



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE
DIRETTORE: PROF.SSA CLAUDIA CROSIO
XXVI CICLO P.O.R

INDIRIZZO: PROTEOMICA, METABOLOMICA, BIOCHIMICA CLINICA E BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

STUDIO DELLA LUNGHEZZA TELOMERICA NELLA POPOLAZIONE SARDA

TESI DI DOTTORATO:
Dott. Andrea Mannu

TUTOR:
Prof. Luca Deiana

IL COORDINATORE:
Prof.ssa Claudia Crosio

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della scuola di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2010/2011 – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1. Breve descrizione del progetto AKeA	6
1.2. Telomeri e telomerasi	8
1.3. Fattori che influenzano la lunghezza telomerica	18
1.3.1. Stress Ossidativo e lunghezza dei Telomeri	18
1.3.2. Età	19
1.3.3. Genere	20
2. SCOPO DELLA RICERCA	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 Soggetti partecipanti	24
3.2 Estrazione di DNA genomico da cellule	25
3.3 Analisi spettrofotometrica del DNA estratto	27
3.4 Verifica dell'integrità del DNA estratto	28

3.5 Metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica	30
3.6 Determinazione della lunghezza dei telomeri (T/S) mediante Real-Time PCR	32
3.7 Analisi dei dati della Real Time PCR	34
3.8 Analisi statistica	36
4. RISULTATI	37
5. DISCUSSIONE	44
6. BIBLIOGRAFIA	46

Introduzione

1. Introduzione

Uno dei più recenti sviluppi della ricerca scientifica riguarda il campo della biologia dei telomeri. La comprensione del ruolo dei telomeri, della telomerasi, e di altri fattori correlati nei processi di invecchiamento e di immortalità cellulare hanno registrato degli enormi progressi negli ultimi anni e la letteratura in questo settore è in continua crescita. La ragione dell'entusiasmo è che la telomerasi e i telomeri potrebbero essere un elemento centrale nella progressione all'immortalità cellulare o al cancro. L'applicazione di conoscenze in quest'area potrebbe portare ad una diagnosi più efficace e ad un trattamento migliore delle neoplasie maligne. Questa tesi focalizzerà la sua attenzione sui telomeri, che potrebbero avere un ruolo nei processi dell'invecchiamento. Nel 2009 Elizabeth Blackburn, Carol Greider e Jack Szostak hanno ricevuto il Premio Nobel per la Medicina per la scoperta dei processi fondamentali attraverso i quali le estremità cromosomiche sono protette dai telomeri e dall'enzima telomerasi. L'attribuzione di tale prestigioso premio riconosce giustamente l'enorme importanza della loro ricerca alla nostra comprensione sul mantenimento dell'integrità del genoma. Tuttavia, gran parte della biologia dei telomeri in un contesto evolutivo è ancora da studiare. Sappiamo ancora poco del modello di eredità della lunghezza dei telomeri, e dei fattori ambientali che influiscono sull'accorciamento e sull'allungamento dei telomeri stessi. Tutte queste incognite fanno di questo un emozionante e potenzialmente molto fruttuoso settore della ricerca in cui vi è ancora molto da scoprire.

1.1. Breve descrizione del progetto AKeA

La longevità viene definita come l'effetto dell'interazione di fattori sia genetici sia ambientali. Negli ultimi decenni, nella maggior parte dei paesi sviluppati, è stata osservata una crescita stabile nell'aspettativa di vita media, che viene attribuita, principalmente, alla diminuzione della mortalità in età avanzata ⁽⁵⁸⁾. Diversi studi hanno dimostrato che la Sardegna, rispetto alle altre regioni italiane, possiede un numero di centenari e ultracentenari decisamente superiore, (ad oggi circa 372), con una media di circa 22 ogni centomila abitanti, contro una media tra gli 8 e i 10 che si può osservare in altre parti del mondo. Questo rapporto risulta in crescita col passare del tempo, dal momento che nel periodo '97-'99 la media era di 13,5 ultracentenari, salita nel 2000 a 19 ⁽²³⁾. E' emerso, inoltre, che il 60% della più alta proporzione di centenari, nati tra il 1880 e il 1902, è dovuta alla più bassa mortalità degli uomini sardi tra gli 80 e i 99 anni ⁽¹⁶⁾. Una più bassa mortalità a queste età implica che un maggior numero di persone potrebbe raggiungere e superare la soglia dei 100 anni. Il Progetto AKeA, pensato, elaborato e diretto dal prof. Luca Deiana nel 1996, è un progetto che verte allo studio e alla comprensione di tutti quei fattori che contribuiscono alla longevità, così marcata in Sardegna ⁽²³⁾. Questa ricerca viene svolta da un'equipe di ricercatori comprendenti demografi, medici e biologi. In particolare, un accurato studio demografico, ha reso possibile la raccolta e la catalogazione in database elettronici delle informazioni relative ai dati anagrafici delle persone viventi d'età superiore agli 80 anni, nei 377 comuni della Sardegna; questo tipo di studio è stato effettuato mediante la consultazione dei registri degli atti di nascita, matrimonio e morte e mediante la costruzione di un albero

genealogico di una parte dei soggetti arruolati. L'equipe di medici si occupa della raccolta delle informazioni relative allo stato di salute, mediante la compilazione delle cartelle cliniche, e del prelievo di sangue, previo consenso. I biologi e i ricercatori si occupano dell'analisi e dello studio dei meccanismi biochimici e genetici coinvolti nell'invecchiamento. Alcuni studi, condotti all'interno del Progetto AKeA ⁽⁷¹⁾, hanno messo in evidenza le differenti cause di mortalità ad età avanzate tra la Sardegna e le altre regioni italiane e all'interno dell'isola. Da questi studi è emerso che il tasso di mortalità per malattie cardiovascolari sia più basso in Sardegna rispetto al resto d'Italia; all'interno dell'isola, sebbene sia stata individuata un'area interna, in provincia di Nuoro, con una più alta concentrazione di centenari, l'individuazione delle cause di mortalità è più complessa: il livello di urbanizzazione, industrializzazione e inquinamento di particolari aree geografiche possono determinare un aumento di mortalità. I risultati di tali studi hanno suggerito l'esistenza di specifici fattori genetici ed ambientali (condizioni nei primi anni dell'esistenza, stili di vita, istruzione, occupazione, luogo di residenza, abitudini alimentari, inquinamento, ecc) che favoriscono un'aumentata presenza di centenari nella popolazione sarda. Lo studio dei fattori genetici, così come la conoscenza delle loro specifiche funzioni, è determinante per la comprensione dei meccanismi alla base del processo dell'invecchiamento.

1.2. Telomeri e telomerasi

I telomeri sono delle sequenze di DNA ripetuto, conservate, specifiche e non codificanti localizzate alle estremità dei cromosomi eucariotici ⁽¹¹⁾. I telomeri sono presenti in quasi tutti gli organismi viventi, dai ciliati ai mammiferi, e differiscono per la sequenza ripetuta. Nell'uomo la sequenza è 5'-TTAGGG-3' ripetuto in tandem per circa 15 kb ^(61,62). Questa estremità costituisce un lembo sporgente detto overhang, che può organizzarsi in una struttura secondaria, in seguito ad appaiamenti "non Watson e Crick" tra i residui di guanina: quello che si viene a formare è una sorta di ansa detta T-loop. ^(25,33). I telomeri si associano con le proteine nucleari incluse le proteine del rivestimento nucleare ⁽²⁴⁾. Le proteine che legano le sequenze telomeriche identificate nell'uomo sono numerose, tra le quali TRF1 e TRF2 (TTAGGG repeat binding factors), TERT (telomerase reverse transcriptase) e TEP-1 (telomerase-associated protein) (Fig.1). Molte di queste proteine potrebbero essere coinvolte nella regolazione della struttura e della funzione telomerica. Studi di microscopia elettronica hanno rivelato che, ad esempio, TRF2 rimodella in vitro il DNA telomerico lineare in un esteso cappio a T a doppio filamento ⁽³³⁾.

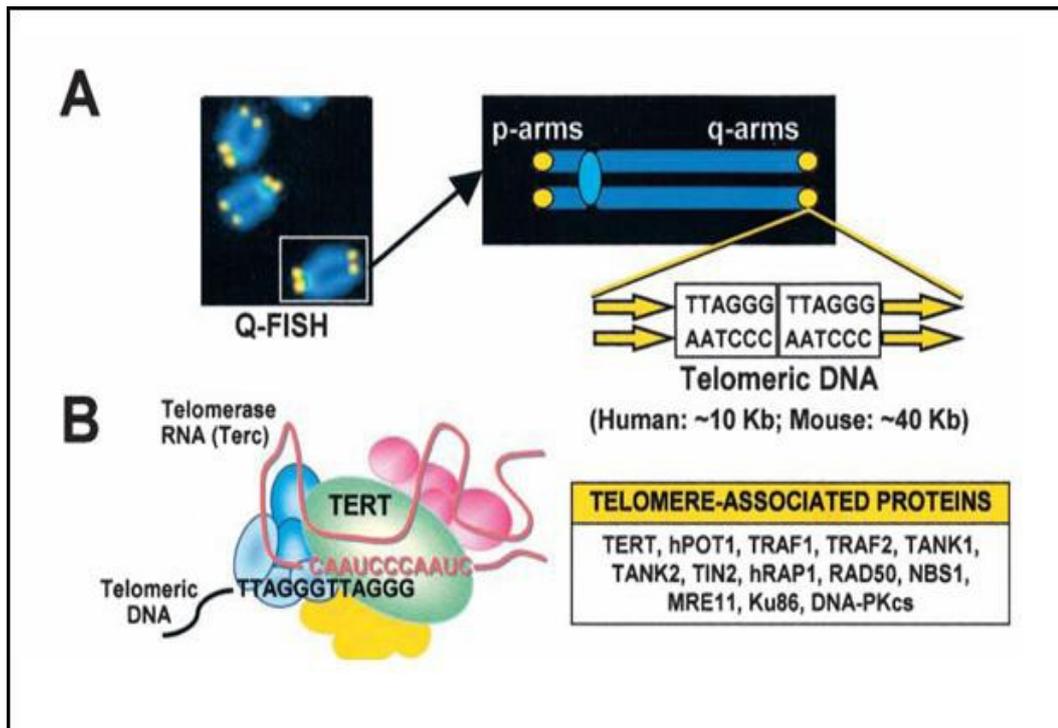


Figura 1: Telomeri e telomerasi. A) la marcatura a fluorescenza Q-FISH rivela i telomeri (giallo) nella parte terminale dei cromosomi (blu). Lo schema a destra mostra la sequenza telomerica ripetuta in tandem presente nel DNA telomerico umano. B) Composizione proteica del complesso ribonucleoproteico della telomerasi umana, caratterizzata solo in parte; lo schema mostra le componenti telomeriche a DNA ed RNA (Terc), la subunità catalitica della telomerasi trascritta inversa (TERT) e le proteine associate alla telomerasi. (Serrano A. L., Circ Res. 2004).

