

Jorrick Wubs s1665030

[ERFELIJKHEID VAN TELOMEERLENGTE]

Een literatuurstudie naar de erfelijkheid van telomeer lengte. In deze studie wordt de rol van genen en omgeving op de lengte van telomeren verkend. En wordt er gekeken naar mogelijke mechanismen van telomeerlengte-verkorting.

Inhoudsopgave

Abstract.....	3
Telomeren	4
Gebruikte methoden	5
Q-PCR.....	5
TRF	6
Kanttekeningen bij de methoden.....	7
Erfelijkheid	8
Tweelingstudies.....	9
Erfelijkheid telomeerlengte	11
Tabel 1	11
Grafiek bij tabel 1.....	12
Onder de loep.....	13
Opmerkingen.....	14
Erfelijkheidscijfers verklaard	15
Telomeer Dynamics	16
Tabel 2.	16
Grafiek bij tabel 2.....	17
Beschrijving van de studies naar basispaarafname per jaar	18
Telomeer verkorting.....	19
Stress en oxidatieve stress.....	20
Conclusie.....	22
Bijlage	23
REFs.....	25

Abstract

Telomeren beschermen chromosomen tegen rafelen maar door mitotische deling worden ze steeds korter waardoor de cel na ongeveer vijftig delingen niet meer vermeerdert en doodgaat. Naarmate een organisme langer leeft zullen de telomeren korter worden. Langere telomeren zouden ervoor kunnen zorgen dat de cellen vaker kunnen delen en dus het organisme langer zal leven. Verschillende studies hebben gekeken naar de erfelijkheid van de lengte van telomeren. In deze scriptie zet ik verschillende van deze studies naast elkaar en laat zien dat erfelijkheid een kleine rol speelt bij telomeerlengte en dat leefomgeving een veel belangrijkere rol speelt. Daarnaast zullen een aantal studies beschreven worden waarin de basisjaar afname op jaar basis van telomeren onderzocht is. Hier is duidelijk het verloop van de afname van basisparen per jaar te zien, met een sterke afname in het begin van het leven die daarna snel zwakker wordt. Welk mechanisme hieraan te grondslag ligt is niet echt duidelijk, wel is bijvoorbeeld gebleken dat oxidatieve stress een grote rol speelt. Als laatste wordt er nog een mogelijke link tussen oxidatieve stress enerzijds en fysieke stress anderzijds beschreven.

Telomeren

Telomeren bestaan uit een aantal subunits (zie figuur 3) die als functie hebben de uiteinden van chromosomen te beschermen (zie figuur 4) (Pinto et al, 2011). De basis van een telomeer zijn de herhalingen van TTAGGG nucleotiden met de complementaire herhalingen AATCCC. Deze herhalingen resulteren in een stuk dubbelstrengs DNA dat ongeveer 4-12 Kb lang is. De 3' streng heeft nog een overlap van ongeveer 100-200 nucleotiden, de terminus. De dubbelstrengs DNA kan een loop vormen met zichzelf doordat terminus ervoor zorgt dat de loop gesloten kan worden door te binden aan een stukje in het begin van de 3'streng. De dubbelstrengs DNA en de terminus zijn omringd door shelterin of telosoom dat opgebouwd is uit 6 eiwitten namelijk: TRF1, TRF2, TIN1, RAP1, TPP1 en POT1. Tussen de telosomen zitten histonen waar het DNA van de telomeer omheen gewikkeld zit. Deze eenheden van het telomeer-complex zorgen ervoor dat de uiteinden van chromosomen geen interactie aangaan met zichzelf of andere chromosomen en de uiteinden niet gaan rafelen.

Het einde-van-replicatie-probleem (Olovnikov, 1973). Replicatie begint op bepaalde plekken, genaamd 'origin of replication'. In eukaryoten is dit op verschillende plekken in het DNA. Voordat de DNA polymerase kan beginnen met het bouwen van een nieuwe streng moet eerst de DNA helix uit elkaar geritst en moeten er primers aangebracht worden. DNA polymerase leest de templaatsstreng altijd in een '3 -> '5 richting en bouwt logischerwijs de nieuwe streng in een '5 -> '3 richting. De DNA streng in de '3 -> '5 richting wordt de 'leading strand' genoemd en kan zonder moeilijkheden gebouwd worden. Maar de DNA streng in de '5 -> '3 richting, de 'lagging strand' moet in kleine stukjes gebouwd worden omdat de polymerase alleen in een '3 -> '5 richting kan lezen. Zo worden er om de 100-200 b primers aangebracht op de template en kan de nieuwe streng geassembleerd worden. Deze stukjes worden ozaki-fragments genoemd. Omdat er altijd DNA voor de primer moet zitten om van het RNA, DNA te maken blijft er in de lagging strand een stukje DNA over dat niet volledig gekopieerd wordt. Daarom zal het DNA korter worden na elke replicatie maar omdat telomeren lange niet coderende stukken zijn duurt het even voor het 'echte' DNA aangetast wordt. Ook door enkel en dubbelstreng brekingen kunnen telomeren aanzienlijk verkorten tenminste in fibroblast cellen (von Zglinicki et al 2002).

Tenzij telomerase telomeren verlengen zullen de telomeren te kort worden en stopt de cel met repliceren (Hayflick, 1975). De meeste cellen in het menselijk lichaam hebben geen enzym telomerase (von Zglinicki, 2002.) De cel komt in de senescense phase, wordt oud en sterft af, of de cel ondergaat een geprogrammeerde celdood genaamd apoptose. Er is een duidelijke relatie tussen het korter worden van de telomeren en veroudering maar hoe dit zich verhoudt naar cel senescense en celdood is nog niet helemaal duidelijk. Is ouderdom een gevolg van te korte telomeren of zijn korte telomeren een gevolg van ouderdom?, Of kan het zijn dat de te korte telomeren tot chromosomale afwijkingen leidt en tot veranderde expressie van genen in de subtelomeer gebieden wat mogelijk

gevolgen heeft voor de celfuncties (Biessmann and Mason 1992). Aangepaste humane fibroblast cellen kregen instabiele telomeer gebieden gingen dood wanneer een kritieke lengte van 1.5 kb (TRF lengte van 4 kb) bereikt is (Counter et al. 1992). Voordat dit gebeurt hebben mitotische cellen zich ongeveer 50 keer gedeeld, dan is de hayflick limiet bereikt (Hayflick, 1961). Dit, wordt gedacht, is een verdedigingsmechanisme tegen kanker zodat er geen ongecontroleerde groei ontstaat. Maar er zijn ook cellen, waaronder witte bloedcellen en spermacellen, die meer dan 50 kopieën van zichzelf moeten kunnen maken in het leven van een organisme. Deze cellen produceren het enzym telomerase welke de novo het DNA van de telomeren kan verlengen en zo het 'leven' van de cel kan verlengen.

Telomerase is niet de enige manier hoe een telomeer langer kan worden. Een non-conservatieve manier van telomeer verlengen is die via ALT (alternative lengthening of telomeres). Een mechanisme waarbij de nucleotiden herhaling van een telomeer getransporteerd word tussen zusterchromatiden. Volgens welk mechanisme dit tot stand komt is vrij onduidelijk (Cesare&reddel 2010).

Gebruikte methoden

Q-PCR

Een PCR cyclus bestaat uit een aantal fasen waarin een stuk DNA vermeerderd kan worden. In de eerste fase zal de temperatuur verhoogd worden, zodat de DNA strengen loslaten. Nadat de temperatuur verlaagd is, kunnen de primers binden aan het complementaire DNA, zowel in de 3'5'richting als visa versa. Polymerase bindt en begint DNA synthese. In de synthese fase zal polymerase het stuk DNA synthetiseren uit dNTP's. Daarna volgt er nog een finale synthese fase om ervoor te zorgen dat elk stukje enkel strengs DNA volledig gesynthetiseerd is. Zo kunnen er veel cycli volgen en theoretisch gezien zal dit elke cyclus verdubbelen.

Het hele PCR proces kan ook weer in drie fasen worden verdeeld, bestaand uit de exponentiële fase, de 'leveling off' fase en de plateau fase. De verdubbeling van het DNA per cyclus vindt plaats in de exponentiële fase. In de leveling off fase is nu zoveel DNA gesynthetiseerd dat de reactie langzamer zal worden, omdat primers en dNTP's gelimiteerd aanwezig zijn. In de laatste fase zal geen DNA gesynthetiseerd meer worden, de reagenten zijn op (zie figuur 5).

QPCR is een methode om in "real time" de hoeveelheid start DNA te kwantificeren en de basis voor deze methode is het hiervoor beschreven PCR. Om de DNA synthese te kunnen bijhouden wordt een fluorescerend eiwit toegevoegd, bijvoorbeeld SYBR green. Dit is een eiwit dat alleen bindt aan dubbel strengs DNA en niet aan enkel strengs DNA. Wanneer SYBR green gebonden is zal het sterk fluoresceren. De QPCR machine meet de mate van luminescentie als maat voor de hoeveelheid DNA.

