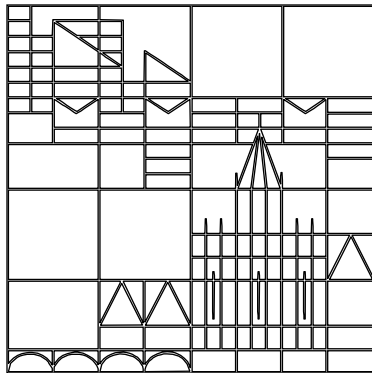


Biomarker verraten das Alter (www.mark-age.eu)



Prof. Dr. med. Alexander Bürkle

Lehrstuhl Molekulare Toxikologie

Fachbereich Biologie

Universität Konstanz

D-78457 Konstanz

Email: Alexander.Buerkle@uni-konstanz.de

What ist Altern?



- Zunehmende Abnahme der normalen Organ- bzw. Zellfunktionen
- Zunehmender Verlust von Widerstandskraft gegen „Stress“
- Zunehmendes Risiko für Krankheiten und Tod

Häufige altersabhängige Krankheiten

- Viele Krebsformen
- Typ II Diabetes mellitus
- Atherosklerose (=> Myokardinfarkt; Hirninfarkt)
- M. Alzheimer
- M. Parkinson
- Arthrose / Arthritis
- Osteoporose
- Sarcopenie
- Katarakt
- Maculadegeneration
- ...

Altern beim Menschen

- Das Altern innerhalb der menschlichen Population verläuft nicht einheitlich (genetische Heterogenität; Umwelteinflüsse)
- Das Altern von Individuen kann bisher nicht direkt bestimmt werden

Möglicher Ausweg:

“Biomarker des Alterns”

- Altersabhängige Veränderungen in Funktion und Zusammensetzung des Körpers -- Surrogat für die Bestimmung des “biologischen Alters”
- Sollten das allgemeine Risiko für das Eintreten altersabhängiger Krankheiten vorhersagen => mögliche Anwendung in der Präventivmedizin
- Viele derzeitige Biomarker-Kandidaten weisen eine starke Variabilität in Querschnittsstudien aus; bisher hat sich kein einzelner Messparameter als aussagekräftiger Biomarker des Alterns erwiesen

MARK-AGE Projekt

Vollständiger Titel:

European Study to Establish Biomarkers of Human Ageing

(HEALTH-F4-2008-200880)

April 2008 – March 2013

Koordinator:

Alexander Bürkle
Universität Konstanz
Konstanz, Deutschland



www.mark-age.eu





MARK-AGE:

Populationsstudie (ca. 3.700 Probanden) zur Identifizierung einer Gruppe von Biomarkern des Alterns, die in ihrer Gesamtheit mit entsprechender Gewichtung das biologische Alter besser erfassen können als jeder dieser Marker für sich genommen.



www.mark-age.eu



MARK-AGE:

Populationsstudie (ca. 3.700 Probanden) zur Identifizierung einer Gruppe von Biomarkern des Alterns, die in ihrer Gesamtheit mit entsprechender Gewichtung das biologische Alter besser erfassen können als jeder dieser Marker für sich genommen.

Probandengruppen:

- (1) RASIG: *randomly recruited age-stratified individuals* aus der Allgemeinbevölkerung im Altersbereich 35-74 Jahre





MARK-AGE:

Populationsstudie (ca. 3.700 Probanden) zur Identifizierung einer Gruppe von Biomarkern des Alterns, die in ihrer Gesamtheit mit entsprechender Gewichtung das biologische Alter besser erfassen können als jeder dieser Marker für sich genommen.

Probandengruppen:

- (1) RASIG: *randomly recruited age-stratified individuals* aus der Allgemeinbevölkerung im Altersbereich 35-74 Jahre
- (2) “*GEHA offspring (GO)*”: Probanden mit familiärer Langlebigkeit, von denen ein Elternteil bereits in der GEHA-Studie rekrutiert wurde





EU FP6 *“Genetics of Healthy Ageing (GeHA)”* Studie

GeHA Proband:

Sehr gesunde >90-jähr. Person mit

mindest. 1 gesunden Geschwister mit >90 J.

Genetische Analysen (Haplotypen)

Töchter / Söhne: *“GeHA offspring (GO)”*

Spouses of “GO” (SGO)

Voraussichtlich erfolgreich alternde Menschen

Kontrollen





MARK-AGE:

Populationsstudie (ca. 3.700 Probanden) zur Identifizierung einer Gruppe von Biomarkern des Alterns, die in ihrer Gesamtheit mit entsprechender Gewichtung das biologische Alter besser erfassen können als jeder dieser Marker für sich genommen.

Probandengruppen:

- (1) RASIG: *randomly recruited age-stratified individuals* aus der Allgemeinbevölkerung im Altersbereich 35-74 Jahre
- (2) “*GEHA offspring (GO)*”: Probanden mit familiärer Langlebigkeit, von denen ein Elternteil bereits in der GEHA-Studie rekrutiert wurde
- (3) “*Spouses of GO (SGO)*”: Ehegatten von GO als Kontrollen
- (4) Einige Patienten mit progeroiden Syndromen (Cockayne / Down / Werner Syndrom) als weitere Kontrollen





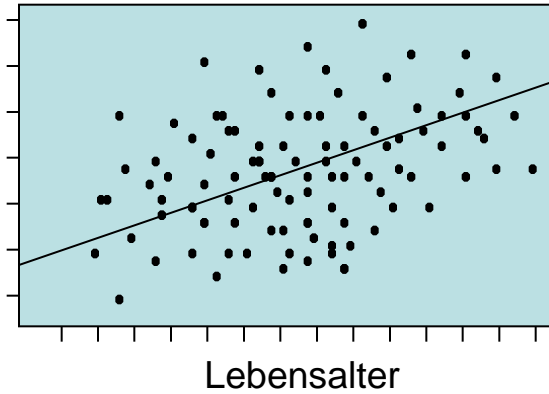
Zu untersuchende Biomarker-Kandidaten:

