

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/26946> holds various files of this Leiden University dissertation

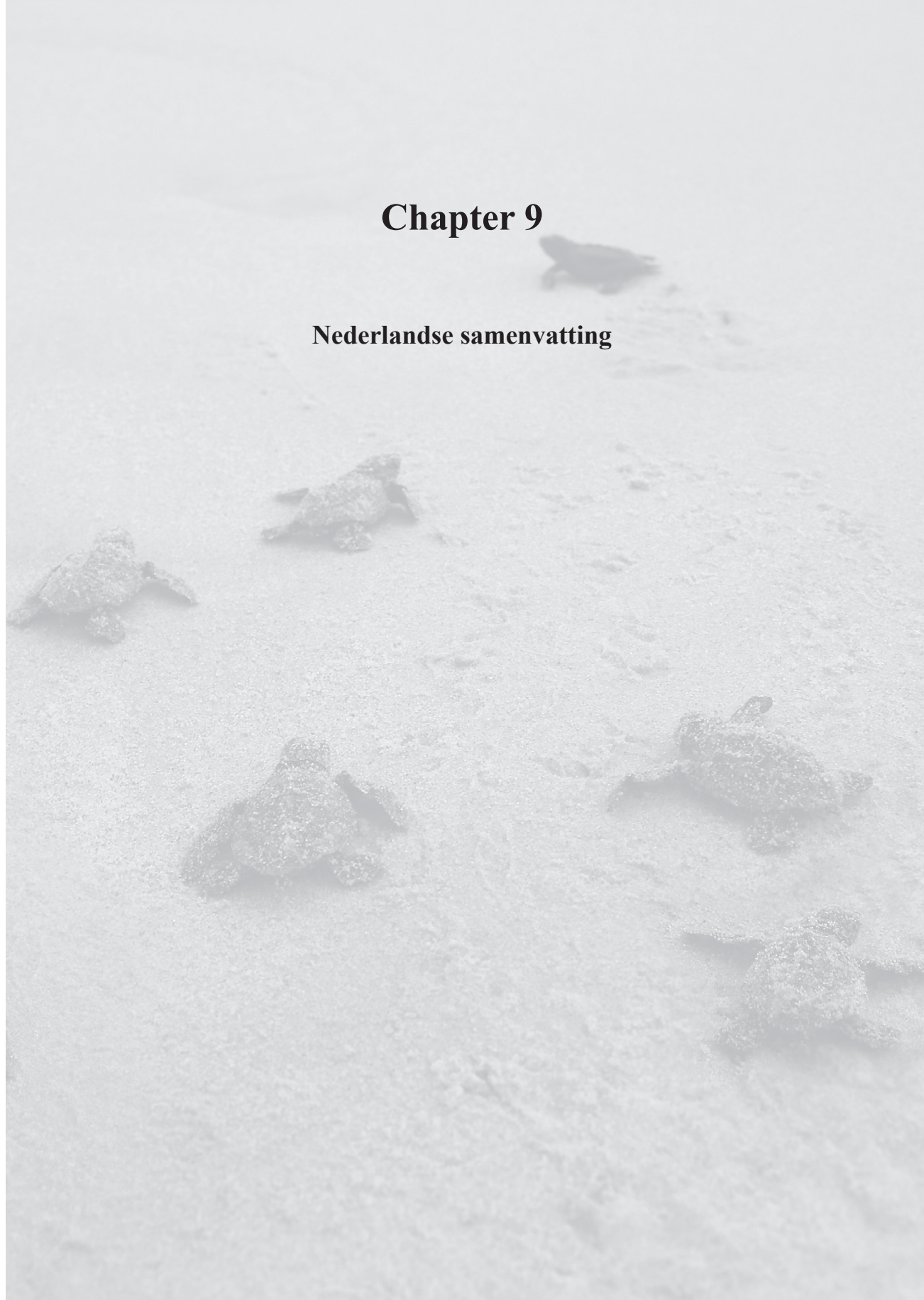
Author: Deelen, Joris

Title: Genetic and biomarker studies of human longevity

Issue Date: 2014-06-25

Chapter 9

Nederlandse samenvatting



Introductie

De afgelopen 200 jaar is de levensverwachting wereldwijd sterk toegenomen, wat voornamelijk komt door verbeterde hygiëne, voeding en gezondheidszorg. De toename in levensduur bestaat echter niet alleen uit gezonde jaren. We spenderen ongeveer 25% van ons leven in slechte gezondheid, voornamelijk veroorzaakt door leeftijd gerelateerde ziekten zoals kanker, hart- en vaatziekten en diabetes mellitus type II. Er zijn families waarin personen generaties achtereen langer leven in vergelijking tot personen uit hetzelfde geboortecohort. Op middelbare leeftijd ontwikkelen personen uit zulke langlevende families minder leeftijd gerelateerde ziekten en hebben ze daarnaast gezondere bloedspiegels voor vet- (cholesterol) en suikerhuishouding (glucose) en afweer (immuun) gerelateerde eigenschappen. Het lijkt er dus op dat personen uit langlevende families op een natuurlijke manier bescherming genieten tegen leeftijd gerelateerde ziekten, waarbij het met name gaat om aandoeningen die verband houden met veranderingen in de stofwisseling die optreden tijdens het ouder worden. Door het bestuderen van langlevende families hopen we mechanismen te kunnen vinden die bescherming bieden tegen leeftijd gerelateerde ziekten en daarmee bijdragen aan gezonde veroudering.

Om die mechanismen te ontrafelen, kunnen verschillende strategieën worden toegepast. Ongeveer 25% van de variatie in levensduur kan verklaard worden door genetische verschillen tussen personen (variatie), wat impliceert dat er een erfelijke basis is voor langlevendheid. Eén van

de strategieën is dus om op zoek te gaan naar genetische varianten die samengaan met het bereiken van een hoge leeftijd, waarbij het erfelijk materiaal van groepen langlevende personen wordt vergeleken met dat van jongere controlegroepen. Omdat het aantal beschikbare studies met langlevende deelnemers echter beperkt is, kan men er ook voor kiezen om in veel grotere bevolkingsgroepen biomarkers voor gezonde veroudering te meten