

## Nederlandse samenvatting

Uit de Leiden Lang Leven Studie is gebleken dat negentigjarige broers en zussen uit families met een aanleg voor langlevendheid 41% minder kans hebben om te overlijden vergeleken met negentigjarigen die zonder broer of zus die leeftijd hebben weten te behalen (de zogenaamde sporadisch negentigjarigen). Ook de kinderen ( $\pm$  60 jaar oud) van de negentigjarige broers en zussen uit de langlevende families vertonen een significant lagere prevalentie van hartinfarcten, hoge bloeddruk en suikerziekte vergeleken met de partners van de kinderen. Met andere woorden, de leden van de langlevende families lijken biologisch jonger te zijn dan leeftijdgenoten uit andere families. Het doel van dit proefschrift is het bestuderen van de cellulaire processen die ten grondslag liggen aan deze familiair aangelegde langlevendheid, gebruik makend van huidcellen, de zogenaamde fibroblasten. Het doel was om eerst aan te tonen dat de fibroblasten van de kinderen uit de langlevende families *in vitro* (kunstmatig gekweekt in het laboratorium) anders reageren, waarbij we fibroblasten van de kinderen vergeleken met de fibroblasten van hun partners. Zij delen immers dezelfde leefomgeving en (eet-) gewoontes en vertegenwoordigen de algemene bevolking. Om de kans te vergroten verschillen tussen deze twee groepen te zien, bestudeerden we de fibroblasten onder niet-gestimuleerde omstandigheden en na het toedienen van oxidatieve stress. Om deze processen ook te kunnen vergelijken voor kalenderleeftijd, vergeleken we verder fibroblasten afkomstig van jonge mensen ( $\pm$  23 jaar oud) met fibroblasten van heel oude mensen ( $>$  90 jaar oud) uit de Leiden 85-plus Studie. We hebben ons vooral gericht op de cellulaire processen apoptose (gereguleerde celdood) en cellulaire senescence (een staat waarin cellen stoppen met delen en heel andere eigenschappen krijgen), omdat deze processen een grote rol spelen in de reactie van cellen op stress en in ouderdomsgerelateerde ziekten. Verder waren we geïnteresseerd in de vraag welke signaaltransductieroutes verantwoordelijk zijn voor de verschillen tussen de fibroblasten afkomstig van de verschillende groepen mensen. Met signaaltransductieroutes bedoelen we de communicatie tussen de verschillende processen op celniveau.

In **hoofdstuk 2** wordt de optimalisatie beschreven van een flow-cytometriemethode waarmee beter onderscheid gemaakt kan worden tussen fibroblastpopulaties die een verschillende

mate van Senescence Associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activiteit vertonen. SA- $\beta$ -gal activiteit is een veelgebruikte marker voor cellulaire senescence die oorspronkelijk op een cytochemische (het kleuren van cellen) manier gebruikt wordt, waarbij cellen handmatig geteld worden. Deze methode is tijdrovend, subjectief en daarom gevoelig voor fouten. Uit de resultaten trokken wij de conclusie dat de flow-cytometriemethode om SA- $\beta$ -gal activiteit te meten superieur is in het onderscheiden van de mate van senescence van verschillende populaties van fibroblasten.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de cellulaire reacties op stress in fibroblasten geïsoleerd uit jonge en oude mensen die deelnamen aan de Leiden 85-plus Studie. Deze reacties werden vergeleken met de reacties van fibroblasten geïsoleerd uit kinderen uit de langlevende families en uit hun partners, als deel van de Leiden Lang Leven Studie. Wanneer senescence, apoptose/celdood en het vermogen van fibroblasten om te delen gemeten werden, leken de reacties van de fibroblasten uit de mensen uit de langlevende families meer op de reacties van de fibroblasten uit de jonge mensen, met andere woorden, deze fibroblasten leken biologisch jonger te zijn. Hieruit concludeerden wij dat de uitzonderlijke langlevendheid van de mensen uit de langlevende families ook tot uiting komt in de cellulaire reacties van hun fibroblasten *in vitro*.

Cellulaire senescence wordt beschouwd als een belangrijke factor in het verouderingsproces en kan opgewekt worden door cellen net zo lang *in vitro* te laten groeien totdat zij stoppen met delen. Echter, senescence kan ook optreden in cellen als zij worden blootgesteld aan stress. In beide processen spelen telomeren een belangrijke rol. Telomeren zijn de uiteinden van de chromosomen en dienen als beschermende buffers tijdens het kopiëren van het DNA (vergelijkbaar met de uiteinden van veters om te voorkomen dat deze gaan rafelen). In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken of er een relatie is tussen de verschillende oorzaken van senescence. We vonden dat fibroblasten waarvan bekend is dat zij een grotere replicatiecapaciteit hebben (ofwel langer door kunnen groeien *in vitro*) ook langere telomeren hadden, minder gevoelig waren voor stress-geïnduceerde senescence en juist sneller doodgingen als gevolg van stress.