- (a) “klassische”: Daten aus mehreren kleineren Studien liegen vor;
 - (b) “neue”: präliminäre, erfolgversprechende Daten liegen vor;
 - (c) “neuartige”: auf neuesten Forschungsergebnisse zu den biologischen Mechanismen der Alterung fußend
-
- Mittels bioinformatischer Analyse soll dann aus den grossen Mengen von Primärdaten eine aussagekräftige Gruppe von Biomarkern des menschlichen Alters und ein Index für das biologische Alter identifiziert werden



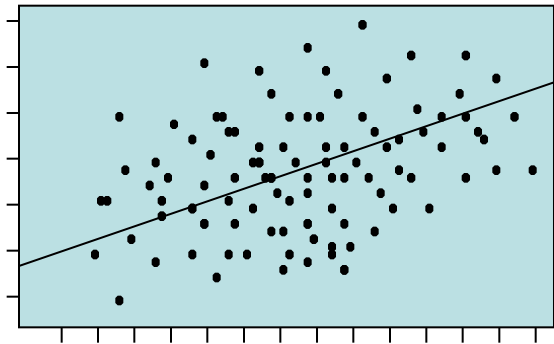
Strategie zur Auffindung eines Index für das biologische Alter

Parameter 1



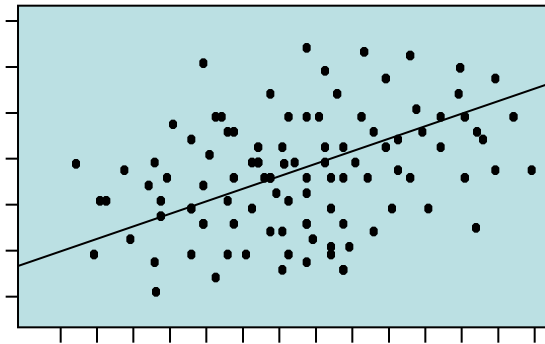
Strategie zur Auffindung eines Index für das biologische Alter

Parameter 1



Lebensalter

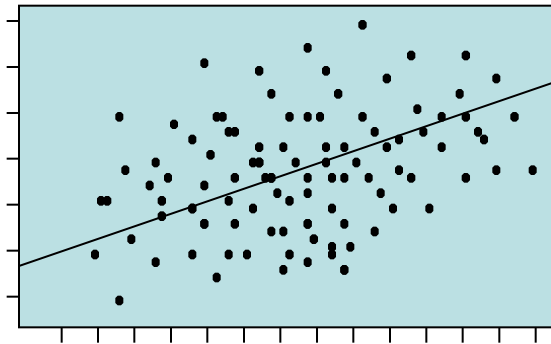
Parameter 2



Lebensalter

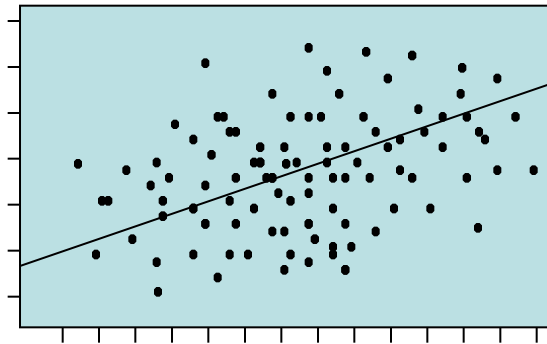
Strategie zur Auffindung eines Index für das biologische Alter

Parameter 1



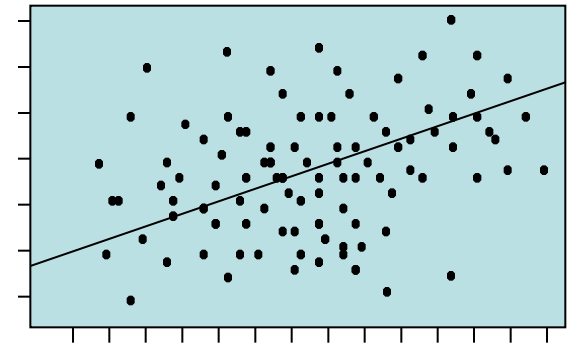
Lebensalter

Parameter 2



Lebensalter

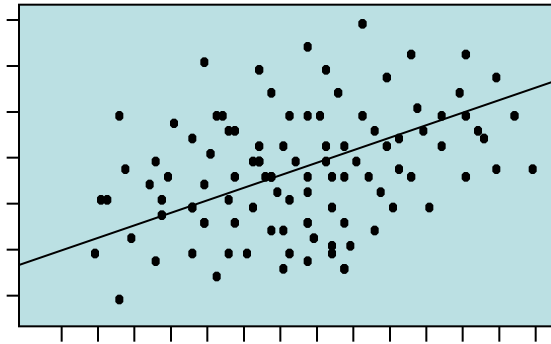
Parameter 3



Lebensalter

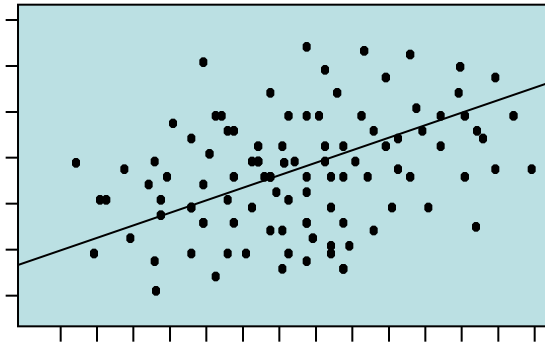
Strategie zur Auffindung eines Index für das biologische Alter