en vervolgens te kijken welke genetische varianten samengaan met deze biomarker. Omdat er nog geen betrouwbare biomarkers bekend zijn die langlevendheid voorspellen, is een deel van het onderzoek gericht op het identificeren van zulke biomarkers. Dat gebeurt door biologische eigenschappen en karakteristieken van fysiologische gezondheid (biologische leeftijd) van individuen te koppelen aan de leeftijd op basis van geboortedatum (kalenderleeftijd).

Verschillende soorten studie designs worden toegepast voor het genetisch en biomarker onderzoek naar gezonde veroudering en langlevendheid. Allereerst worden langlevende personen (≥ 85 jaar) of hun kinderen (die door hun genetische achtergrond een verhoogde kans hebben om langlevend te worden) vergeleken met jonge (< 65 jaar), nog levende, personen uit niet-langlevende families. Dit soort studies wordt ook wel cross-sectionele studies genoemd. Daarnaast worden langlevende personen of personen van middelbare leeftijd (≥ 55 jaar) voor langere tijd gevolgd, idealiter tot hun overlijden, in zogeheten prospectieve studies. In dit proefschrift wordt gebruik gemaakt van diverse cross-sectionele en prospectieve studies.

Overzicht eerder genetisch onderzoek naar gezonde veroudering en langlevendheid

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van cross-sectionele studies waarin is gekeken naar de genetische basis van gezonde veroudering en langlevendheid. De meeste van deze studies hebben onderzoek gedaan naar DNA variaties, waarbij één bouwsteen van het DNA (nucleotide) bij een deel van de bevolking is vervangen door een andere. Dit soort genetische variaties worden ook wel ‘single nucleotide polymorphisms (SNPs)’ genoemd. Personen kunnen (1) de veel voorkomende variant van een SNP dragen op beide chromosomen, (2) de veel voorkomende variant van een SNP dragen op één chromosoom en de zeldzame variant op de andere of (3) de zeldzame variant van een SNP dragen op beide chromosomen. Als de zeldzame variant van de SNP vaker voorkomt in langlevende personen (cases) in vergelijking tot jonge personen (controles), dan zeggen we dat deze SNP samengaat (geassocieerd is) met langlevendheid. Komt de zeldzame variant juist minder vaak voor in cases dan in controles dan is de SNP mogelijk geassocieerd met mortaliteit.

