انتهای گوانینی تلومری.....	۶۴
فصل ۷: سنتز رشته G/C انتهای تلومر: اندازه‌گیری عملکرد تلومراز و اضافه شدن سیتوزین.....	۷۱
فصل ۸: ساختارهای چهاروجهی گوانین و ترکیبات تعاملی چهاروجهی گوانین (G-Guadruplex).....	۸۵
فصل ۹: بررسی تلومراز مخمر با استفاده از روش طویل‌سازی پرایمر.....	۱۰۳
فصل ۱۰: روش تکثیر تکرارهای تلومری: اندازه‌گیری میزان فعالیت تلومراز.....	۱۱۴
فصل ۱۱: انواع تکنیک‌های FISH (CO-FISH, COD-FISH, ReD-FISH, SKY-FISH).....	۱۱۹
فصل ۱۲: آشکارسازی موقعیت تلومراز انسانی از طریق تکنیک‌های میکروسکوپ فلورسنت.....	۱۳۲
فصل ۱۳: تجزیه و تحلیل سیتوژنتیک تلومر غیرعملکردی.....	۱۴۵
فصل ۱۴: ردیابی پاسخ تلومر نسبت به آسیب.....	۱۵۰
فصل ۱۵: تجزیه و تحلیل پروتئین‌های تلومر با استفاده از Immunoprecipitation کروماتین (ChIP).....	۱۵۶
فصل ۱۶: مطالعه برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین تلومری به وسیله‌ی (BiFC) و آزمایشات مبتنی بر آرایه‌های پپتیدی.....	۱۶۵
فصل ۱۷: کمپلکس POT1 – TPP1 تلومر انسانی و نقش آن در تنظیم فعالیت تلومراز.....	۱۷۷

مقدمه‌ای بر تلومرها و تلومراز

Zhou Songyang

چکیده

تلومرها انتهای کروموزوم‌ها هستند که نقش مهمی در بیولوژی سلول‌های یوکاریوتی دارند. طول و تمامیت تلومرها برای جلوگیری از عملکرد نامناسب تلومر که با پیری، سالخوردگی، بیماری‌ها و سرطان‌ها مرتبط شده است و از طریق فعالیت هماهنگ تلومراز و شبکه‌های سایر پروتئین‌ها و فاکتورها، نگهداری و حفظ می‌شود؛ برقرار شده است. ابزار و روش‌های مطالعه‌ی تلومرها، گسترده شده‌اند که این روش‌ها به ما اجازه داده‌اند جزئیات بیشتر و تصاویری با قدرت تفکیک بالا از عوامل متنوع و مسیرهای درگیر در ناحیه تلومرها به دست آید.

کلمات کلیدی: تلومرها، تلومراز، ارتباطات تلومری^۱، عملکرد نامناسب تلومر.

۱- ساختار تلومر

کار ابتدایی مولرومک کلیتوک (۱ و ۲) به شناسایی اولیه اهمیت انتهای کروموزوم- تلومرها- منجر شد. کارهای بلک‌برن و گریدر (۳ و ۴) باعث بیشتر و بهتر مشخص شدن تلومراز که به نگهداری و حفظ توالی‌های انتهایی کروموزومی کمک می‌کند، شد. در سال‌های بعدی، اطلاعات عظیمی از مکانیسم‌های چگونگی حفظ تلومر و پیامدهای از هم گسیختگی هموستاز (هم‌ایستایی) تلومر به دست آمد.

^۱ telomere interactome: این واژه اولین بار در سال ۱۹۹۹ به وجود آمد و به کار برده شد. در زیست‌شناسی مولکولی، اینترکتوم به عنوان مجموعه کامل میان واکنش‌های مولکولی بین سلول‌ها تعریف می‌شود. به خصوص به عنوان میان واکنش‌های فیزیکی مابین مولکول‌ها در نظر گرفته می‌شود که البته در علم ژنتیک به معنی میان واکنش‌های غیرمستقیم بین ژن‌ها نیز به کار می‌رود. در واقع می‌توان گفت به معنی شبکه بیولوژیکی (biological network) می‌باشد {مترجم}.

در اکثریت یوکاریوت‌ها، DNA تلومری شامل توالی‌های تکراری پشت‌سرهم به همراه پایانه انتهایی در ناحیه انتهایی آزاد 3' تک رشته غنی از G^۱ می‌باشد. هم طول و هم توالی دقیق توالی تکراری و انتهایی آزاد از گونه‌ای به گونه دیگر می‌تواند متفاوت باشد. در سلول‌های پستانداران، توالی‌های تکراری 3'-TTAGGG-5' می‌تواند به طول صدها کیلوباز وجود داشته باشد (به عنوان مثال در رده‌های مشخص موشی)، به همراه انتهایی آزاد 3' با طولی در محدوده بین ۷۵ و ۳۰۰ باز (۵ و ۶). مابین انتهاهای تلومری تکرار شونده و توالی‌های ژنی اختصاصی کروموزوم، ناحیه تحت تلومری^۲ وجود دارد که تنوع و پیچیدگی بسیار زیادی در میان ارگانیسم‌ها نشان می‌دهد و شاید حاوی ژن‌ها نیز باشد (۷) و در تنوع ژنتیکی مشارکت داشته باشد (۸ و ۱۲).