Parameter 1



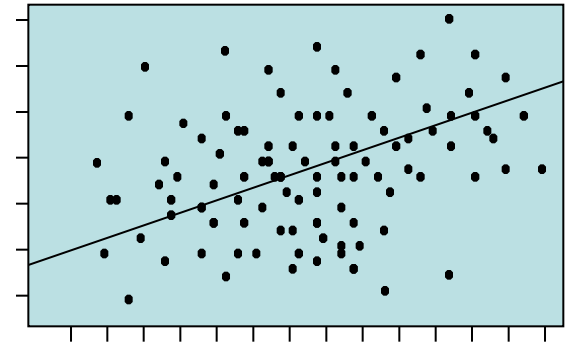
Lebensalter

Parameter 2



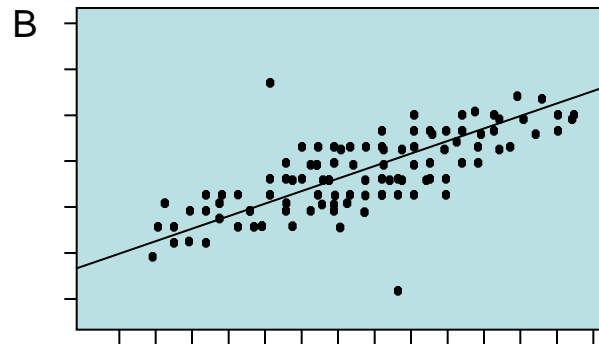
Lebensalter

Parameter 3



Lebensalter

Index für das biol. Alter $B = a \times P_1 + b \times P_2 + c \times P_3 \dots$



Lebensalter

Validierung des Index für das Biologische Alter

- **Vergleich GO / SGO**: Die GO-Gruppe sollte biologisch jünger sein
- **Vergleich progeroide Patienten / RASIG**: Progeroide Patienten sollten biologisch älter sein
- **Longitudinalstudie**: Nachbeobachtung von Probanden über längere Zeiträume, um ihren medizinischen / funktionellen Status zu erheben (Krankheit / Behinderung / Tod) => Welche Vorhersagekraft hatte der Index des biologischen Alters zum Zeitpunkt der Rekrutierung?

Das MARK-AGE Konsortium

#	<i>Beneficiary name</i>	<i>PI</i>	<i>Country</i>
1	Universitaet Konstanz	Alexander Bürkle	Germany
2	BioTeSys GmbH	Jürgen Bernhardt, Christiane Schön	Germany
3	Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III	Maria Blasco	Spain
4	DNage B.V.	Gerben Zondag	The Netherlands
5	Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam	Jan Hoeijmakers	The Netherlands
6	Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur	Olivier Toussaint	Belgium
8	Oesterreichische Akademie der Wissenschaften	Beatrix Grubeck-Loebenstein	Austria
9	Istituto Nazionale Riposo e Cura per Anziani	Eugenio Mocchegiani	Italy
10	NESTEC SA	Sunil Kochar	Switzerland
11	National Hellenic Research Foundation	Stathis Gonos	Greece
12	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN	Ewa Sikora	Poland
13	Institutul National de Gerontologie si Geriatrie Ana Aslan	Daniela Gradinaru	Romania
14	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu	Martijn Dollé	The Netherlands
15	StratiCELL Screening Technologies SA/NV	Michel Salmon	Belgium
16	Aarhus Universitet	Peter Kristensen	Denmark
17	Aston University	Helen Griffiths	UK
18	Vlaams Instituut voor Biotechnologie vzw	Chitty Chen	Belgium
19	Universitaet Hohenheim	Tilman Grune	Germany
20	Martin-Luther Universitaet Halle-Wittenberg	Andreas Simm	Germany
21	Alma Mater Studiorum – Università di Bologna	Claudio Franceschi	Italy
22	Unilever UK Central Resources Limited	Duncan Talbot	UK
23	Università degli Studi di Roma “La Sapienza”	Paola Caiafa	Italy
24	Université Pierre et Marie Curie – Paris 6	Betrand Friguet	France
25	Academisch Ziekenhuis Leiden - Leids Universitair Medisch Centrum	Rudi Westendorp, Eline Slagboom, Ton de Craen	The Netherlands
26	Tampereen Yliopisto	Antti Hervonen	Finland
27	Cranfield University	Richard Aspinall	UK

Das MARK-AGE Konsortium



Work package list

Work package No ¹	Work package title	Type of activity ²	Lead Beneficiary No ³	Person-months ⁴	Start month ⁵	End month ⁶
1	Recruitment of probands and physiological markers	RTD	21	504.2	1	54
2	DNA-based markers	RTD	23	276	1	60
3	Markers based on proteins and their modifications	RTD	18	287	1	60
4	Immunological markers	RTD	8	277.6	1	60
5	Clinical chemistry, hormones and markers of metabolism	RTD	14	63.5	1	60
6	Oxidative stress markers	RTD	19	228.5	1	60
7	Emergent biomarkers of ageing from model systems and novel methodological approaches	RTD	17	336	1	60
8	Data analysis and bioinformatics	RTD	1	94	9	60
9	Dissemination and training	MGT	6	86	1	60
10	Project management and ethical issues	MGT	1	223	1	60
TOTAL				2375.8		