Si ritiene che i telomeri siano necessari per mantenere l'integrità dei cromosomi proteggendone l'estremità dalla degradazione degli enzimi cellulari ⁽¹¹⁾. I cromosomi privi di telomeri sono, infatti, molto suscettibili all'azione enzimatica ed interagiscono chimicamente in modo rapido con altre strutture cellulari, tra cui i cromosomi stessi. I telomeri, inoltre, prevengono la fusione dei cromosomi e il riarrangiamento del DNA. Un'altra importante funzione dei telomeri è quella di fornire un cuscinetto di DNA non codificante per prevenire un progressivo accorciamento del cromosoma che si verifica con la replicazione, il cosiddetto problema di fine-replicazione ^(52,53). La

polimerizzazione del DNA può procedere, infatti, solamente nella direzione da 5' a 3'. Nel filamento "comando", la polimerizzazione del DNA procede lentamente da 5' a 3'. Nel filamento "ritardo", i primers dell'RNA si legano per iniziare la polimerizzazione in diversi punti, creando i cosiddetti frammenti di Okazaki. Successivamente, i primers dell'RNA sono rimossi e gli intervalli riempiti dalla DNA polimerasi (da 5' a 3') utilizzando come innesco il DNA a monte appena sintetizzato. L'RNA all'estremità 5' non può essere sostituito con il DNA perché non ci sono primer a monte (5') (Fig2).

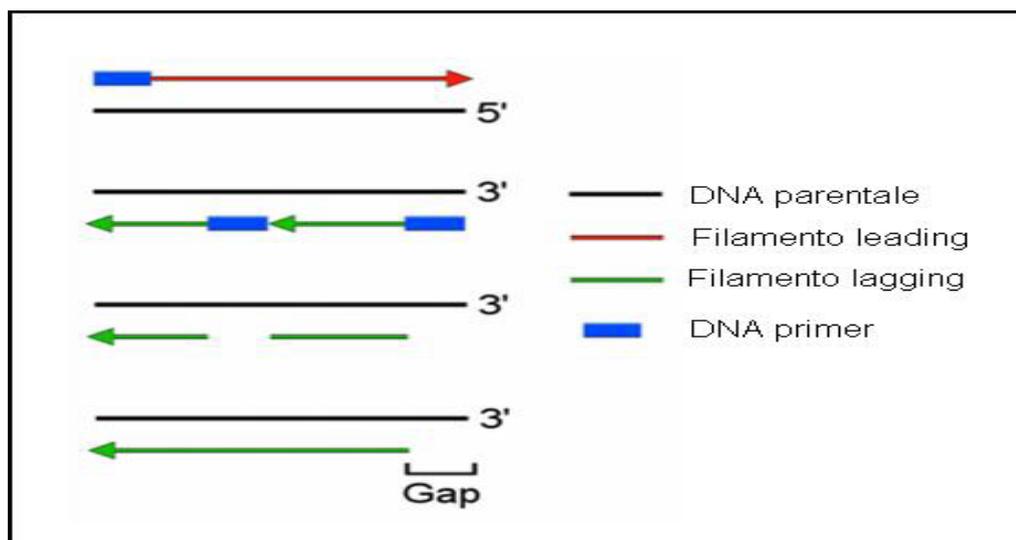


Figura 2: Schema della replicazione del DNA. Poiché la replicazione del DNA è bidirezionale ed inizia da un primer ad opera di una DNA polimerasi unidirezionale, ciascun ciclo di replicazione del DNA lascia 50-200 pb di DNA non replicate all'estremità del cromosoma. (Campisi J., S. Kim, C. Lim, M, Rubio. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. Experimental Gerontology 36 (2001) 1619-1637).

In questo modo, ad ogni divisione cellulare (ciclo di replicazione), si perdono da 50 a 200 basi al filamento 5' neo sintetizzato con una progressiva riduzione della molecola di DNA ⁽³⁸⁾. Perciò, quando i telomeri, dalla loro lunghezza massima iniziale di 10-15 kb (nelle linee germinali), raggiungono una lunghezza di 4-6 kb, le cellule umane arrestano irreversibilmente la loro crescita, mostrando un caratteristico fenotipo senescente, fino alla perdita del DNA telomerico e dei suoi effetti protettivi. Nel 1961 Hayflick pubblicò un lavoro ⁽³⁴⁾ nel quale riportava che fibroblasti umani in coltura smettevano di proliferare dopo circa 50 divisioni, e che tutte le cellule perdevano la capacità proliferativa dopo un uniforme e fissato numero di duplicazioni. Questa soglia è stata chiamata "Hayflick limit" e assume che ogni tipo di cellula abbia un limite del potenziale replicativo intrinsecamente fissato (Fig.3)

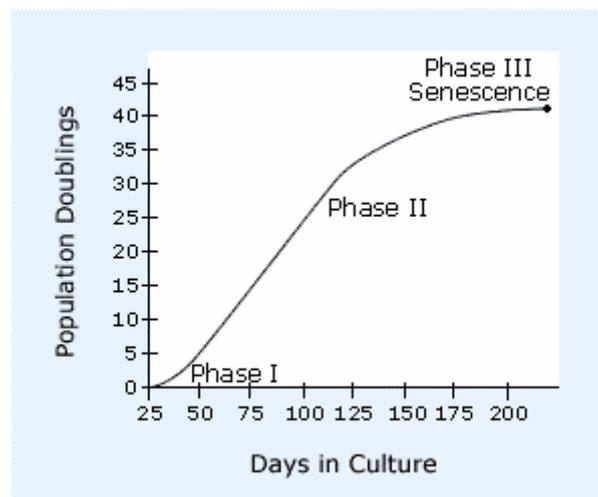


Figura 3: Rappresentazione schematica del limite di Hayflick.

Il fatto che ogni telomero si accorci ad ogni divisione cellulare e che in presenza della telomerasi, che blocca tale accorciamento, le cellule diventino quasi immortali, ha suggerito che lunghezza del telomero agisca come orologio mitotico responsabile della limitata durata della vita della nostra e delle altre specie. Alsopp e collaboratori ⁽²⁾ nel 1992 hanno dimostrato che il numero delle divisioni a cui le cellule possono andare incontro in coltura è proporzionale alla lunghezza iniziale del telomero. Inoltre, le cellule di pazienti affetti dalla sindrome di Hutchinson-Gilford, una malattia caratterizzata da invecchiamento precoce, hanno dei telomeri più corti e una ridotta capacità di proliferare. La teoria dell'orologio mitotico ha portato ad un periodo di grande euforia, associata all'ipotesi che, se i telomeri sono i responsabili dell'invecchiamento, bloccando il loro accorciamento si sarebbe raggiunta l'immortalità. Per questo motivo i ricercatori cominciarono a studiare tutte le malattie che presentavano come fenotipo una senilità precoce, come ad esempio la sindrome di Werner (le persone affette da questa patologia non raggiungono i quarant'anni, e a venti anni mostrano le caratteristiche di sessantenni). In realtà si è scoperto che tale patologia non è imputabile ad un accorciamento precoce o più veloce dei telomeri, ma ad una mutazione su un gene codificante una elicasi. La regressione telomerica va a coincidere, nell'ultima fase, con il fenomeno dell'invecchiamento cellulare (senescenza replicativa). Pertanto, dopo un numero calcolabile di duplicazioni (50-70 nelle cellule umane), al di sopra di una certa soglia critica di riduzione della lunghezza telomerica, la crescita cellulare si blocca. Si passa così da una fase di senescenza ad una fase di crisi, nella quale la letalità cellulare prevale a seguito della fusione e della frammentazione

dei cromosomi. I telomeri umani si accorciano con l'aumentare dell'età^(30,43,44,45) ed in risposta a sporadici eventi, come l'aumento dello stress ossidativo^(28,41,82). Alcuni studi di popolazione hanno dimostrato che una diminuzione della lunghezza dei telomeri negli umani può essere associata a minori performances cognitive⁽⁷⁸⁾, a condizioni correlate all'età come insulino resistenza^(29,32), a infarto del miocardio e a elevati livelli di mortalità. Questi dati suggeriscono che la lunghezza dei telomeri sia implicata nei cambiamenti biologici e funzionali osservati con l'età. Misure cardiovascolari, come la pressione, sono state inversamente associate con la lunghezza dei telomeri, ma i risultati sono inconsistenti^(9,8,31). Le cellule stabilizzano la perdita dei telomeri e trasferiscono un insieme completo di cromosomi alla loro progenie tramite l'attività dell'enzima telomerasi⁽¹⁴⁾. Benché una debole attività telomerasica sia rilevabile in alcune popolazioni di cellule staminali e linfociti, in condizioni normali, la telomerasi è presente e attiva soltanto nelle cellule germinali (spermatozoi, cellule uovo e loro cellule progenitrici) e durante lo sviluppo embrionale, garantendo così la completezza dei telomeri al momento della nascita. Nel corso della vita la telomerasi scompare in quasi tutte le cellule somatiche e pertanto viene a determinarsi un accorciamento progressivo dei telomeri in rapporto al numero delle replicazioni cellulari nel frattempo intervenute. La telomerasi è il complesso enzimatico che ha il compito di allungare i telomeri ed essa ne contrasta, in parte, il normale accorciamento durante la replicazione. La telomerasi (Fig.4) è un complesso ribonucleoproteico multimerico costituito da tre componenti:

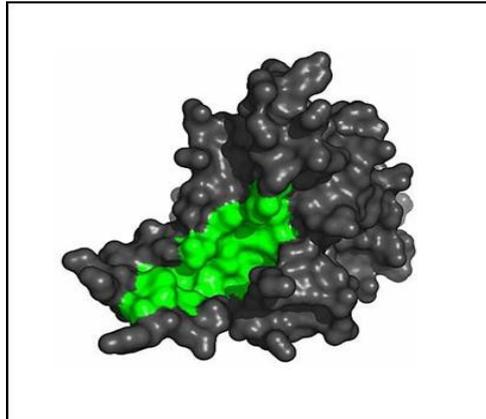


Figura 4: Struttura proteica tridimensionale della telomerasi umana. Il sito attivo dell'enzima appare di colore verde (Howard Hughes Medical Institute).