تلومرها به کمک پروتئین‌های متنوع متصل شونده به تلومر، ساختار اختصاصی به خود گرفته‌اند، همچنان که توسط مطالعات بیوشیمیایی و EM نشان داده شده است (۱۳). در این مورد، حمله‌ی انتهایی آزاد 3' به سمت DNA تلومر دورشته‌ای منجر به تشکیل t-لوپ^۳ می‌شود، در حالی که یک رشته به صورت تشکیل D-لوپ جایگزین می‌شود (۱۳ و ۱۴). چنین پیکربندی، انتهایی تلومری را از حملات نوکلئازها می‌تواند محافظت کند و از به هم چسبیدگی انتها به انتهایی کروموزوم‌ها با یکدیگر جلوگیری می‌کند (۱۵). انتهایی آزاد غنی از G در تلومرهای پستانداران G-چهاررشته‌ای را می‌تواند تشکیل دهد که باعث مهار دسترسی تلومراز می‌گردد (۱۶ و ۱۸).

۲- ارتباطات تلومری^۴: شبکه سیگنالینگ تلومری یکپارچه

مشکل ذاتی در طی ساخت DNA سلول پستانداران، همانندسازی انتهایی کروموزوم‌های خطی می‌باشد (۱۹) و اجزای TERT و TERC^۵ که همان کمپلکس نوکلئوپروتئینی تلومری هستند، به سبب همانندسازی انتهایی ناقص، برای جلوگیری از بین رفتن اطلاعات ژنتیکی به کار می‌رود (۲۱ و ۲۵). پیشرفت شگرفی در چند سال گذشته در فهم ما از شبکه کمپلکس پروتئینی در ناحیه تلومرها به وجود آمده است (ارتباطات تلومری) (۲۶). ارتباطات تلومری، راه‌های متنوع سیگنالینگ تلومر و حضور ماشین مولکولی را با یکدیگر آمیخته می‌کند که باعث تنظیم تلومرهای پستانداران می‌شود. واکنش‌های پروتئین-پروتئین مرکز اصلی ارتباطات تلومری می‌باشد که این پروتئین‌ها شامل تلومراز، TRF1 و TRF2 می‌باشد.

1 Single-stranded G-rich 3' overhang

2 subtelomeric

3 t- loop

4 Telomer interactome

۵. تلومراز کمپلکس آنزیمی از جنس ریبونوکلئوپروتئین می‌باشد که تکرارهای تلومری را به انتهایی کروموزوم‌ها اضافه می‌کند. هسته مرکزی تلومراز ۲

زیرواحد دارد؛ یکی از زیرواحد‌ها دارای فعالیت کاتالیتیکی ترانس کریپتاز معکوس است (Telomerase reverse transcriptase (TERT)

subunit) و دیگری الگوی RNA تلومراز می‌باشد (teromerase RNA (TERC) subunit). TERC به نام TR نیز نامیده می‌شود. ژن

TERT در انسان در موقعیت 33, 15p و ژن TERC در موقعیت 3q26.3 قرار گرفته است {مترجم}.

تلومراز محتوی ترانس کریپتاز معکوس بسیار محافظت شده (TERT) و RNA به عنوان الگو (TR یا TER) می‌باشد (۲۲). با استفاده از انتهای آزاد انتهای $3'$ تلومر که به عنوان پرایمری برای هم ردیف کردن^۱ با توالی‌های موجود در TERC می‌باشد، TERT تکرارهای تلومری را به انتهای کروموزوم اضافه می‌کند. تعدادی از پروتئین‌ها و فاکتورهایی که در تقابل با تلومراز هستند، شامل دیس کرین^۲ و TCAB1 می‌باشند (۲۷ و ۲۸). سلول‌هایی که کمبود TERT دارند، تلومرهایشان را از طریق مسیر جایگزین طویل کننده‌ی تلومرها^۳ طویل می‌کنند (۲۹-۳۱).

TRF1 و TRF2 به طور اختصاصی از طریق دومین Myb به DNA تلومری متصل می‌شوند (۳۲-۳۵). تحقیقات نشان داده که TRF1، طول تکرارهای تلومر را کنترل و شمارش می‌کند و این کار احتمالاً از طریق کمپلکس شدن با TIN2، تانکیراز^۴، PINX1، TPP1 و POT1 انجام می‌گیرد (۳۶-۴۷). در مقایسه، TRF2 نقش اساسی در چندین مورد دارد که از جمله، در حفاظت انتهایی، به کارگیری مجدد دومین BRCT پروتئین RAP1، پروتئین ERCC1/XPF در ترمیم جایگزینی نوکلئوتیدی، هلیکاز BLM و کمپلکس (MRN) Mre11/Rad50/NBS1 ایفای نقش می‌کند. (۴۵ و ۴۸-۵۶). تصور بر این است که TRF2 برای پایداری t لوپ بحرانی است که احتمالاً برای حفاظت انتهایی از شکست‌های DNA دارای اهمیت می‌باشد (۳۵، ۵۷ و ۵۸). به علاوه، WRN (هلیکاز شبه RecQ^۵) که حفاظت انتها را تنظیم می‌کند) و همچنین با ساختار D لوپ و همانندسازی رشته تلومر غنی از گوانین ارتباط دارد (۵۹-۶۱). در حقیقت، ۶ پروتئین تلومری (TRF1، TRF2، TPP1، TIN2، RAP1، POT1) می‌توانند با یکدیگر کمپلکس تشکیل دهند و هسته ارتباطات تلومری (۲۶)، میان‌کنش‌های پروتئین-پروتئین هماهنگ و ارتباطات مابین کمپلکس‌های پروتئینی را ایجاد نمایند. در این پروتئین‌ها جمعیت کثیری از فاکتورها برای تنظیم تلومرها به صورت پویا عمل می‌کنند.