“Work package” 1: Rekrutierung von Studienteilnehmern (m/w)

3,700 Personen sind einzubeziehen:

2,400 RASIG; ~ 1,250 GO + SGO; ~ 50 Patienten mit progeroiden Syndromen

An 8 Orten in Europa:

- Athen (Griechenland)
- Bologna (Italien)
- Hall in Tirol / Innsbruck (Österreich)
- Esslingen (Deutschland)
- Leiden (Niederlande)
- Namur (Belgien)
- Tampere (Finnland)
- Warschau (Polen)

Status von Juni 2012:

Rekrutierung fast abgeschlossen

Altersklassen: 35-39, 40-44,, 70-74. (N.B. Gilt nicht für progeroide Patienten)

Verhältnis Männer : Frauen = 1:1

WP1

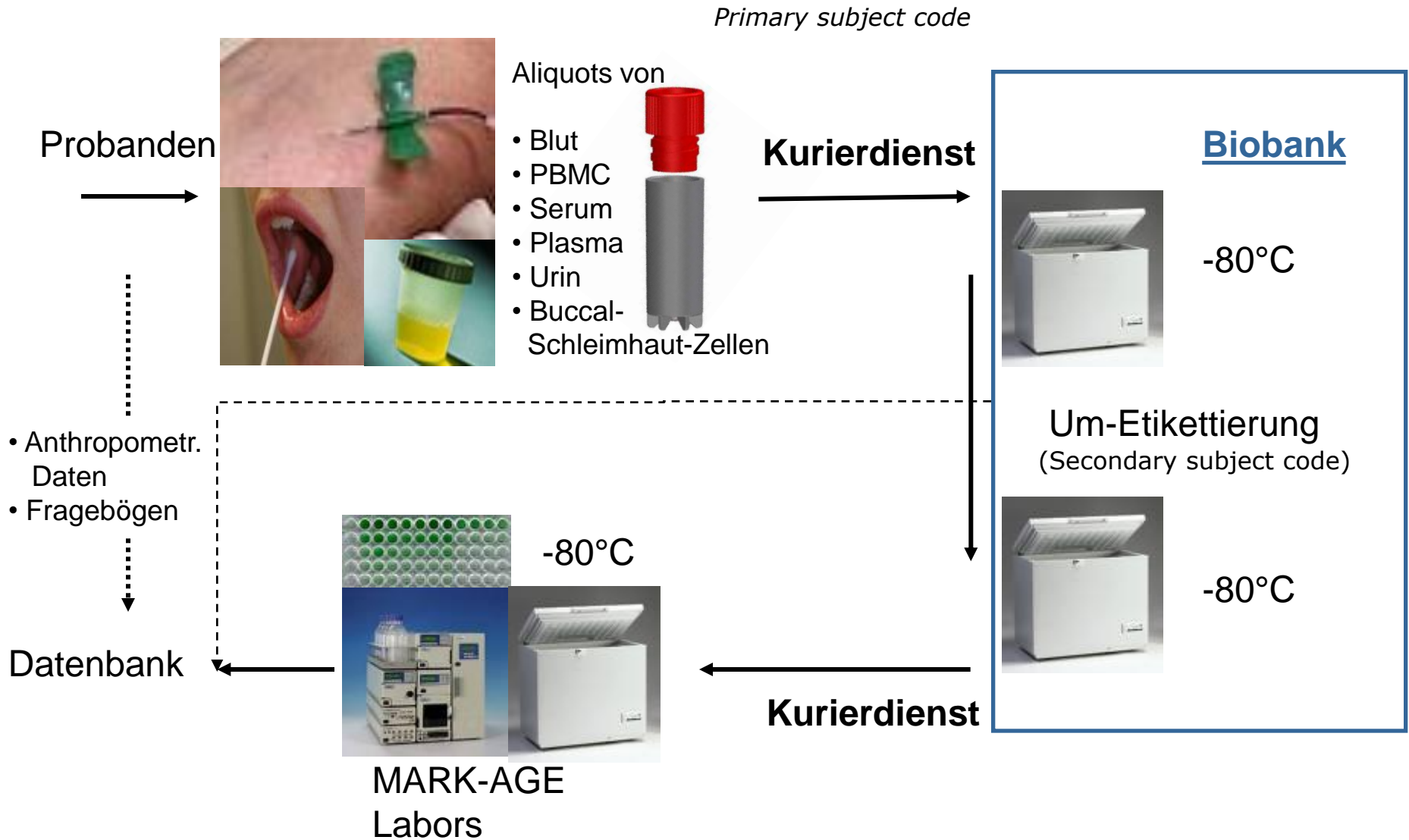
From all subjects enrolled, anthropometric, clinical and social data will be collected in a standardised fashion. Upon written informed consent, the following set of information will be obtained by using a questionnaire:

- **Demographic information:** family composition, marital status, education, occupation, and housing conditions.
- **Lifestyle:** use of tobacco and alcohol, daily activities.
- **Functional status:** Activities of Daily Living (ADL) and Norton Scale
- **Cognitive status:** STROOP test, 15-picture learning test
- **Health status:** present and past diseases, self-perceived health, number and type of prescribed drugs.
- **Mood:** ZUNG depression scale.

