

Accorciamento accelerato dei telomeri in risposta allo stress

Elissa S. Epel, Elizabeth H. Blackburn, Jue Lin, Firdaus S. Dhabhar, Nancy E. Adler, Jason D. Morrow e Richard M. Cawthon

Dipartimento di Psichiatria, Università della California, 3333 California Street, Suite 465, San Francisco, CA 94143; Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Università della California, San Francisco, CA 94143; Dipartimento di Biologia orale, College of Dentistry, e Dipartimento di Virologia Molecolare, Immunologia e Genetica Medica, College of Medicine, Università dell'Ohio, Columbus, OH 43210; Dipartimento di Medicina e Farmacologia, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232, e del Dipartimento di Genetica Umana, Università dello Utah, 15 del Nord 2030 E Street, Room 2100, Salt Lake City, UT 84112

Contributo di Elizabeth H. Blackburn (Premio Nobel 2009 per la Medicina per gli studi sulla Telomerasi), 28 set 2004

Numerosi studi dimostrano i legami tra stress cronico e gli indici di cattiva salute, tra cui fattori di rischio per malattie cardiovascolari e funzioni immunitarie povere. Tuttavia, l'esatto meccanismo di come lo stress si trasforma "sotto la pelle" rimane poco chiaro. Abbiamo studiato l'ipotesi che lo stress colpisce la salute modulando il tasso di invecchiamento cellulare. Qui forniamo la prova che lo stress psicologico - sia lo stress percepito che lo stress cronico - è significativamente associato con un alto stress ossidativo, inferiore alla telomerasi attiva, e più corto della lunghezza dei telomeri, che determinano le cellule di senescenza e longevità, nelle cellule mononucleari del sangue periferico delle donne sane in premenopausa. Le donne con più alti livelli di stress percepito hanno telomeri più brevi in media all'equivalente di almeno un decennio di invecchiamento addizionale rispetto alle donne con poco stress. Questi risultati hanno implicazioni per la comprensione di come, a livello cellulare, lo stress può favorire la prima insorgenza di malattie legate all'età.

stress psicologico | lunghezza dei telomeri | telomerasi | stress ossidativo

Le persone che sono stressate per lunghi periodi sembrano stanche, e si pensa comunemente che lo stress psicologico porta all'invecchiamento precoce e all'esordio più precoce di malattie dell'invecchiamento. Numerosi studi dimostrano i legami tra stress cronico e gli indici di cattiva salute, tra cui i fattori di rischio per malattie cardiovascolari e la funzione immunitaria povera (1, 2). Tuttavia, l'esatto meccanismo di come lo stress esercita questi effetti non sono ben noti, anche se lo stress accelera l'invecchiamento a livello cellulare e non è noto come si traduce l'invecchiamento cellulare all'invecchiamento degli organismi. Sono state effettuate recenti ricerche sul ruolo cruciale dei telomeri e della telomerasi nell'invecchiamento cellulare e potenzialmente nella malattia. I telomeri sono complessi DNA-proteine che terminano con un cappuccio cromosomico e promuovono la stabilità cromosomica. Quando le cellule si dividono, i telomeri non si replicano totalmente a causa delle limitazioni di DNA polimerasi nel completamento della replicazione delle estremità delle molecole lineari, con conseguente accorciamento dei telomeri ad ogni replica (3). In vitro, quando i telomeri si accorciano a sufficienza, la cellula viene arrestata in senescenza. Nelle persone, i telomeri si accorciano con l'età in tutte le cellule somatiche replicate che sono state esaminate, inclusi i fibroblasti e i leucociti (4). Quindi, la lunghezza dei telomeri può servire come un biomarker di una cellula biologica (Vs cronologica) di "età" o potenziale per l'ulteriore divisione cellulare.

