

Samenvatting van het proefschrift "Carnitine metabolism in relation to physical performance and cognition in aging" (Marjanne D. van der Hoek, 2020).

Carnitine is een relatief klein molecuul met drie belangrijke functies in het energiemetabolisme van de mens (**Hoofdstuk 1**). Alle drie functies berusten op het feit dat carnitine als vervangend molecuul kan optreden voor coënzym A (CoA; net als carnitine een vitamine-achtige verbinding) en dat daarbij geen energie verloren gaat.

De eerste en meest bekende functie van carnitine is dat het vetzuren transporteert naar de mitochondriën. In de mitochondriën worden de vetzuren verbrand en de energie die hierbij vrijkomt wordt doorgegeven als ATP, maar voordat vetzuren verbrand kunnen worden moeten ze eerst opgeladen worden met CoA. Dat opladen gebeurt in de cel buiten het mitochondrion. Een opgeladen vetzuurmolecuul noemen we acyl-CoA. Acyl-CoA kan niet over membranen getransporteerd worden, maar als de CoA-groep vervangen wordt door carnitine krijgen we acylcarnitine dat wel over membranen getransporteerd kan worden. Het enzym CPT1 zorgt ervoor dat acyl-CoA wordt omgezet in acylcarnitine en dat kan dus over de mitochondriële membranen getransporteerd worden. Eenmaal in het mitochondrion zorgt het enzym CPT2 ervoor dat carnitine losgekoppeld wordt van de acylgroep, en er weer een CoA-groep voor in de plek komt. Vervolgens wordt de acylgroep verbrand in de vetzuurverbranding.

De tweede functie van carnitine is dat het zich ook ten behoeve van allerlei andere processen bindt aan acylgroepen (vetzuren) waardoor de hoeveelheid vrij CoA in de cel op peil blijft. CoA is betrokken bij de aanmaak en verbranding van vetzuren, en daarnaast bij de verbranding van pyruvaat in de citroenzuurcyclus en is dus cruciaal voor het energiemetabolisme. Een derde functie van carnitine is dat het een tijdelijk opslagmolecuul is voor het eindproduct (*acetyl-CoA*) van de vetzuurverbranding, waarbij er acetylcarnitine gevormd wordt. Acetylcarnitine kan in één stap weer omgezet worden naar acetyl-CoA, wat vervolgens direct verbrand kan worden in de citroenzuurcyclus.

Bij mensen komt ongeveer 75% van de carnitine uit het dieet. Met name dierlijke producten zoals vlees, kip en zuivelproducten bevatten veel carnitine, waarbij de meeste carnitine in rood vlees zit. Ongeveer 25% van de carnitine wordt door het lichaam zelf aangemaakt (dit percentage hangt af van de hoeveelheid die wordt verkregen uit het dieet; vegetariërs maken praktisch alle carnitine zelf). Carnitine kan worden aangemaakt in de lever, nieren en het brein. De andere weefsels in het lichaam zijn afhankelijk van de opname van carnitine uit het bloed door middel van transporters. Transporters zijn speciale eiwitten in het buitenmembraan van de cel die een kanaaltje vormen dat doorlaatbaar is voor bepaalde moleculen. De transporters spelen dus een grote rol bij het vervoeren van stoffen naar bepaalde cellen in het lichaam. De belangrijkste carnitine transporter is OCTN2. Deze transporter is overal in het lichaam aanwezig en is onder andere betrokken bij de opname van carnitine in de darmen, afgifte van carnitine door de melkklier, terugresorptie van

carnitine in de nieren en carnitine-opname in de spieren. De meeste carnitine wordt in de spieren gebruikt, omdat spierweefsel voornamelijk vetzuren als brandstof verbruikt. Ongeveer 98% van de totale hoeveelheid aan carnitine in het lichaam bevindt zich in de spier.