- hTR, una catena di RNA di 445 nucleotidi ricca in guanina e adenina contenente la sequenza stampo per la sintesi delle ripetizioni telomeriche;
- hTERT, una proteina di circa 1100 aa, con attività di retrotrascrittasi che fornisce il sito attivo per la reazione di polimerizzazione;
- diverse proteine accessorie associate (es.TP1) essenziali per l'assemblaggio di un complesso attivo.

La componente a RNA di questo enzima funge da stampo per la polimerizzazione di nuove sequenze telomeriche, che avviene grazie all'azione trascrittasi inversa dell'hTERT. La telomerasi, nel suo complesso, è capace di allungare le estremità del filamento di DNA, attraverso un meccanismo ciclico di trascrizione inversa (Fig.5).

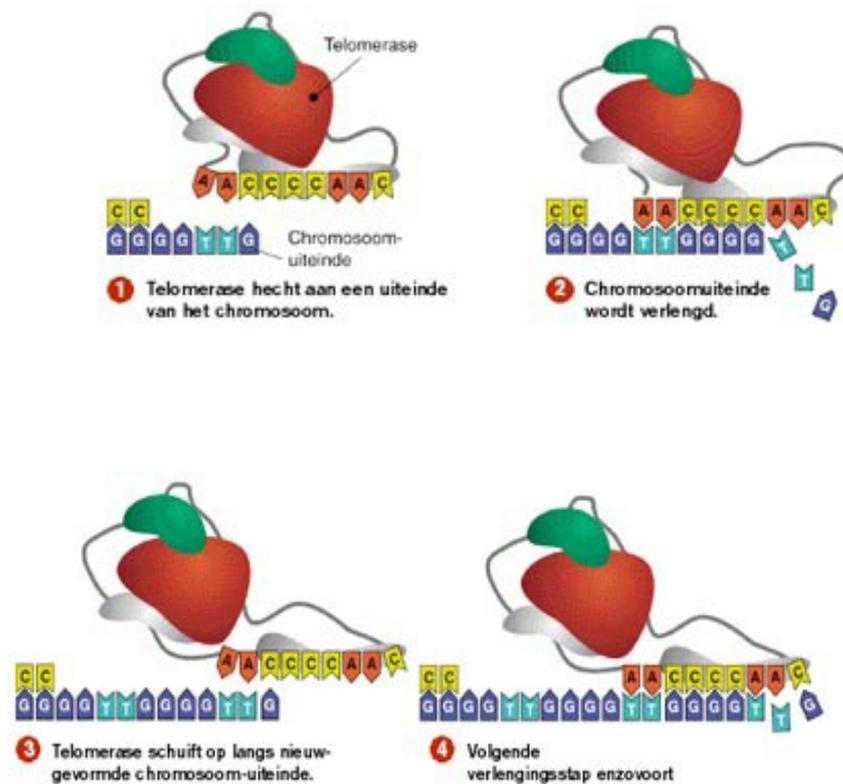


Figura 5: La telomerasi permette di risolvere il problema della replicazione delle estremità cromosomiche aggiungendo ripetizioni telomeriche ad ogni ciclo di sintesi del DNA.

Mentre molto del lavoro pionieristico che ha esaminato la telomerasi è stato fatto utilizzando i cromosomi del lievito *Tetrahymena*, la componente ad RNA della telomerasi umana ⁽²⁹⁾ è stata descritta solo in seguito. La telomerasi utilizza una regione della sua componente ad RNA come stampo per la sintesi ripetitiva delle sequenze telomeriche. Come già accennato, la telomerasi non è attiva nelle cellule somatiche differenziate ma è stato dimostrato essere attiva nelle cellule della linea germinale e debolmente attiva in alcune popolazioni cellulari proliferanti auto-rinnovantesi come le cellule ematopoietiche, le cellule delle cripte intestinali, e le

cellule basali dell'epidermide. La teoria del ruolo della telomerasi nell'invecchiamento e nel cancro può essere così sintetizzata ⁽⁵⁾:

1) La perdita dei telomeri determina l'invecchiamento cellulare dovuto all'uscita delle cellule dal ciclo cellulare e all'interruzione della divisione cellulare;

2) La telomerasi non è presente nelle cellule somatiche normali ma è presente nelle cellule che si auto-rinnovano come le cellule della linea germinale;

3) L'attività della telomerasi è stata trovata nella maggior parte delle proliferazioni cellulari maligne;

4) L'attivazione della telomerasi permette alle cellule di sfuggire all'invecchiamento e diventare immortalizzate.

L'analisi della telomerasi potrebbe avere un'utilità diagnostica e prognostica nell'ambito dei tumori maligni. Sono stati infatti condotti numerosi studi che hanno esaminato l'attività della telomerasi di campioni tumorali di quasi tutti gli organi, ponendola a confronto nella maggior parte dei casi con quella del tessuto normale o non-neoplastico. I risultati suggeriscono che la telomerasi potrebbe essere utile come marcatore diagnostico di malattie neoplastiche maligne. Contrariamente alla maggior parte delle cellule somatiche normali, l'attività della telomerasi è stata individuata in circa l'85-90% delle neoplasie esaminate ^(26,35,46,47). Analizzando alcuni dei tumori più frequenti, una recente indagine ⁽⁷⁴⁾ ha individuato l'attività della telomerasi nell'89% dei carcinomi coloretali, nell'88% dei carcinomi della mammella, nel 78% dei

carcinomi polmonari a cellule non piccole, e nel 100% dei carcinomi polmonari a piccole cellule. Infine, numerose speranze sono state poste sulla telomerasi come nuovo bersaglio per i farmaci anti-cancro. L'idea è che l'inibizione selettiva della telomerasi in neoplasie telomerasi-positive potrebbe condurre all'eventuale degradazione dei telomeri, all'invecchiamento ed alla morte cellulare. Le iniziali speranze che una tale terapia così indirizzata verso questo bersaglio specifico possa produrre un numero inferiore di effetti collaterali rispetto alla chemioterapia convenzionale è stata ridimensionata dalle ripetute dimostrazioni di un basso livello di attività della telomerasi nei tessuti normali, come precedentemente segnalato. Tuttavia, molto deve essere ancora fatto in questo campo. In breve, la telomerasi rappresenta una potenziale promessa come marcatore tumorale, ma molto ancora deve essere appreso per capire ulteriormente la sua biologia e per definire più chiaramente l'utilità clinica del suo dosaggio.

1.3. Fattori che influenzano la lunghezza telomerica

1.3.1. Stress Ossidativo e lunghezza dei Telomeri

Oltre ad anomalie disfunzionali a carico della telomerasi, molti altri fattori sono associati ad un aumentata erosione telomerica e quindi a telomeri più corti; tra questi lo stress ossidativo, che, indipendentemente dalle sue origini, è considerato la causa primaria dell'accorciamento telomerico ^(28,41,82). Cellule muscolari lisce e cellule endoteliali esposte a fonti di stress ossidativo mostrano, infatti, elevato accorciamento telomerico e prematura senescenza cellulare. Inoltre, l'attività telomerasica diminuisce in risposta allo stress ossidativo. E' stato osservato che la presenza di fattori di rischio cardiovascolare (CV) quali fumo e obesità, condizioni che conferiscono un elevato stress ossidativo, sono correlate ad una riduzione della lunghezza telomerica ^(60,77). Infine, strategie per ridurre lo stress ossidativo, mediante la over-espressione di enzimi anti-ossidanti, sono in grado di mantenere integri i telomeri prevenendone un prematuro accorciamento e si associano ad un aumentata attività telomerasica.

1.3.2. Età

L'attività della telomerasi è indispensabile per il mantenimento delle lunghezze telomeriche, ed è stato dimostrato come telomeri eccessivamente corti e ridotta attività telomerasica siano associati ad un prematuro invecchiamento nell'uomo. In un articolo non recentissimo ⁽¹⁷⁾, Richard Cawthon e colleghi hanno dimostrato come la lunghezza dei telomeri diminuisca con l'età e con ogni divisione cellulare e che la graduale perdita del DNA telomerico durante la divisione cellulare possa contribuire all'apoptosi. Per ogni anno di incremento di età, gli autori hanno evidenziato una perdita di sequenza telomeriche di 14 paia di basi e non si sono riscontrate differenze significative tra uomini e donne nel tasso di diminuzione della lunghezza dei telomeri ($p=0,645$). La lunghezza telomeriche (LTL) è quindi inversamente correlata con l'età ⁽⁷⁶⁾. In aggiunta individui con telomeri più corti sono più predisposti a manifestare invecchiamento vascolare e patologie età correlate, in primis quelle CV.