La telomerasi, un enzima cellulare, aggiunge il telomerico necessario del DNA (ripete T2AG3) sulla terza estremità dei telomeri (5). La telomerasi ha anche una diretta funzione dei telomeri (6). Nelle cellule T umane, aumenta l'attività della telomerasi con un'acuta esposizione agli antigeni, ma diminuisce con la ripetizione della stimolazione dell'antigene a seconda di come le cellule approssimano alla senescenza (7). Le persone con discheratosi congenita, una malattia genetica rara che diminuisce la capacità di sintetizzare la telomerasi sufficiente, possiedono i

telomeri accorciati e muoiono prematuramente per insufficienza progressiva del midollo osseo e a causa della vulnerabilità alle infezioni (8).

L'ambiente cellulare gioca un ruolo importante nella regolazione della lunghezza dei telomeri e dell'attività della telomerasi. In particolare, in vitro, lo stress ossidativo può accorciare i telomeri e gli antiossidanti possono rallentare l'accorciamento (9, 10). Lo stress percepito è stato collegato a una misura del danno del DNA ossidativo nei leucociti nelle donne (11, 12). Alla luce di questi collegamenti osservati, abbiamo ipotizzato che lo stress psicologico cronico può portare a un accorciamento dei telomeri e abbassare la funzione della telomerasi nelle cellule periferiche mononucleari del sangue (PBMC) e dello stress ossidativo.

Metodi

Per studiare sia gli oggettivi (eventi-ambiente-base) che i soggettivi (percezione-base) stress, abbiamo esaminato 58 donne sane in premenopausa che erano madri biologiche sia di un bambino sano (n = 19, "le madri di controllo") o di un bambino malato cronico (n = 39, "le madri assistenziali").

Questi ultimi si è previsto che abbiano, in media, una maggiore esposizione a stress ambientali. Le donne in entrambi i gruppi hanno completato un questionario di valutazione standardizzato in 10-item segnando il livello dello stress percepito nell'ultimo mese (13). **Questo progetto ci ha permesso di esaminare l'importanza dello stress percepito e le misure di stress oggettivo (stato di accudimento e la cronicità di stress assistenziale in base al numero di anni dalla diagnosi di un bambino)** (vedi Testo di Supporto, che viene pubblicato come informazione di supporto sul sito web PNAS). Tutte le analisi sono state condotte per età perché abbiamo voluto mettere alla prova l'accorciamento dei telomeri causato da stress indipendente dall'età cronologica delle donne (l'età era legata alla lunghezza dei telomeri, r: -0.23, P < 0.04).

Ogni soggetto aveva 20-50 anni [media (M) = 38 ± 6.5 anni] e aveva almeno un figlio biologico che viveva con lei. I soggetti erano privi di malattie in corso o croniche (vedere Testo di Supporto). L'uso di contraccettivi orali è risultato simile nei gruppi assistenziali e nei gruppi di controllo. Il livello di obesità è stato quantificato secondo l'indice di massa corporea (BMI): peso (in kg)/[altezza (in metri) X altezza (in metri)]. Il sangue è stato disegnato in uno stato di digiuno di mattina durante i primi 7 giorni della fase follicolare del ciclo mestruale. La lunghezza media dei telomeri e l'attività della telomerasi è stata misurata quantitativamente in PBMC che sono stati congelati e conservati a -80 ° C. I valori della lunghezza dei telomeri sono stati misurati dal DNA dal PRC quantitativo che determina il rapporto relativo dei telomeri che ripetono un numero di copie in gene copia-singola del numero di copie (rapporto T/S) in campioni sperimentali rispetto ad un campione di DNA di riferimento (14). L'attività della telomerasi è stata misurata mediante il protocollo di ripetizione di di amplificazione della telomerasi (15) con un kit commerciale (Trapeze, Chemicon) e tutti i valori sono stati utilizzati nella gamma lineare quantitativa. La Vitamina E (alfa-tocoferolo) è stata misurata con HPLC dal siero isolato di un campione di sangue

