

## **Samenvatting**

---

### **Het begrijpen van het verouderingsproces**

Onderzoek aan zowel hoge als lage eukaryotische modelsystemen heeft laten zien dat verschillende processen bij het verouderingsproces betrokken zijn. Gedurende het leven wordt een organisme continu blootgesteld aan schadelijke omgevings- en endogene factoren. De ernst van deze schadelijke factoren en de effectiviteit waarmee een organisme hiertegen kan optreden bepalen uiteindelijk de levensduur van het organisme. Een van de meest onderzochte schadelijke factoren die een rol spelen tijdens veroudering zijn reactieve zuurstof radicalen, die zowel een interne als externe cellulaire oorsprong kunnen hebben. Een cel bevat verschillende verdedigingsmechanismen, die deze schadelijke factoren proberen te neutraliseren. Wanneer dit niet afdoende gebeurt, worden er cellulaire moleculen beschadigd, wat een negatieve invloed kan hebben op het functioneren van de cel. Gelukkig bevat een cel ook mechanismen die de beschadigde moleculen kunnen herstellen of opruimen om zo het evenwicht in de cel weer te herstellen. Ondanks deze verdedigingsmechanismen neemt het aantal beschadigde cellulaire moleculen in de tijd toe. Aangezien dit het normaal functioneren van de cel onder druk zet, bevat een cel ook cellulaire mechanismen die in werking treden als een bepaalde drempelwaarde van schade is bereikt. Een cel kan dan doodgaan of in een onomkeerbare staat terechtkomen waarbij deling van de cel niet meer mogelijk is. Uiteindelijk kan dit leiden tot een verlies van functionele cellen en een gebrek aan regeneratieve capaciteit van weefsel, wat ook het functioneren van het organisme negatief kan beïnvloeden.

Ondanks het feit dat al deze moleculaire en cellulaire processen een rol lijken te spelen bij veroudering, is er nog geen overeenstemming bereikt over het belang van elk van deze processen hierbij. Het in kaart brengen van de veranderingen die ontstaan gedurende veroudering, zogenaamde biomarkers van veroudering, kunnen belangrijk zijn voor het begrijpen van het verouderingsproces en de mate waarin de verschillende processen hierin een rol spelen. Dit proces werd gestart met genomics, dat informatie geeft over verschillen in gen-expressie, en is nu uitgebreid met proteomics, dat informatie geeft over de expressie en modificatie van de uiteindelijke genproducten, de eiwitten. Het ontwikkelen van nieuwe proteomicstechnieken en het identificeren van eiwitexpressieverschillen tijdens veroudering vormen de focus van dit proefschrift.

### **Antilichamen in proteomics**

De grote interesse in proteomics in de laatste jaren heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende 'high throughput'-assays en verbetering van bestaande technieken die het analyseren van eiwitexpressieverschillen in een enkel experiment mogelijk maken. Moleculen die eiwitten kunnen binden, zogenaamde affiniteitsliganden, zoals antilichamen, bieden een goede mogelijkheid voor toepassing in dit onderzoeksveld, aangezien ze gebruikt kunnen worden voor het zuiveren en aantonen van eiwitten. Voor een succesvol gebruik van deze antilichamen moet men er zeker van zijn dat het antilichaam een hoge affiniteit heeft voor het eiwit dat hij bindt en dat het antilichaam geen andere eiwitten bindt (dus specifiek is). De traditionele methode voor het verkrijgen van antilichamen is door dieren te immuniseren met het targeteiwit, gevolgd door het isoleren van de geproduceerde antilichamen uit het bloed van het geïmmuniseerde dier. Dit kan resulteren in polyklonale of monoklonale antilichamen. Polyclonale antilichamen zijn vaak niet zo specifiek als monoklonale antilichamen en zijn daardoor minder geschikt voor het gebruik in proteomics. Monoclonale antilichamen zijn daar vaak wel geschikt voor, maar zijn relatief duur om te maken.

Het gebruik van recombinante antilichamen biedt hiervoor een goedkoop alternatief. Dit zijn vaak alleen de eiwitbindende delen van een normaal antilichaam. Met behulp van een ingewikkelde selectietechniek kunnen recombinante antilichamen worden verkregen met vooraf bepaalde eigenschappen. Doordat dit proces geautomatiseerd kan worden, kunnen de productiekosten extreem worden verlaagd.

