

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22948> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Passtoors, Willemijn M.

Title: Transcriptomic studies in human ageing and longevity

Issue Date: 2013-12-19

Chapter 10

Nederlandse samenvatting

Mensen verouderen met een verschillende snelheid. Je kunt het proces aan de buitenkant zien; ouderen krijgen rimpels, worden grijs, bewegen stijver en krijgen te maken met diverse leeftijdsgerelateerde ziekten. Ook aan de binnenkant, in moleculen en cellen van mensen kun je het verouderingsproces aflezen. Zo verschilt ook de activiteit van genen in het erfelijk materiaal tussen ouderen en jonge mensen. Door de verschillen tussen ouderen is de biologische leeftijd niet altijd dezelfde als de kalenderleeftijd. In een groep mensen van 70 jaar zijn grote verschillen aanwezig met betrekking tot de gezondheid, het functioneren en welbevinden, maar ook op het niveau van de cellen en moleculen. De levensverwachting is zeer sterk gestegen in de laatste tweehonderd jaar en veel ouderen van nu maken een jongere indruk dan ouderen in vorige generaties. De stijging in levensverwachting werd veroorzaakt door omgevinggerelateerde oorzaken zoals verbetering van hygiëne, voeding en medische zorg. Men kan zich afvragen of erfelijkheid een rol speelt bij het bepalen van de levensverwachting.

Uit de Leiden LangLeven Studie is gebleken dat kinderen, maar ook de ouders, van negentigjarige broer-zuster paren 30% minder kans hebben om te overlijden in vergelijking met mensen van de algemene bevolking uit hetzelfde geboortjaar. Onder de kinderen (ongeveer 60 jaar oud) van de negentigjarige broers en zussen uit de langlevende families komen hartinfarcten, hoge bloeddruk en suikerziekte minder voor dan bij de partners van deze kinderen. Anders gezegd, de leden van langlevende families lijken trager te verouderen en biologisch jonger te zijn dan hun eigen partners die je kunt zien als controlepersonen: leeftijdsgenoten uit andere families.

Het doel van dit proefschrift was om indicatoren, ook wel biomarkers genoemd, voor biologische veroudering te vinden in het bloed van langlevende families en controles van de Leiden LangLeven Studie aan de hand van genexpressiemetingen waarin de activiteit van genen wordt bepaald. Deze biomarkers zouden ons kunnen wijzen op de processen die te maken hebben met de snelheid van veroudering in de mens. Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van het onderzoek dat bij aanvang van het promotie onderzoek is gedaan naar de relatie tussen genexpressieprofielen en kalenderleeftijd. Echter, in verschillende studies die kalenderleeftijd bestuderen werden steeds weer andere groepen genen gevonden. Dit kan komen door verschillen in onderzoekspopulaties, de grootte van de studie, de onderzochte weefsels en testmethodes. Een aanpak die niet elk gen apart onderzoekt, maar kijkt naar groepen genen die betrokken zijn bij veroudering, laat in meerdere studies wel zien welke processen consistent

lijken te associëren met de kalenderleeftijd (hoofdstuk 2). In dit proefschrift hebben we verschillende methoden gebruikt om de biomarkers voor biologische veroudering te vinden. Deze worden in de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift beschreven.

In hoofdstuk 3 beschrijven we een zogenaamde hypothesis-vrije aanpak waarin we expressieniveaus van bijna 18.000 bekende genen hebben kunnen meten. Hiervoor onderzochten we bloed van deelnemers van de Leiden LangLeven Studie: vijftig negentigjarigen, vijftig van hun kinderen en vijftig partners van de kinderen die als controles fungeren. In deze studieopzet kunnen we verschillende vergelijkingen maken.

Als eerste die tussen negentigjarigen en mensen van middelbare leeftijd. We kozen daarvoor de partners van de kinderen (die zijn geen familie van de negentigjarigen). In deze vergelijking bleken er 1853 genen in hun expressie te verschillen tussen de twee groepen. Deze genen vertegenwoordigen óf een kenmerk van kalenderleeftijd (90 versus ± 60 jaar oud), óf een kenmerk van de langlevende families, die je ook in andere familieleden kunt aantreffen. Wat uniek is in vergelijking met andere studies is dat we ook de kinderen (middelbare leeftijd) van deze negentigjarigen konden meten. In de vergelijking van die kinderen en hun partners bleken 259 van de 1853 genen verschillend tot expressie te komen. Aangezien deze groepen van dezelfde leeftijd zijn, zijn dit waarschijnlijk kenmerken van langlevende families. De expressie van deze genen heeft mogelijk een relatie met de biologische leeftijd die in de kinderen van lang levende families lager is dan die van hun echtgenoten. Deze categorie genen zou een aanwijzing kunnen geven over de processen die mede bepalen hoe snel de biologische veroudering verloopt.

Van de 259 genen hebben we er 22 opnieuw gemeten in een groter deel van de Leiden LangLeven Studie; 79 negentigjarigen, 332 kinderen en 312 partners. Hieruit bleek dat een lagere expressie van de ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (*ASF1A*) en het interleukine 7 receptor (*IL7R*) gen kenmerkend is voor de langlevende families. Dit duidt erop dat de genexpressie van deze genen, betrokken bij modellering van chromosomen en immuunsysteem functie, samen gaat met een jongere biologische leeftijd.