Omdat in de 'leveling off' - en de plateau fase de toename niet meer exponentieel is, zoals dat te verwachten is door gelimiteerde hoeveelheden primers en dNTP's, worden alleen de gegevens in de exponentiële fase gebruikt. De hoeveelheid start DNA is in de 'leveling off' - en de plateau fase niet meer terug te berekenen omdat er niet meer met maar één factor vermeerderd wordt maar deze factor fluctueert door het tekort.

De factor waarmee de hoeveelheid DNA vermeerderd wordt heet de efficiency. In theorie zal deze 2 moeten zijn maar in de praktijk is dat vaak iets minder. Dat de efficiency iets minder is dan twee is minder belangrijk dan het feit dat deze factor gelijk blijft in de exponentiële fase voor alle samples. Daarmee kan teruggerekend worden hoeveel DNA er in de oorspronkelijke sample zat met de absolute methode. Door de luminescentie van de sample logaritmisch te plotten ontstaat er een rechte lijn in exponentiële fase, de helling hiervan is de efficiency.

Het aantal cycli dat nodig was om de CT waarde te overschrijven, is alles dat resteert om de berekening uitgevoerd kan worden. Een rekenvoorbeeld ter verduidelijking. Na N cycli is: vermeerdering = (efficiency)ⁿ. N is het aantal cycli dat de sample nodig had om de CT waarde te overschrijven. Wanneer dit bijvoorbeeld 12 cycli is en met een efficiency van 1.95 dan is de vermeerdering $1.93^{12} = 2509$. Met dit vermeerderingsgetal is de oorspronkelijke hoeveelheid in de te meten sample na te gaan.

Ook wordt er in plaats van absolute waarden uit te rekenen een C/T ratio uitgerekend. Dit gebeurt met een loading control, een referentie-gen die ook gePCRt wordt en waarvan bekend is hoe vaak en hoeveel die in de sample zat. Door nu te kijken hoeveel cycli het referentie gen en de telomeer uit elkaar liggen, wordt een C/T ratio verkregen.

TRF

Met de TRF methode wordt met behulp van een restrictie-enzym het DNA in stukken geknipt en kan het van de telomeren worden gescheiden. De restrictie-enzymen knippen een bepaalde nucleotide sequentie, afhankelijk van het type enzym. Door deze sequentie zo te kiezen dat deze wel voorkomt in het DNA maar niet in de telomeer, wordt het meeste van het DNA in kleine stukjes geknipt maar blijft de telomeer intact.

De fragmenten worden op een agarose gel gebracht en er wordt voltage aangebracht. Omdat de DNA stukken even geladen zijn zal nu de grootte doorslaggevend voor de snelheid waarmee ze door de matrix van de gel bewegen. Grote stukken bewegen langzamer dan kleine door de gel.

Wanneer de fragmenten, op basis van hun grootte, verspreid zijn over de gel, kan de gel in een alkaline oplossing gezet worden. Dit kan de negatief geladen DNA beter laten binden aan het positieve membraan. Ook zal het DNA splitsen in enkel strengen waardoor het later gehybridiseerd kan worden met de probe.

Een vel nitrocellulose of nylon membraan kan nu worden aangebracht op de gel. Als er papieren doeken met een gewicht op het membraan gelegd wordt kan via capillaire werking het DNA meegenomen worden. Door het verschil in lading blijft het DNA plakken aan het membraan.

Het DNA kan op verschillende manieren permanent aan het DNA binden. Bijvoorbeeld door het bakken of door middel van UV. Hierna een 'probe', een specifiek stuk enkelstrengs DNA dat alleen bindt aan het DNA van interesse, aangebracht worden. Door aan de probe een radioactief of fluorescerend deel te binden kunnen de telomeren zichtbaar gemaakt worden.

Nu kan met behulp van software de lengte van de telomeren worden bepaald.

Kanttekeningen bij de methoden

Bij gebruik van de TRF of qPCR methode moet met een aantal zaken rekening worden gehouden. Voordelen van TRF methode zijn de meting van de absolute telomeerlengte en ook de verdeling van die lengten. Wel moet rekening gehouden worden met de aanwezigheid van subtelomeer DNA en verschillende hoeveelheden van repeat sequences die worden gedetecteerd als telomeren in een TRF southern blot (Baird, 2005). Daardoor worden de meetresultaten overschat en zal er altijd minder daadwerkelijk telomeer TTAGGG DNA zijn. Bij qPCR is gebrek er een aan goede referentie standaarden en hierdoor wordt de meting van absolute telomeerlengte bemoeilijkt. Alleen gemiddelde telomeerlengten kunnen worden gemeten en daarbij is de coëfficiënt van de variatie groter dan 2% (Nature Protocols, 2010).

Door verschillen in turn-overrate is het van belang voor een goede vergelijking van telomeerlengte dat dezelfde celtype gebruikt wordt. Dit heeft te maken met het feit dat de lengte van telomeren verband houdt met het aantal keer dat ze gekopieerd worden. Wanneer cellen verschillen in functies zullen ze ook verschillen in de mate van levensduur en dus in turn-overrate.

Omdat bij de beide methoden niet de gemiddelde telomeerlengte per cel of specifieke cel populaties berekend kan worden in tegenstelling tot bij de q-FISH methode moet altijd met de gemiddelde lengten gewerkt worden vanwege de variatie tussen cellen in telomeerlengte. Een doelcel zoals bijvoorbeeld een leukocyte wordt gemaakt in een serie stappen dat begint bij stamcellen en precursorcellen. Telkens worden de stamcellen gedeeld en zal een deel daarvan specialiseren in een leukocyte precursorcel. Deze precursorcel zal ook weer delen en een deel daarvan zal uiteindelijk een leukocyte worden. Omdat het voor een organisme niet uitmaakt of alle stamcellen en precursorcellen even vaak gedeeld zijn, als er maar een bepaald aantal doelcellen beschikbaar zijn voor overleven, zal er uit een sample naar de gemiddelde telomeerlengte van doelcellen gekeken moeten worden. Op deze manier kunnen ook lengten verkregen uit verschillende methodes met elkaar vergeleken worden.

Erfelijkheid

Een aantal factoren hebben invloed op de uiting van erfelijke eigenschappen. Genen en additieve gen variatie, geninteractie en omgevingsfactoren dragen allemaal bij aan de mate waarin een bepaalde eigenschap in de volgende generatie tot uiting komt. Daarom is een goede definitie van erfelijkheid belangrijk.

Formeel wordt erfelijkheid gedefinieerd als de ratio van variantie. Specifiek als de proportie van de totale variantie in een populatie voor een bepaalde meting, genomen op een bepaald moment of leeftijd dat toe te schrijven is aan de variantie in additieve genetische variantie of totale genetische waarden. Dit wordt ook wel narrow sense erfelijkheid genoemd (Visscher, 2008).

Een werkbaar model voor de verdeling van een fenotype volgens het bekende Nature-Nurture model, is het volgende: fenotype (P) = Genotype (G) + Omgeving (O). Hierin is het fenotype (P) de eigenschap van interesse hetgeen van alles kan zijn van een bepaalde bloedwaarde tot complexe gedragingen. Genotype (G) is de genetische constitutie van een organisme, specifiek de allelconstitutie. Omgeving (O) \ zijn alle biologische en non-biologische factoren met hun chemicalische interactie die effect uitoefenen op een organisme. Dat kan alles zijn van het milieu in een baarmoeder tot het weer en het eten.

Genotype (G) kan verder uitgewerkt worden in drie delen namelijk additieve-, dominante-, en epistatische-genetische effecten. Additieve genetische effecten (G_a) zijn het gevolg van twee of meer allelen op verschillende plekken in het genoom samenwerken. De som van de effecten is gelijk aan de individuele bijdrage, er is hier geen sprake van geninteractie. Dominantie genetische effecten (G_d) zijn er wanneer allelen op dezelfde locus interactie aangaan. Epistatische genetische effecten (G_e) zijn wanneer allelen op verschillende loci interactie met elkaar aangaan.

De formule is nog verder uit te breiden door de interacties tussen G en O op te nemen. Wanneer iets in de omgeving nodig is om bepaalde genen tot werking te laten komen is er sprake van G - O interacties.