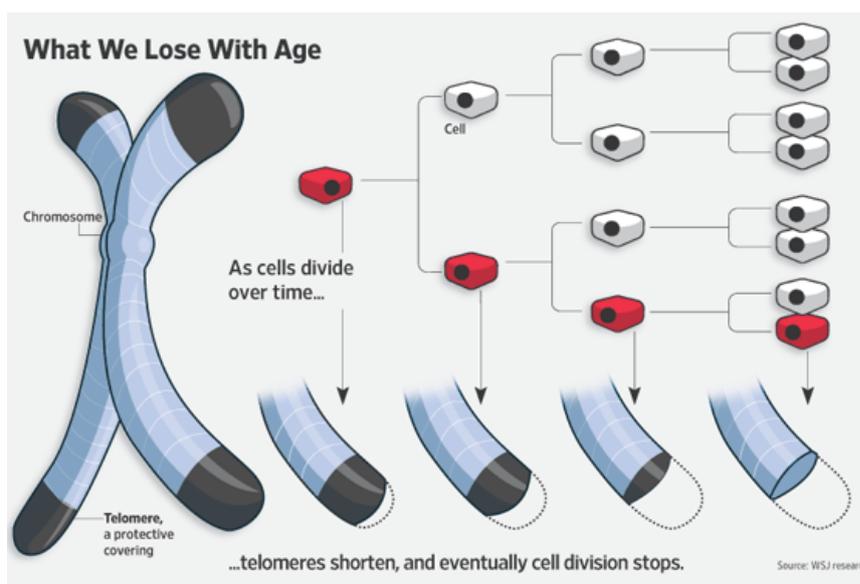


Fig 6: Rappresentazione dell' accorciamento telomeriche ad ogni divisione cellulare

1.3.3. Genere

Numerosi studi confermano che la lunghezza telomerica è minore negli uomini rispetto alle donne ^(9,21). Ricerche condotte sia sull' animale che sull' uomo, hanno dimostrato una maggiore attività telomerasica e minore esaurimento telomerico correlato al genere, risultante in una maggiore lunghezza telomerica nel genere femminile rispetto a quello maschile (in precedenti lavori si è osservato come i telomeri delle femmine presentino una lunghezza maggiore del 3,5 per cento rispetto a quella dei telomeri dei maschi) ⁽¹⁷⁾. La minore incidenza delle malattie CV nelle donne in pre-menopausa è, in parte, attribuibile agli estrogeni. In aggiunta alla ben caratterizzata azione sul metabolismo delle lipoproteine e sulle cellule vascolari, gli estrogeni potrebbero esercitare un'influenza anche sull'omeostasi telomerica, contribuendo al benefico effetto sul sistema CV. E' necessario quindi approfondire le relazioni tra la differenza di genere relativamente alla lunghezza telomerica.

SCOPO DELLA RICERCA

Abbiamo precedentemente osservato come in letteratura sia nota una diminuzione della lunghezza telomerica all'aumentare dell'età. Abbiamo inoltre evidenziato che la Sardegna possiede un numero di centenari e ultracentenari sensibilmente superiore a quello riscontrato nelle altre regioni .

Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di analizzare la lunghezza telomerica nella popolazione sarda, per capire come questo fattore vari con l'età ed il sesso. E' stata quindi analizzata la lunghezza telomerica di centenari sardi e di persone di differenti classi di età, utilizzando metodiche di Real Time PCR. I campioni di DNA analizzati, storiati nella "biobanca della longevità" del progetto AKeA (A Kent'Annos) provengono da individui nati e vissuti in Sardegna, di età compresa tra 20 e 105 anni.

MATERIALI E METODI

2.1 Soggetti partecipanti

E' stata misurata la lunghezza telomerica di 65 campioni, suddivisi in tre fasce di età (centenari, sessantenni e giovani). Tutti i campioni di DNA utilizzati per questo lavoro provengono da individui nati e vissuti in Sardegna. Il prelievo di sangue è stato effettuato dai medici in laboratorio o direttamente a casa. I soggetti arruolati fanno parte dell' "archivio della longevità" del progetto AKeA, sotto la responsabilità del prof. Luca Deiana, ed il prelievo è avvenuto dopo la sottoscrizione del consenso informato. Di tutti i soggetti inoltre sono state redatte le relative cartelle cliniche. I campioni di DNA, infine, sono stati estratti con il metodo del Fenolo- Cloroformio, diluiti con il Low TE (il tampone ha lo scopo di mantenere costante il pH della soluzione e creare le condizioni ottimali per la conservazione) e conservati alla temperatura di -20°C. L'età degli individui facenti parte dello studio varia da un minimo di 20 anni per i controlli ad un massimo di cento anni ed oltre.

2.2 Estrazione di DNA genomico da cellule

Il DNA utilizzato per il nostro studio è stato estratto in precedenza mediante il metodo del fenolo-cloroformio. L'estrazione del DNA da sangue periferico è stata eseguita su sangue fresco prelevato in tubi Vacutainer contenenti EDTA (Etilen Diamina TetrAcetato) come anticoagulante. In alternativa sono state utilizzate provette sterili contenenti Na citrato (0,5ml di Na citrato/ml di sangue). L'utilizzo dell'EDTA è connesso alla sua azione chelante degli ioni bivalenti (la cui presenza facilita l'azione delle "nucleasi", enzimi che degradano il DNA). Il sangue prelevato, è stato processato immediatamente; successivamente si è proceduto con l'estrazione. La prima fase ha previsto l'eliminazione dei globuli rossi mediante l'utilizzo di opportuni tamponi di lisi e il successivo isolamento delle cellule nucleate. I leucociti così ottenuti sono stati trattati con un tampone di lisi dei globuli bianchi, con un detergente (SDS) e con Proteinasi K, allo scopo di solubilizzare le membrane, complessare le proteine ed estrarre gli acidi nucleici. La proteinasi K ha la funzione di digerire le proteine mentre il fenolo le denatura e in parte le dissolve; le proteine così denaturate formano uno strato bianco all'interfaccia tra la fase fenolica inferiore e la fase acquosa superiore. Successivamente, attraverso la duplice estrazione con Fenolo/Cloroformio, la componente organica (contenente le proteine) è stata separata dalla fase acquosa (contenente gli acidi nucleici). Le tracce di Fenolo che contaminano la preparazione sono state eliminate dai successivi passaggi in cloroformio e con la precipitazione del DNA in etanolo assoluto in presenza di sali. La precipitazione etanolica in presenza di concentrazioni relativamente alte di ioni monovalenti (100-500mM) è indispensabile

per concentrare le soluzioni di DNA ed eliminare i residui di fenolo e cloroformio; un breve lavaggio del sedimento con etanolo al 70% rimuove gran parte dei cationi monovalenti che possono interferire con le successive analisi molecolari. E' indispensabile utilizzare fenolo bidistillato, di ottima qualità , conservato a -20°C fino al momento della saturazione. Il fenolo saturato deve essere usato entro 2 mesi poiché i prodotti di ossidazione, che gli conferiscono una colorazione giallo-rosa, potrebbero danneggiare gli acidi nucleici.

2.3 Analisi spettrofotometrica del DNA estratto

La concentrazione di DNA estratto da ogni campione è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica. Di ogni campione è stata prelevata un'aliquota di cui, previa opportuna diluizione in acqua sterile sono state effettuate letture spettrofotometriche degli assorbimenti a 320, 280 e 260 nm. La contaminazione da parte delle proteine è stata valutata considerando il rapporto OD 260/OD 280 ed eliminando i campioni con un rapporto inferiore a 1.7.

La concentrazione di DNA è stata calcolata con il valore di assorbanza a 260 nm. Dal momento che 50 µg di DNA, letto a 260 nm ed utilizzando una cuvetta con cammino ottico di 1 cm, ha un valore di assorbanza pari a 1,00, tenendo conto del fattore di diluizione e applicando la seguente proporzione: $1 : 50 \mu\text{g/ml} = A \text{ campione } (\lambda 260) : x$, potremo calcolare la concentrazione di un DNA ignoto.

2.4 Verifica dell'integrità del DNA estratto

Allo scopo di saggiarne l'integrità, una quantità pari a 1 µg di DNA estratto dai campioni ed implementato del relativo tampone di caricamento (Loading Buffer), è stato analizzato mediante migrazione elettroforetica sul gel di agarosio allo 0.8% in un opportuno tampone (TBE 1X). Il loading buffer, contenente blu di bromofenolo, rende possibile la migrazione elettroforetica del campione e contiene inoltre glicerolo, che permette al campione di depositarsi sul fondo del pozzetto e di non disperdersi nel tampone della cella. Il gel si allestisce portando ad ebollizione una sospensione di agarosio solido in un tampone acquoso (nel nostro caso TBE) fino ad ottenere una soluzione limpida; a quest'ultima, raffreddata a 60°C, si aggiunge un volume di bromuro di etidio tale da avere una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Questo colorante si intercala tra le basi azotate degli acidi nucleici e li rende visibili se esposto ad una sorgente UV. La soluzione viene quindi versata all'interno di uno stampo e raffreddandosi dà origine ad una matrice la cui porosità è determinata dalla concentrazione del polimero stesso nella soluzione iniziale. La migrazione elettroforetica avviene all'interno di una vasca fornita di due elettrodi (catodo e anodo) collegati ad un generatore di corrente. Al gel, una volta immerso nel tampone di corsa (TBE 1X), viene applicata una differenza di potenziale di 50-70 V che dà inizio al processo elettroforetico. Nell'intervallo di pH (7,5-7,8) del tampone di corsa e del gel, l'RNA e il DNA risultano carichi negativamente e migrano dal catodo verso l'anodo con una mobilità elettroforetica che è condizionata esclusivamente dalle loro dimensioni. Dal momento che la densità di carica (quantità di carica per unità di

lunghezza) dovuta ai gruppi fosfato rimane costante, i frammenti più lunghi mostrano maggiore difficoltà al passaggio attraverso i pori del gel mentre i più piccoli migrano più velocemente. IL DNA , se degradato, migrerà nel gel come una larga strisciata (dal pozzetto fino alla parte terminale del gel), anziché come una banda netta. (Fig.7)