protetto da un foglio (Laboratori ARUP, Salt Lake City). F²-livello di isoprostani, una misura affidabile di stress ossidativo, è stata quantificata da un campione di 12-ore di urina notturna da un sottocampione di 44 delle donne (l'urina non è stata raccolta nei primi 14 soggetti) utilizzando un estremamente curato e preciso gas cromatografico/ spettrometrico di massa (16) e la regolazione dei livelli di creatinina. Un indice di stress ossidativo è stato calcolato con il rapporto tra (isoprostani per milligrammo di creatinina)/vitamina E. Questo indice rappresenta l'effetto netto dello stress ossidativo, tenendo conto di un marker di stress ossidativo e delle difese antiossidanti. Tutte le analisi statistiche che hanno testato un'ipotesi a priori sono state effettuate con test P munito di coda, data la natura direzionale delle previsioni (vedi Testo di Supporto per i dettagli sui metodi e sulle misure).

Tabella 1. Le correlazioni tra lo stress e i marcatori di senescenza cellulare in tutto il campione (adattate per età e potenziali mediatori/salute comportamentale)

| | Stress percepito, n | Anni di assistenza, n |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| Lunghezza dei telomeri | 0.31* (-0.27+), 54 | -0.40* (0.43*), 36 |
| Attività di telomerasi | 0.24+ (-0.24+), 59 | -0.35 (0.32 +), 37 |
| Indice di stress ossidativo | 0.27+ (0.22), 44 | 0.33 (0.38 +), 30 |

I valori sono le correlazioni adattate solo per l'età, il BMI, il fumo, e la vitamina utilizzata tra parentesi. Quando le persone sono stressate, alcuni tendono a mangiare e fumare di più, e non possono impegnarsi in comportamenti auto-cura, come ad esempio l'assunzione di integratori multi-vitaminici antiossidanti. Pertanto, potenziali mediatori (il BMI, il fumo e l'uso di vitamine) sono stati controllati per lungo con l'età. Anche quando questi fattori erano controllati, lo stress era ancora significativamente associato con telomeri più corti e l'attività della telomerasi inferiore, anche se il rapporto con l'indice di stress ossidativo non era più significativo, e quindi in parte mediati da comportamenti di salute. Lo stress percepito non era direttamente collegato agli isoprostani ($r = 0.18$, il valore P non è significativo) o vitamina E ($r = 0.09$, il valore P non è significativo), ma era legato all'indice di stress ossidativo (il rapporto tra isoprostani diviso per livelli di vitamina E). †, $P < 0.01$; ‡, $P < 0.05$ (munito di coda). I valori n variano a causa dei dati mancanti, perché gli anni di accudimento sono stati misurati solo negli assistenziali, o perché lo stress ossidativo è stato misurato su un sottoinsieme del campione ($n = 44$).

Risultati

Come previsto, il livello medio di stress percepito era significativamente maggiore negli assistenziali rispetto ai controlli. **Come gruppo, gli assistenziali non differivano dai controlli nella lunghezza dei telomeri, nell'attività della telomerasi, o nell'indice dello stress ossidativo, ma nella durata del loro stress cronico (numero di anni trascorsi come assistenziale) che variava notevolmente (da 1 a 12 anni).** Così, abbiamo pensato che la durata poteva avere una più forte associazione con la lunghezza dei telomeri dei semplici assistenziali rispetto allo stato di controllo. **Infatti, all'interno del gruppo assistenziale, maggiori erano gli anni di accudimento, minore era la lunghezza dei telomeri della madre, più bassa era l'attività della telomerasi, e maggiore era lo stress ossidativo,** anche dopo l'adattamento per età della madre (Tabella 1 e fig. 1A).

