



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular senescence in vitro and organismal ageing

Maier, A.B.

Citation

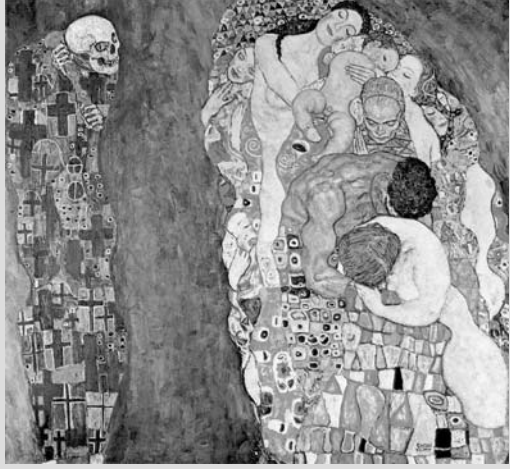
Maier, A. B. (2008, December 11). *Cellular senescence in vitro and organismal ageing*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13335>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13335>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Chapter 9

General discussion in Dutch

Samenvatting

De veronderstelling, dat geïsoleerde cellen eigenschappen van het menselijke lichaam kunnen afspiegelen en als model voor het verouderingsonderzoek kunnen fungeren, is gebaseerd op de observatie dat fibroblast-culturen slechts een beperkt aantal keer kunnen verdubbelen. Daarna stoppen de cellen met delen (senescence). Dit werd voor het eerst opgemerkt door Leonard Hayflick in 1961. Het maximum aantal verdubbelingen wordt daarom ook wel de "Hayflick-limiet" genoemd.

Het celdelingsvermogen wordt door twee verschillende mechanismen gelimiteerd: door voorafgaande celdelingen en door blootstelling aan (oxidatieve) stress. Bij iedere celdeling worden telomeren, de beschermende uiteinden van de chromosomen, iets korter, totdat deze zo kort zijn dat de cellen in een arresttoestand overgaan. In deze toestand kunnen cellen niet meer delen en worden dan "senescent" (verouderd) genoemd. Dit mechanisme wordt grotendeels beïnvloed door het oncogen p53. Het p16 eiwit, dat wordt geproduceerd wanneer een cel beschadigd is door bijvoorbeeld bestraling, remt de voortgang van de celcyclus. Ook in dit geval gaat de cel in een vergelijkbare 'senescent' toestand over.

In een cultuur kan het groeivermogen van geïsoleerde fibroblasten in drie fases worden onderverdeeld. Fase I, de initiatie van de cultuur, wordt opgevolgd door een relatief lange periode van exponentiële celverdubbelingen (fase IIa). Hierna volgt met fase IIb een periode met een verminderde groeisnelheid. In fase III neemt de celdichtheid niet meer toe. In deze laatste fase bestaat de cultuur vooral uit senescent cellen, die nog metabool actief blijven.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift, is uitgevoerd in de Leiden 85-plus Studie, een prospectieve bevolkingsstudie bij 599 mensen van 85 jaar met een follow-up duur van vijf jaar. Op negentig-jarige leeftijd werden bij 68 relatief gezonde deelnemers huidbiopten afgenomen. Uit deze huidbiopten zijn fibroblasten gekweekt tot o.a. het einde van hun verdubbelingvermogen.

In **hoofdstuk 2** wordt het verdubbelingvermogen van uit huidbiopten geïsoleerde humane fibroblasten onderzocht. Alle ingezette biopten leverden fibroblast-culturen op. Zonder uitzondering volgden de fibroblast-culturen de eerder beschreven groeifases. De overgang naar een langzamere groeisnelheid (van fase IIa naar IIb) vond plaats tussen 26 en 81 verdubbelingen van de fibroblast-culturen. Binnen een periode van 30 maanden bereikten 57 van de 68 culturen de postmitotische fase III. In tegenstelling tot eerdere onderzoeken, die een verminderd maximum aantal verdubbelingen van fibroblast-culturen met toenemende leeftijd lieten zien, behielden de fibroblasten van negentig-jarigen in deze studie een vermogen van 51 tot 108 verdubbelingen. Vergeleken met eerder gepubliceerde studies was het verdubbelingvermogen opvallend hoog en was de inter-individuele variatie zeer groot. De groei-eigenschappen van de fibroblast-culturen waren niet geassocieerd met morbiditeit en sterfte van de donoren.

In **hoofdstuk 3** wordt de overgang tussen de verschillende groeifases met behulp van de senescence marker β -galactosidase nader onderzocht. β -Galactosidase omvat een groep uit diverse enzymen, die vooral in de lysosomen in oude cellen accumuleren. Twaalf fibroblasten strains werden tijdens hun verouderingsproces in de cultuur beoordeeld op hun β -galactosidase stapeling. In subconfluente fibroblast-culturen kunnen cellen op basis van de kwantiteit van de β -galactosidase enzymen als positieve of negatieve cellen worden geïdentificeerd. Het percentage β -galactosidase positieve fibroblasten was laag tijdens de groeifase IIa en nam voornamelijk in fase IIb significant toe. De β -galactosidase activiteit was een betere voorspeller voor de achteruitgang in groeisnelheid dan de chronologische leeftijd van de fibroblast-culturen. Concludeerd kan worden, dat β -galactosidase activiteit een betrouwbare marker is voor celveroudering in de cultuur.