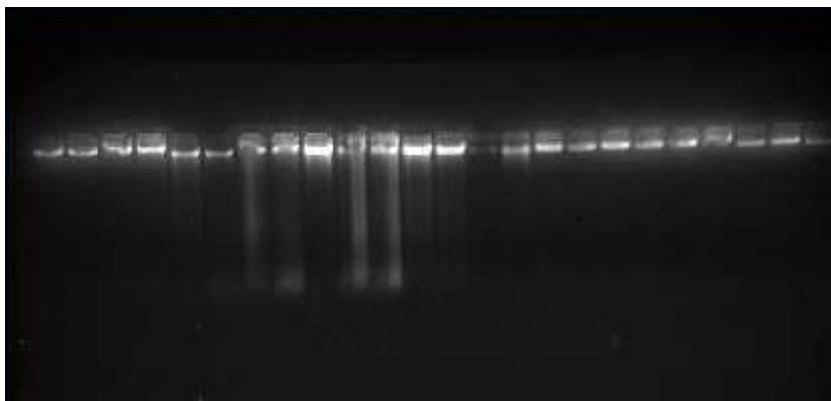


Figura 7: Verifica dell'integrità del DNA estratto; Il DNA , se degradato, migrerà nel gel come una larga strisciata

2.5 Metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica

Esistono in letteratura diverse metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica ⁽⁶⁾. Ad oggi la metodica di riferimento è il saggio Telomere Restriction Fragment (TRF) basato su un ibridazione in Southern Blot ^(1,61). La tecnica prevede dapprima la digestione del DNA estratto seguita da elettroforesi e trasferimento su membrana di nylon per successiva ibridazione e visualizzazione mediante chimioluminescenza o radioattività. Un'altra metodica, di recente applicazione in questo campo, è la quantitative Fluorescent In Situ Hybridization (qFISH) ⁽⁵⁰⁾, riassumibile in un saggio di citogenetica che prevede l'ibridazione dei cromosomi fissati con una sonda fluorescente specifica per le estremità telomeriche (ripetizioni in tandem di TTAGGG) in seguito quantificata. Entrambe queste metodiche sono di non semplice esecuzione ma soprattutto sono "timeconsuming" se si pensa ad una applicazione ad un ampio numero di campioni. La metodica senz'altro più indicata e utilizzata per gli studi di popolazione è una tecnica messa a punto nel 2002 da Cawthon; questa si basa su un saggio di PCR-real time e sfrutta l'appaiamento di specifici primers in grado di riconoscere in modo univoco le ripetizioni telomeriche evitando la formazione di primer dimer ^(17,18,19). Questo metodo ampiamente validato, risulta di più facile applicazione clinica perché più adatto a studi di popolazione e proprio per questo moltissimi studi lo hanno adottato per la valutazione della LTL in un ampio numero di soggetti. Anche nel nostro studio pertanto la LTL è stata valutata con metodica PCR-real time. I prodotti di amplificazione possono essere quantificati in modo assoluto o relativo. La quantificazione assoluta è una modifica del protocollo di Cawton, ed è

ottenuta introducendo degli oligomeri standard di concentrazione conosciuta che vengono diluiti serialmente ed amplificati per ottenere delle curve standard. Un campione sconosciuto può quindi essere quantificato basandosi su queste curve. Nello specifico si utilizzano per la costruzione delle curve diluizioni seriali di due oligomeri, uno di 84 paia di basi contenente 14 ripetizioni di unità telomeriche, e un altro di 75 paia di basi contenente il gene a singola copia 36b4. La quantificazione relativa invece necessita di controlli endogeni denominati housekeeping che servono come normalizzatori. Gli “unknowns” vengono “quantificati” paragonando il loro ΔCt con quello del controllo endogeno.

La reazione di amplificazione per i telomeri è stata effettuata a 95°C per 10 min, seguita da 30 cicli a 95°C per 30s, 62°C per 1m e 72°C per 30s ,mentre quella per il 36b4 è stata effettuata a 95°C per 10 min, seguita da 45 cicli a 95°C per 30 s e 56°C per 1 min e 72° per 30s. La reazione di amplificazione è, seguita da una curva di dissociazione per confermare la specificità della reazione.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato per valutare la riproducibilità del test e in ogni saggio è stato inserito un controllo negativo dove il DNA è stato sostituito con H₂O. È stata inoltre calcolata la Deviazione Standard e sono stati eliminati i campioni con DS>0.2.

2.7 Analisi dei dati della PCR-real time

Al termine dell'amplificazione, i prodotti di PCR sono stati salvati ed elaborati mediante il software iQ™5 Optical System Software. Il software determina il numero di cicli in cui la reazione raggiunge la threshold. Questo valore, indicato come ciclo soglia (Ct), compare sempre durante la fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione.

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa comparativa⁽⁵⁶⁾, in cui la quantità del target viene normalizzata rispetto al controllo endogeno (housekeeping) ed espressa relativamente ad un campione basale (comparatore) che diventa il campione 1x, mentre tutte le altre quantità vengono espresse come n volte relativamente a quel campione. Tale metodo consente di valutare le differenze tra un campione ed il relativo controllo "comparatore". Per poter effettuare tale confronto è necessario disporre di uno "standard interno"(housekeeping), comune sia al campione che al controllo. Nell'analisi della LTL, l'housekeeping è un gene a singola copia che non presenta comunemente amplificazioni, ed è quindi direttamente correlato con il numero di molecole di DNA presenti nel campione in esame. Questo permette quindi di "normalizzare" il saggio eliminando eventuali differenze determinate da errori di quantificazione del DNA. L'housekeeping utilizzato nel lavoro è il 36B4, gene che codifica per P0, una fosfoproteina ribosomiale acida.

In breve per ogni campione è stato individuato il valore di Ct del telomero e del gene housekeeping. E' stata calcolata dapprima la differenza tra il Ct del telomero e il Ct del gene housekeeping, sia dei campioni che del comparatore, ad ottenere il ΔCt .

E' stata poi calcolata la differenza tra il ΔCt di un qualsiasi campione ed il ΔCt del campione di controllo utilizzato come "comparatore", ad ottenere il $\Delta\Delta Ct$. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che per il campione comparatore sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto al comparatore. Con tale metodo per ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nelle cellule. I dati ottenuti sono stati esportati su un foglio di Excel e per ogni campione è stata elaborata una tabella dalla quale è stato possibile estrapolare T/S (Fig.8).

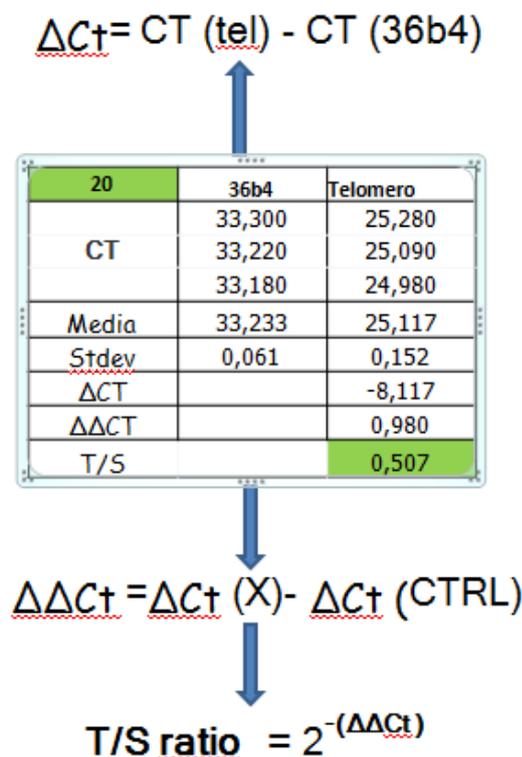


Figura 8: Tabella riassuntiva per ogni campione

2.8 Analisi statistica

Al fine di esprimere in maniera quantitativa l'intensità del legame tra la lunghezza telomerica e l'età, è stato calcolato il coefficiente di correlazione r di Pearson, utilizzando il software R. Il coefficiente di correlazione di Pearson ci da informazioni sulla dipendenza di due variabili casuali. Il campo di variazione va da -1 a 1. In particolare quando il valore è -1 si ha correlazione perfetta negativa e le due variabili variano contemporaneamente ma in senso opposto. Quando il valore è pari ad 1 si ha massima correlazione e le due variabili si muovono contemporaneamente nello stesso modo. Quando il valore è 0 le variabili sono totalmente indipendenti. Con lo stesso software è stato calcolato anche il p-value, che ci indica il livello di significatività dei nostri dati. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

Risultati dello studio

I risultati ottenuti dalle analisi mediante Real time PCR, relativi ai 65 campioni analizzati, sono riassunti nelle tabelle e nei grafici seguenti. Nei campioni analizzati, il valore medio di Ct relativo all' amplificazione delle estremità telomeriche è risultato 24.66 ± 1.52 mentre quello relativo al gene 36b4 è risultato essere 33.35 ± 1.40 (Fig.9).