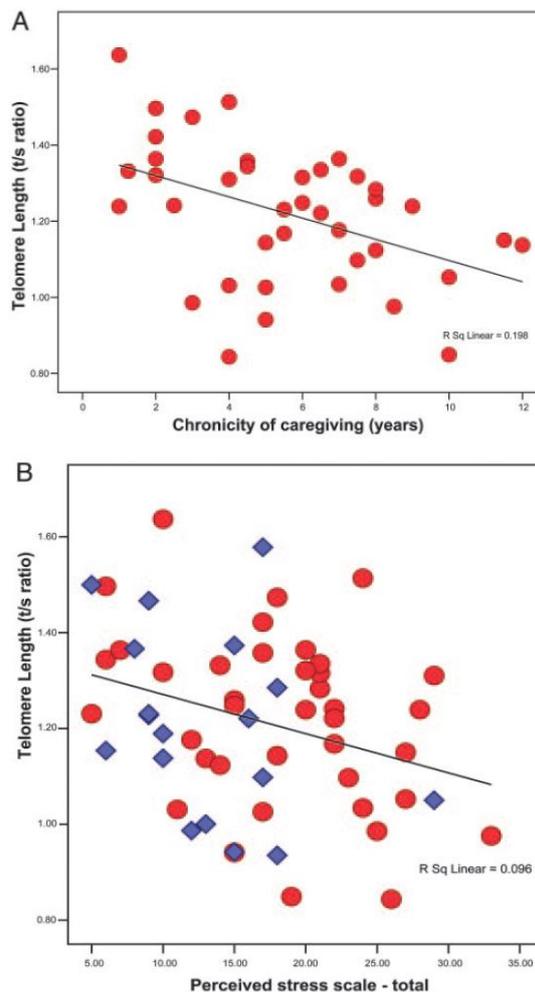


Fig. 1. Grafici a dispersione di cronicità di stress per la lunghezza dei telomeri negli assistenziali e punteggi di stress percepito dalla lunghezza dei telomeri. (A) La correlazione dell'ordine zero tra cronicità di accudimento e la media della lunghezza dei telomeri, r , è -0.445 ($P < 0.01$) e, aggiustando per l'età della madre, resta significativa ($r = -0.40$, $P < 0.01$). Per verificare se l'età del bambino conti per questa relazione indipendente di accudimento, le correlazioni tra l'età del bambino e la lunghezza media dei telomeri sono stati calcolati in ciascun gruppo. L'età del bambino è legata ai telomeri più corti nel gruppo degli assistenziali ($r = -0.45$, $P < 0.01$) ma non il gruppo di controllo ($r = +0.22$, valore P non è significativo). Questi risultati dimostrano che la relazione tra la cronicità di accudimento e la media della lunghezza dei telomeri non è semplicemente a causa dell'età della madre o del bambino. (B) Correlazione dell'ordine zero tra il campione è $r = -0.31$ ($P < 0.01$, $n = 57$). Quando la correlazione è aggiustata per l'età, l'indice di massa corporea, il fumo, e l'utilizzo della vitamina, la correlazione rimane significativa ($r = -0.27$, $P < 0.05$). Sia nel controllo (diamante blu) che nei gruppi ad alto-stress (cerchio rosso), più alto è il livello di stress, minore è la lunghezza dei telomeri (controlli, $r = -0.34$; assistenziali, $r = -0.36$; adattato per età). Quando il controllo di un soggetto di stress particolarmente elevato è eliminato, vi è ancora un'associazione tra i controlli di stress più bassi, dimostrando che quelle con il minor stress sono più lunghe della media della lunghezza dei telomeri ($r = -0.27$).

Abbiamo anche trovato correlazioni significative tra lo stress percepito e tutti e tre i marcatori di invecchiamento cellulare attraverso l'intero campione degli assistenziali e dei non assistenziali (Tabella 1). In particolare, la lunghezza dei telomeri era legata allo stress percepito sia dagli operatori sanitari che dai controlli (Fig. 1B). **Quindi, il rapporto tra lo stress percepito e i**

telomeri più corti non era semplicemente a causa del grave stress sperimentato da molti degli assistenziali o da alcune vulnerabilità biologiche a cui è predisposto il loro bambino di avere una condizione cronica ma è dovuto piuttosto al continuum dei livelli di stress normativo, soprattutto notevole