Het aantal ouderen in de wereld neemt sterk toe. In 2017 was 18% van de Europese bevolking 65-plus en naar verwachting zal dit in 2050 28% zijn. Ongeveer twee derde van de 65-plussers is vrouw. Hoewel de levensverwachting steeds meer toeneemt, zien we aan de andere kant dat de leeftijd waarop men een chronische ziekte krijgt daalt. Wat met name opvalt is dat de levensverwachting van vrouwen hoger is dan mannen, maar dat de leeftijd waarop een vrouw een chronische ziekte krijgt lager is in vergelijking met mannen. Vrouwen leven dus gemiddeld langer, maar hebben gemiddeld wel eerder te kampen met chronische ziekten. Ook de prevalentie¹ van *frailty* (kwetsbaarheid) is hoger in vrouwen dan in mannen. *Frailty* gaat vaak gepaard met een afname van spiermassa, spierzwakte en vermoeidheid, en verhoogt de kans op functionele achteruitgang en sterfte. Ook zijn er aanwijzingen dat *frailty* gerelateerd is aan cognitieve achteruitgang.

Carnitine is erg belangrijk voor het spiermetabolisme, de mitochondriële functie en cognitie. Verschillende studies hebben laten zien dat de hoeveelheid carnitine in de spier daalt bij veroudering, maar het is niet bekend of carnitine een rol speelt bij *frailty*. Een afname in de carnitinestatus zou kunnen resulteren in een verminderde mitochondriële functie en energieproductie, wat zou kunnen leiden tot de symptomen van *frailty* (spiermassaverlies, spierzwakte en vermoeidheid).

Dit proefschrift focust op twee verschillende aspecten van carnitine. Het eerste deel is gericht op het verkrijgen van meer inzicht in de oorsprong, evolutie en functie van enzymen die betrokken zijn bij het carnitine metabolisme. Het tweede deel spits zich toe op de rol van carnitine bij veroudering. Hierbij was het eerste doel vaststellen of de hoeveelheid carnitine in de spieren daalt bij veroudering, of hierin een verschil was tussen fitte en kwetsbare ouderen, en of hierin een verschil was tussen mannen en vrouwen. Het tweede doel was om meer mechanistisch inzicht te verkrijgen in de relatie tussen kwetsbaarheid, spiercarnitine en mitochondriële functie. Het derde doel was om een recent ontwikkelde cognitieve test (MemTrax test) te vergelijken met een andere veel gebruikte cognitieve test om te bepalen of de nieuwe test geschikt zou zijn om te gebruiken in verder onderzoek. Het laatste doel was om te onderzoeken in hoeverre de eerste stadia van *frailty* gepaard gaan met milde maar aantoonbare cognitieve achteruitgang en of carnitine status hieraan gerelateerd is.

Omdat het carnitinemetabolisme zo goed geconserveerd is gebleven tijdens de evolutie kunnen we concluderen dat carnitine erg belangrijk is voor 'het leven'. De enzymen CPT1 en CPT2 zijn onderdeel van de carnitine/choline acyltransferase familie. Deze familie bestaat uit zeven enzymen die allemaal carnitine kunnen binden aan vetzuren van verschillende lengte,

¹ De prevalentie is het *voorkomen op een bepaald moment* van het ziekteverschijnsel of aandoening in een bepaalde populatie uitgedrukt als proportie van een populatie.

behalve één enzym dat niet carnitine bindt aan vetzuren, maar (het sterk op carnitine lijkende) choline. Er wordt verondersteld dat al deze enzymen één gemeenschappelijke voorouder hebben waaruit ze zijn ontstaan. In **hoofdstuk 2** hebben we de evolutie van de genen die coderen voor de enzymen die betrokken zijn bij het carnitine metabolisme bestudeerd. We laten zien dat CPT1 en CPT2, ondanks dat ze samen de carnitine shuttle bewerkstelligen, evolutionair gezien het verst van elkaar af staan. Ten opzichte van de gezamenlijke voorouder hebben CPT1 en CPT2 de meeste veranderingen ondergaan. Daarnaast tonen we aan dat CPT2, welke gelokaliseerd is in de mitochondriën, het meest lijkt op de transferase (Sc-YAT-1 en 2) van de gist die gelokaliseerd is in het cytosol van de cel, en dat CPT1, welke gelokaliseerd is in het cytosol van de cel, het meest lijkt op de transferase (Sc-CAT-2) van de gist die in de mitochondriën zit. Dit duidt erop dat in de loop van de evolutie de twee later ontstane enzymen van plaats hebben gewisseld. Het voor neurologische processen belangrijke choline acetyltransferase (ChAT) lijkt het meest op carnitine acetyltransferase (CrAT), maar is verder geëvolueerd om zijn choline specifieke functie te verkrijgen. Bij CPT1 hebben er tijdens de evolutie meerdere duplicaties plaatsgevonden die geresulteerd hebben in drie verschillende isovormen: CPT1A (actief in lever en elders), CPT1B (actief in spier) en CPT1C (actief in brein). We laten zien dat CPT1C veel veranderingen tijdens de evolutie heeft ondergaan en dat het waarschijnlijk is dat CPT1C een andere functie heeft gekregen dan CPT1A en CPT1B, welke elk de eerste stap van de carnitineshuttle regelen. De exacte functie van CPT1C, welke met name tot uiting komt in gebieden van het brein die hongersignalen doorgeven, is tot op heden nog onbekend.