De gehele formule ziet er nu zo uit $P = (G_a + G_d + G_e) + O + (G*O)$. Maar wat heeft dit voor biologische betekenis, wat betekent een bepaald erfelijk cijfer? Wanneer een bepaalde eigenschap een hoog erfelijkheidscijfer heeft, dan betekent dit, dat in de populatie, waarin de metingen zijn gedaan, het fenotype een goede voorspeller is van het genotype. Het betekent niet dat het fenotype vast staat, wanneer het genotype bekend is omdat de omgeving kan veranderen. Wanneer een eigenschap een laag erfelijkheidscijfer heeft betekent het, dat een klein beetje van de geobserveerde variatie te wijten is aan variatie in het genotype. En wat zegt een bepaald erfelijkheidscijfer over de aard van verschillen tussen twee verschillende groepen? Als er tussen twee groepen een groot

verschil is in de erfelijkheidsgetallen hoeft dit niet per se te komen door genetische verschillen. Ook is moeilijk om op basis van individuele erfelijkheidsberekeningen iets te zeggen over verschillen tussen groepen omdat de ene omgeving van een populatie de andere niet is. (Visscher, 2008)

Erfelijkheid of wel narrow sense erfelijkheid wordt aangegeven met h^2 en geeft aan in welke mate een eigenschap wordt overgedragen van ouders op het nageslacht, uitgedrukt als de ratio van de additieve genetische variatie tot de totale fenotypische variatie.

Bij complexe eigenschappen of eigenschappen waarvan niet bekend is hoeveel genen eraan bijdragen is het wat ingewikkelder om de mate van erfelijkheid te bepalen. Een goed begin om te onderzoeken in hoeverre gene bijdragen aan een eigenschap, is het gebruik van tweelingstudies, het vergelijken van monozygote en dizygote tweelingen.

De kracht van tweeling studies komt door de twee typen tweelingen namelijk de monozygote en de dizygote. De monozygote tweelingen zijn ontstaan uit één enkele bevruchte eicel en hebben dus allemaal dezelfde allelen en dizygote uit twee bevruchte eicellen en delen gemiddeld 50% van de polymorfe allelen. Deze bekende verschillen in genetische overeenkomst samen met het feit dat de tweelingen in nagenoeg dezelfde omgeving opgroeien, maken het mogelijk de effecten van genetische en omgevingsvariatie op een fenotype te onderzoeken (Neale & Cardon, 1992).

Tweelingstudies

Een goede en veel gebruikte methode om de erfelijkheid van een eigenschap te bepalen is door middel van tweelingstudies. Tweelingen komen in twee soorten voor, namelijk de monozygoten en de dizygoten. De monozygoot ontstaat uit één zygoote, een bevruchte eicel, doordat de zygoote zich splitst en er twee embryo's ontstaan die beide uitgroeien tot een foetus. Daardoor zijn de monozygote tweeling genetische gezien identiek. Wanneer twee eicellen vrijkomen en deze beide bevrucht worden en uitgroeien tot foetussen ontstaan er dizygote tweeling. Deze dizygote tweelingen delen dus gemiddeld voor 50% genetische aan elkaar gelijk. Met dit gegeven en feit dat de tweelingen samen zijn grootgebracht kan een vergelijking worden gemaakt tussen correlaties van een eigenschap, bijvoorbeeld telomeerlengte. Wanneer in monozygote tweelingen een veel hogere correlatie gevonden wordt dan in dizygote tweelingen kan dit wijzen op een grote rol voor genetische factoren.

Met een standaard model beschreven door Neale en Cardon (1992) kan de erfelijkheid van telomeerlengte worden geschat. De formule: $V = A + D + O + U$. Waarin V staat voor de totale variantie in een populatie. De letter A staat voor additieve genetische effecten. Dominante interactie tussen loci wordt weergegeven met de letter D. Omgeving (O) zijn de omgevingsfactoren door beide tweelingen ondergaan en (U) staat voor de unieke omgevingsfactoren die niet op de beide maar één van de twee effect hebben. De covariantie voor de monozygote tweeling kan dan als volgt worden weergegeven $cov = A + D + O$. Voor dizygote tweelingen geldt $cov = (1/2)A + (1/4) D + C$.

Voor de monozygote tweelingen is alleen (U) een bron voor verschil en voor de dizygote is dat ook nog de additieve en dominante genetische effecten. Met behulp van software kunnen de verschillende parameters in verscheidene modellen gestopt worden om te zien welke het best past bij de data. Bij het modeleren van de data kunnen meer factoren worden meegenomen zoals bijvoorbeeld sekse, leeftijd en een rookverleden, om een beter beeld te krijgen van de invloed op de variantie. Op deze manier kan een schatting van de erfelijkheid van telomeerlengte worden gemaakt (Bischoff et al 2005).

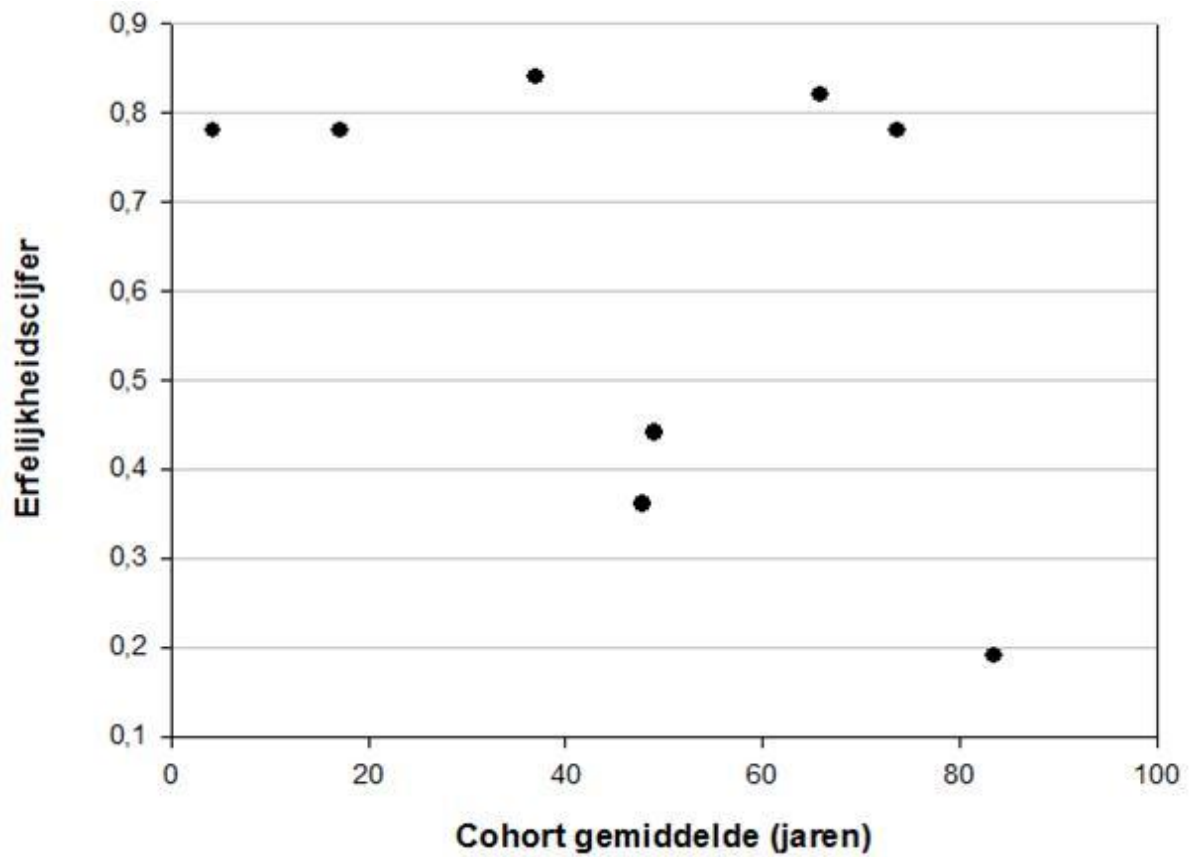
Erfelijkheid telomeerlengte

In verschillende studies is onderzoek gedaan naar de erfelijkheid van telomeerlengte. In de onderstaande tabel (tabel 1) zijn een aantal van deze studies weergegeven met daarin resultaten en de belangrijkste aspecten. Figuur 1 laat een grafische weergave zien van de resultaten uit tabel 1. Onder het kopje 'Onder de loep' is een beschrijving gegeven van de onderzoeksset-up en enkele opmerkelijkheden van de onderstaande studies.

Tabel 1 Een overzicht van erfelijkheidscijfers uit verschillende studies.