agli estremi (stress percepito a basso e alto stress). Una dimostrazione ulteriore del rapporto tra lo stress e la lunghezza dei telomeri è vista sul confronto tra i due gruppi estremi, quelli nel più alto ($n = 14$) e quelli nel più basso ($n = 14$) quartili dei punteggi dello stress percepito. Questi gruppi erano simili per l'età, l'uso di tabacco, e l'uso di vitamine, ma il gruppo di alto stress ha avuto un significativo BMI più alto (28.6 ± 6.6 contro 24.0 ± 3.3 , $P < 0.05$). Le analisi di covarianza sono state effettuate, controllando l'età e il BMI. Indipendentemente dalla loro età cronologica e dall'indice di massa corporea, il gruppo di alto-stress aveva telomeri significativamente più brevi (media T/S rapporto = 1.13 ± 0.17), che converte a 3.110-bp telomeri rispetto al gruppo di basso stress (prima media T/S rapporto ± 1.33 0.15), che converte a 3.660-bp telomeri (Fig. 2A).

Siccome la lunghezza dei telomeri durante l'invecchiamento normale diminuisce, si possono stimare gli anni di invecchiamento previsti per portare i telomeri relativamente lunghi del fondo-stress-quartile individuale fino alla lunghezza relativamente breve del top-stress-quartile individuale. Studi trasversali dell'età in funzione della lunghezza dei telomeri nella popolazione generale mostrano che l'accorciamento dei telomeri in età adulta appare minimale nei linfociti o PBMCs (4, 17-19) e diventa più veloce (~60 anni/bp) in età avanzata (50-70 anni) (17, 19). Non ci sono studi che stimano la media dell'accorciamento dei telomeri previsti nella fascia dell'età esatta studiata qui (20-50 anni), che ricade in gran parte entro il periodo di età adulta della perdita minima. Pertanto, nella traduzione dell'accorciamento dei telomeri ad anni di invecchiamento, abbiamo basato le nostre stime sugli studi della media dell'accorciamento dei telomeri attraverso l'età adulta (età 20-95 anni), che trovano una perdita di 31-63 anni/bp (17, 20, 21). **Così, il 550-bp dell'accorciamento nel gruppo di alto stress indica che i loro linfociti erano invecchiati l'equivalente di 9-17 anni addizionali, rispetto al gruppo di basso-stress.**

Sorprendentemente, il gruppo di alto-stress ha avuto anche l'attività della telomerasi significativamente più bassa (Fig. 2B) e maggiore stress ossidativo rispetto al gruppo di basso-stress. Significa che l'attività della telomerasi, adattata al BMI e all'età, è stata del 48% inferiore nel gruppo di alto-stress ($M = 0.053 \pm 0.016$ contro 0.092 ± 0.016 unità della telomerasi per 10.000 cellule; $F(1, 27) = 3.1$; $P < 0.045$). L'indice della media dello stress ossidativo è stato $F(3, 22) = 4.5$, $P < 0.025$ ($M = 0.052 \pm 0.010$ contro 0.085 ± 0.010 unità arbitrarie di isoprostani/vitamina E). Quando i risultati sono stati analizzati nell'alta rispetto alla bassa lunghezza dei telomeri, le conclusioni erano simili nel sottolineare che il gruppo di breve lunghezza dei telomeri aveva percepito maggiore stress ossidativo, e l'attività della telomerasi era inferiore (vedere Supporto del testo).

Discussione

I meccanismi esatti che collegano la mente alla cellula sono sconosciuti. Sebbene sia ben accettato che la senescenza cellulare possa includere i processi di stress-indotto, lo stress psicologico non è ancora stato considerato come parte del percorso di stress. I risultati attuali suggeriscono che lo stress indotto da senescenza precoce nelle persone potrebbe essere influenzato dallo stress conico o percepito della vita.