مطالعات میان‌واکنش پروتئین-پروتئین، شواهدی مبنی بر وجود پس ترجمه‌ای ارائه می‌دهند که این اصلاحات پس ترجمه‌ای در پایداری تلومری اهمیت دارند. به عنوان مثال، کینازها (مثلاً ATM و DNA PK) در ناحیه تلومرها نیز درگیرند (۶۲-۶۸)، در حالی که ریبوزیلاسیون پلی-ADP^۶ نقش مهمی در تنظیم TRF1 و TRF2 ایفا می‌کند (۴۰، ۶۹ و ۷۰). به علاوه، احتمالاً یوبی کوئیتیناسیون^۷، سطح دیگری از کنترل بر روی پروتئین‌های تلومری را اضافه می‌نماید (۷۱). مطالعات بیشتری مورد نیاز می‌باشد تا مسیر سیگنال‌هایی که آنزیم‌های اصلاح کننده را فعال می‌کنند، روشن‌تر شود و مشخص شود که آیا اصلاح کننده‌های دیگری نیز در این مسیرها درگیر می‌باشند یا خیر.

1 Align

2 Dyskerin

3 Alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway

4 Tankyrase

5 RecQ-like helicase WRN

6 poly-ADP ribosylation

7 Ubiquitination

۳- عملکرد نامناسب تلمور، پایداری ژنوم و بیماری‌ها

بدون محافظت از تلمور، کوتاه شدن کروموزوم‌ها تا حد بحرانی شاید منجر به اتصال انتها به انتهای کروموزومی شود و کروموزوم‌های دی‌ستریک تشکیل شود و در نهایت منجر به آنیوپلوئیدی شود (۷۲). انتهای حفاظت شده می‌تواند مسیرهای پاسخ به آسیب DNA، نقاط بازرس چرخه سلولی، پیری یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را فعال نمایند (۶۷ و ۶۸ و ۷۳-۷۶). پیشرفت سرطان و سالخوردگی با تغییرات تلمورها مرتبط است تصور می‌شود که فرسایش تلمور که در بسیاری از انواع سلول‌های انسانی دیده می‌شود ظرفیت تکثیر سلول‌های تغییر شکل یافته را محدود می‌کند. در انسان، بیان تلموراز به طور شدیدی تنظیم شده است. در بیش از ۹۰٪ سرطان‌های انسانی، پایداری تلمور طبیعی از بین می‌رود. TERT سطح بیان بالاتری پیدا می‌کند (۲۵). قوی‌ترین گواه تا به امروز برای اهمیت و عملکرد تلموراز و پایداری تلموراز، از مطالعات انجام شده در بیماری‌های انسانی و سلول‌های موشی به دست آمده است. بیماری‌هایی با پایداری نادر انسانی به نام سندرم مادرزادی دیس‌کراتوزیر^۱ (DKC)، به صورت غیرطبیعی دارای تلمورهای کوتاه و فعالیت تلمورازی پائین‌تری هستند (۷۷) و ظهور بالینی فنوتیپ‌های سالخوردگی زودرس و افزایش بروز سرطان را نشان می‌دهند (۷۷-۸۰). DKC وابسته به X در نتیجه ایجاد جهش در دیسکرین رخ می‌دهد که می‌تواند به الگوی RNA تلموراز (TERC) متصل شود (۸۱). DKC اتوزومال غالب بر اثر جهش در ژن TERC ایجاد می‌شود (۷۹). اخیراً، جهش‌هایی در TIN2 که یکی از پروتئین‌های هسته تلمور می‌باشد در بیماران DKC دیده شده است (۸۲). به علاوه، بعضی از بیماران دچار لوسمی، دارای جهش‌هایی در ژن‌های hTERT و hTERT می‌باشند (۷۷، ۷۸).