A **physical examination** for all probands will comprise the following:

- Body mass index
- Waist and hip circumference
- Blood pressure at rest
- Heart rate at rest
- Lung capacity- FEV1
- Lung capacity- FVC (forced expiratory vital capacity)
- Handgrip strength

Biologische Proben => Zentrale Biobank



WP 2 – “DNA-basierte Marker”

Global and subtelomeric DNA methylation
DNA methylation of the chromosomal region 11p15.5 (including <i>SIRT3</i> , <i>PMSD13</i> , <i>HRAS1</i> , <i>IGF1</i> , <i>TH</i> , <i>INS</i>)
Expression of <i>DNMT1</i> , <i>IGF2</i> , <i>PARP,1</i> <i>TERT</i>
Telomere length
DNA repair upon X-irradiation
Cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity
mtDNA mutation
APOE genotype

WP3 – “Proteinveränderungen als Marker”

N-glycans in serum	Serum
N-glycans in urine	Urine
N-glycan of IgG fraction	Serum
ApoJ/CLU	Serum
AGEs in plasma (fluorescence spectroscopy)	Plasma
Carboxymethyllysine, pentosidine, arg-pyrimidine and imidazolone	Plasma
Proteasome chymotrypsin-like activity	PBMC
Protein levels of proteasome catalytic subunit	PBMC
Protein levels of proteasome regulatory subunit	PBMC
Total methionine sulfoxide reductase (Msr) activity	PBMC
Protein levels of Msr A	PBMC
Protein levels of Msr B	PBMC

WP4 – “Immunsystem”

IgG	Serum
IgM	Serum
IgA	Serum
IgE	Serum
IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , b-FGF, IP-10, MCP-1, IFN- γ , GM-CSF, CD40	Serum
Phenotyping of T cells (CD3/CD4, CD3/CD8), B cells (CD19), NK cells (CD3/CD16+56), monocytes (CD14/CD16)	PBMC
sjTRECs	PBMC
HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, CMV viral loads	PBMC (Plasma, Urine)
CMV antibodies	Serum
Influenza A IgG antibodies	Serum
Influenza B IgG antibodies,	Serum
Measles IgG antibodies	Serum
Tetanus IgG antibodies	Serum
Interferone- γ production upon stimulation with Influenza A antigen	PBMC
Interferone- γ production upon stimulation with Influenza B antigen	PBMC
Interferone- γ production upon stimulation with Measles antigen	PBMC
Interferone- γ production upon stimulation with Tetanus antigen	PBMC
Autoantibodies against thyroglobulin	Plasma-EDTA
Autoantibodies against antinuclear antibodies	Serum
Blood counts and differential blood counts	Whole blood
Dead/apoptotic T cells (non-treated, PHA- or curcumin-treated)	PBMC
Caspase-3 positive T cells cells (non-treated, PHA- or curcumin-	PBMC

WP 5 – “Klinische Chemie, Hormone, Stoffwechselmarker” I

Blood urea nitrogen	Plasma (EDTA)
Creatinine	Plasma (EDTA)
Creatinine	Urine
Adiponectin concentration	Serum
Serum amyloid A and P	Serum
Pentraxin 3	Serum
Lipoprotein particle size classes	Serum
Transferrin	Serum
Ferritin	Serum
Alpha2-macroglobulin	Serum
Ceruloplasmin	Serum
Fasting glucose	Serum
Fasting insulin	Plasma (EDTA)
Glycosylated hemoglobin A _{1C}	Blood
Albumin	Plasma (EDTA)
Total protein	Serum
Total protein	Plasma (EDTA)

WP 5 – “Klinische Chemie, Hormone, Stoffwechsellmarker” II

Fasting triglycerides	Serum
Free fatty acids	Serum
Total cholesterol	Serum
HDL-cholesterol	Serum
LDL-cholesterol	Serum
Serotonin	Serum
High sensitive-CRP	Plasma (Heparin)
Fibrinogen	Plasma (EDTA)
Testosterone	Serum
25-Hydroxy Vitamin D	Plasma (EDTA)
PSA	Serum
DHEAS	Plasma (EDTA)
Serum iron	Serum
Gamma glutamyl transferase	Serum
Uric acid	Plasma (EDTA)
Alanine aminotransferase	Plasma (EDTA)
Homocystein	Plasma (EDTA)
Metabolomics	Urine / serum / plasma

WP 6 – “Marker für Oxidativen Stress” I

Malondialdehyde	Plasma (EDTA)
Protein carbonyls	Plasma (EDTA)
Nitrated proteins	Plasma (EDTA)
Protein oxidation	Plasma (EDTA)
LDL oxidation	Serum
Nitric Oxide (NO ₂ - + NO ₃ -)	Plasma (EDTA)
8-Isoprostane; prostaglandin F2-alpha	Urine, Plasma (heparin)
2,3-dinor 8-isoprostane; prostaglandin F1-alpha	Urine
Creatinine	Urine
Total glutathione	Blood
Total cysteine	Blood
Oxidized and reduced glutathione	Blood
Total glutathione	BMC
Retinol	Serum