Een juiste werking van de IL7 receptor waar het *IL7R* gen voor codeert is erg belangrijk voor ons immuunsysteem. De ontwikkeling van T cellen die nodig zijn voor een optimale immuun reactie is afhankelijk van de IL7 signalering waarvan de IL7 receptor aan de basis ligt. Om te zien of genen die met het *IL7R* gen te maken hebben ook veranderen met biologische leeftijd, hebben we een *IL7R* netwerk getest dat bestaat uit *IL7R* zelf en zes

andere genen die een directe connectie hebben met *IL7R*. De expressie van deze genen hebben we getest in de grote groep deelnemers van de Leiden LangLeven Studie (hoofdstuk 4). Het netwerk als geheel bleek nu anders tot expressie te komen in leden van langlevende families, in het bijzonder *IL7R* zelf. De langelevende families worden gekarakteriseerd door een relatieve lage genexpressie, onafhankelijk van de samenstelling van celtypen in het bloed en de aanwezigheid van immuun-gerelateerde ziekten. We hebben tevens gekeken naar de relatie tussen de *IL7R* expressie en overleving gedurende 7 jaar. Nu bleek dat een hoger expressieniveau gerelateerd is aan een betere overleving op middelbare en hoge leeftijd. Hieruit blijkt dat de relatie van *IL7R* genexpressie met biologische leeftijd enerzijds en gezondheidsstatus anderzijds op het eerste gezicht tegenstrijdig is. Deze complexe relatie wordt ook bij andere immuun parameters gevonden in ouderen en moet verder onderzocht worden.

Een andere aanpak die we hebben gebruikt om de relatie tussen langlevendheid en genexpressie te onderzoeken is de hypothesis-gebaseerde aanpak. In dieren is het bekend dat mammalian target of rapamycin (mTOR) signalering de levensduur beïnvloedt. Bij mensen is dit proces betrokken bij het optreden van ziekten zoals diabetes en kanker. De basis van mTOR signalering ligt in twee eiwitcomplexen, mTOR-complex 1 en mTOR-complex 2. Deze reageren op onder andere voeding, energieverbruik (sporten) en het glucoseniveau in het bloed. Tot nu toe is vooral bewezen dat verlaagde activiteit van het mTOR-complex 1 de levensduur verlengt (in diersmodellen) en dat verhoogde activiteit van datzelfde complex samen gaat met de ernst van ziekten bij de mens. De rol van mTOR-signalering bij het bepalen van levensduur bij de mens was nog niet eerder onderzocht. Dat hebben we in dit proefschrift in de Leiden LangLeven Studie gedaan (hoofdstuk 5). Expressie van veertig genen uit de mTOR signalering werd gemeten in 87 negentigjarigen, 337 van hun kinderen en 321 partners daarvan. Hiervan lieten zeven genen een duidelijk significant verschil zien tussen de negentigjarigen en de partners van de kinderen. In de vergelijking van kinderen en hun partners vonden we nu dat op middelbare leeftijd een lagere expressie voor *RPTOR* en *PRR5L* kenmerkend was voor de langlevende families. Als genexpressie daadwerkelijk een reflectie is van mTOR signalering dan zou een lagere MTORC1 en MTORC2 expressie bevestigen dat ook in mensen een lage mTOR signalering samengaat met familiale langlevendheid.

In hoofdstuk 6 hadden we als doel de mTOR-bevindingen uit hoofdstuk 5, die gedaan zijn in bloed, te bevestigen op eiwitniveau in cellen uit de huid (fibroblasten) die bij een huidbiopt van een deel van de studiegroep uit

hoofdstuk 5 waren verzameld. In de fibroblasten werd niet alleen de genexpressie gemeten, maar ook de expressie en activiteit van eiwitten die bij de mTOR signalering betrokken zijn. Behalve een verschil in totale eiwit hoeveelheid, zagen we in de fibroblasten geen verschil tussen de kinderen van langlevenden en hun echtgenoten. Het verschil tussen de groepen dat we aantreffen in het bloed was dus niet aanwezig in huidcellen van dezelfde mensen. De expressie van genen reflecteerde niet het corresponderende eiwitniveau in dezelfde cellen. Tevens bleek dat genexpressie in huidcellen niet correspondeerde met de expressie van diezelfde genen in bloed. Of dit komt door de gekozen groep mensen, het kleine aantal mensen dat in deze stap kon worden onderzocht (37 kinderen en 36 partners), het onderzochte weefsel of de gebruikte technieken, is niet duidelijk. Het lijkt erop dat de gekweekte huidfibroblasten wat betreft het samengaan van lage mTOR signalering en familiale langlevendheid niet hetzelfde laten zien als bloed.