چندین پروتئین مسئول در ترمیم DNA در ناحیه تلمورها جمع شده‌اند و با پروتئین‌های متصل شونده با تلمور میان‌کنش دارند (۷۸)، که ژن‌های این چندین پروتئین در سندرم‌های ناپایداری ژنومی انسانی دارای جهش می‌باشند و مشخصه‌ی این سندرم‌ها سالخوردگی، استعداد افزایش یافته ابتلا به سرطان‌ها و تلمورهای خیلی کوتاه شده می‌باشد. به عنوان مثال، در بیماری سندرم ورنر (WS)^۲ که توارث اتوزومال مغلوب دارد، نقص در ژن WRN وجود دارد. WRN نوعی اگزونوکلاز و هلیکاز ۳' به ۵' می‌باشد که در همانندسازی DNA، ترمیم، نوترکیبی و رونویسی مشارکت دارد (۵۹، ۸۳-۹۰). سلول‌های فرد مبتلا به WS دچار پیری زودرس، فرسایش افزایش یافته تلمور و نقص در ترمیم تلمور می‌شوند (۹۱). همانند سندرم ورنر، جهش در ژن BLM که نوعی هلیکاز را کد می‌کند و عملکردهای متنوعی دارد، باعث ایجاد سندرم بلوم^۳ (BS) می‌شود (۹۲-۹۴). BLM و WRN در میان‌کنش با پروتئین TRF2 متصل شونده به تلمور در سلول‌های ALT (طویل کننده‌ی جایگزین تلمورها) دخیل هستند (۵۱، ۵۲). آتاکسی تلانژکتازیا (AT)^۴ و سندرم شکست نیجمن^۵ (NBS) ویژگی‌های مشترکی دارند که شامل عقب ماندگی رشد و استعداد ابتلا به بدخیمی لنفوئیدی می‌باشد (۹۵-۱۰۰). سلول‌های این بیماران، ناپایداری ژنومی مشخصی را نشان می‌دهند؛ مانند اتصال انتها به انتهای کروموزومی. محصولات ژن مسئول در بیماری NBS (ژن NBS1) و AT

1 Dyskeratosis Congenita syndrome

2 WS: Werner syndrome

3 BS: Bloom syndrome

4 AT: Ataxia telangiectasia

5 NBS: Nijmegen

(ژن ATM) در میان کنش با تعدادی از پروتئین‌های تلومری می‌باشند (۴۹، ۶۵، ۶۷، ۶۸، ۱۰۱-۱۰۴). آنمی فانکونی^۱ (FA) بیماری هتروژنی می‌باشد که با از دست رفتن مغز استخوان و بروز ناهنجاری‌های رشدی و سرطان همراه است (۱۰۵-۱۰۷). در بیماران FA، ارتباط قوی بین عملکرد نامناسب تلومر و نقص هماتوپیتیک وجود دارد (۱۰۸-۱۱۰). چندین مدل موشی از بیماری‌ها که در بالا ذکر شد، ایجاد شده است. جهش در تعدادی از تنظیم کننده‌های تلومر (مثل، Rte1، RAD51D، کینازهای خانواده Ku، ATM) گواه مهمی مبنی بر این‌که عملکرد نامناسب تلومر موجب توسعه بیماری‌هایی همچون سرطان می‌شود، فراهم آورده است (۱۱۱-۱۱۵). حذف کردن هموزیگوت BLM کننده است (۱۱۶)، در حالی که موش‌های $TERC^{-/-}$ و $WRN^{-/-}$ به طور اولیه طبیعی‌اند (۱۱۷). به هر حال، تولید مثل متوالی موش‌های $TERC^{-/-}$ به از دست رفتن پیشرفته تلومر، اتصال انتها به انتهای کروموزوم و بیماری‌های متنوع مرتبط با سن که بافت‌های با تکثیر بالا را تحت تأثیر قرار می‌دهد، ختم می‌شود (۱۱۸ و ۱۱۹). به علاوه، غیرفعال شدن ژن کد کننده TERC در نوترکیبی به همراه جهش هیپومورفیک BLM و یا جهش خنثی WRN، منجر به پاتولوژی افزایش یافته در مقایسه با $TERC^{-/-}$ می‌شود (۱۲۰ و ۱۲۱). به طور مشابه، موش‌هایی که به طور هموزیگوت حذف در ژن TERT را داشتند، کوتاه شدگی سریع‌تری در تلومر و همچنین ناپایداری ژنومی نشان می‌دهند (۱۲۲). غیرفعال شدن هموزیگوت پروتئین هسته مرکزی تلومری (TIN2 یا TRF1) کننده می‌باشد (۱۲۳-۱۲۵). موش‌های حذف ژن شده POT1، موش POT1a و POT1b، جهت بررسی عملکرد به طور جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند و مشخص شد که هر دو برای پایداری تلومر طبیعی مورد نیاز می‌باشند (۱۲۶، ۱۲۷). در موش‌های دچار دیس‌پلازی آدرنوکورتیکال (acd)^۲ (جهش خودبه‌خودی اتوزومال مغلوب)، جهش در ژن TPP1 منجر به پیرایش نابه‌جا^۳ در ژن TPP1 می‌شود که به دیس‌پلازی آدرنال، مشکلات پوستی و نقص در سلول‌های جنینی^۴ و زایا^۵ ختم می‌شود.