Uit eerdere studies kwam naar voren dat verschillende isovormen van het apolipoproteïne E (ApoE) eiwit associëren met langlevendheid. Dit eiwit speelt onder andere een rol bij cholesterol huishouding, cognitief functioneren en het ontstaan van hart- en vaatziekten. Er bestaan drie isovormen van dit eiwit (ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 en ApoE ϵ 4). De ApoE ϵ 4 isovorm is geassocieerd met een verlaagde kans om oud te worden, terwijl de ApoE ϵ 2 isovorm juist

geassocieerd is met een verhoogde kans om oud te worden. Uit genetische studies bleek vervolgens dat deze isovormen bepaald worden door twee variaties (SNPs) in het *APOE* gen, rs7412 (ApoE ϵ 2) en rs429358 (ApoE ϵ 4).

Naast de studies naar variatie in *APOE* waren de eerste genetische studies naar langlevendheid vooral gericht op de menselijke versies (homologen) van genen die na manipulatie in wormen, fruitvliegen en/of knaagdieren (muizen/ratten) leiden tot een verlengde levensduur. Voor één zo’n ‘kandidaatgen’, namelijk *FOXO3A*, bleek in meerdere onafhankelijke studies dat SNPs in dit gen ook samengaan met humane langlevendheid, vooral bij heel oude mensen. *FOXO3A* codeert voor het eiwit forkhead box O3, dat de transcriptie reguleert van genen die onder andere betrokken zijn bij geprogrammeerde celdood (apoptose).

Genoomwijde associatie studies voor langlevendheid

Naast het bestuderen van ‘kandidaatgenen’ werden er ook genoomwijde associatie studies (GWAS) naar langlevendheid verricht om in het hele genoom genen op te sporen die de menselijke levensverwachting beïnvloeden. In zo’n GWAS wordt voor 300.000 tot 2.500.000 SNPs, verspreid over alle chromosomen, getest of de zeldzame variant vaker, of juist minder vaak, voorkomt bij langlevende cases in vergelijking met jongere controles.

In **hoofdstuk 3** werd dit onderzocht voor ongeveer 520.000 SNPs in negentigjarige cases uit de Leiden

LangLeven Studie en controles (< 60 jaar) uit de Rotterdam Studie. Vervolgens werden de 62 SNPs waarvan de zeldzame variant vaker, of juist minder vaak, voorkwam in de cases ook bestudeerd in een groep langlevende cases (≥ 85 jaar) uit de Rotterdam Studie, Leiden 85-plus studie en het Deense 1905 cohort en controles (< 65 jaar) uit het Nederlands Tweeling Register, Deense Tweeling Register en, wederom, de Rotterdam Studie. In de gecombineerde analyse van al deze studies (4.149 cases ≥ 85 jaar en 7.582 controles < 65 jaar) bleek er één SNP te zijn, rs2075650, waarvan de zeldzame variant minder vaak voorkomt in langlevende cases. Draggers van de zeldzame variant van rs2075650 bleken een 29% lagere kans te hebben om 85 jaar te worden en bleken na de 85 jaar nog steeds sneller te overlijden in vergelijking met niet-dragers. De SNP is gepositioneerd op de lange arm van chromosoom 19 in het gen *TOMM40*, direct naast het *APOE* gen. Na bestudering van deze SNP bleek echter dat het effect op langlevendheid eigenlijk bepaald wordt door de al bekende SNP rs429358 ($\epsilon 4$) in *APOE*, die niet gemeten was in deze GWAS.