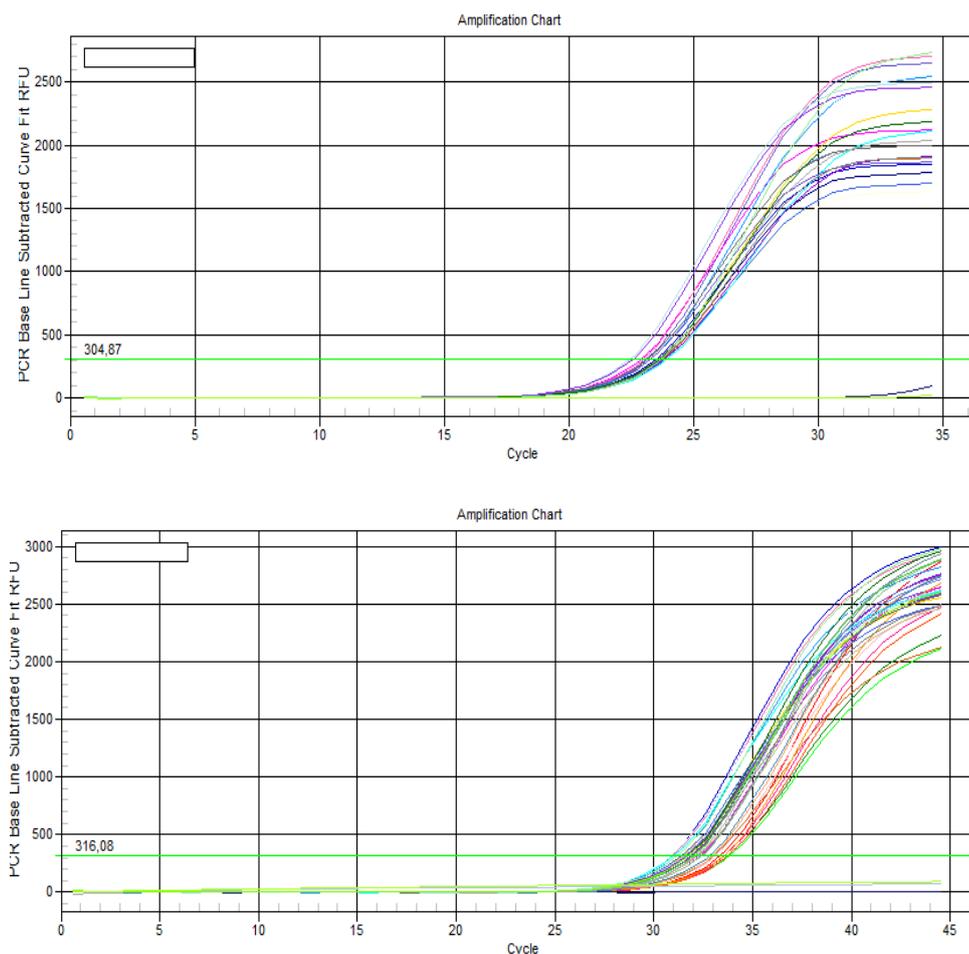


Figura 9: Curve di amplificazione dei telomeri e del gene 36b4.

Il controllo qualitativo delle reazioni di PCR real-time prevede inoltre la possibilità di monitorare le temperature di melting dei prodotti di reazione di ogni pozzetto. L'amplificazione del gene 36B4 genera una curva di melting omogenea con un solo picco alla temperatura attesa per il prodotto di PCR (Fig.9). Osservando la curva di

melting dei campioni relativi ai telomeri (Fig.10) si può notare la presenza di un picco più ampio ad indicare la presenza di amplificati di diverse lunghezze in ogni pozzetto. Ciò riflette di fatto l'atteso, cioè prodotti di diversa lunghezza corrispondenti a sequenze nucleotidiche derivate dall'amplificazione dei telomeri per l'appaiamento dei primers a distanze variabili. Infine è da considerare che la corretta amplificazione telomerica, nei controlli negativi (corrispondenti all'assenza di DNA templato), non genera alcun amplificato (nessun picco nelle curve).

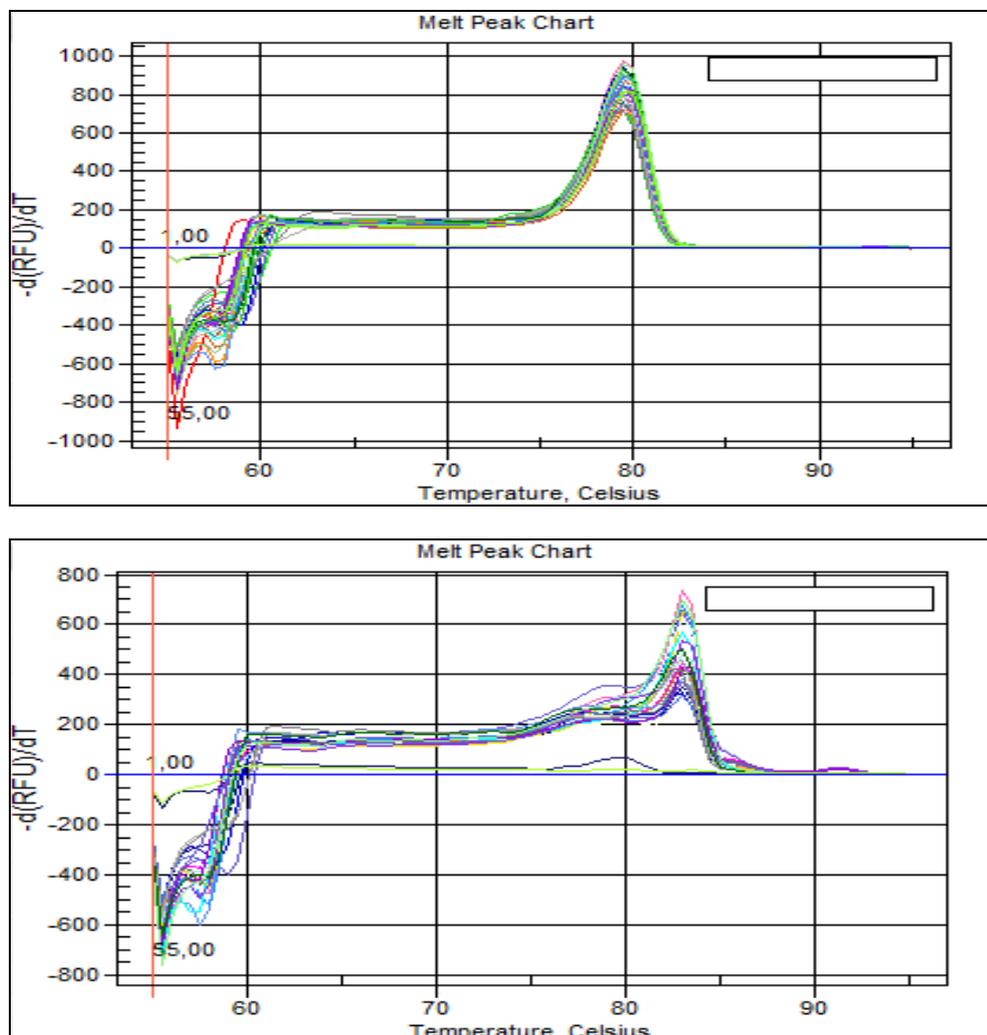


Figure 9 e 10: Curve di melting dei campioni analizzati in qPCR per telomeri e 36b4. Le curve di melting con valori oscillanti intorno allo zero rappresentano i controlli negativi

Il grafico a dispersione mostra la variazione della lunghezza telomerica (indicata come T/S e rappresentata sull'asse delle ordinate) in relazione all'età (rappresentata sull'asse delle ascisse). Dal grafico possiamo evidenziare una forte correlazione lineare tra lunghezza telomerica ed età: la lunghezza telomerica infatti diminuisce all'aumentare dell'età, così come atteso. Il coefficiente di correlazione di Pearson r ha un valore elevato ($r=-0.88$), ed il valore di p è risultato <0.0001 , ad indicare una forte significatività statistica (Fig.11).

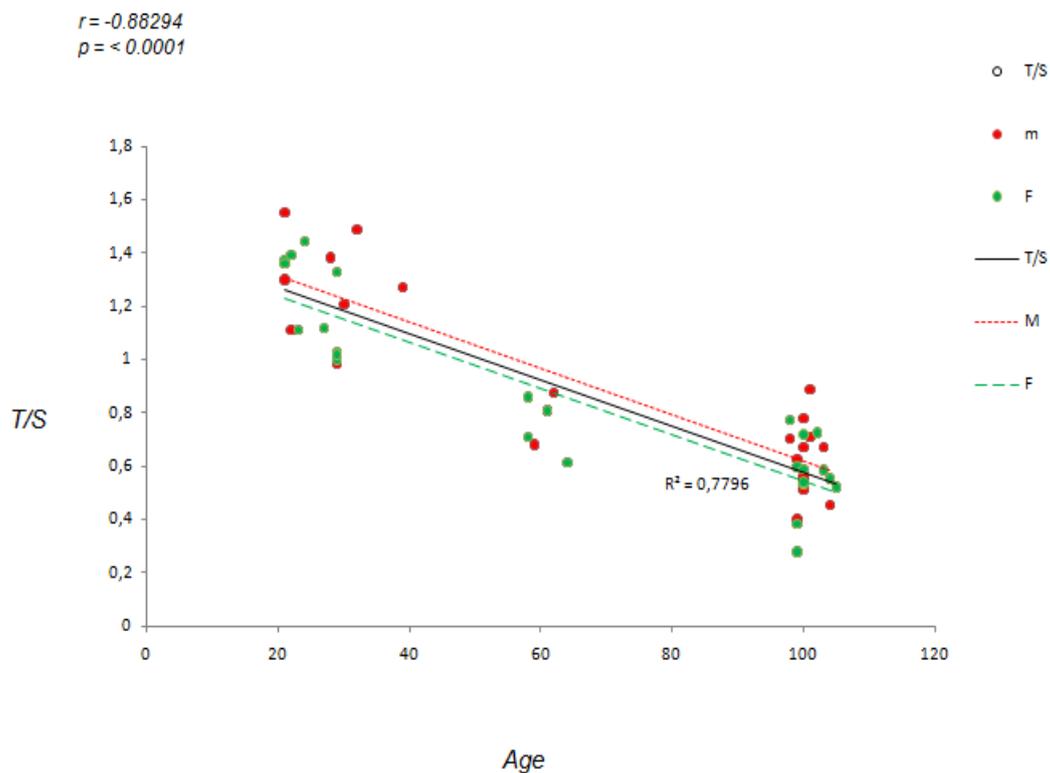


Figura 11: Grafico a dispersione rappresentante la correlazione tra la lunghezza telomerica e l'età

I campioni sono stati quindi raggruppati per età e per sesso. Media e deviazione standard dei gruppi sono indicati in tabella (Tab.2).

COHORTS	n	Mean T/S	ds
Centenarians	32	0,594	0,137
Sixty years	7	0,765	0,098
Young	18	1,248	0,180
Male	24	0,869	0,341
Female	33	0,787	0,325

Tabella 2: Lunghezza telomerica nelle varie classi di età.

I grafici successivi mostrano i campioni divisi in categorie; dai primi due grafici si può notare come la media della lunghezza telomerica degli uomini sia più elevata rispetto a quella delle donne (Fig.12).