Voor het tweede deel van dit proefschrift hebben we de Fitaal-studie uitgevoerd in fitte en (pre-)kwetsbare 75-plussers, die we vergeleken hebben met een groep jongvolwassenen. Kwetsbaarheid hebben we bepaald met behulp van de Fried-criteria, een veelgebruikte test om kwetsbaarheid in ouderen te bepalen. De leeftijd van de fitte en (pre-)kwetsbare ouderen, voor zowel mannen als vrouwen, was zeer vergelijkbaar. Dit was erg belangrijk omdat dit maakt dat verschillen tussen de fitte en (pre-)kwetsbare ouderen hierdoor niet toe te schrijven zijn aan een verschil in leeftijd.

In **hoofdstuk 3** hebben we bestudeerd of een afname van (acyl)carnitines in de spier geassocieerd is met kwetsbaarheid (*(pre-)frailty*), fysieke gesteldheid en een verandering in mitochondriële functie. Daarnaast hebben we onderzocht of dit verschillend is voor mannen en vrouwen. Bij de oudere deelnemers werd de fysieke gesteldheid gemeten met de 400-meter looptest, de 'Short Physical Performance Battery' en een handknijpkrachtmeting. Bij alle deelnemers zijn spierbiopten afgenomen om de carnitine status in de spier vast te stellen. Daarnaast is bloed afgenomen om de (acyl)carnitine status in het bloedplasma te kunnen bepalen. Verder is ook de expressie van veel genen in de spier geanalyseerd. We hebben gevonden dat de totale carnitine status en de korte keten acylcarnitines verlaagd waren in (pre-)kwetsbare oude vrouwen ten opzichte van fitte oude vrouwen en jonge vrouwen, terwijl we geen verschillen hebben gevonden in mannen. De daling in korte keten acylcarnitines was geassocieerd met een afname van de fysieke gesteldheid in vrouwen.

Daarnaast was deze daling geassocieerd met een lagere expressie van genen die betrokken zijn bij de energieproductie in de mitochondriën. Onze hypothese is dat verminderende mitochondriële functie de onderliggende oorzaak is van de verlaagde carnitinestatus bij (pre-)kwetsbare vrouwen, en dat de daling in korte keten acylcarnitines geïnterpreteerd kan worden als een afspiegeling van verminderde acetyl-CoA productie (slechtere energiestatus).

In **hoofdstuk 4** hebben we als voorbereiding op het gebruik van de cognitieve MemTrax (MTX) test in de Fitaal studie eerst de MTX test vergeleken met de Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test. De MoCA is een veelgebruikte test bij de screening van milde cognitieve achteruitgang. Het is een test op papier die zeven verschillende cognitieve domeinen meet en welke face-to-face afgenomen moet worden door een getraind persoon. Na afloop van de test worden alle behaalde punten bij elkaar opgeteld. De eindscore is een maat voor de cognitieve status, maar de precieze betekenis van deze score is controversieel. De recent ontwikkelde MTX test is een online geheugen test, die gebaseerd is op de techniek *continuous recognition task*. Bij deze test wordt op een computerscherm een serie van plaatjes getoond, waarbij er zo snel mogelijk op de spatiebalk van het toetsenbord gedrukt dient te worden wanneer een plaatje getoond wordt dat al eerder getoond is. Deze test kent twee uitkomsten: $MTX_{correct}$, wat het percentage is van het aantal correcte responsen, en MTX_{speed} , wat de reactiesnelheid weergeeft. We hebben de MoCA en de MTX test afgenomen bij in totaal 82 75-plussers. De proefpersonen zijn naderhand verdeeld in twee groepen op basis van de behaalde MoCA resultaten: normale cognitie en milde cognitieve achteruitgang. De resultaten laten zien dat de gemiddelde MTX-scores lager waren in de milde cognitieve achteruitgang groep dan in de normale cognitie groep. Daarnaast hebben we op basis van de MoCA berekend welke afkapwaarden van de MTX test resultaten gebruikt zouden kunnen worden als indicatie voor milde cognitieve achteruitgang.