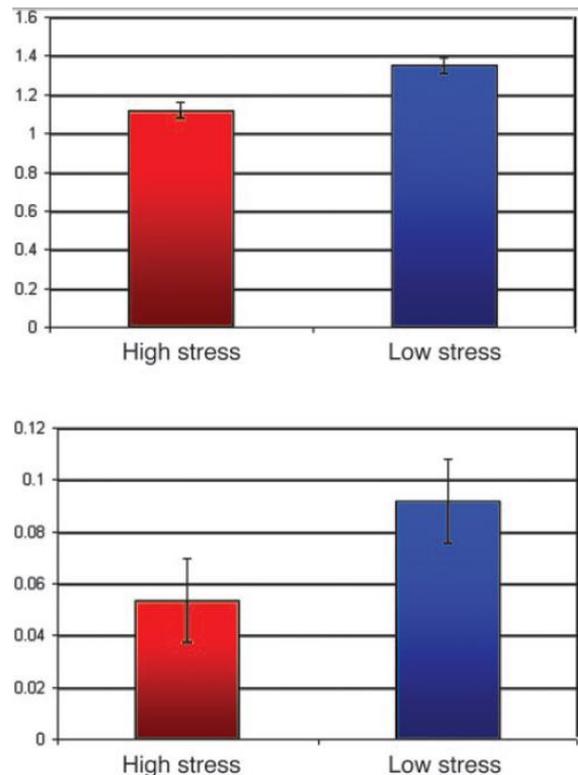


Fig. 2. La lunghezza dei telomeri e i livelli di attività della telomerasi in gruppi degli estremi alto e basso stress. (A) La media della lunghezza dei telomeri e SE sono mostrati. Il gruppo di alto-stress aveva i telomeri più corti, anche dopo l'adattamento per età e l'indice di massa corporea [$F(1, 27) = 12.8$, $P < 0.001$]. (B) La media dell'attività della telomerasi e SE sono mostrati. Il gruppo di alto stress ha avuto l'attività della telomerasi inferiore anche dopo l'adattamento per età e indice di massa corporea [$F(1, 27) = 3.1$, $P < 0.05$]. Poiché i valori per l'attività della telomerasi non sono stati distribuiti normalmente, i valori sono stati convertiti per seguire una distribuzione normale utilizzando una trasformazione del logaritmo naturale. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate sulla variabile trasformata. I primi (non adattati) livelli di telomerasi sono presentati in tutto, perché questi valori sono più significativi dei valori trasformati.

Lo stress psicologico potrebbe influenzare l'invecchiamento cellulare attraverso almeno tre percorsi non mutuamente esclusivi: la funzione delle cellule immunitarie o di distribuzione, lo stress ossidativo o l'attività della telomerasi. Abbiamo preso in considerazione se lo stress potrebbe avere diminuito le cellule T che aumentano le cellule T della memoria [che hanno la lunghezza dei telomeri più corti (22)], ma i dati non supportano questa teoria (Tabella 2, che viene pubblicata come informazione di supporto sul sito web PNAS). In secondo luogo, lo stress potrebbe portare a stress ossidativo per mezzo di attivazione cronica del sistema nervoso autonomo e in risposta allo stress neuroendocrino. Anche se questa ipotesi non è mai stata testata in vivo, il rapporto tra ormoni dello stress e lo stress ossidativo è stato chiaramente dimostrato a livello cellulare. Glucocorticoidi, gli ormoni surrenali primari secreti durante lo stress, aumentano i danni dello stress ossidativo verso i neuroni, in parte dovuti dal glutammato, dal calcio, dagli enzimi e dall'aumento di antiossidanti decrescenti (23, 24). **E' anche da notare che, nelle donne, il disagio auto-riferito è stato correlato ad un maggiore danno ossidativo del DNA (8-OH-dG) (12).** Lo stress ossidativo riduce i telomeri nelle cellule coltivate in vitro (10). I nostri risultati che lo stress percepito e cronico correlati con un

maggiore stress ossidativo e la lunghezza dei telomeri più brevi dimostrano questa relazione trasversalmente per la prima volta in vivo. Infine, se l'attività osservata della telomerasi rappresenta abbassati i livelli cronici, si potrebbe anche aver contribuito ai telomeri accorciati nelle PBMCs. Pur trattandosi di un'assistenza di per sé, non era correlata alla lunghezza dei telomeri, la cronicità di stress assistenziale era legata alla lunghezza dei telomeri. Si tratta di una possibilità formale, che l'associazione tra lo stress e la lunghezza dei telomeri qui riportata è in parte dovuta alle persone con i telomeri più lunghi che sono psicologicamente più resistenti ai fattori di stress oggettivo rispetto alle persone con telomeri più corti. La costruzione che hanno telomeri più lunghi ha comportato un prolungamento della loro durata della vita, anche se tutte le loro cellule somatiche sono postmitotiche e i loro telomeri non si accorciano durante l'invecchiamento (25).