Referentie	Steekproefgrootte	cohort range	Cohort Gemiddelde en sd	Erfelijkheidscijfer	CI, Std. E.	Methode	DNA cel type
Andrew et al (2006)	♀ DZ: 2050	18 t/m 80 jr.	gem.: 47,8 sd:12,4	0,36	95%[CI] 0.18-0.48	TRF	WBC
Bischoff et al (2005)	♀ MZ:112 DZ: 140 ♂ MZ: 62 DZ: 70	73 t/m 94 jr. 73 t/m 94 jr.	gem.: 83,5 gem.: 83,5	0,19 0,19	95%[CI] 0,01-0,36	Q pcr	WBC
Jeanclos et al (2000)	MZ: 20 DZ: 78	14 t/m 44 jr.	gem.: 36,98 sd: 7,95	0,84	(P<0,05)	TRF	WBC
Njajou et al (2007)	♂: 356 ♀: 551	18 t/m 92 jr. 18 t/m 92 jr.	gem.: 49 sd 16 gem.: 49 sd 17	0,44 0,44	SD: 0,06 (P<0,001)	TRF	WBC
Slagboom et al (1994)	MZ: 16 DZ:15 MZ: 15 DZ: 14 MZ: 27 DZ: 27	2 t/m 95 jr. 2 t/m 95 jr. 2 t/m 95 jr.	gem.: 4,15 sd: 1,4 gem.: 17,1 sd: 2,4 gem.: 43,7 sd: 5,79	0,78 0,78 0,78	SE: 0,046	TRF	WBC
Vasa-Nicotera (2005)	all: 383	47 t/m 82 jr.	gem.: 65,8 sd: 6,4	0,82	SE: 0,118	TRF	WBC

Grafiek bij tabel 1



Figuur 1. Hier is een duidelijk verschil te zien tussen de hoge en lage uitkomsten uit de verschillende studies doordat in het statistische model wel of geen rekening is gehouden met leefomstandigheden en additieve genetische effecten.

Onder de loep

Een studie door Slagboom et al (1994) met tweelingen om een erfelijkheidscijfer van telomeerlengte te bepalen. De subjecten zijn random gekozen uit het Nationaal tweelingregister en lijden niet aan noemenswaardige ziekten en of afwijkingen. De leeftijden van de subjecten variëren tussen de 2 en 95 jaar en zijn verdeeld over vier leeftijdscohorten. De laatste leeftijdscohort, de groep met een gemiddelde leeftijd van 79, niet is meegenomen in de analyse vanwege te kleine aantallen, namelijk 4 MZ en 4 DZ paren. Opmerkelijk was het grote batch effect, tot 42% van de totale TRF lengte variatie was hierdoor te verklaren. De tweelingpaar samples behoorden tot dezelfde gels in de analyse. Er is in deze studie niet getest voor bewijs van “common environment” en additieve polygenetische effecten hetgeen het hoge erfelijkheidscijfer zou kunnen verklaren.

Denemarken het land met de eerste nationale tweelingregistratie systeem, daarom hebben Bischoff et al (2005) onderzoek kunnen doen naar de erfelijkheid van telomeerlengte op subjecten met een leeftijdsrange van 72 tot 102 jaar. Voor de daadwerkelijke analyse was de leeftijdsrange 76 tot en met 95 jaar. Uit de groep werden de subjecten gevraagd of ze mee wilden doen en bloed wilden doneren voor het onderzoek, alleen wanneer de co-tweeling ook wilde doneren werden ze meegenomen in de analyse. Het erfelijkheidscijfer uit dit onderzoek met oudere tweelingen kwam uit op een 0.36. Opmerkelijk was dat voor vrouwen MZ intraclass correlaties consistent hoger waren dan die van de DZ klasse, hetgeen invloed van genetische factoren in oudere vrouwen suggereert. In het geval van de oudere mannen was de MZ intraclass correlatie niet hoger dan de DZ. Een andere opmerkelijk punt was dat de telomeerlengte van vrouwen langer was dan dat van leeftijdgerelateerde mannen. Voor de vrouwen gold een strikte lineaire relatie tussen leeftijd en telomeerlengte, voor mannen in kwadratische relatie.

Vasa-Nicotera et al (2005) hebben onderzoek gedaan naar QTL (kwantitatieve eigenschap analyse) en leukocyte telomeerlengte. De studie subjecten kwamen uit een andere studie en waren beschikbaar. De tweelingen en hun cotweeling in deze studie hebben coronaire hart ziekte. De auteur heeft net als een aantal andere auteurs, namelijk Brouillette et al (2003) en Cawthon et al (2003), een associatie gevonden tussen kortere telomeren en kans op coronaire hart ziekte. Maar omdat het om een relatief homogene populatie patiënten met coronaire hart ziekte gaat en selectie in studie vanuit de populatie patiënten hoogstwaarschijnlijk is, denkt de auteur dat dit geen invloed heeft op het erfelijkheidscijfer. Ook omdat uit de multipunt linkage analyse met coronaire hart ziekte als fenotype en telomeerlengte geen bewijs van significantie of suggestieve verbinding kwam. Onder de aanname dat de gehele familiale vergelijking in telomeerlengte genetische is, komt de auteur met een h^2 van 0.819 voor gemiddelde TRF lengte.

Andrew et al (2006) heeft een QTL analyse gedaan op TRF lengten en daarbij ook een erfelijkheidscijfer berekend van TRF lengten. Het onderzoek is gedaan met tweelingen die zijn uitgenodigd via het St. Thomas's United Kingdom adult twin registry. Het ging hier om 2050 volwassen vrouwen, 1025 dizygote tweelingparen. Alle vrouwen zijn

onderzocht op een brede range fenotypen gerelateerd aan cardiovasculaire ziekte, obesitas en osteoporose, het betrof gezonde vrouwen. Om te controleren voor experimentele batch effecten in het laboratorium, zijn de tweelingparen random, rekening houdend met leeftijd en zygositeit, toebedeeld aan gel batches voor de TRF analyse. Het erfelijkheidscijfer dat uit deze analyse kwam was 36% met een 95% confidence interval van 0.18-0.48

De personen uit het onderzoek van Njajou et al (2007) zijn tussen de 19 en 92 jaar oud en de groep bestaat uit 356 mannen en 551 vrouwen. De mensen zijn afkomstig uit grote Amish families en maken deel uit van een andere osteoporose studie. De Amish, zo een 30.000 in aantal in 2007, zijn afkomstig van een groep van 200 Amish families die in de 18^{de} eeuw zijn geëmigreerd naar Amerika. Veel van de genologie is bekend en een totaal van 954 subjecten werden rekruteert als onderdeel van een osteoporose studie. Personen met een lage bot mineraal dichtheid of met een geschiedenis van botbreuken werden gekozen, hun wederhelft en eerste graad familieleden werden ook uitgenodigd om deel te nemen aan de studie. De vrouwen en mannen in de Amish gemeenschap worden even oud, en hebben een levensverwachting gelijk met die van de Amerikaanse caucasiër, en de gemiddelde telomeerlengte was ook gelijk voor man en vrouw. H^2 voor deze studie is berekend op .44 met een SD van 0.06. in lijn met andere studies waar gecorrigeerd is voor leeftijd, sex en batch effect.

Jeanclous et al (2000) hebben onderzoek gedaan naar de relatie tussen telomeerlengte in witte bloedcellen en bloeddruk en tegelijkertijd de rol van genetische factoren gedetermineerd in telomeerlengte. Ze hebben hierbij gebruikt gemaakt van 49 tweelingparen die ze via het Deense tweelingregister hebben verkregen. 10 MZ en 39 DZ in de leeftijdsrange van 18 tot en met 44 jaar zijn verworven door reactie op een toegestuurde vragenlijst. Ze werden geselecteerd op een negatieve geschiedenis voor metabole, cardiovasculaire en chronische ontstekingsziekten. Uit de analyse voor de erfelijkheid van telomeerlengte kwam in deze studie een getal van .84 naar voren. De auteur geeft aan dat in het statistisch model dat gebruikt is geen rekening gehouden is met factoren die niet gemeten zijn zoals, gelijk dieet en leefomstandigheden enzovoorts en dit ontbrekt aan erfelijkheid kan worden toegeschreven.

Opmerkingen

Er zijn een aantal kanttekeningen te plaatsen bij de studies wat een goede vergelijking bemoeilijkt. Zo is in de helft van de hierboven genoemde studies gebruikt gemaakt van subjecten uit een andere studie gericht op een bepaalde afwijking zoals osteoporose en in een studie is zelfs geselecteerd op een negatieve geschiedenis van een aantal afwijkingen.

De cohorten verschillen in leeftijdsrange. Hoewel cohort gemiddelde een mooie spreiding geeft is de range waarop deze gemiddelden gebaseerd zijn, in sommige gevallen heel groot.

In een studie is gebruik gemaakt van een andere methode, Q per en in de andere gevallen TRF Southern blot. Hoewel beide methodes uitkomen op een gemiddelde telomeerlengte, is bekend dat de uitkomst van de TRF Southern blot wat overschat is door non-telomeer stukjes van inter-individuele variatie (Baird, 20005).

Los van het feit dat subjecten uit andere studies komen, studies naar ziekten en daarop geselecteerd werden, zijn wat betreft levenswijze ook een aantal verschillen. Subjecten uit verschillende landen, hoewel allemaal uit een westerse cultuur en met verschillende levenswijze. Het meest opvallende zijn de Amish mensen. Amish zijn een groep uit Europaan geëmigreerde boeren, die er een traditionele levenswijze erop na houden en sommige groeperingen mijden alle na 1850ste technologie. Door onder andere de traditionele levenswijze en streng religieus handelen is er weinig inmenging van buitenaf. De Amish gemeenschap is dan ook in hogere mate verwant aan de familie van zijn/haar partner, hetgeen leidt tot genetische drift.