۴- ابزارهایی جهت مطالعه زیست‌شناسی تلومر

پس از سال‌ها، ابزارها و روش‌های فراوانی برای مطالعات تلومر توسعه یافته است که ما را قادر می‌سازد که در زمینه بسیاری از جنبه‌های زیست‌شناسی تلومر تحقیق و جستجو کنیم. در همین زمان، تکنیک‌هایی که به طور معمول در سایر زمینه‌های زیستی به کار می‌رود، برای مطالعه تلومر به کار گرفته شده است. ما اکنون قادر به سنجش تغییرات تلومرها و پروتئین‌های تلومری در مقیاس وسیع و با قدرت تفکیک بالاتر (در تک سلول یا سطح کروموزوم) و با حساسیت بیشتر می‌باشیم. ابزارهایی که به طور معمول برای مطالعات تلومر به کار می‌روند، به طور اصلی به ۳ دسته تقسیم‌بندی می‌شوند. دسته اول به مطالعه DNA تلومری، روش‌های بیوشیمیایی مانند EM و NMR جهت جستجوی ساختار و ویژگی DNA تلومر، می‌پردازد. به عنوان مثال، ساختار ۴ وجهی -G احتمالاً نقش مهمی در ساختار تلومر ایفا می‌کند. در دوره‌های اخیر، ما روش‌هایی را برای شناسایی شکل‌گیری و ساختار ۴ وجهی -G ایجاد نموده‌ایم. طول تلومر، شاخص اصلی فعالیت تلومراز می‌باشد، ولیکن سنجش‌ها برای اندازه‌گیری طول تلومر، بسیار دشوار بوده است. تاکنون روش‌هایی که

1 FA: Fanconi Anemia

2 Acd: adrenocortical dysplasia

3 Aberrant splicing

4 embryologic cell

5 germ cell

6 G-quadruplexes

جهت تعیین طول DNA تکراری تلومر (و انتهای آزاد) تحت شرایط مختلف و در طیف متنوعی از سیستم‌ها توسعه یافته‌اند. این سنجنش‌ها امکان بررسی تغییرات طول تلومر را در جمعیت‌های سلولی یا در تک سلول فراهم می‌سازند. علاوه بر سنجنش‌های TRF و STELLA، این دسته از روش‌ها، ابزارهای گسترده‌ای برای سنجنش طول انتهای آزاد 3' که اطلاعات دقیق بیشتری از تغییرات در محافظت تلومر می‌تواند ایجاد کند، اضافه کرده‌اند.

دسته دوم ابزارها، بر پروتئین‌هایی که در عملکرد تلومر مهم هستند، تمرکز دارد. مهم‌ترین آنزیم در ناحیه تلومر، تلومراز می‌باشد و مطالعات قبلی، تعدادی روش برای سنجنش فعالیت تلومراز فراهم آورده‌اند. در چند سال گذشته، سایر پروتئین‌های مرتبط با تلومر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. انواع روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای آنالیز این فاکتورهای تلومر به کار گرفته شده است، مثال‌هایی از این دست شامل ابزارهای پروتئومی برای مطالعه شبکه پروتئین‌های تلومری و چگونگی واکنش آن‌ها با یکدیگر و اطلاعات فضایی و زمانی چگونگی هدف‌گیری پروتئین‌ها به سمت تلومرها می‌باشد. این دسته ابزارها سنجنش مکملی پروتئین فلورسنت را در میان سایرین اضافه کرده‌اند که این سنجنش به بررسی شبکه میان کنش پروتئین- پروتئین کمک می‌کند.

آخرین دسته‌ی روش‌ها برای فهمیدن پیامد عملکرد نامناسب تلومر می‌باشد. در حالی که تغییرات طول تلومر، شاید بازتابی از عملکرد نامناسب تلومر باشد، ولیکن عملکرد نامناسب تلومر زمان بیشتری می‌گیرد تا اثرات آن بر جمعیت سلولی آشکار شود. به بیان دیگر، پیامدهای سریع به عنوان نتیجه‌ی عدم کلاهک‌گذاری و با عدم محافظت در ناحیه تلومر توسط ابزارهای متنوعی می‌تواند سنجنش شود که بسیاری از آن‌ها بر روش‌های میکروسکوپی برای آشکار سازی آسیب و تغییرات در تلومرها تکیه دارند. به عنوان مثال یکی از مصادیق مهم عملکرد نامناسب تلومر، به کارگیری تلومری از پروتئین‌هایی که در پاسخ‌های آسیب DNA می‌باشند، است. این پاسخ توسط بخش TIF¹ می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. سپس تعداد فوسی آسیب اختصاصی DNA در ناحیه تلومر است. می‌تواند کمی شود و مقایسه گردد. زمانی که از پروب اختصاصی تلومر، هیبریداسیون در جای فلورسنت فضایی کروموزوم (CO-FISH)²، استفاده می‌شود، جهت مطلق و قطعی 5' به 3' انتهای p به انتهای q³ از توالی DNA می‌تواند تعیین شود. این تکنیک ثابت کرده است که به خصوص قدرت سنجنش مشکلات مرتبط با عملکرد نامناسب تلومر که شامل تعویض کروماتیدهای خواهری تلومر (T-SCE)⁴ و اتصال تلومر می‌باشد، را دارا هستند.