Eén van de bekendste theorieën van veroudering is gebaseerd op de veronderstelling dat het omzetten van brandstof en zuurstof in cellen minder efficiënt wordt met toenemende leeftijd. Dit leidt tot het vrijkomen van meer reactieve zuurstofradicalen die eiwitten en DNA kunnen beschadigen. In **hoofdstuk 5** beschrijven we experimenten waarmee we dit proces hebben willen simuleren. Rotenon is een chemische stof die het verbrandingsproces in de mitochondriën (de energiecentrales van de cel) verstoort en zo leidt tot toegenomen hoeveelheden zuurstofradicalen. Zowel in niet-gestresste en rotenon-behandelde toestand vonden we dat fibroblasten van mensen uit langlevende families leken op fibroblasten van jonge mensen. We vonden echter geen verschillen in telomeerlengte of mate van telomeerverkorting.

Er is nog niet veel bekend over de complexe samenwerking tussen de signaaltransductieroutes die leiden tot senescence en de routes die als gevolg van senescence actief worden. **Hoofdstuk 6** beschrijft de experimenten waarmee we deze signaaltransductieroutes hebben willen identificeren, gebruik makend van een techniek waarmee de expressie van vele duizenden genen tegelijk kan worden bestudeerd. We vergeleken fibroblasten van jonge en oude mensen en vonden verschillen in de signaaltransductieroutes die betrokken zijn bij de celcyclus, mitochondriale processen en transcriptie. In het bijzonder het eiwit p16, een celcyclusremmer, kwam in verschillende mate tot expressie in fibroblasten van jonge mensen vergeleken met de expressie in oude mensen. Het is bekend dat p16 een belangrijke rol speelt in senescence.

Vergeleken met de algemene bevolking hebben de mensen uit langlevende families minder kans op suikerziekte, betere insulinegevoeligheid, betere glucoseverwerking en een verschillend lipidemetabolisme. Deze verschillen duiden op verschillen in metabolisme tussen de normale bevolking en de langlevende families. In **hoofdstuk 7** hebben we gekeken of de fibroblasten van deze groepen mensen *in vitro* ook verschillen in metabolisme vertonen door met NMR-spectroscopie metabolieten in het celweekmedium te meten. We vonden een hogere opname van glucose door fibroblasten uit mensen uit langlevende families. Ook andere metabolieten werden in verschillende mate uit het medium opgenomen

of in het medium uitgescheiden, wanneer fibroblasten uit mensen uit langlevende families vergeleken werden met fibroblasten uit hun partners.

### **Conclusie**

We hebben laten zien dat de fibroblasten van verschillende populaties van mensen zich *in vitro* ook verschillend gedragen. In het bijzonder hebben we aangetoond dat de *in vitro* reacties op stress afhankelijk zijn van de kalenderleeftijd en de biologische leeftijd van de mensen waaruit de fibroblasten geïsoleerd zijn. Zo neigen de reacties van fibroblasten uit de mensen uit langlevende families meer naar reacties van de fibroblasten uit jonge mensen: de fibroblasten van jonge mensen en van de mensen uit de langlevende families vertonen minder senescence en gaan sneller dood als reactie op stress. Dit laatste lijkt een negatief effect, maar als cellen beschadigd raken lopen ze het risico de controle over de celcyclus te verliezen en ongecontroleerd te gaan delen. Dit verschijnsel is beter bekend onder de term kanker. Het verwijderen van deze cellen door ze gecontroleerd te verwijderen (apoptose) kan dus als beschermingsmechanisme tegen kanker gezien worden. De voorwaarde is dan wel dat de verwijderde cel vervangen kan worden door een gezonde cel. Vervolgonderzoek zal duidelijk moeten maken of dit inderdaad het geval is, welke genen en signaaltransductieroutes deze verschillen kunnen verklaren en hoe deze routes zodanig gemanipuleerd kunnen worden dat biologisch oudere fibroblasten (van de partners van mensen uit langlevende families) meer op biologisch jongere fibroblasten (van de mensen uit langlevende families) gaan lijken. Vervolgens zou dit principe voor andere celtypen *in vitro* aangetoond moeten en ten slotte *in vivo* (op het niveau van het organisme).