Erfelijkheidscijfers verklaard

Het meest opmerkelijke aspect uit figuur 1 is de dichotomie van de resultaten. Er zijn een aantal studies die naar buiten komen met hoge erfelijkheidscijfers, gemiddeld 0.81, en een aantal met juist lage of lagere erfelijkheidscijfers, gemiddeld 0.33. Uit de studie van Jeanclos et al is op te maken dat in het statistische model geen rekening is gehouden met vergelijkbare leefomstandigheden, wel met additieve genetische effecten, net als Slagboom et al. Zo ook voor de uitkomst van Vaso nicotera et al. In de studies wordt aandacht besteed aan batch effect hetgeen niet onbelangrijk is. De invloed van batch effect is met de methode van TRF Southern blot erg hoog. In de studie van Andrew et al wordt komt naar voren dat tussen 19% en 42% van de variatie in telomeerlengte toe te schrijven is aan batch effect.

De hoge erfelijkheidscijfers zijn onder andere te verklaren door dat er geen rekening gehouden is met leefomstandigheden. Wanneer de formule uit het hoofdstuk 'erfelijkheid' erbij gepakt wordt is te zien dat een fenotype onderverdeeld kan worden in een genetische component en een omgevingscomponent. Wanneer het fenotype telomeerlengte onderzocht wordt op erfelijkheid moet altijd rekening worden gehouden met de omgevingscomponent, hetgeen hier duidelijk naar voren komt. De studies die dit niet gedaan hebben komen daardoor op een hoog erfelijkheidscijfer uit. De factor omgeving is voor het fenotype telomeerlengte dus heel belangrijk. Huda et al (2007) onderschrijft dit met de opmerking dat voor MZ en DZ tweelingen gelijk sterke erfelijkheidscijfers gevonden zijn hetgeen suggereert dat de correlatie vooral komt door gelijke leefomstandigheden.

Dus gesteld zou kunnen worden dat telomeerlengte laag erfelijk is en dat vooral de leefomstandigheden bepalend zijn voor de lengte en wellicht dus ook voor de afname ervan. In het volgende hoofdstuk wordt dit verder uitgediept.

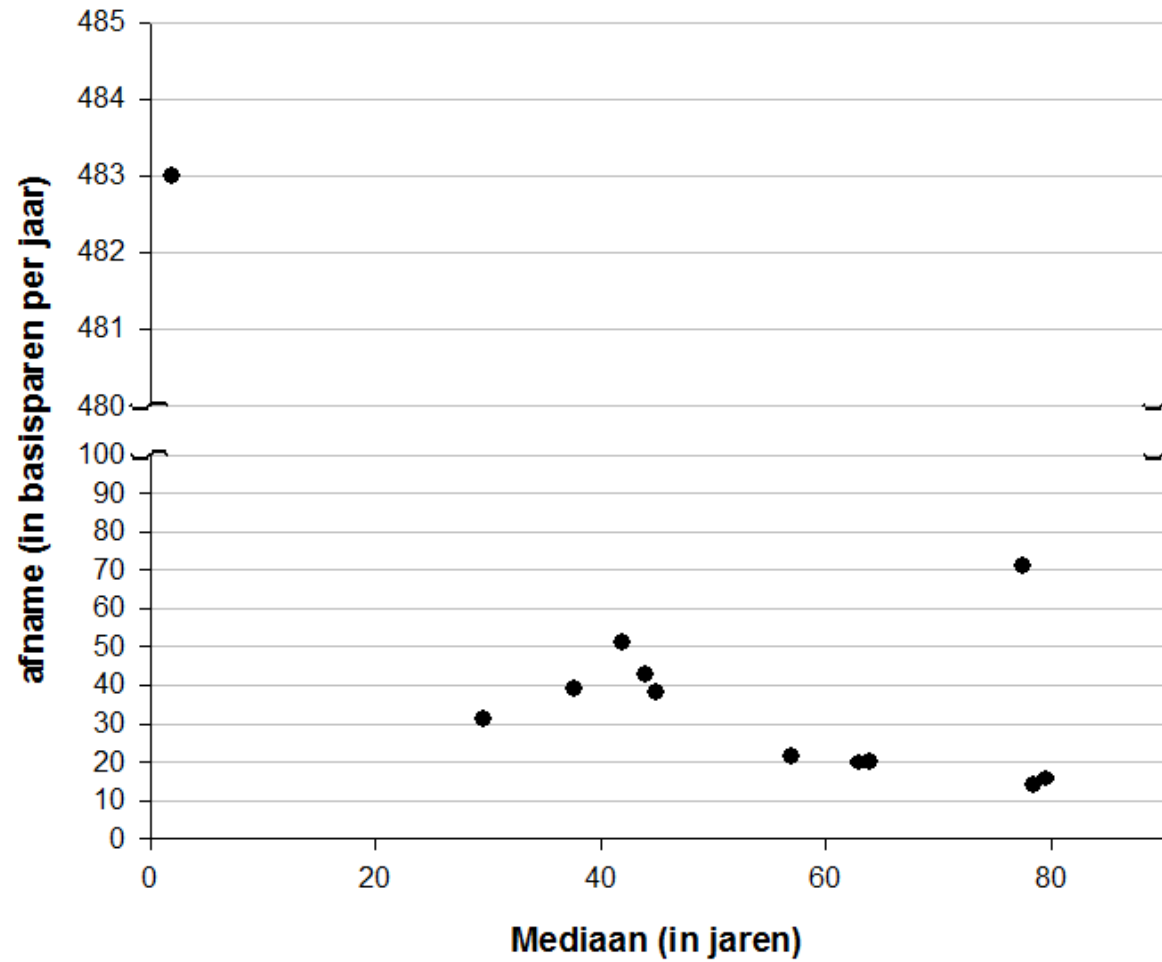
Telomeer Dynamics

Uit het vorige hoofdstuk bleek dat genen niet de belangrijkste rol hebben wanneer er gekeken wordt naar het fenotype telomeerlengte, daarom kijken we in dit hoofdstuk naar de component 'omgeving'. Als de omgeving van een organisme meer invloed heeft op de telomeerlengte op een gegeven moment is het wellicht belangrijk te kijken naar de afbraak van telomeren. Telomeren verkorten door mitotische delingen en breuken, zijn er factoren die deze processen versnellen? Om hierachter te komen gaan we eerst kijken naar een aantal studies die onderzoek gedaan hebben naar de afname (in basisparen per jaar) van telomeren op verschillende groepen mensen. De belangrijkste uitkomsten hiervan staan genoteerd in tabel 2, de onderstaande tabel. In de grafiek die bij tabel 2 hoort, figuur 2, is de afname van het aantal basisparen per jaar is uitgezet tegen de mediaan van de verschillende groepen mensen,.

Tabel 2.

Referentie	Afname (bp. p. jr.)	Range (jr.)	Mediaan (jr.)	N	DNA celtype	Methode
Bestilny et al., 2000	38,3	0-82	45	15	PBMCs	TRF
Cawthon et al., 2003	14	60-97	78,5	143	bloedcellen	Q pcr
Huda et al., 2007	71	73-83	77,5	686	WBC	TRF
Mondello et al., 1999	42,6	26-72	44	26	PBMC	TRF
	15,6	50-104	79,5	26	PBMC	TRF
Rufer et al., 1999	483	0-4	2	69	PBL	FISH
	39	4 tot 90	37,7	269	PBL	FISH
Slagboom et al., 1994	31	2-95	29,6	123	WBC	TRF
Unryn et al., 2005	51	30-49	42	36	PBMCs	TRF
	19,8	50-80	63	89	PBMCs	TRF
	21,5	30-80	57	125	PBMCs	TRF
von Zglinicki et al., 2000)	20	18-98	63,9	186	PBMC	TRF

Grafiek bij tabel 2



Figuur 2: In deze figuur staan de belangrijkste resultaten uit tabel 2 grafisch weergegeven met daarin de afname in basisparen per jaar uitgezet tegen de mediaan in jaren van de verschillende cohorten.

Beschrijving van de studies naar basispaarafname per jaar

In de studie van Bestilny et al (2000) wordt gebruik gemaakt van aids patiënten om onder andere onderzoek te doen naar de relatie tussen telomeerlengte en leeftijd. Voor elk individu werden meerdere metingen gedaan en de gewogen kleinste kwadraten werd gebruikt voor een gemiddelde TRF lengte. De range van 0- 82 komt door het gebruik van bloed uit navelstrengen waar ook een TRF lengte bepaling mee is gedaan. Dit voor een duidelijker beeld van de afname in telomeerlengte met leeftijd voor aids-patiënten en van de gezonde controles. Opmerkelijk was een ander deel van de studie die aantoonde dat de groep patiënten in de midden en late fase van de ziekte vergelijkbare telomeerlengte hadden met die van een gezonde 82 jarige.