Omdat er in **hoofdstuk 3** voor slechts één genetische variant bewijs werd gevonden voor associatie met langlevendheid, rees het vermoeden dat van andere genetische varianten die samengaan met langlevendheid het effect kleiner is. Om zulke genetische varianten te kunnen detecteren, hebben we daarom ook een groter aantal SNPs (~2.500.000) bestudeerd in een veel grotere groep cases (≥ 85 jaar) en controles (< 65 jaar) uit zesentwintig studies verspreid over Europa (**hoofdstuk 4**). Uiteindelijk bleek uit de gecombineerde analyse van al deze

studies (20.789 cases en 77.277 controles) dat er een nieuwe SNP was, rs2149954, die associeerde met langlevendheid. Deze SNP is gepositioneerd op de lange arm van chromosoom 5 onder een zogeheten ‘lincRNA’, een stukje RNA dat andere genen aanstuurt. Draggers van de zeldzame variant van rs2149954 bleken een 10% hogere kans te hebben om 90 jaar te worden en bleken daarnaast minder snel te overlijden in vergelijking met niet-dragers. Uit eerder gepubliceerd onderzoek bleek dat het dragen van deze variant is geassocieerd met een verlaagde bloeddruk op middelbare leeftijd. Dit benadrukt het belang van het vermijden van een hoge bloeddruk op middelbare leeftijd voor het bereiken van een hoge leeftijd, bijvoorbeeld door middel van een gezonde leefstijl of medicatie. Het is nog niet duidelijk welke fysiologische processen de variant verder nog beïnvloedt.

Ondanks dat we twee SNPs gevonden hebben die van invloed lijken te zijn op langlevendheid is dit aantal vrij klein vergeleken met studies van vergelijkbare grootte naar erfelijke oorzaken van leeftijd gerelateerde ziekten als artrose en de ziekte van Alzheimer. Dit zou kunnen komen doordat slechts een klein deel van de levensduur bepaald wordt door de genetische achtergrond van een individu. Omgevingsfactoren hebben in feite een grotere invloed op de levensduur dan erfelijke factoren. De sterk toegenomen levensverwachting veroorzaakt door verbeterde hygiëne, voeding en medische zorg heeft er toe geleid dat er ook veel personen zijn die een hoge leeftijd bereiken zonder dat dit direct wordt veroorzaakt door hun genetische achtergrond. Daarnaast

lijkt het effect van genetische variatie op langlevendheid veroorzaakt te worden door een groot aantal varianten met kleine effecten. Om het effect van genetische variatie op langlevendheid beter te kunnen bestuderen, zouden daarom nog meer langlevende personen onderzocht moeten worden, met name uit langlevende families waarin de invloed van erfelijke factoren groter is dan in de algemene bevolking. Het aantal langlevende personen dat voor een GWAS in aanmerking komt, is echter beperkt. Er zal dus gezocht moeten worden naar andere methoden om nieuwe genetische varianten voor langlevendheid te vinden.

Genetische variatie in genen betrokken bij insuline/IGF-1 signaaltransductie en regulering van telomeerlengte

Zoals uit **hoofdstuk 3** en **4** blijkt, is het effect van genetische varianten die samengaan met langlevendheid waarschijnlijk te klein om te kunnen onderzoeken met behulp van GWAS. Een mogelijkheid om deze kleine effecten toch te kunnen detecteren, is door het gezamenlijk effect van SNPs gegroepeerd per gen of proces te bestuderen. In **hoofdstuk 5** werd deze methode toegepast om te kijken naar het gecombineerde effect van SNPs in ‘kandidaatgenen’ die betrokken zijn bij twee processen waarvan wordt verondersteld dat ze een rol spelen in langlevendheid. Het eerste proces is insuline/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaaltransductie (IIS), dat betrokken is bij groei en stofwisseling. Het tweede proces is de regulering van de lengte van telomeren (TM). Telomeren zijn

de uiteinden van chromosomen die er voor zorgen dat het DNA beschermd wordt. Met iedere celdeling neemt de lengte van het telomeer af en op het moment dat de lengte te kort wordt, stopt de cel met delen en gaat hij uiteindelijk dood. Indien de lengte van een telomeer constant kan worden gehouden, kan een cel in potentie dus vaker delen en langer leven of zich tot een kankercel ontpoppen. Uit de analyse, waarbij we gebruik hebben gemaakt van de dataset zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, bleek inderdaad dat genetische variatie in beide processen van invloed lijkt te zijn op langlevendheid. Dit lijkt vooral veroorzaakt te worden door gecombineerde genetische variatie in de genen *AKT1*, *AKT3*, *FOXO4*, *IGF2*, *INS*, *PIK3CA*, *SGK*, *SGK2*, *YWHAG* (IIS) en *POT1* (TM). Analyse in grotere datasets met gebruik van meer geavanceerde methoden zal moeten uitwijzen of de complexiteit van langlevendheid kan worden ontrafeld door het onderzoeken van het gecombineerde effect van SNPs met kleine effecten.