WP 6 – “Marker für Oxidativen Stress” II

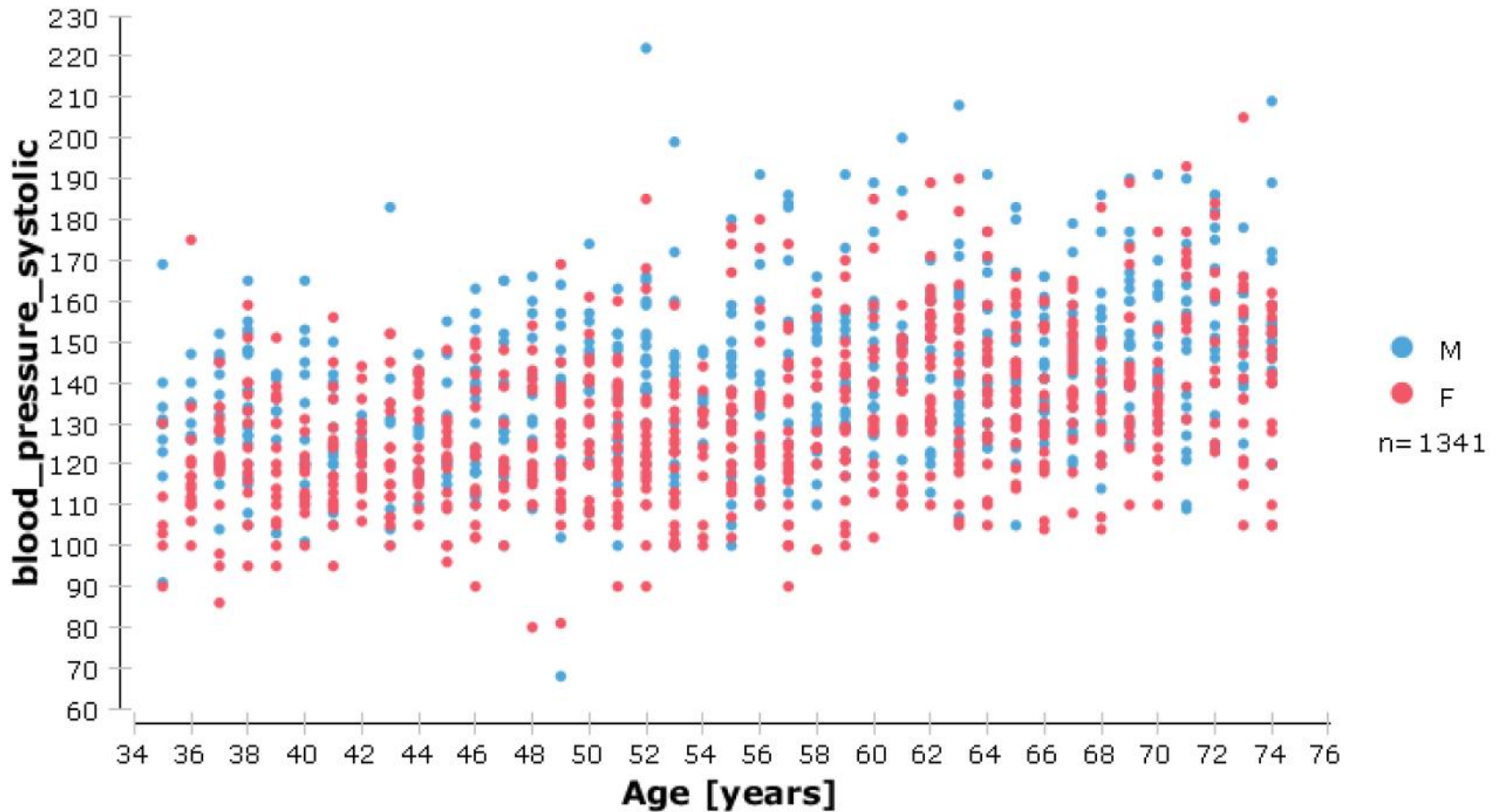
Total lutein	Plasma (EDTA)
Total zeaxanthin	Plasma (EDTA)
Beta-cryptoxanthin	Plasma (EDTA)
Total lycopene	Plasma (EDTA)
Alpha-carotene	Plasma (EDTA)
Beta-carotene	Plasma (EDTA)
Gamma-tocopherol	Plasma (EDTA)
Alpha-tocopherol	Plasma (EDTA)
Ascorbic acid	Plasma (EDTA)
Uric acid	Plasma (EDTA)
Ascorbate	BMC
Alpha-tocopherol	BMC
Beta-carotene	BMC
DNA amount	BMC
Total Zn, Cu, Se and Fe in plasma	Plasma (Heparin)
Distribution/ amount of Zn, Cu, Se and Fe among plasma proteins	Plasma (Heparin)
Metallothioneins	PBMC

WP 8 – Datenanalyse und Bioinformatik

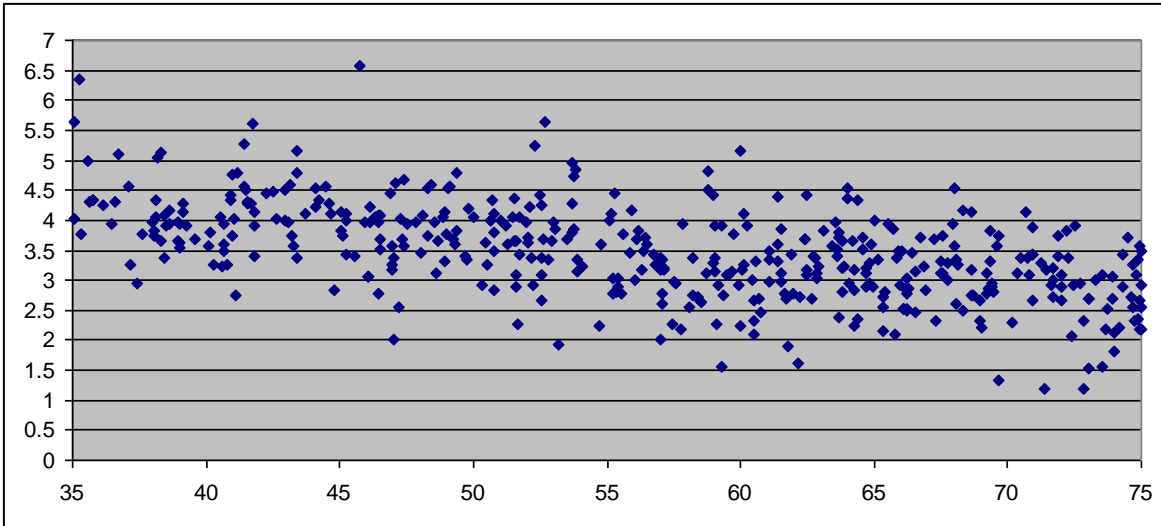
- **Data property analysis.** Partial knowledge about suspected correlations between measurements will be available and can be used to judge the noise ratio within some of these measurements using classical statistical techniques. We will also apply correlation measures to identify additional relationships between measurements. Duplicate data (collected after 6 months from 100 probands) will be used to further investigate biological and analytical variance in measurements.
- **Modeling.** Both, statistical models as well as machine learning/data mining methods will be used to build models aiming to predict biological age from the available measurements. We will use classical techniques, such as regression analysis but also aim to introduce additional knowledge (monotonicity) to improve those models. Neural Networks and Decision/Regression Trees will be used to find more local relationships within the data, for instance revealing properties that are relevant only for a subset of the chosen population.
- **Variance Reduction.** Through dimensionality reduction techniques (principal component analysis and others) we will aim to reduce the number of required measurements while, at the same time, reducing the variance in the generated predictions. Machine Learning offers ensembles of models for this purpose which allows combining different, diverse predictors to generate models with lower variance.
- **Clustering / Visualisation.** We expect to discover previously unknown or unexpected relationships in the data that define successful ageing. Data visualisation techniques and interactive methods such as visual clustering models will help uncover some of these relationships. It is expected that some measurements will have higher correlations with the biological age than others in parts of the population. Finding such clusters will further help to reduce variance in the generated models since we will be able to better model characteristics of subgroups.