De subjecten uit de studie van Cawton et al (2003) waren allemaal ouder dan 60 jaar en werden gebruikt om een associatie te leggen tussen telomeerlengte in het bloed en mortaliteit. De 143 subjecten werden niet geselecteerd op de aanwezigheid of afwezigheid van specifieke ziekten of klinische afwijkingen en zijn niet aan elkaar gerelateerd. T/S ratio's werden berekend en gemiddelde TRF lengte bepaald en vervolgens omgezet in lengte in basisparen. Zo kwamen Cawton et al (2003) uit op een afname van 14 basisparen per jaar.

In een prachtig onderzoek door Huda et al (2007) zijn WW2 en Koreaanse Oorlogs veteranen in fysieke conditie onderzocht en hun gemiddelde telomeerlengte. In totaal werden 686 veteranen onderzocht waaronder 181 MZ en 125 DZ tweelingen, de gemiddelde leeftijd was 77.5 uit een range van 73- 85 jaar. Omdat de subjecten uit een ander onderzoek kwamen, die genen relateerde aan gezondheid en daarvoor een gezondheidsonderzoek gedaan hadden, concludeerde Huda et al dat ze gezonder waren dan leeftijdsgelateerde uit de totale populatie. Afname van gemiddelde WBS telomeerlengte, van alle gezondheidsgroepen samengevoegd, was 71 bp., per jaar en de gemiddelde lengte van telomeren per gezondheidsgroep verschilde aanzienlijk. De geen-hart-en-vaat-ziekte-groep scoorde de langste telomeren daarna significant korter waren die van hypertensie groep en weer significant korter aan de hypertensie groep de welk-vorm-van-hart-en-vaatziekte-dan-ook (exclusief alleen hypertensie). Opmerkelijk was dat er geen bewijs gevonden werd voor erfelijkheid in deze oudere groep. De auteurs stellen dan ook dat telomeerlengte hoofdzakelijk gerelateerd is leefomstandigheden.

Mondello et al (1999) bestudeerde de telomeerlengte in fibroblastcellen en bloedcellen van gezonde oude mensen en jonge mensen die meewerkten aan het onderzoek. De subjecten onderverdeeld in drie cohorten namelijk 26–29, 50–72, en 92–104 jaar, waarvan de gemiddelde TRF lengte werd bepaald. De gemiddelde basisparen afname per jaar waren voor de eerste en tweede cohort gelijk maar verschilde aanzienlijk met die van de laatste. Het aantal subjecten, van deze studie is niet groot waarmee rekening moet worden bij de interpretatie van de uitkomst.

In de studie van Rufer et al (1999) zijn de gemiddelde telomeerlengte van individuele bloedcellen gemeten bij meer dan verschillende individuen met leeftijdsrange van 0 tot 90 jaar. Subjecten met kwaadaardige, immunologische of infectie ziekten werden uitgesloten. Verschillende leeftijdsc cohorten zijn er gemaakt met verschillende celtypen.

In de tabel zijn de resultaten opgenomen van de granulocyten/monocyten van de lineaire regressie analyse. Omdat er individuele cellen zijn gebruikt vermeldt de auteur dat het mogelijk is, maar niet waarschijnlijk, dat abnormale cellen in de analyse zijn opgenomen. Ze schatten het onwaarschijnlijk dat dit invloed heeft vanwege de grote getallen die geanalyseerd zijn en de impact daarvan op de significante resultaten.

Unryn et al (2005) hebben een gemiddelde telomeerlengte voor 125 subjecten uitgerekend, gebruikt in drie cohorten. Een cohort van 30-80 met daarin alle 125 subjecten cohorten van 30-49 en 50-80 waarin de 125 over verdeeld werden. De subjecten zijn verkregen door random telefoonnummers te bellen en vragen of ze mee wilden doen aan het onderzoek. Afnames van 51.3, 19.8 en 21.5 basisparen per jaar zijn gevonden voor de cohorten van respectievelijk 30-49, 50-80 en 30-80.

In de studie van Von Zglinicki et al (2000) is onderzoek gedaan naar telomeerlengte in PBMC's en fibroblasten bij VaD patiënten en gezonde vrijwilligers. De range in beide groepen was 19-98 jaar met een mediaan van 63,9. Hoewel in de groep vasculaire dementie de gemiddelde telomeerlengte korter was dan in de controle groep met de gezonde vrijwilligers, was de gemiddelde afname van het aantal basisparen per jaar voor beide groepen 20.

Telomeer verkorting

In de grafiek is een afnemende afname te zien van het aantal basisparen per jaar met leeftijd. In de eerste levensjaren is er een enorme afname van het aantal basisparen per jaar van 3052 (niet opgenomen in de grafiek) in de eerste helft van het eerste levensjaar, gemeten in granulocyten (Rufer, 1999). Deze afname daalt snel want wanneer deze groep baby's uitgebreid werd met kinderen tot 4 jaar zit de afname op 483 basisparen per jaar. En wanneer de range uitgebreid wordt tot 90 jaar is de gemiddelde afname gedaald tot 39 voor de granulocyt cellen. Vanwege dit enorme verschil is in dezelfde studie van Rufer et al, tweedelige lineaire regressie gemaakt met een ideaal snijpunt voor granulocyten op een half jaar. Wat laat zien dat voor granulocyt cellen er tot de helft van het eerste levensjaar een enorme basispaar-afname is en daarna een lagere gematigde afname.

Wanneer er naar de andere punten in grafiek gekeken wordt is nog steeds een afnemende afname te zien met als een uitschieter de uitkomst van Huda 2007. De bevindingen van Verfaillie et al 2002, spreken van een ander beeld namelijk dat er ongeveer na het zestigste levensjaar de afname weer zou toenemen. De studie van Cawton et al gebaseerd op mensen ouder dan 60 jaar en niet geselecteerd op de aanwezigheid of afwezigheid van specifieke ziekten of klinische afwijkingen, geeft juist een hele lage afname van 14 basisparen per jaar. Net als de studie van Mondello die met een range van 50 tot en met 104 uitkomt op 15.6 basisparen per jaar, hoewel volgens auteur de aantallen in de groepen klein waren voor hele betrouwbare uitkomsten. De uitkomsten wijken aardig af van die gevonden door Huda et al, hun onderzoek met veteranen en ingedeeld in verschillende gezondheidsgroepen, hoewel er voor de

basispaar afname van alle subjecten een getal is berekend. Ondanks de groepen met hart en vaatziekten en hypertensie vond de auteur de subjecten in betere gezondheid dan leeftijdsgenoten.

Volgens Zon Zglinicki is het verlies van basisparen vanwege het end-of-replication probleem door celdivisie niet meer dan 4 tot 6 basisparen. Dit is beduidend minder dan te zien in de verschillende studies. Dus zijn er andere mechanismen aan het werk die voor die extra basisparen per jaar zorgen. Er is verondersteld dat zou kunnen komen door C streng degradatie, gezien er alleen lange G base rijke staarten gevonden werden (Makarov, 1999). Na de replicatie zou DNA 50 tot over 200 basisparen enkel strengs C base rijk DNA afbreken waardoor er lange G base rijke staarten overblijven. Von Zglinicki et al stellen dat de hypothese van Makarov verre van bewezen is en dat het het end-of-replication probleem en de lengte enkel strengs einde van telomeren niet onderhevig zijn aan andere DNA schade toebrengende factoren. Verder gaan ze dat het verlies van basisparen door de twee mechanisme niet meer is dan 30 basisparen per divisie. Al dit onderzoek is gedaan op humane fibroblasten.

Oikawa et al onderzochten een ander mechanisme dat zou kunnen leiden tot telomeerlengte verkorting. Zij vonden dat in G base rijke telomeren veel meer kans was op schade dan in G base rijke niet telomeer DNA door oxidatieve componenten. DNA schade in de telomeren was ongeveer zes keer sterker dan in de niet DNA gebieden. Henle et al (1999) vonden vergelijkbare resultaten. De precieze mechanismen hoe deze schade voorkomen zou kunnen worden is niet bekend wel, dat oxidatieve schade bijdraagt aan telomeer verkorting.