Biomarkers voor gezonde veroudering

Zoals bediscussieerd in **hoofdstuk 3** en **4** zouden genetische varianten met heel kleine effecten op langlevendheid mogelijk nog gevonden kunnen worden in grotere genetische studies, maar helaas is het aantal beschikbare langlevende personen voor dit soort studies beperkt. Een mogelijkheid om toch grotere genetische studies te kunnen uitvoeren, is door het gebruik van een biomarker voor gezonde veroudering die gemeten kan worden in grote populatie

studies. In **hoofdstuk 2** worden vier criteria beschreven waaraan een dergelijke biomarker voor gezonde veroudering in onze ogen zou moeten voldoen. Ten eerste moet de waarde van de biomarker toe- of afnemen met de kalenderleeftijd. Ten tweede moet de biomarker onderscheid kunnen maken tussen personen op basis van hun biologische leeftijd of genetische aanleg voor langlevendheid. Ten derde moet de biomarker gerelateerd zijn aan eigenschappen die de verandering in gezondheid van een individu weergeven. Ten slotte moet de biomarker van invloed zijn op het risico op ziekten en mortaliteit in prospectieve studies.

Voor het testen van de verschillende criteria voor een biomarker voor gezonde veroudering zou het ideaal zijn om een studie te hebben waarin meerdere generaties familieleden van een groot aantal personen uit de bevolking voor langere tijd gevolgd wordt, idealiter tot aan hun dood. Een voorbeeld van zo'n studie is LifeLines (<https://lifelines.nl/>). Ondanks dat deze studie al een paar jaar geleden begonnen is, zal het echter nog vele jaren duren voordat de data gebruikt kunnen worden voor biomarker onderzoek. Het beste alternatief voor biomarker studies is daarom om cross-sectionele studies (het liefst gebaseerd op families) te combineren met grote populatie-gebaseerde prospectieve studies, zoals het Erasmus Rotterdam Gezondheid Onderzoek. Voor de biomarker studie beschreven in dit proefschrift is gebruik gemaakt van de Leiden LangLeven Studie. Deze studie bestaat uit langlevende personen (> 90 jaar), hun kinderen en de partners van die kinderen die inmiddels gedurende ongeveer 10 jaar gevolgd zijn. Aangezien de Leiden LangLeven Studie

een combinatie is van een cross-sectionele en prospectieve studie kunnen de meeste criteria voor een biomarker voor gezonde veroudering getest worden.

Studie naar telomeerlengte als biomarker voor gezonde veroudering

Een potentiële biomarker voor gezonde veroudering is de lengte van telomeren gemeten in leukocyten (LTL), een bepaald type bloedcellen. In eerdere studies is gevonden dat LTL afneemt met kalenderleeftijd en dat verkorte LTL samengaat met slechtere waarden voor gezondheid gerelateerde eigenschappen en een verhoogde kans op ziekten en overlijden in prospectieve studies. Om te kijken of LTL als biomarker voor gezonde veroudering zou kunnen worden gebruikt, hebben wij getest of LTL ook aan het tweede criterium voor een biomarker voldoet (**hoofdstuk 6**). Met andere woorden, of LTL ook onderscheid kan maken tussen personen op basis van hun biologische leeftijd of genetische aanleg voor langlevendheid. Hiervoor werd LTL van langlevende personen uit de Leiden LangLeven Studie bestudeerd, evenals van hun kinderen en de partners van die kinderen. Zoals verwacht is LTL in personen uit de Leiden LangLeven Studie inderdaad gerelateerd aan de kalenderleeftijd, oudere mensen hebben een verkorte LTL. Tevens is een verkorte LTL geassocieerd met ongunstige bloedspiegels voor immuun gerelateerde eigenschappen en een verhoogde kans op overlijden. Echter, LTL is niet verschillend tussen de kinderen van