Recombinante antilichamen verkregen van de soort *Camelidae* (VHH) hebben additionele voordelen. Deze zijn stabielere dan andere antilichamen, kunnen makkelijker worden geproduceerd en ze zijn de kleinste antilichaamfragmenten die kunnen worden verkregen uit antilichamen. Het gebruik van deze antilichamen voor de ontwikkeling van proteomicstechnieken staat beschreven in dit proefschrift.

### **Verwijderen van bulkeiwitten uit humaan plasma**

Veranderingen die optreden tijdens veroudering, zoals verhoogde celdood en verlaagd functioneren van weefsel en organen, kunnen leiden tot veranderingen in de expressie van eiwitten in bloed. Het analyseren van deze verschillen wordt bemoeilijkt door het bestaan van verschillende veel

voorkomende eiwitten in het bloed. In hoofdstuk 2 van dit proefschrift wordt beschreven hoe VHHs worden verkregen, die de bulkeiwitten HSA en IgG kunnen binden. Deze VHHs zijn vervolgens gebruikt om deze bulkeiwitten uit bloed te verwijderen, wat een betere analyse van de minder voorkomende eiwitten mogelijk maakt. Verder is aangetoond dat deze VHHs ook gebruikt zouden kunnen worden voor klinische toepassingen als beter alternatief voor bestaande technieken bij de behandeling van auto-immuunpatienten.

### **Eiwitexpressie veranderingen in bloedplasma gedurende veroudering**

In hoofdstuk 3 wordt met behulp van de hierboven beschreven VHHs en een geavanceerde proteomicstechniek (2D-gelelectroforese) gezocht naar verschillen in expressie van bloedeiwitten tussen jonge en oude mensen. Uiteindelijk zijn er verschillende eiwitten gevonden die een verandering in expressie lieten zien tussen de jonge en oude groep. Enkele van deze verschillen kwamen overeen met resultaten van anderen en suggereren dat veroudering gepaard gaat met een licht verhoogde pro-coagulante en pro-inflammatoire staat. Verder werden er van sommige eiwitten verschillende isovormen gevonden. De diversiteit in expressieverschillen van isovormen uit een enkel genproduct liet zien dat het belangrijk is om afzonderlijke isovormen van hetzelfde genproduct te bestuderen.

Verder werden er vooral verschillen gevonden in de expressie van delen van het eiwit complement C3 (CO3). Dit eiwit is betrokken bij de activatie van de immuunrespons. De verhoogde aanwezigheid van enkele fragmenten van dit eiwit in het bloed van de oude groep, suggereerde dat de activiteit van dit eiwit in oude mensen is verhoogd. Dit verschil is nog niet eerder aangetoond wat verklaard kan worden doordat de technieken die door anderen zijn gebruikt, niet geschikt zijn voor het analyseren van eiwitfragmenten die zijn ontstaan uit een enkel genproduct.

### **Het gebruik van antilichamen die meerdere eiwitten herkennen**

Een monoklonaal antilichaam herkent een bepaalde plek op een eiwit, het epitoom. Het komt in de natuur geregeld voor dat een epitoom op verschillende eiwitten voorkomt. Een antilichaam dat zo'n epitoom kan binden, kan dus gebruikt worden voor het aantonen en zuiveren van meerdere verschillende eiwitten. In hoofdstuk 4 wordt het verkrijgen en testen van zo'n antilichaam beschreven. Dit antilichaam herkent een epitoom dat voorkomt op eiwitten die

zich bevinden in het endoplasmatisch reticulum (ER), een organel dat betrokken is bij de vouwing van eiwitten die worden gesecreteerd door de cel. In een cellulair model wordt met het gebruik van dit antilichaam aangetoond dat de expressie van verschillende van deze ER-residente eiwitten verandert als de cel wordt blootgesteld aan verschillende soorten stress. Dit soort antilichamen biedt de mogelijkheid om op een snelle manier de expressie van verschillende eiwitten tegelijk te analyseren.