Bij het vergelijken van verschillende studies naar genexpressie in bloed is er weinig overeenkomst tussen studies in de gevonden individuele genen, waarvan de expressie verandert met kalenderleeftijd. Er is meer overeenkomst tussen de biologische processen waarvan de expressie verandert met leeftijd. Om te weten te komen welke processen een consistente rol spelen in veroudering kan onderzocht worden van welke groepen genen in gezamenlijkheid de expressie verandert bij het ouder worden, zodat daarna onderzocht kan worden binnen welk proces deze groep genen een functie vervult. We hebben daarom in hoofdstuk 7 de datasets van drie grote studies uit de literatuur verzameld waarin genexpressie werd gemeten in bloed van mensen met verschillende leeftijden. We hebben gezocht naar die genen die als groep (netwerk) een verandering in expressie met leeftijd ondergaan in meerdere studies (zogenoemde meta-analyse). De netwerken van genen die we in de data vonden zijn gebaseerd op een combinatie van de vergelijkbare genexpressieniveaus in de op bloed gebaseerde datasets de tot nu toe bekende eiwit-eiwitverbindingen van de eiwitten waar de genen voor coderen. Deze combinatie levert netwerken op van genen waarvan we veronderstellen dat ze in een gezamenlijk biologische proces zijn betrokken. Vervolgens zijn deze netwerken getest voor differentiële expressie met kalenderleeftijd, wat resulteerde in identificatie van vijf netwerken waarvan de expressie consistent over studies verandert met veroudering. Een onafhankelijke herhalingsstudie in een Nederlandse groep mensen liet zien dat vier van de vijf netwerken ook in deze studie veranderde met veroudering. Om te onderzoeken of deze netwerken ook echt potentiële biomarkers zijn is er een overlevingsanalyse gedaan in de

LLS welke liet zien dat een van de netwerken, degene die *ASF1A* bevat, daadwerkelijk samengaat met overleving op hoge leeftijd. Opvallend is dat vijf genen (*ABCE1*, *ASF1A*, *DCK*, *MPHOSPH10* en *ZZZ3*) van het netwerk dat indicatief is voor betere overleving ook voorkomen op de lijst van genen die gerelateerd zijn aan biologische leeftijd, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Dit netwerk heeft geen duidelijk bekende biologische functie en is nu een kandidaatbiomarker voor gezonde veroudering. Het is van belang dit netwerk te onderzoeken in relatie met gezondheid en veroudering. Tevens is het van belang om de biologische functie van dit netwerk te achterhalen.

Als we alle resultaten combineren, komen we uit op één groot netwerk van genen dat zowel de mTOR signalering, het IL7R netwerk, als de vijf netwerken van de meta-analyse omvat. Dit proefschrift laat zien dat dit grote netwerk (figuur 1 van hoofdstuk 8) met al zijn genen gerelateerd is aan veroudering. De hypothese-vrije aanpak beschreven in hoofdstuk 3 heeft in totaal 259 kandidaatgenen opgeleverd als mogelijke marker voor biologische leeftijd. Voor enkele van deze genen, *ASF1A*, *IL7R* en *RPTOR*, hebben we laten zien dat verlaagde genexpressie samengaat met een jongere biologische leeftijd. Er zijn dus veel genen over die nog onderzocht moeten worden. Om de prioriteit van deze nog te testen kandidaatgenen aan te geven, hebben we gekeken of ze ook onderdeel zijn van het bovengenoemde grote verouderingsnetwerk (de combinatie van de resultaten uit hoofdstukken 4, 5 en 7). Van deze kandidaatgenen hebben er 99 een directe connectie met een of meerdere van de netwerkgenen. Deze 99 zullen dan ook verder onderzocht moeten worden op hun eigenschappen als mogelijke biomarker voor biologische veroudering.

Een van de belangrijkste processen die aan veroudering wordt gerelateerd in dieronderzoek en ook in dit proefschrift is de mTOR signalering. We hebben laten zien dat verlaagde expressie van deze genen onder andere samen gaat met minder ziektes en een gezonder suiker metabolisme in de langlevende families. In muizen observeert men een vergelijkbaar beeld als de voedselinname wordt beperkt; verlaagde mTOR signalering en een verlengde levensduur. Er is geen verschil in voedselinname tussen leden van de lang-levende families en hun partners, dus wij concluderen dat deze families een betere 'afstelling' van nature hebben. De vraag is nu, kunnen de partners iets doen om net zo gezond te worden?

Iemands leefstijl kan de expressie beïnvloeden, mTOR signalering is bijvoorbeeld zogenaamd 'nutrient sensing' en wordt beïnvloed door voeding en lichaamsbeweging. Naar aanleiding van de bevindingen uit dit

Chapter 10

proefschrift is de Samen Oud Samen Thuis (Growing Old Together) Studie opgezet waarin de kinderen van langlevende mensen en hun partners een dieet volgen met verminderde hoeveelheid calorieën en een bewegingsprogramma. De effecten van deze interventie op gen- en eiwitexpressie wordt gevolgd in bloed, spier en vet van de personen. Door middel van het veranderen van eet- en bewegingspatronen proberen we erachter te komen of de partners zonder de gunstige genen toch net zo gezond oud kunnen worden als de kinderen van de negentigjarigen.