de langlevende personen en hun partners. Dit geeft aan dat LTL geen onderscheid kan maken tussen personen op basis van hun genetische aanleg voor langlevendheid. Verder bleek dat SNPs die van invloed lijken te zijn op LTL niet associëren met langlevendheid in de GWAS beschreven in **hoofdstuk 4**. Dus ondanks dat LTL aan drie van de vier criteria voor een biomarker van gezonde veroudering voldoet, lijkt dit onvoldoende te zijn om LTL als voorspeller van langlevendheid te kunnen gebruiken in grote genetische studies bij personen van middelbare leeftijd. Er zal dus gezocht moeten worden naar eigenschappen die aan alle vier de criteria voldoen.

Van genetische variant naar mechanisme

Nadat nieuwe genetische varianten voor langlevendheid zijn gevonden, zoals rs2149954 op chromosoom 5, moet worden bepaald hoe deze varianten gezonde veroudering en langlevendheid beïnvloeden. **Hoofdstuk 7** geeft een overzicht van de stappen die hiervoor nodig zijn. Allereerst zal worden gekeken welke genetische variant in de buurt van de gevonden SNP de causale variant is, oftewel de variant die daadwerkelijk het effect op langlevendheid veroorzaakt. Hiervoor zal de complete DNA volgorde in het gebied worden bepaald en zullen de zogenaamde ‘epigenetische’ signalen worden bekeken. Tevens zal bekeken worden voor welke ‘kandidaatgenen’ de expressie in gekweekte cellen door de variant wordt beïnvloedt. Verder zal in andere epidemiologische studies onderzocht

worden of de causale variant gerelateerd is aan andere eigenschappen of ziekten om te ontdekken welke processen worden beïnvloed door deze variant. Daarnaast zal onderzocht worden hoe veranderingen in de expressie van de ‘kandidaatgenen’ bijdragen aan het ontstaan van ziekten en de kans op overlijden beïnvloeden door gebruik te maken van diermodellen.

Conclusie en toekomst

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat zien dat het lastig is om genetische varianten te ontdekken die invloed hebben op langlevendheid. Desondanks hebben wij een nieuwe SNP ontdekt op chromosoom 5 waarvan de zeldzame variant associeert met een verhoogde kans om 90 jaar te worden en een verlaagde kans om te overlijden en op middelbare leeftijd bijdraagt aan een lage bloeddruk. Om nieuwe genetische varianten te vinden die samengaan met langlevendheid worden in **hoofdstuk 7** enkele mogelijkheden voor toekomstig onderzoek gegeven. Allereerst moeten er betere criteria komen voor het selecteren van personen voor genetische studies naar langlevendheid waardoor personen waarvan duidelijk is dat hun hoge leeftijd voornamelijk veroorzaakt wordt door omgevingsfactoren geëxcludeerd zullen worden. Daarnaast kunnen toekomstige genetische studies gebruik maken van biomarkers voor gezonde veroudering, het liefst samengevoegd tot een patroon gebaseerd op meerdere eigenschappen. Het combineren van verschillende soorten cross-sectionele familie studies, zoals de

Leiden LangLeven Studie, en prospectieve studies kan helpen bij het zoeken naar zulke biomarkers, aangezien we op deze manier alle vier de criteria voor een biomarker kunnen testen. In dit proefschrift hebben wij aan de hand van LTL laten zien hoe de vier criteria voor een potentiële biomarker getest kunnen worden. LTL bleek echter niet verschillend te zijn tussen kinderen van de langlevende

personen en hun partners, waardoor LTL niet als biomarker voor langlevendheid kan worden gebruikt. Tot slot kan toekomstig onderzoek naar gezondere veroudering en langlevendheid gebruik maken van nieuwe technologieën waarbij de nucleotidevolgorde van het hele genoom van een individu wordt bepaald, zodat de relevante genetische variatie kan worden onderzocht.