Inoltre, il percorso biochimico coinvolto in questo effetto della lunghezza dei telomeri sulla durata della vita è la stessa via già dimostrata di mediare una maggiore resistenza fisiologica dello stress in seguito a varie varianti genetiche che aumentano la durata della vita. Non è noto se la resistenza allo stress fisiologico è legata alla resistenza dello stress psicologico. Lo stress percepito può essere sia una causale sia una correlazione relativa alla lunghezza dei telomeri. **Tuttavia, la relazione tra cronicità di stress assistenziale (una misura oggettivamente basica) e la lunghezza dei telomeri implica che lo stress ha preceduto l'accorciamento dei telomeri, perché la lunghezza dei telomeri non può avere influenzato il numero di anni di un assistenziale.** Chiaramente, studi longitudinali in cui viene analizzata la lunghezza dei telomeri più volte, sono necessari per verificare direttamente se il tasso di accorciamento dei telomeri in individui con alti livelli di stress riportato è effettivamente più veloce nei soggetti con minore stress. Inoltre, studi clinici di interventi efficaci nel ridurre lo stress percepito durante la vita adulta ha potuto testare se rallenta il tasso di accorciamento dei telomeri. Queste associazioni tra stress e invecchiamento cellulare hanno implicazioni clinicamente significative per la salute umana. Una carenza del 50% nel dosaggio della telomerasi gene RNA causata dalla malattia genetica rara discheratosi congenita è sufficiente a causare la morte prematura negli adulti con insufficienza del midollo osseo e vulnerabilità alle infezioni (8).

Negli anziani, l'accorciamento dei telomeri è fortemente associato con tassi di mortalità più elevati (26). Infine, i pazienti con primo infarto miocardico avevano lunghezza dei telomeri dei leucociti equivalenti a quelle tipiche di una persona di 11 anni, simili alla grandezza dell'invecchiamento accelerato delle cellule osservate nel nostro gruppo di alto stress (27).

In sintesi, in donne sane, lo stress psicologico è associato con indicatori di invecchiamento cellulare e dell'organismo: lo stress ossidativo, la lunghezza dei telomeri e l'attività della telomerasi nelle PBMCs. Restano molte domande, ad esempio se i telomeri più corti nei leucociti portano alla senescenza prima immunitaria e si riferiscono a telomeri più corti in altre cellule proliferative, come endotelio cardiovascolare. Tuttavia, anche se il percorso esatto di eventi dalla percezione dello stress nel cervello per la longevità delle cellule somatiche è chiaro, i risultati riportati qui per ora coinvolgono i telomeri più brevi nelle conseguenze negative per la salute di un prolungato stress psicologico.

per la competenza statistica; Drs. Melvin Heyman, Bryna Siegel, e Paolo Hartz per reclutare i partecipanti che aiutano in clinica; Sheryl Jimenez, Denise Kruszewski, e Drs. Judith Moskowitz, Susan Folkman e Judith Stewart per l'aiuto cruciale, e le madri che hanno occupato volontariamente il loro tempo. ESE è stato sostenuto dalla John D. e Catherine T. MacArthur Foundation Network su status socio-economico e salute, il Fondo Famiglia Hellman, e la University of California, San Francisco, Centro di Ricerca Clinica Pediatrica (sotto l'egida dell'Istituto Nazionale di Salute Mentale di Grant M01-RR01271), National Institute of Mental Health Award K08 MH64110-01A1, e l'Alleanza Nazionale per la Ricerca sulla Schizofrenia e Depressione Investigator Award Young. EHB è stata sostenuta dalla Steven e Michele Kirsch Foundation e la National Institutes of Health di Grant GM26259. JDM è stato sostenuto dalla Scientist Award Burroughs Wellcome Fondo in Ricerca Clinica e Trasazionale Nazionale Istituti di sovvenzioni Salute GM15431, CA77839, DK48851 e RR00095. FSD è stato sostenuto dalla Dana Foundation e la National Institutes of Health di Grant.