Stress en oxidatieve stress

In het hierboven beschreven stuk is een mogelijk mechanisme beschreven waardoor telomeren korter kunnen worden, nu zal gekeken worden naar een mogelijk oorzaak. In een studie van Salomons (2009) wordt een relatie beschreven tussen stress door life history traits en telomeer verkorting in kauwtjes. De associatie tussen en telomeren en levenspan wordt verklaard door het mechanisme van oxidatieve stress. Het vrijkomen van ROS (reactieve oxidatieve deeltjes) door een verhoogd celmetabolisme brengt schade aan, bij onder andere het DNA. Telomeer verkorting wordt dan ook bevorderd door oxidatieve stress (von Zglinicki, 2002). En hogere stress in het leven van het organisme zorgt voor oxidatieve stress en dus kortere telomeren (Jennings et al 2000; Monaghan & Hausmann). De life history traits van vrij levende kauwtjes werden bijgehouden en tevens werd regelmatig de lengte van de telomeren gemeten. Een tal van zaken wordt bijgehouden dat al begint bij het ei. Het hoeveelste ei is het en wat voor sekse komt daar uit. Hoe hoog staan de ouders in de sociale ranking in de kauwtjes gemeenschap. Hoe goed krijgt het te eten, hoe goed kan het zijn eigen eten vinden. Wat voor maatje krijgt het en wanneer leggen ze hoeveel eieren. Al deze zaken hebben invloed op hoe zwaar het leven van de kauw is. En dit is terug te vinden in telomeerlengte.

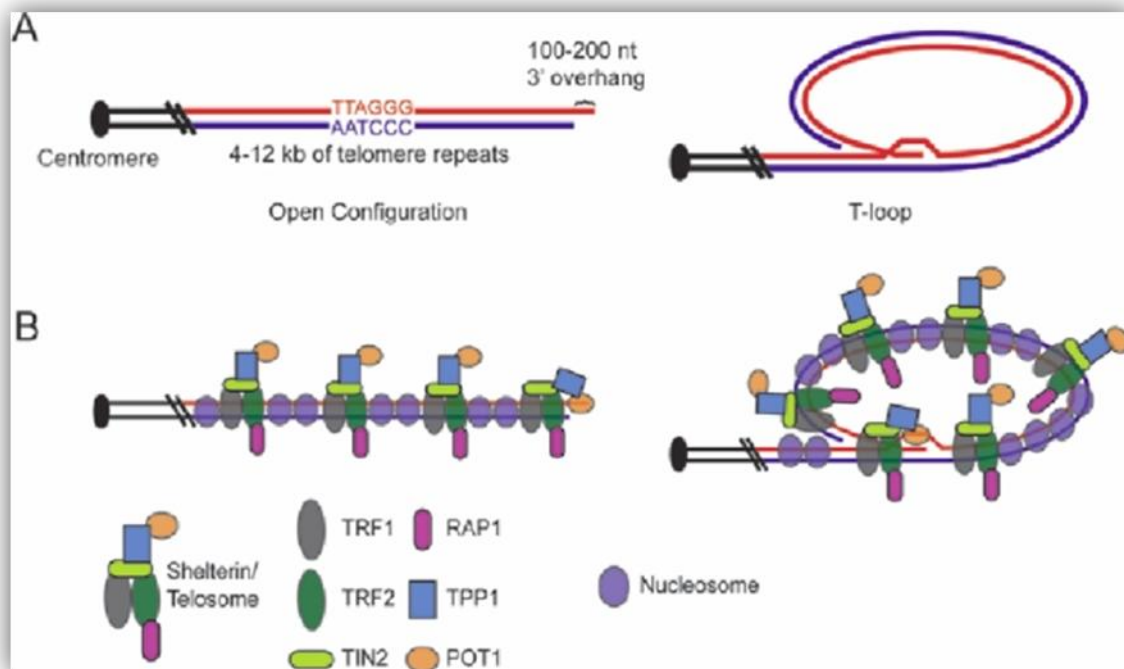
Ook in de eerder beschreven studies, terug te vinden in de tabel 1, is een correlatie te vinden tussen stressoren in het leven en telomeer-verkorting. In bijvoorbeeld het leven

in een Amish gemeenschap is het voor beide seksen een zwaar bestaan doordat zij hard werken omdat alle moderne middelen afgezworen worden. Hoewel de levensverwachting van de Amish overeenkomt met de Amerikaanse caucasier -worden de Amish mannen en vrouwen gemiddeld even oud en ook de gemiddelde telomeerlengte is even lang voor man en vrouw. (Njajou et al, 2007). Wanneer dit vergeleken wordt met het onderzoek van Bischoff et al (2005) dan valt wel iets op over levensstijl en telomeerlengte. In dit laatst genoemde onderzoek met oudere mannen en vrouwen uit de Deense populatie waar, zeker in de tijd dat de subjecten in de kracht van het leven waren, een vast rollenpatroon gold. Mannen deden zwaar en gevaarlijk werk en vrouwen deden licht huishoudelijk werk. Mannen hadden kortere telomeren wanneer dit vergeleken werd met leeftijdgerelateerde vrouwen. Daar komt bij dat de correlaties tussen de intraklasse MZ en DZ tweelingen tussen mannen en vrouwen ook verschilden. De cijfers suggereerden bij vrouwen sterke invloed van genetische factoren en dit was bij de mannen niet het geval. Ook bestaat er een relatie tussen een reeks ziektebeelden en verkorte telomeren zoals bijvoorbeeld coronaire hartziekte uit het onderzoek van Vasa-Nicotera et al. (2005)

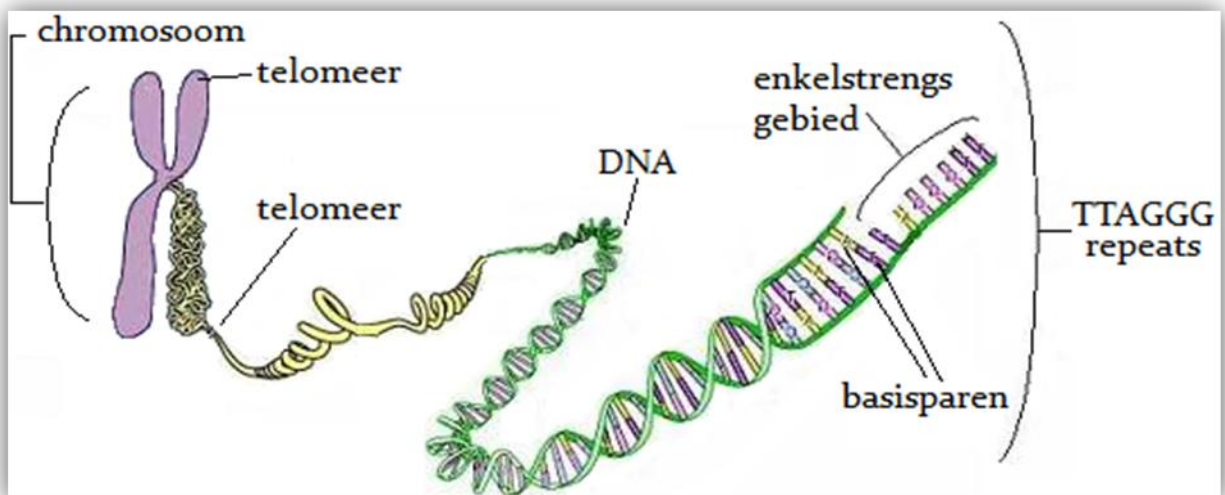
Conclusie

In deze literatuurstudie naar de van erfelijkheid van telomeerlengte vond ik dat de genen een kleinere rol spelen dan in eerste instantie door sommige studies werd aangetoond. De invloed van de omgeving speelt hierbij een veel grotere rol zo blijkt uit verscheiden van de behandelde studies. Naar voren komt dat het end-of-replication probleem niet hoofdzakelijk bijdraagt aan telomeer-verkorting maar voornamelijk oxidatieve stress. Oxidatieve stress heeft veel invloed op telomeerlengte-verkorting en er zijn aanwijzingen voor verschillende mechanismen zoals bijvoorbeeld die van G base sterke enkelstrengs breuken. Op welke manier en in welke mate dit bijdraagt aan telomeer verkorting blijft echter nog onopgehelderd. En dus ook de manier waarop fysieke stress als ziekte en andere zaken invloed hebben op telomeerlengte, terwijl er toch een duidelijke correlatie te zien is. Graag zou ik verder onderzoek willen zien naar het precieze mechanisme van telomeer-verkorting door stress in het dagelijks leven van de mens.