در اختتام به طور خلاصه، ما در دارایی‌هایمان انبار همیشه مبسوطی داریم که به ما در جهت مباحثه در مورد عملکرد تلومراز و پروتئین‌های متصل شونده به تلومر، بررسی تغییرات تلومرها و شفاف‌سازی پیامدهای عملکرد نامناسب تلومر، کمک‌رسانی ممتدی دارد.

1 TIF: telomere dysfunction- induced foci.

2 CO-FISH: chromosome orientation fluorescence in situ hybridization

3 5' to 3' pter-qter direction

4 T-SCE: Telomere sister chromatid exchange

منابع

1. Müller, H. J. (1938) The remaking of chromosomes. *Collecting Net*. 13, 181–198.
2. McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*. 26, 234–282.
3. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43, 405–13.
4. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 51, 887–98.
5. Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*. 88, 657–66.
6. Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev*. 11, 2801–9.
7. Mefford, H. C., and Trask, B. J. (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 3, 91–102.
8. Pologe, L. G., and Ravetch, J. V. (1988) Large deletions result from breakage and healing of *P. falciparum* chromosomes. *Cell*. 55, 869–74.
9. Corcoran, L. M., Thompson, J. K., Walliker, D., and Kemp, D. J. (1988) Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell*. 53, 807–13.
10. Trask, B. J., Friedman, C., Martin-Gallardo, A., Rowen, L., Akinbami, C., Blankenship, J., Collins, C., Giorgi, D., Iadonato, S., Johnson, F., Kuo, W. L., Massa, H., Morrish, T., Naylor, S., Nguyen, O. T., Rouquier, S., Smith, T., Wong, D. J., Youngblom, J., and van den Engh, G. (1998) Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet*. 7, 13–26.
11. de Bruin, D., Lanzer, M., and Ravetch, J. V. (1994) The polymorphic subtelomeric regions of *Plasmodium falciparum* chromosomes contain arrays of repetitive sequence elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 619–23.
12. Louis, E. J. (1995) The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11, 1553–73.
13. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97, 503–14.
14. Nikitina, T., and Woodcock, C. L. (2004) Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J Cell Biol*. 166, 161–5.
15. de Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 19, 2100–10.
16. Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., and Prescott, D. M. (1991) Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*. 350, 718–20.
17. Williamson, J. R., Raghuraman, M. K., and Cech, T. R. (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*. 59, 871–80.
18. Wang, Y., and Patel, D. J. (1992) Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry*. 31, 8112–9.
19. Watson, J. D. (1971) The regulation of DNA synthesis in eukaryotes. *Adv Cell Biol*. 2, 1–46.
20. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 41, 181–90.
21. Autexier, C., and Greider, C. W. (1996) Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci*. 21, 387–91.
22. Cech, T. R., Nakamura, T. M., and Lingner, J. (1997) Telomerase is a true reverse transcriptase. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 62, 1202–5.
23. McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 34, 331–358.
24. Collins, K., and Mitchell, J. R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 21, 564–79.
25. Granger, M. P., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002) Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*. 41, 29–40.
26. Songyang, Z., and Liu, D. (2006) Inside the mammalian telomere interactome: regulation and regulatory activities of telomeres. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 16, 103–18.
27. Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., and Reddel, R. R. (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 315, 1850–3.

28. Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., Terns, M. P., and Artandi, S. E. (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*. 323, 644–8.
 29. Johnson, F. B., Marciniak, R. A., McVey, M., Stewart, S. A., Hahn, W. C., and Guarente, L. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *Embo J*. 20, 905–13.
 30. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*. 21, 598–610.
 31. Lundblad, V. (2002) Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 21, 522–31.
 32. Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science*. 270, 1663–7.
 33. Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J*. 16, 1785–94.
 34. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*. 17, 231–5.
 35. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*. 92, 401–13.
 36. van Steensel, B., and de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*. 385, 740–3.
 37. Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*. 23, 405–12.
 38. Smith, S., and de Lange, T. (2000) Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol*. 10, 1299–302.
 39. Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*. 20, 1659–68.
 40. Smith, S., Giriati, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998) Tankyrase, a poly(ADPribose) polymerase at human telomeres. *Science*. 282, 1484–7.
 41. Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001) The Pin2/ TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell*. 107, 347–59.
 42. Baumann, P., and Cech, T. R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*. 292, 1171–5.
 43. Cong, Y. S., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66, 407–25.
- 7Introduction to Telomeres and Telomerase
15. de Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 19, 2100–10.
 16. Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., and Prescott, D. M. (1991) Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*. 350, 718–20.
 17. Williamson, J. R., Raghuraman, M. K., and Cech, T. R. (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*. 59, 871–80.
 18. Wang, Y., and Patel, D. J. (1992) Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry*. 31, 8112–9.
 19. Watson, J. D. (1971) The regulation of DNA synthesis in eukaryotes. *Adv Cell Biol*. 2, 1–46.
 20. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 41, 181–90.
 21. Autexier, C., and Greider, C. W. (1996) Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci*. 21, 387–91.
 22. Cech, T. R., Nakamura, T. M., and Lingner, J. (1997) Telomerase is a true reverse transcriptase. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 62, 1202–5.
 23. McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 34, 331–358.
 24. Collins, K., and Mitchell, J. R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 21, 564–79.
 25. Granger, M. P., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002) Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*. 41, 29–40.