Einige präliminäre Einblicke in die Charakterisierung der MARK-AGE Studienpopulation

RASIG: Systolischer Blutdruck

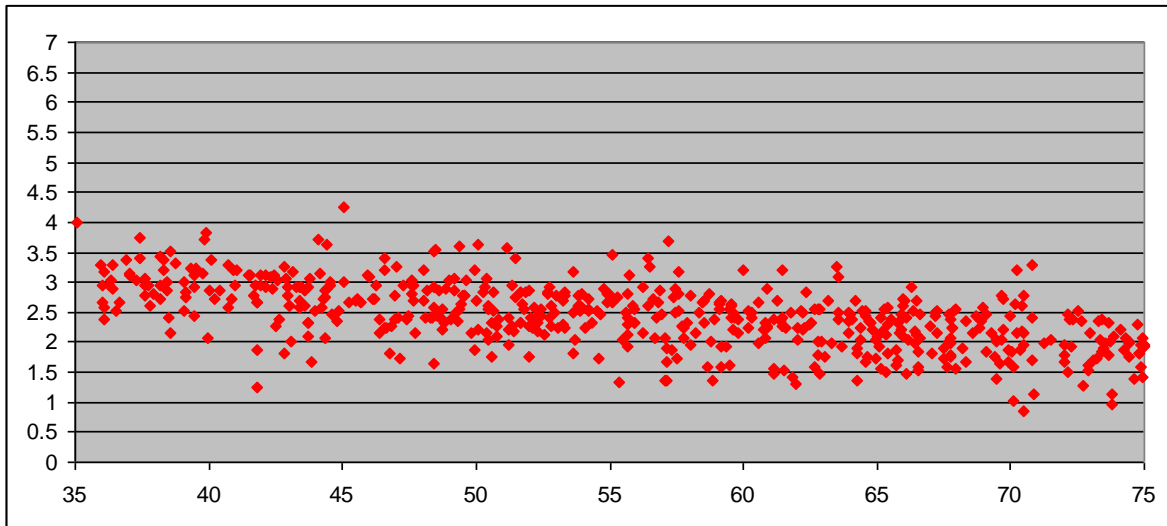


RASIG: Lungenfunktion – FEV1



Männer

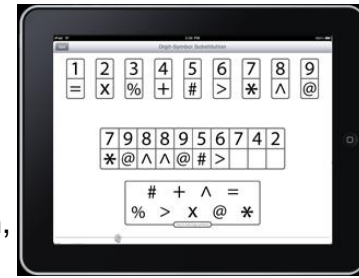
FEV1: maximales
Luftvolumen (in Liter),
welches nach voller
Inspiration innerhalb 1
Sekunde wieder ausgeatmet
werden kann