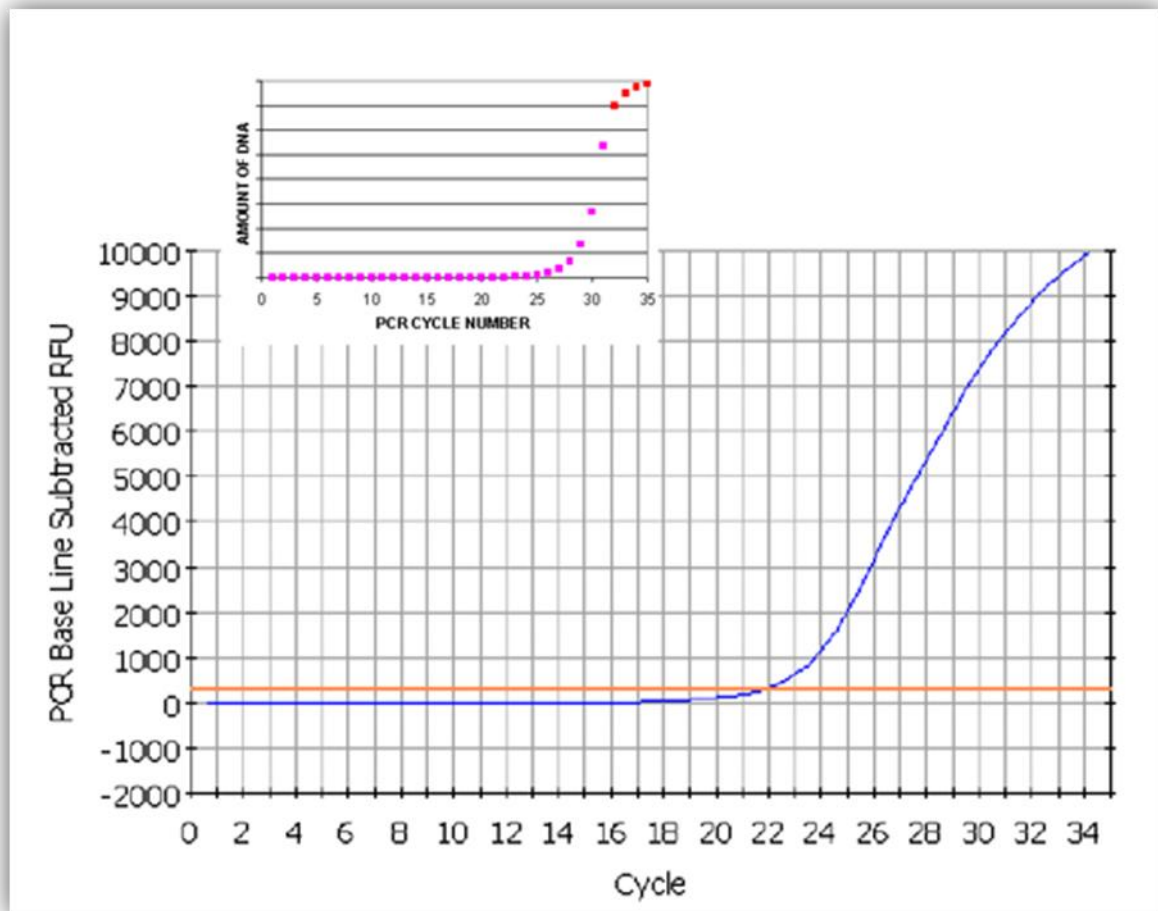
Bijlage



Figuur 3: A) de open configuratie van een telomeer met daarnaast de gesloten configuratie door de T-loop vorming. B) de verschillende eiwitten die de subunits van shelterin/telosome complex vormen. Uit Ceasre & Reddel (2010).



Figuur 4 : Een schematische weergave van de opbouw en positie van een telomeer in de context van een chromosoom. (herkomst figuur onbekend)



Figuur 5: Een grafiek behorend bij een PCR machine. De blauwe lijn is de hoeveelheid luminescentie. De oranje lijn is de CT-waarde. De bijgevoegde grafiek geeft een schematische weergave van de hoeveelheid DNA uitgezet tegen het aantal cycles

REFs

Andrew T., Aviv A., Falchi M., Surdulescu G.L., Gardner J.P., Lu X., Kimura M., Kato B.S., Valdes A.M., and Spector T.D., Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *The American Journal of Human Genetics* (2006) Vol.78, March, pp. 480-486

Ceasre A.J, Reddel R.R., Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Gen.*(2010) Vol.11 May, pp.319-330

Baird D.M., New developments in telomere length analysis. *Exp Gerontol* (2005), Vol.40, pp. 363-368

Bestilny L.J., Gill M.J., Mody C.H., Riabowol K.T., Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *AIDS*, 2000, Vol.14, pp.771–780.

Biessmann H., and Mason J.M., Advances in genetics incorporating molecular medicine E (1992) Vol.30, , pp.185-249

Bischoff C., Graakjear J., Petersem H.C., Hjelmberg J v.B, Vaupel J.M., Bohr V., Koelvraa S., Christensen K., The heritability of telomere length among the elderly and oldest-old, *Twin Research and Human Genetics* (2005) Vol. 8 No. 5, pp.433–439

Cawthon R.M., Smith K.R., O'Brien E., Sivatchenko A., Kerber R.A., Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003, Vol.361, pp.393–395

Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., and Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity *EMBO Journal* (1992) Vol.11, Iss. 5, pp. 1921- 1929

Falconer, DS, MacKay TFC. *Introduction to Quantitative Genetics*, (1996), 4th Ed. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.

Hayflick L, Moorhead PS. "The serial cultivation of human diploid cell strains". *Exp Cell Res* (1961) Vol.25 pp. 585–621

Hayflick L., Current theories of biological aging, *Fed Proc*, (1975) Vol. 34, pp. 9-13

Henle E.S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., Linn S., Sequencespecific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem*. (1999), Vol.274 pp. 962-971

Huda N., Tanaka H., Herbert B.S. Reed T., Gilley D., Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell*, 2007 Vol.6, pp.709–713

Hunt, D.M. (2010). REAL TIME PCR In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. Uni of S. Carolina School of Medicine. Available from: URL: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

Jeanclous E., Schork N.J., Kyvik K.O., Kimura M, Skurnick J.H., Aviv A., Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* (2000) 36, pp.195-200

Jennings B.J., Ozanne S.E., Hales C.N., Nutrition, oxidative damage, telomere shortening and cellular senescence: individual or connected agents of aging. *Mol Genet Metab*, (2000), Vol.71, pp.32-42

Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P., Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, (1997), Vol. 88 pp. 657-666

Monaghan P., Haussmann M.F., Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol*, (2006), Vol.32, pp.47-53

Mondello C., Petropoulou C., Monti D., Gonos E.S., Franceschi C., Nuzzo F., Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res.*, 1999, Apr Vol.248, pp.234-42

Nature Protocols Vol.5, 2010, pp.1596–1607 DOI:10.1038/nprot.2010.124

Neale, M.C., Cardon L.R., Methodology for genetic studies of twins and families. Dordrecht and Boston, Kluwer Academic Publishers, (1992)

Njajou O.T., Cawthon R.M., Damcott C.M., Wu S.H., Ott S., Garant M.J., Blackburn E.H., Mitchell B.D., Shuldiner A.R., and Hsueh W.C., Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan.(2007) PNAS MED. July 17, Vol. 104 no. 29 pp.12135–12139

O'Callaghan N.J., Varinderpal S., Dhillon S., Thomas P., Fenech M., A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques*, (2008) Vol. 44, No. 6, May, pp. 807–809

Oikawa S., Kawanishi S., Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* (1999), Vol. 453 pp. 365-368

Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensens K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M., Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets Point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol.190, nr. 2 pp. 157-167

Salomons H.M, Mulder E, Zande L van de, Hausmann M.F., Linskens M.H.K., Verhulst S., Telomere shortening and survival in free-living corvids *P Roy Soc Lond B Bio* (2009), Vol. 276, pp. 3157-3165

Slagboom P.E., Droog S, Boomsma D., Genetic Determination of Telomere Size in Humans: A Twin Study of Three Age Groups. *Am. J. Hum. Genet.* (1994) Vol.55 pp. 876-882,

Olovnikov A.M., "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon". *J. Theor. Biol.*, (1973), Vol.41, iss.:1 pp. 181–90

Pinto A.R., Li H., Nicholls C., Liu J.P., Telomere protein complexes and interactions with telomerase in telomere maintenance. *Front Biosci*, (2011) Vol. 16 pp. 187-207

Unryn B.M., Cook L.S., Riabowol K.T., Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell*, 2005, Vol 4, pp. 97-101

Visscher P.M., Hill W.G., Wray N.R. Heritability in the genomics era concepts and misconceptions *nature reviews genetics*.(2008) April, Vol. 9, pp.255-266

Vaso-Nicotera M., Brouillette S., Mangino M., Thompson J.R., Braund P., Clemitson J.R., Mason A., Bodycote C.L., Raleigh S.M., Louis E, and Samani N.J., Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am. J. Hum. Genet.* (2005) Vol.76 pp.147–151

von Zglinicki T., Serra V., Lorenz M., Saretzki G., Lenzen-Grobimlighaus R., Gebner R., Risch A., Steinhagen-Thiessen E., Short Telomeres in Patients with Vascular Dementia: An Indicator of Low Antioxidative Capacity and a Possible Risk Factor?, *Laboratory Investigation*, 2000, Vol. 80, No. 11, pp. 1739-1747

von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N., Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblast. *Free Radical Biology & Medicine*, (2000) Vol. 28, No. 1, pp. 64–74,

von Zglinicki T., Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*, (2000), Vol. 27, pp.339-344