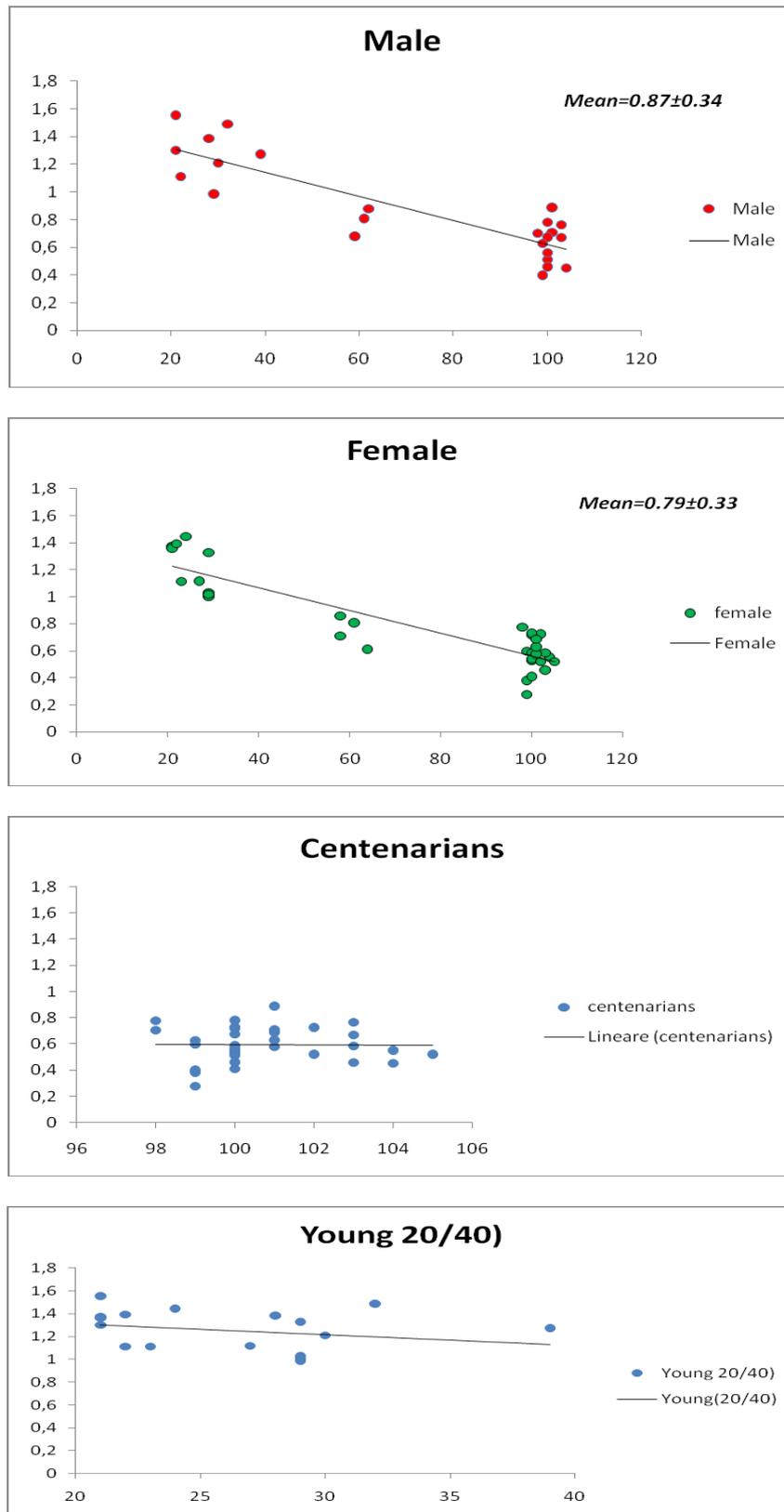


Figura 12: Grafici suddivisi per categorie.

I box plot infine mostrano come la lunghezza telomerica sia maggiore negli uomini rispetto alle donne in tutte e tre le coorti di età (Fig 13).

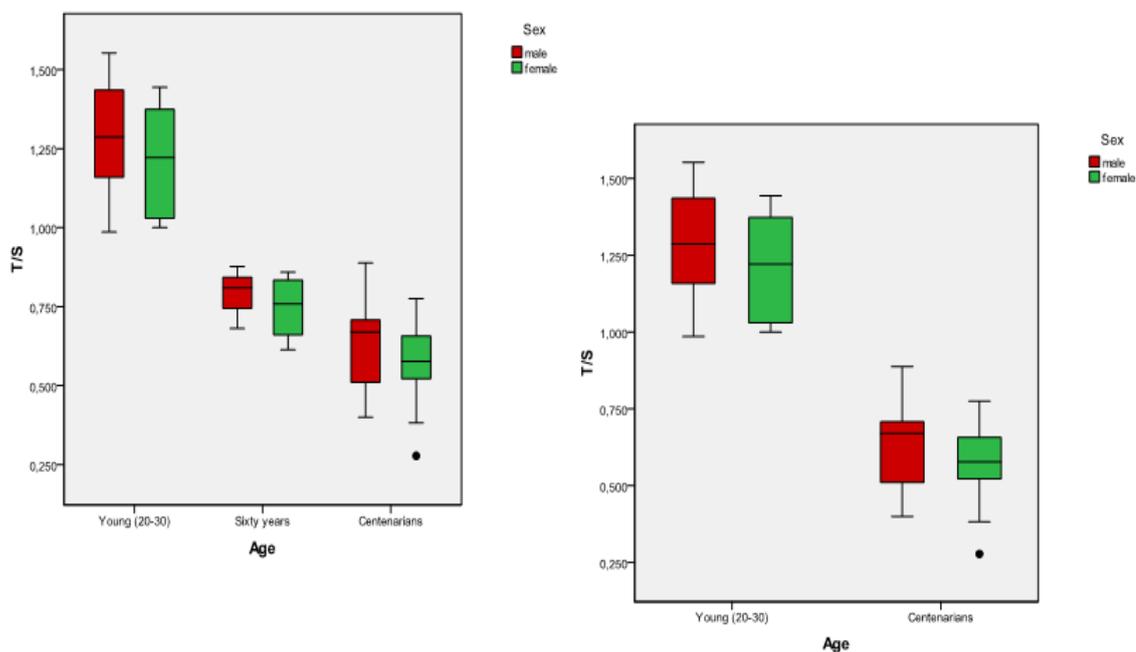


Figura 13: Box plot relativi alle varie classi di età.

Alcuni campioni di centenari hanno infine mostrato una LTL estremamente elevata rispetto a quanto avremmo dovuto aspettarci. I campioni sono indicati in tabella (Tab.3).

Samples	Age	Sex	T/S
48	100	f	1,456
54	99	f	3,41
84	103	m	1,87
88	100	f	1,384
360	100	m	1,668
379	100	m	1,462
380	102	f	1,95
367	101	f	2,194

Tabella 3: Outliers

Discussione

I risultati ottenuti mediante l'analisi mediante Real time della lunghezza telomerica mostrano una correlazione negativa lineare tra la lunghezza telomerica e l'età; la LTL diminuisce all'aumentare dell'età. Tali dati sono in linea con quelli riscontrati in altri lavori scientifici. La media della lunghezza telomerica negli uomini risulta invece maggiore rispetto a quella delle donne. Questo dato è in contrasto rispetto a quello osservato in altri lavori, ed è riscontrabile in tutte le fasce di età. Precedenti studi, hanno infatti dimostrato come la lunghezza telomerica negli uomini sia minore rispetto alle donne. Il fatto che la lunghezza telomerica degli uomini sia maggiore rispetto alle donne potrebbe essere in linea con precedenti studi compiuti nell'ambito del progetto AKeA. In Sardegna, infatti, sono state individuate delle zone interne ad alta concentrazione di longevi, e si è scoperto che il rapporto maschi/femmine ultracentenari in Sardegna è ben diverso da quello presente altrove. Se nel resto dell'occidente il rapporto è di 1 a 4, se non addirittura di 1 a 7, nell'Isola è generalmente al di sotto di 1 a 2, per diventare paritetico nelle aree interne ^(16,24). La maggior lunghezza telomerica degli uomini potrebbe, in questo contesto confermare come il rapporto maschi/femmine centenari in Sardegna si riduca rispetto al resto del mondo. Infine occorre evidenziare gli elevati valori della LTL di alcuni campioni considerati outliers; di tali campioni sarebbe necessaria un'ulteriore verifica ed una validazione con altre tecniche di misurazione della LTL, per confermare i dati ottenuti, e cercare di capire se la loro longevità possa essere strettamente correlata con la maggiore

lunghezza telomerica. Nel caso che questa ipotesi venisse confermata, sarebbe interessante verificare se la maggiore lunghezza telomerica sia dovuta ad una più lenta erosione del telomero o ad una inconsueta espressione della telomerasi.