1. McEwen, B. (1998) N. Engl. J. Med. 338, 171-179.
2. Segerstrom, S. & Miller, G. (2004) Psychol. Bull. 130.
3. Chan, S. R. & Blackburn, E. H. (2004) Philos. Trans. R. Soc. London B 359, 109-121.
4. Frenck, R., Blackburn, E. & Shannon, K. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5607-5610.
5. Blackburn, E. H. (1997) Biochemistry (Moscow, Russ. Fed.) 62, 1196-1201.
6. Chan, S. W. & Blackburn, E. H. (2003) Mol. Cell 11, 1379-1387.
7. Weng, N. P., Palmer, L. D., Levine, B. L., Lane, H. C., June, C. H. & Hodes, R. J. (1997) Immunol. Rev. 160, 43-54.
8. Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P. J. & Dokal, I. (2001) Nature 413, 432-435.
9. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. & Lotze, C. (1995) Exp. Cell Res. 220, 186-193.
10. von Zglinicki, T. (2002) Trends Biochem. Sci. 27, 339-344.
11. Irie, M., Asami, S., Nagata, S., Miyata, M. & Kasai, H. (2001) Int. Arch. Occup. Environ. Health 74, 153-157.
12. Irie, M., Asami, S., Ikeda, M. & Kasai, H. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 1014-1018.
13. Cohen, S. & Williamson, G. (1988) in The Social Psychology of Health: Claremont Symposium on Applied Social Psychology, ed. Oskamp, S. S. S. (Sage, Newbury Park, CA).
14. Cawthon, R. M. (2002) Nucleic Acids Res. 30, e47.
15. Kim, N. W. & Wu, F. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 2595-2597.
16. Morrow, J. D. & Roberts, L. J., II (2002) Methods Mol. Biol. 186, 57-66.
17. Iwama, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H., Hayashi, S., Yahata, N., Ando, K., Toyama, K., Hoshika, A., Takasaki, M., Mori, M. & Shay, J. W. (1998) Hum. Genet. 102, 397-402.
18. Jeanclos, E., Schork, N. J., Kyvik, K. O., Kimura, M., Skumick, J. H. & Aviv, A. (2000) Hypertension 36, 195-200.
19. Rufer, N., Brummendorf, T. H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M. & Lansdorp, P. M. (1999) J. Exp. Med. 190, 157-167.
20. Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K. & Allshire, R. C. (1990) Nature 346, 866-868.
21. Satoh, H., Hiyama, K., Takeda, M., Awaya, Y., Watanabe, K., Ihara, Y., Maeda, H., Ishioka, S. & Yamakido, M. (1996) Jpn. J. Hum. Genet. 41, 413-417.
22. Hodes, R. J., Hathcock, K. S. & Weng, N. P. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2, 699-706.
23. McIntosh, L. J. & Sapolsky, R. M. (1996) Neurotoxicology 17, 873-882.
24. Patel, R., McIntosh, L., McLaughlin, J., Brooke, S., Nimon, V. & Sapolsky, R. (2002) J. Neurochem. 82, 118-125.
25. Joeng, K. S., Song, E. J., Lee, K. J. & Lee, J. (2004) Nat. Genet. 36, 607-611.
26. Cawthon, R., Smith, K., O'Brien, E., Sivatchenko, A. & Kerber, R. (2003) Lancet 361, 393-395.
27. Brouillette, S., Singh, R. K., Thompson, J. R., Goodall, A. H. & Samani, N. J. (2003) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 842-846.

Ringraziamo la Drs. Teresa Seeman, Margaret Kemeny, e Bruce McEwen per il supporto intellettuale, Jean M. Tillie, un tecnico specializzato con citometria a flusso, Michael Acree