Hoofdstuk 4 beschrijft de samenhang tussen het kolonievormend-vermogen en het maximaal aantal celdelingen van fibroblast-culturen. Het bereiken van het maximaal aantal celdelingen in een cultuur neemt meerdere maanden tot jaren in

beslag. In eerdere studies werd het kolonievormend-vermogen van jonge fibroblasten als surrogaat marker voor het maximaal aantal verdubbelingen van celculturen gebruikt. De relatie tussen kolonievormend-vermogen en maximaal aantal verdubbelingen werd in 23 fibroblasten strains, waaronder de strains met het laagste en hoogste verdubbelingvermogen, getoetst. Zowel het aantal gevormde kolonies als ook de grootte van de kolonies waren niet geassocieerd met het maximaal aantal verdubbelingen van de fibroblast-culturen. Aangezien de groeisnelheid van fibroblasten in fase IIa niet geassocieerd was met het maximaal aantal verdubbelingen van de cultuur (hoofdstuk 2), was deze uitkomst in lijn met onze verwachting. De groeisnelheid in fase IIa was wel geassocieerd met het aantal fibroblasten binnen de gevormde kolonies.

In **hoofdstuk 5** wordt de invloed van het *TP53* codon 72 polymorfisme op cellulaire kenmerken onderzocht. Genetische modificatie van het p53 gen beïnvloedt zowel kanker als ook langlevendheid, in de muis en in de mens. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat het codon 72 polymorfisme de cellulaire reactie op oxidatieve stress gemeten aan het optreden van de geprogrammeerde celdood (apoptose) beïnvloedt. De cellulaire respons van fibroblasten na bestraling werd afhankelijk van het codon 72 polymorfisme in het p53 gen onderzocht. De p53 codon 72 variant was van significante invloed op de β -galactosidase activiteit en het optreden van abnormale celkernmorfologie. De verschillende, aan het p53 codon 72 polymorfisme geassocieerde, cellulaire reacties na blootstelling aan stress zou het eerder beschreven voorkomen van kanker en langlevendheid afhankelijk van het genotype gedeeltelijk kunnen verklaren.

Naar aanleiding van de bevindingen tussen verschillende species, waarin een sterker verband tussen lichaamsbouw en het maximaal aantal verdubbelingen van fibroblast-culturen werd gevonden dan tussen langlevendheid en het maximaal aantal verdubbelingen, wordt in **hoofdstuk 6** de relatie tussen lichaamsbouw en het maximaal aantal verdubbelingen van fibroblast-culturen binnen een species beschreven. Er bestond een significante inverse relatie tussen lengte en het

maximaal aantal verdubbelingen van de fibroblast-culturen in donoren van dezelfde leeftijd. Verder hadden fibroblasten van mannelijke donoren een significant lager maximaal verdubbelingsvermogen in vergelijking met vrouwen. Het gewicht van de donoren was niet met het maximaal aantal verdubbelingen van de fibroblast-culturen geassocieerd. Het lagere maximale verdubbelingsvermogen van donoren met een grotere lengte zou veroorzaakt kunnen zijn door een groter aantal celdelingen tijdens groei en regeneratie van het lichaam.

In **hoofdstuk 7** wordt het verdubbelingsvermogen van satelliet cellen (de stamcellen van de spier) in mengculturen versus culturen, die uit een individuele cel zijn opgezet, onderzocht. Sarcopenia, ook wel spierarmoede genoemd, wordt als afname van spiermassa en spierkracht gedefinieerd en wordt hoogstwaarschijnlijk door uitputting van satelliet cellen veroorzaakt. Ook in aanwezigheid van sarcopenia kunnen satelliet-celculturen worden ingezet. Deze werden tot op heden als mengculturen, dat wil zeggen uit meerdere cellen bestaande culturen, onderzocht. Wij hebben een mengcultuur met culturen, die uit een enkele cel zijn opgezet, vergeleken. Aangetoond is dat het maximaal aantal verdubbelingen van de gemengde cultuur veel hoger ligt dan die van individuele cellen. Daardoor is de gemengde cultuur niet representatief voor het maximale verdubbelingsvermogen van spiercellen in het menselijke lichaam. De eigenschappen van de mengcultuur worden naar alle waarschijnlijkheid bepaald door een dominante celkloon met een hoge groeisnelheid en een hoge resterende verdubbelingscapaciteit.

In **hoofdstuk 8** worden de resultaten van het onderzoek naar het maximale verdubbelingsvermogen van fibroblast-culturen in patiënten met progeria - een ziekte waarbij vroegtijdige veroudering optreedt - en leeftijdsgerelateerde ziekten zoals diabetes mellitus, naast de invloed van donorleeftijd op het delingsvermogen samengevat. In patiënten met progeria was het maximaal aantal verdubbelingen van fibroblast-culturen lager vergeleken met fibroblast-culturen van controle donoren uit dezelfde leeftijdscategorie. Fibroblasten van patiënten met

leeftijdsgelateerde ziekten hadden in het algemeen geen verlaagd maximaal aantal verdubbelingen vergeleken met controle fibroblasten van donoren met dezelfde leeftijd. Het maximale verdubbelingvermogen van meer dan 1000 individuele fibroblast-culturen, gepubliceerd tussen 1964 en 2006, werd op de invloed van de donorleeftijd onderzocht. Eerder gepubliceerde studies lieten een duidelijk invers verband tussen donorleeftijd en het maximaal aantal verdubbelingen van de fibroblast-culturen zien. Dit verband was afwezig in studies die een groter aantal donoren onderzochten en meer recent gepubliceerd waren. Er was een duidelijke heterogeniteit in de uitkomst van de studies, wijzend op publicatie bias. Hieruit kan geconcludeerd worden dat, met uitzondering van monogenetische ziektes zoals progeria, het maximaal aantal verdubbelingen van fibroblast-culturen geen eigenschappen van het menselijke lichaam weerspiegelt.