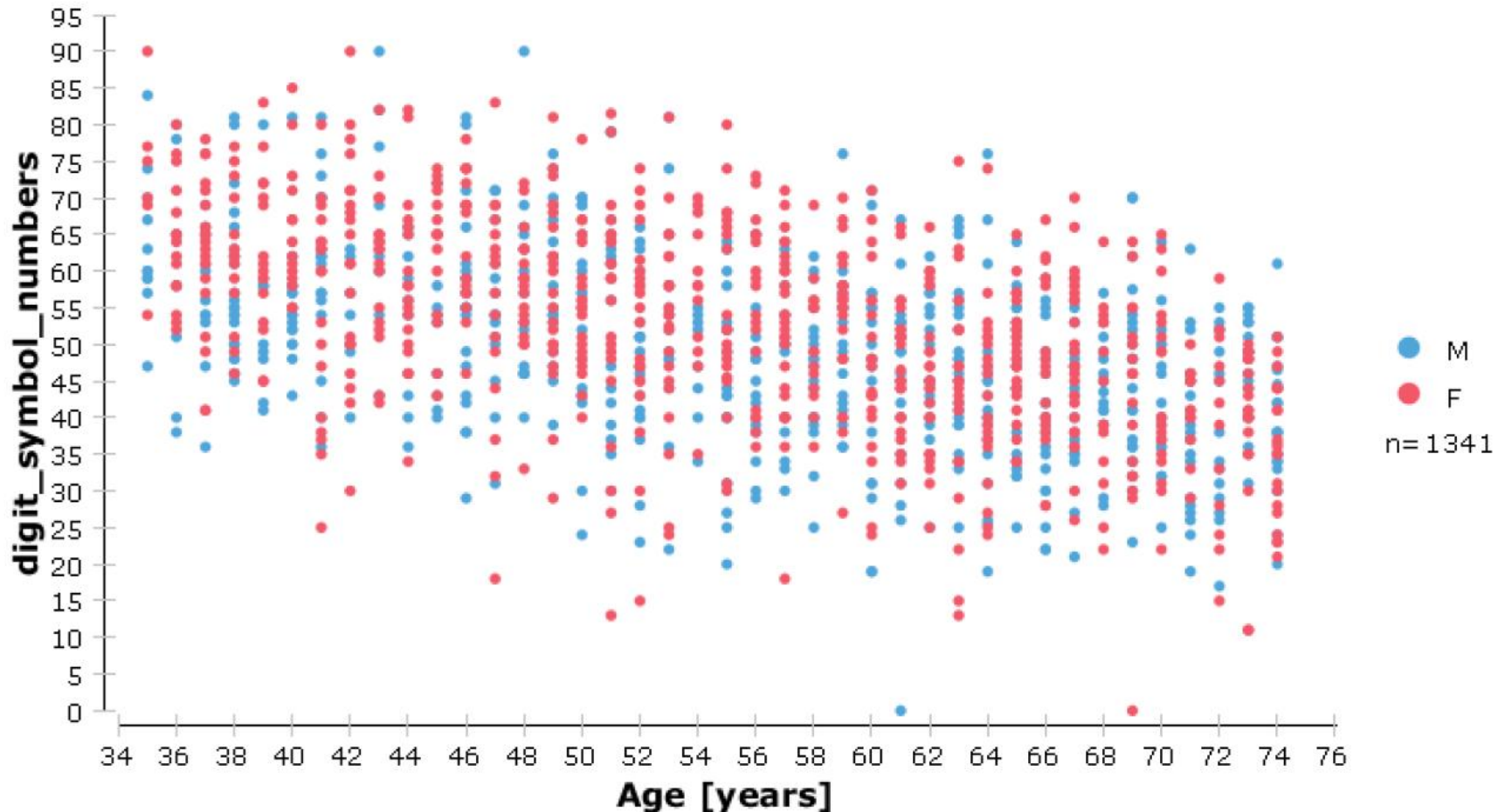
Frauen

RASIG: “Digit Symbol Substitution Test”

In einer Tabelle sind korrespondierende Paare von Zahlen [von 1 bis 9] und Symbolen aufgelistet; die Teilnehmer müssen in leere Quadrate das Symbol eintragen, welches der darüberstehenden Zahl entspricht; die Teilnehmer müssen in 90 Sekunden so viele Quadrate wie möglich ausfüllen)



[http:// brainbaseline.com](http://brainbaseline.com)



Danksagung

2	BioTeSys GmbH	Jürgen Bernhardt, Christiane Schön	Germany
3	Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III	Maria Blasco	Spain
4	DNage B.V.	Gerben Zondag	The Netherlands
5	Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam	Jan Hoeijmakers	The Netherlands
6	Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur	Olivier Toussaint	Belgium
8	Oesterreichische Akademie der Wissenschaften	Beatrix Grubeck-Loebenstein	Austria
9	Istituto Nazionale Riposo e Cura per Anziani	Eugenio Mocchegiani	Italy
10	NESTEC SA	Sunil Kochar	Switzerland
11	National Hellenic Research Foundation	Stathis Gonos	Greece
12	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN	Ewa Sikora	Poland
13	Institutul National de Gerontologie si Geriatrie Ana Aslan	Daniela Gradinaru	Romania
14	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu	Martijn Dollé	The Netherlands
15	StratiCELL Screening Technologies SA/NV	Michel Salmon	Belgium
16	Aarhus Universitet	Peter Kristensen	Denmark
17	Aston University	Helen Griffiths	UK
18	Vlaams Instituut voor Biotechnologie vzw	Chitty Chen	Belgium
19	Universitaet Hohenheim	Tilman Grune	Germany
20	Martin-Luther Universitaet Halle-Wittenberg	Andreas Simm	Germany
21	Alma Mater Studiorum – Università di Bologna	Claudio Franceschi	Italy
22	Unilever UK Central Resources Limited	Duncan Talbot	UK
23	Università degli Studi di Roma “La Sapienza”	Paola Caiafa	Italy
24	Université Pierre et Marie Curie – Paris 6	Bertrand Friguet	France
25	Academisch Ziekenhuis Leiden - Leids Universitair Medisch Centrum	Rudi Westendorp, Eline Slagboom, Ton de Craen	The Netherlands
26	Tampereen Yliopisto	Antti Hervonen	Finland
27	Cranfield University	Richard Aspinall	UK

Das Konstanz-Team

Dr Maria Moreno
Scientific Manager

Thilo Sindlinger:
IT manager

Prof Michael Berthold:
Bioinformatics

Dr Tobias Eltze
Postdoc

Lothar Gasteiger:
IT Technician

Prof Michael Junk:
Math. Modelling

**Gudrun von Scheven,
Barbara Bausch:**
Lab Technicians

Anne Keller:
Project secretary

Das Hohenheim-Team

Prof Tilman Grune:
Deputy Co-ordinator

Dr Nicolle Breusing:
Biobank Manager



Europäische Kommission:



WhyWeAge

Universität Konstanz