BIBLIOGRAFIA

-
1. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. (1989)
Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly.
Nucleic Acids Res; 17:4611-4627
 2. Allsopp RC et al. (1992)
Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.
Proc. Natl Acad. Sci. USA; 89, 10114–10118.
 3. Armanios M. (2009)
Syndromes of telomere shortening.
Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.; 10, 45–61.
 4. Aubert G, P.M. Lansdorp. (2008)
Telomeres and aging.
Physiol. Rev.;88: 557–579.
 5. Autexier C, Greider CW.(1996)
Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis.
Trends Biochem Sci;21(10):387–391.
 6. Baird DM.(2005)
New developments in telomere length analysis.
Exp. Gerontol. 40: 363–368.
 7. Baerlocher GM, Vulto I, De Jong G, Lansdorp PM. (2006)
Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH).
Nat. Protoc. 1 (5),2365–2376.
 8. Bekaert S, De Meyer T, Rietzshel ER, et al. (2007)
Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle aged population free of overt cardiovascular disease.
Aging Cell.6:639-647.
 9. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A.(2003)
Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation

-
- with pulse pressure and pulse wave velocity.*
Hypertension;37:381–385.
10. Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW et al. (2006)
No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old
Epidemiology 17 (2), 190–194.
 11. Blackburn EH.(1991)
Structure and function of telomeres.
Nature; 350: 569–573.
 12. Blasco MA. (2005)
Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond.
Nat. Rev. Genet 6 (8), 611–622.
 13. Bryant JE, Hutchings KG, Moyzis RK, and Griffith JK. (1997)
Measurement of telomeric DNA content in human tissues.
Biotechniques 23, 476–484.
 14. Bodnar AG, Ouellette M et al. (1998)
Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.
Science 279, 349–352.
 15. Canela A, Vera E et al. (2007)
High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies.
Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (13), 5300–5305
 16. Caselli G. and Rasulo D. (2005)
Centenarians in Sardinia: the underlying causes of low sex ratio.
Paper presented at XXV IUSSP Conference, Session 149 on “Mathematical and Formal Demography” Tours, 18-23
 17. Cawthon RM, Smith KR, O’Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. (2003)
Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older.
Lancet 361 (9355), 393–395

-
18. Cawthon RM. (2002)
Telomere measurement by quantitative PCR.
Nucleic Acids Res. 30, e47.
 19. Cawthon RM. (2009)
Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method.
Nucleic Acids Res. 37: e21.
 20. Cech TR. (2000)
Life at the end of the chromosome: telomeres and telomerase.
Angew. Chem. Int. Ed.Engl. 39, 34–43
 21. CherifH.,TarryJ.L.,OzanneS.E.,HalesC.N.(2003)
Ageing and telomeres: a study into organ and gender specific telomere shortening.
NucleicAcidsRes. 31:1576–1583.
 22. Collado M, Blasco MA et al. (2007)
Cellular senescence in cancer and aging.
Cell.130 (2), 223–233
 23. Deiana L, Ferrucci L, Pes GM, Carru C, Delitala G, Ganau A, Mariotti S, Nieddu A, Pettinato S, Putzu P, Franceschi C, Baggio G. (1999)
A Kent Annos. The Sardinia Study of Extreme Longevity.
Aging Clinical and Experimental Research 11, pp. 142-149
 24. De Lange. (1992)
Human telomeres are attached to the nuclear matrix
EMBO J. 1992 Feb;11(2):717-24.
 25. De Lange. (2004)
T. T-loops and the origin of telomeres.
NatureRev. Mol. Cell Biol. 5, 323–329
 26. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R.(2000)
Telomeres, telomerase and cancer: an up-date.
Virchows Arch;437:1-16.

-
27. Dubey RK, Jackson EK. (2001)
Estrogen induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms.
Am J Physiol Renal Physiol; 280:F36588.
28. Epel ES, Blackburn EH et al. (2004).
From the cover: accelerated telomere shortening in response to life stress.
Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (49), 17312–17315.
29. Feng J, Funk WD, Wang S et al. (1995)
The RNA component of human telomerase.
Science 269:1236-1241.
30. Frenek RV Jr, Blackburn EH, Shannon KM. (1998)
The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age.
Proc Natl Acad Sci USA ;95:5607-5610.
31. Fritzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, et al. (2007)
Leucocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study.
Am J Epidemiol. 165:14-21.
32. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, et al. (2005)
Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition.
Circulation. 111:2171-2177.
33. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T.
Mammalian telomeres end in a large duplex loop.
Cell. 1999 May 14;97(4):503-14.
34. Hayflick L. (1965)
The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.
Exp Cell Res; 37: 614–636.
35. Hahn WC. (2003)
Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer.
J. Clin. Oncol. 21, 2034–2043.

-
36. Hansson M, Zendehtrokh N, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Westman UB et al.(2008)
Telomerase activity in effusions: a comparison between telomere repeat amplification protocol in situ and conventional telomere repeat amplification protocol assay.
Arch Pathol Lab Med.;132(12):1896-902.
37. Harley CB (1991)
Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?
Mutat Res 256:271-282
38. Harley CB, Futcher AB, and Greider CW. (1990)
Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.
Nature 345, 458–460.
39. Hausmann MF, Mauck RA. (2008)
New strategies for telomere-based age estimation.
Mol. Ecol. Resour. 8: 264–274.
40. Hewakapuge S, RAH. van Oorschot, P. Lewandowski & S. Baidur-Hudson. (2008)
Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age.
Leg. Med. (Tokyo) 10: 236–242.
41. Houben JMJ, HJJ Moonen, FJ van Schooten , GJ Hageman (2008)
Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?
Free Radical Biol.Med. 44: 235–246.
42. Halaschek-Wiener J, Vulto I, Fornika D, Collins J, Connors JM et al. (2008)
Reduced telomere length variation in healthy oldest old.
Mechanisms of Ageing and Development Volume 129, Issue 11, Nov.r, 638-641
43. Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH et al. (1998)
Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals.
Hum Genet; 102: 397–402.

-
44. Takubo K et al. (2010)
Changes of telomere length with aging .
Geriatr Gerontol Int; 10 (Suppl. 1): S197–S206
45. Kappei D , JA Londono-Vallejo. (2008)
Telomere length inheritance and aging.
Mech. Ageing Dev. 129: 17–26.
46. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, et al. (1994)
Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.
Science 266: 2011–2015.
47. Kim NW. (1997)
Clinical implications of telomerase in cancer.
Eur J Cancer 33(5):781-786.
48. Kimura M et al. (2008)
Telomere length and mortality: a study of leukocytes in elderly Danish twins
Am. J. Epidemiol. 167: 799–806
49. Landsdorp PM. (2005)
Major cutbacks at chromosome ends.
Trends Biochem Sci.30:388-395.
50. Lansdorp PM, Verwoerd NP, Van de Rijke FM et al. (1996)
Heterogeneity in telomere length of human chromosomes.
Hum Mol Genet; 5: 685–691.
51. Leri A, Malhotra A ,Liew C.C, Kajstura J, AnversaP.(2000)
Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent.
J.Mol.Cell.Cardiol.;32:385–390.
52. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB et al. (1992)
Telomere end replication problem and cell aging.
J Mol Biol; 225:951–960.

-
53. Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA et al. (1991)
In vivo loss of telomeric repeats with age in humans.
Mutat Res; 256:45–48.
54. Lio D. et al. (2003)
Association between the HLA-DR alleles and longevity: a study in Sardinian population;
Experimental Gerontology; 38
55. Lundblad V, Wright WE (1996)
Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex.
Cell; 87:369–375.
56. Mather K et al.(2010)
Cognitive performance and leukocyte telomere length in two narrow age-range cohorts: a population study.
BMC Geriatrics, 10:62
57. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS et al. (1998)
Short telomeres on human chromosome 17p.
Nat Genet; 18:76–80.
58. Maruyama Y, Hanai H, FujitaMet al.(1997)
Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach.
Jpn J Clin Oncol; 27: 216–220
59. McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. (2000)
Telomeres and their control.
Annu Rev Genet34:331–358.
60. McGrath M, Wong JY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I (2007)
Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 815–819.
61. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS et al. (1988)
*A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)*n*, present at the telomeres of human chromosomes.*
Proc Natl Acad Sci USA; 85: 6622–6626.

-
62. Morin GB (1989)
The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.
Cell 59:521-529
63. Nakamura K, Takubo K, Izumiyama-Shimomura N et al. (2007)
Telomeric DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older
Exp Gerontol; 42: 944–950.
64. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant M et al. (2007)
Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 12135–12139.
65. O’Callaghan NJ, V.S. Dhillon, P. Thomas, M. Fenech. (2008)
A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length.
Biotechniques. 44: 807–809.
66. Oeppen J, Vaupel JW. (2002)
Broken Limits to Life Expectancy.
Science; 296:1029-1031
67. Olovnikov AM. (1996)
Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory.
Exp Gerontol. 31:443-448.
68. Pat Monaghan. (2010)
Telomeres and life histories: the long and the short of it
Annals of the New York Academy of Sciences Volume 1206, The Year in Evolutionary Biology pages 130–142.
69. Perls T, Kunkel L, Puca A. (2002)
The genetics of aging.
Curr Opin Genet Dev; 12:362-9.
70. P. Eline Slagboom, Simone Droog, and Dorret. Boomsma (1994)
Genetic determination of Telomere Size in Humans: A Twin Study of Three Age Groups
Am. J. Hum. Genet. 55:876-882,

-
71. Poulain M, Pes G.M, Grasland C, Carru C, Ferrucci L, Baggio G, Franceschi C, Deiana L. (2004)
Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: the AKEA study
Experimental Gerontology, 39, 1423-1429.
72. Ralph J Callicott and James E Womack (2006)
Real-time PCR Assay for Measurement of Mouse Telomeres.
Comparative Medicine, Volume 56, Number 1, February, pp. 17-22(6)
73. Reddel RR. (1998)
A reassessment of the telomere hypothesis of senescence.
Bioessays 20:977-984.
74. Shay JW, Bacchetti S (1997)
A survey of telomerase activity in human cancer.
Eur J Cancer 33(5):787-791
75. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. (2001)
Telomerase and cancer.
Hum Mol Genet;10:677-85.
76. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI.(2004)
Genetic determination of telomere size in humans : a twin study of three age groups.
Am J Hum Genet;55:876-882.
77. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF et al. (2005)
Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women.
Lancet 366 (9486), 662-664
78. Valdes AM, Deary IJ, Gardner J et al. (2008)
Leucocyte telomere length is associated with cognitive performance in healthy women.
Neurobiol Aging.

-
79. Van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, Voors AA, Hall AS, Mulder M.J et al. (2007)
Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure.
J. Am. Coll. Cardiol 49 (13), 1459–1464
80. Vaziri H, Schichter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D et al (1993)
Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes.
Am J Hum Genet 52: 661-667
81. Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM, (2005)
Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases.
Curr. Mol. Med. 5 (2), 197–203.
82. Von Zglinicki T. (2002)
Oxidative stress shortens telomeres.
Trends Biochem Sci 27:339-344
83. Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, et al. (2003)
Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor.
J. Natl. Cancer Inst. 95 (16), 1211–1218.