In **hoofdstuk 5** hebben we de relatie tussen *frailty* en cognitieve achteruitgang onderzocht, en of de carnitinestatus daarbij informatief is. Ons doel was om vast te stellen of cognitieve achteruitgang al speelt in de beginstadiën van *frailty*. Hiervoor hebben we de data gebruikt van de pre-kwetsbare ouderen die deel hebben genomen aan de Fitaal studie. We hebben cognitie gemeten door middel van de MoCA en de MTX test. We laten zien dat er bij pre-kwetsbare ouderen sprake is van cognitieve achteruitgang in vergelijking met fitte ouderen van dezelfde leeftijd. Daarnaast hebben we laten zien dat de cognitieve status positief gerelateerd is aan de fysieke gesteldheid in mannen, maar niet in vrouwen. Verder hebben we gevonden dat de midden keten acylcarnitines, C8 en C10 (dat wil zeggen vetzuren met 8 en respectievelijk 10 koolstofatomen in de vetzuurketen), verlaagd waren in pre-kwetsbare oude mannen. Deze plasma acylcarnitines zijn in de literatuur in verband gebracht met de ziekte van Alzheimer, wat zou kunnen impliceren dat er een link is tussen het carnitine metabolisme en cognitieve achteruitgang. Echter, we hebben geen relatie gevonden tussen deze midden keten acylcarnitines, C8 en C10, en cognitieve status bij *frailty*. Omdat de fysieke gesteldheid, maar niet de plasma acylcarnitines, gerelateerd waren aan de

cognitieve status, suggereert dit dat het carnitine metabolisme geen directe rol speelt in de cognitieve achteruitgang bij de beginstadia van *frailty*.

Concluderend hebben we laten zien dat vanuit evolutionair oogpunt carnitine belangrijk is voor het energiemetabolisme van met name zoogdieren, maar dat er in de loop van de evolutie wel een opvallende plaatsverandering van enzymen heeft plaatsgevonden. Bij veroudering namen in ons cohort van 75-plussers van vergelijkbare leeftijd de korte keten acylcarnitines af in de spieren bij (pre-)kwetsbare vrouwen, maar niet bij mannen. Deze daling in met name acetylcarnitine was gerelateerd aan een afname van de fysieke gesteldheid en een lagere expressie van genen die betrokken zijn bij de energieproductie in de mitochondriën. De verminderde mitochondriële functie zou de onderliggende oorzaak kunnen zijn voor de verlaagde carnitinestatus bij (pre-)kwetsbare vrouwen. Ook hebben we laten zien dat in een vroeg stadium van *frailty* er sprake was van milde cognitieve achteruitgang. In pre-kwetsbare mannen waren de midden keten acylcarnitines (C8 en C10) verlaagd, maar er is geen relatie gevonden tussen de plasma acylcarnitines en cognitieve status. Dit maakt het aannemelijk dat het carnitine metabolisme geen directe rol speelt bij de cognitieve achteruitgang in het beginstadium van *frailty*. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft nieuw inzicht gegeven in de rol van carnitine bij kwetsbaarheid in ouderen, en dat dit met name een relatie heeft met fysiek functioneren. De constatering dat de (acyl)carnitine waarden in het bloed niet voorspellend zijn voor de (acyl)carnitine status in de spier heeft belangrijke consequenties voor vervolgstudies en interpretatie van wetenschappelijke literatuur. Door de gekozen studieopzet zijn we ook in staat geweest om duidelijk aan te tonen dat het proces van veroudering sterk afhankelijk is van het geslacht. Het is essentieel om hiermee rekening te houden in vervolgonderzoek en behandeling.

Marjanne D. van der Hoek,
Wageningen, 14 April 2020