### **Verschillen in expressie in senescent endotheelcellen**

Endotheelcellen vormen de barrière tussen het bloed en het omliggende weefsel. Wanneer ze beschadigd worden, worden ze vervangen door deling van naburige cellen of door speciale cellen die circuleren in het bloed. Zoals vele andere cellen kunnen deze cellen niet ongelimiteerd delen. Op een zeker moment zullen ze in een onomkeerbare staat terecht komen waarbij celdeling niet meer mogelijk is. Dit heet senescence. Senescent cellen leven nog en zijn metabolisch actief, maar er treden wel veranderingen op in de expressie van hun genen. Aangezien dit een verandering van cellulair functie suggereert, kan accumulatie van deze cellen leiden tot een verstoorde barrièrefunctie van het endotheelweefsel, wat het ontstaan van pathologische processen, zoals atherosclerosis, in de hand kan werken. Of dit proces ook daadwerkelijk een rol speelt in levend weefsel is nog steeds niet duidelijk. Het in kaart brengen van de verschillen die ontstaan tijdens het senescent worden van cellen, zou hierbij een oplossing kunnen bieden. In hoofdstuk 5 wordt gekeken naar de verschillen in eiwitexpressie van een vooraf bepaalde set van eiwitten tussen jonge en senescent cellen.

Deze eiwitten zijn gekozen op basis van twee verschillende hypothesen. (i) Tijdens veroudering vindt er een graduele verhoging plaats van stress veroorzaakt door reactieve zuurstof radicalen. Er zijn aanwijzingen dat het ER extra gevoelig is voor deze stress. Bovendien is bekend dat ER stress leidt tot expressieverschillen van enkele ER-residente eiwitten. Met de VHH beschreven in hoofdstuk 4 is de expressie van enkele van deze ER-residente eiwitten geanalyseerd. Een duidelijk verschil in expressie is zichtbaar, maar deze verschillen komen niet overeen met de verschillen die te zien zijn tijdens ER stress. Desondanks laat het wel zien dat tijdens het senescent worden van deze cellen de functie van het ER lijkt te veranderen. (ii) Aangezien senescent cellen niet meer kunnen delen, kan de expressie van eiwitten die betrokken

zijn bij celdeling veranderen. Het membraaneiwit endogline, dat voor celdeling nodig is, is daarom een interessant eiwit. De expressie van dit eiwit wordt duidelijk verlaagd in de senescent cel populatie, maar deze verlaging vond niet plaats bij alle cellen in deze populatie. Aangezien dit eiwit ook betrokken is bij verschillende andere cellulaire processen die belangrijk zijn voor het functioneren van de endotheelcel, zou deze verlaagde expressie nadelige gevolgen kunnen hebben voor het functioneren van het endotheel.

### **Toekomst van affiniteitsliganden in proteomics**

Ondanks het feit dat in dit proefschrift verschillende veranderingen zijn gevonden in de expressie van eiwitten gerelateerd aan veroudering, geven ze bij lange na niet alle veranderingen weer, die een rol spelen bij processen van veroudering. De meeste in hoofdstuk 3 gevonden eiwitten die expressieveranderingen vertonen, zijn redelijk veelvoorkomende eiwitten. Informatie over eiwitten die slechts in lage mate voorkomen in bloed, is dus niet gevonden. Om analyse van deze eiwitten toch mogelijk te maken zijn verschillende groepen begonnen met het ontwikkelen van aanvullende technieken, die de complexiteit van biologische samples reduceren. Hierbij wordt het sample opgedeeld in verschillende fracties, die dan afzonderlijk worden geanalyseerd. Resultaten die uit deze studies voortkomen zullen echter met andere technieken geverifieerd moeten worden, aangezien elke stap gedurende sample-opwerking verschillen kan induceren.

Een techniek die het mogelijk zou kunnen maken om biologische samples te analyseren zonder deze eerst te moeten fractioneren is het gebruik van antilichaam micro-arrays. Hierbij worden verschillende antilichamen geïmmobiliseerd op een oppervlak, elk op een verschillende plaats. Deze antilichamen zullen hun antigen binden als het biologische sample wordt toegevoegd, waarna het gebonden antigeen op verschillende manieren kan worden aangetoond. Alhoewel er een grote potentie is voor deze techniek, zijn er nog enkele obstakels die overwonnen moeten worden, zoals het genereren en testen van specifieke en hoog affine antilichamen.

Verder zal het een uitdaging worden om antilichamen te genereren, die een afzonderlijke isovorm van een genproduct kunnen herkennen. Dit zou het mogelijk maken om de eiwitexpressieverschillen gevonden in hoofdstuk 3 verder te analyseren.