26. Songyang, Z., and Liu, D. (2006) Inside the mammalian telomere interactome: regulation and regulatory activities of telomeres. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 16, 103–18.
27. Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., and Reddel, R. R. (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science.* 315, 1850–3.
28. Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., Terns, M. P., and Artandi, S. E. (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science.* 323, 644–8.
29. Johnson, F. B., Marciniak, R. A., McVey, M., Stewart, S. A., Hahn, W. C., and Guarente, L. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *Embo J.* 20, 905–13.
30. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 21, 598–610.
31. Lundblad, V. (2002) Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene.* 21, 522–31.
32. Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science.* 270, 1663–7.
33. Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J.* 16, 1785–94.
34. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 17, 231–5.
35. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92, 401–13.
36. van Steensel, B., and de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature.* 385, 740–3.
37. Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet.* 23, 405–12.
38. Smith, S., and de Lange, T. (2000) Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* 10, 1299–302.
39. Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20, 1659–68.
40. Smith, S., Giriati, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998) Tankyrase, a poly(ADPribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 282, 1484–7.
41. Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001) The Pin2/ TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell.* 107, 347–59.
42. Baumann, P., and Cech, T. R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science.* 292, 1171–5.
43. Cong, Y. S., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 407–25.
44. Loayza, D., and De Lange, T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature.* 424, 1013–8.
45. Lillard-Wetherell, K., Machwe, A., Langland, G. T., Combs, K. A., Behbehani, G. K., Schonberg, S. A., German, J., Turchi, J. J., Orren, D. K., and Groden, J. (2004) Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum Mol Genet.* 13, 1919–32.
46. Liu, D., Safari, A., O'Connor, M. S., Chan, D. W., Laegeler, A., Qin, J., and Songyang, Z. (2004) PTOF interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol.* 6, 673–80.
47. Ye, J. Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A. N., Loayza, D., Hooper, S. M., Chait, B. T., and de Lange, T. (2004) POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev.* 18, 1649–54.
48. Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell.* 101, 471–83.
49. Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H., and de Lange, T. (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet.* 25, 347–52.
50. Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S. G., and Lee, I. (2000) Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett.* 481, 81–5.
51. Stavropoulos, D. J., Bradshaw, P. S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M., and Meyn, M. S. (2002) The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum Mol Genet.* 11, 3135–44.

52. Opreško, P. L., von Kobbe, C., Laine, J. P., Harrigan, J., Hickson, I. D., and Bohr, V. A. (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem.* 277, 41110–9.
53. Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J. H., and de Lange, T. (2003) ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell.* 12, 1489–98.
54. O'Connor, M. S., Safari, A., Liu, D., Qin, J., and Songyang, Z. (2004) The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem.* 279, 28585–91.
55. Opreško, P. L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kolvræ, S., May, A., Seidman, M. M., and Bohr, V. A. (2004) The Werner Syndrome Helicase and Exonuclease Cooperate to Resolve Telomeric D Loops in a Manner Regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell.* 14, 763–774.
56. Kim, H., Lee, O. H., Xin, H., Chen, L. Y., Qin, J., Chae, H. K., Lin, S. Y., Safari, A., Liu, D., and Songyang, Z. (2009) TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 372–9.
57. Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001) T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J.* 20, 5532–40.
58. de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* 21, 532–40.
59. Comai, L., and Li, B. (2004) The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 125, 521–8.
60. Machwe, A., Xiao, L., and Orrén, D. K. (2004) TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene.* 23, 149–56.
61. Crabbe, L., Verdun, R. E., Haggbom, C. I., and Karlseder, J. (2004) Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science.* 306, 1951–3.
62. Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E., and Goodwin, E. H. (1999) DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 14899–904.
63. Kishi, S., Zhou, X. Z., Ziv, Y., Khoo, C., Hill, D. E., Shiloh, Y., and Lu, K. P. (2001) Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem.* 276, 29282–91.
64. Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S. M., Taccioli, G. E., and Blasco, M. A. (2002) Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *Embo J.* 21, 6275–87.
65. Pandita, T. K. (2002) ATM function and telomere stability. *Oncogene.* 21, 611–8.
66. Li, B., and Comai, L. (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res.* 30, 3653–61.
67. Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol.* 13, 1549–56.
68. d'Adda di Fagnana, F., Reaper, P. M., ClayFarrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and
93. Nakayama, H. (2002) RecQ family helicases: roles as tumor suppressor proteins. *Oncogene.* 21, 9008–21.
94. Ellis, N. A., and German, J. (1996) Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet.* 5, 1457–63.
95. Kastan, M. B., and Lim, D. S. (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 179–86.
96. Meyn, M. S. (1999) Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet.* 55, 289–304.
97. Lavin, M. F., and Shiloh, Y. (1997) The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol.* 15, 177–202.
98. Digweed, M., Reis, A., and Sperling, K. (1999) Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays.* 21, 649–56.
99. Shiloh, Y. (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet.* 31, 635–62.
100. van der Burg, I., Chrzanowska, K. H., Smeets, D., and Weemaes, C. (1996) Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet.* 33, 153–6.

101. Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., 3rd, Hays, L., Morgan, W. F., and Petrini, J. H. (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*. 93, 477–86.
102. Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K. M., Chrzanowska, K. H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P. R., Nowak, N. J., Stumm, M., Weemaes, C. M., Gatti, R. A., Wilson, R. K., Digweed, M., Rosenthal, A., Sperling, K., Concannon, P., and Reis, A. (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*. 93, 467–76.
103. Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., and et al. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 268, 1749–53.
104. Purdy, A., and Su, T. T. (2004) Telomeres: not all breaks are equal. *Curr Biol*. 14, R613–4.
105. Carreau, M., and Buchwald, M. (1998) The Fanconi anemia genes. *Curr Opin Pediatr*. 10, 65–9.
106. Dokal, I. (1996) Severe aplastic anemia including Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita. *Curr Opin Hematol*. 3, 453–60.
107. Auerbach, A. D. (1995) Fanconi anemia. *Dermatol Clin*. 13, 41–9.
108. Callen, E., Ramirez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Frias, S., Molina, B., Badell, I., Olive, T., Ortega, J. J., and Surrallés, J. (2002) The clastogenic response of the 1q12 heterochromatic region to DNA cross-linking agents is independent of the Fanconi anaemia pathway. *Carcinogenesis*. 23, 1267–71.
109. Leteurtre, F., Li, X., Guardiola, P., Le Roux, G., Sergere, J. C., Richard, P., Carosella, E. D., and Gluckman, E. (1999) Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br J Haematol*. 105, 883–93.
110. Ball, S. E., Gibson, F. M., Rizzo, S., Tooze, J. A., Marsh, J. C., and Gordon-Smith, E. C. (1998) Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood*. 91, 3582–92.
111. Pittman, D. L., and Schimenti, J. C. (2000) Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, Rad51d/Rad51l3. *Genesis*. 26, 167–73.
112. Samper, E., Goytisolo, F. A., Slijepcevic, P., van Buul, P. P., and Blasco, M. A. (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep*. 1, 244–52.
113. Wong, K. K., Maser, R. S., Bachoo, R. M., Menon, J., Carrasco, D. R., Gu, Y., Alt, F. W., and DePinho, R. A. (2003) Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*. 421, 643–8.
114. Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldi, P. G., Pittman, D. L., Blasco, M. A., and West, S. C. (2004) Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/ repair protein. *Cell*. 117, 337–47.
115. Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E., Tam, P. P., Nagy, A., and Lansdorp, P. M. (2004) Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell*. 117, 873–86.
116. Chester, N., Kuo, F., Kozak, C., O'Hara, C. D., and Leder, P. (1998) Stage-specific apoptosis, developmental delay, and embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption in the murine Bloom's syndrome gene. *Genes Dev*. 12, 3382–93.
117. Introduction to Telomeres and Telomerase
117. Lombard, D. B., Beard, C., Johnson, B., Marciniak, R. A., Dausman, J., Bronson, R., Buhlmann, J. E., Lipman, R., Curry, R., Sharpe, A., Jaenisch, R., and Guarente, L. (2000) Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background. *Mol Cell Biol*. 20, 3286–91.
118. Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 91, 25–34.
119. Blasco, M. A. (2002) Immunosenescence phenotypes in the telomerase knockout mouse. *Springer Semin Immunopathol*. 24, 75–85.
120. Du, X., Shen, J., Kugan, N., Furth, E. E., Lombard, D. B., Cheung, C., Pak, S., Luo, G., Pignolo, R. J., DePinho, R. A., Guarente, L., and Johnson, F. B. (2004) Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes. *Mol Cell Biol*. 24, 8437–46.
121. Chang, S., Multani, A. S., Cabrera, N. G., Naylor, M. L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L., and DePinho, R. A. (2004) Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet*. 36, 877–82.
122. Chiang, Y. J., Hemann, M. T., Hathcock, K. S., Tessarollo, L., Feigenbaum, L., Hahn, W. C., and Hodes, R. J. (2004) Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol*. 24, 7024–31.

123. Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., and de Lange, T. (2003) Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol.* 23, 6533–41.
124. Chiang, Y. J., Kim, S. H., Tesserollo, L., Campisi, J., and Hodes, R. J. (2004) Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Mol Cell Biol.* 24, 6631–4.
125. Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M., and Shinkai, Y. (2004) Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem.* 279, 1442–8.
126. Hockemeyer, D., Daniels, J. P., Takai, H., and de Lange, T. (2006) Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell.* 126, 63–77.
127. Wu, L., Multani, A. S., He, H., CosmeBlanco, W., Deng, Y., Deng, J. M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S. M., Deng, Y., Behringer, R. R., and Chang, S. (2006) Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell.* 126, 49–62.
128. Keegan, C. E., Hutz, J. E., Else, T., Adamska, M., Shah, S. P., Kent, A. E., Howes, J. M., Beamer, W. G., and Hammer, G. D. (2005) Urogenital and caudal dysgenesis in adrenocortical dysplasia (acd) mice is caused by a splicing mutation in a novel telomeric regulator. *Hum Mol Genet.* 14, 113–23.