

Nederlandse samenfassung

Concentratieproblemen en hyperactiviteit zijn veelvoorkomende problemen op de kinderleeftijd; de diagnose ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder) komt wereldwijd voor bij 5 tot 8% van de kinderen. Een klinische diagnose wordt gesteld wanneer er sprake is van concentratieproblemen, hyperactief en/of impulsief gedrag dat niet passend is voor de leeftijd en voorkomt in zowel de school- als de thuissituatie.

Op grond van met name tweelingonderzoek weten we dat ADHD in hoge mate erfelijk is, maar op dit moment zijn er nog geen specifieke genen bekend die van invloed zijn op deze stoornis. Van sommige omgevingsfactoren is bekend dat ze vaker voorkomen bij mensen met ADHD. Vaak is echter onzeker of er ook sprake is van een oorzakelijk effect van de omgevingsfactor op de stoornis. Het doel van dit proefschrift was om een bijdrage te leveren aan het onderzoek naar de oorzaken van ADHD door het bestuderen van specifieke genetische en omgevingsfactoren.

Het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt is uitgevoerd met behulp van gegevens die in de afgelopen 25 jaar verzameld zijn binnen het Nederlands Tweelingen Register (NTR). Ouders en leerkrachten van tweelingen hebben het gedrag van tweelingen en hun broers en zussen beoordeeld met behulp van vragenlijsten die vragen bevatten over aandachtsproblemen en hyperactiviteit. Daarnaast heeft een deel van de tweelingen en hun familieleden lichaamsmateriaal afgestaan waaruit DNA geïsoleerd kon worden voor verder genetisch onderzoek.

Het eerste deel van dit proefschrift omvat, naast een algemene inleiding in hoofdstuk één, drie hoofdstukken waarin gekeken wordt naar vroege voorspellers van aandachtsproblemen. In hoofdstuk twee werd de erfelijkheid van huilgedrag op tweejarige leeftijd onderzocht. Aan de hand van gegevens van meer dan 18.000 moeders van één- en twee-eiige tweelingen werd de erfelijkheid van regelmatig huilen zonder dat hier een duidelijke oorzaak voor is, geschat op 60% en de erfelijkheid van snel van streek zijn op 43% in jongens en 31% in meisjes. De samenhang tussen huilen zonder oorzaak en snel van slag zijn was 0.36 en werd voor een deel verklaard door genetische factoren. Naast een bijdrage van het genotype van het kind, bleken omgevingsfactoren die kinderen binnen hetzelfde gezin met elkaar delen ook van invloed. Met behulp van de uitgebreide gegevens die verzameld worden met het vragenlijstonderzoek van het NTR werd gezocht naar een verklaring voor de relatief grote invloed van de gedeelde omgeving op huilgedrag van tweelingen. Het effect van geboortecohort, zwangerschapsduur, sociaaleconomische status, leeftijd van de ouders en roken en alcoholgebruik tijdens de zwangerschap kon de invloed van de gedeelde omgeving niet verklaren. Dit gold ook voor persoonlijkheidskenmerken van de moeder. Neuroticisme van de moeder verklaarde wel een klein deel van de additief genetische component. Er zijn dus andere factoren die de relatief grote bijdrage van de gedeelde omgeving veroorzaken. Een ander belangrijke

bevinding was dat huilen zonder oorzaak en snel van streek zijn op 2-jarige leeftijd voorspellend waren voor concentratieproblemen en internaliserend en externaliserend gedrag op leeftijd zeven.

In hoofdstuk drie werd gekeken naar de relatie tussen geboortegewicht en concentratieproblemen. In overeenstemming met de resultaten van eerdere studies scoorden kinderen met een lager geboortegewicht gemiddeld hoger op concentratieproblemen op leeftijd 3, 7, 10 en 12. Een belangrijke vraag is echter of de concentratieproblemen het gevolg zijn van het lage geboortegewicht. Een alternatieve verklaring is dat het geobserveerde verband veroorzaakt wordt door een vertekend effect van onderliggende factoren die zowel een laag geboortegewicht als concentratieproblemen veroorzaken, zoals bijvoorbeeld het effect van een korte zwangerschapsduur, roken tijdens de zwangerschap, of het effect van genen die zowel geboortegewicht als concentratieproblemen beïnvloeden. Eéneiige tweelingen delen vrijwel al hun genetisch materiaal en twee-eiige tweelingen gemiddeld de helft, daarnaast delen tweelingen veel omgevingsfactoren; daarmee bieden tweelingdata een unieke gelegenheid om te testen of er sprake is van een causaal verband. Als ééneiige tweelingen die verschillen in geboortegewicht gemiddeld niet verschillen in concentratieproblemen, is dit een aanwijzing dat de concentratieproblemen niet het gevolg zijn van het lage geboortegewicht. Als dit beeld ook wordt gezien bij twee-eiige tweelingen duidt dit er op dat er gedeelde omgevingsfactoren zijn die zowel geboortegewicht als concentratieproblemen beïnvloeden. Als twee-eiige tweelingen met een verschillend geboortegewicht echter wel verschillen in concentratieproblemen, maar dit verschil is kleiner dan in de algemene bevolking, worden geboortegewicht en concentratieproblemen door dezelfde genetische factoren beïnvloed. In de studie in hoofdstuk drie werd gevonden dat bij één- en twee-eiige tweelingen met een verschillend geboortegewicht het kind met het lagere geboortegewicht gemiddeld meer concentratieproblemen had dan de tweelingbroer of zus met een hoger geboortegewicht. De verschillen in concentratieproblemen binnen tweelingparen waren vergelijkbaar met de verschillen die gezien werden in ongerelateerde paren. Dit patroon wijst op een causaal verband tussen een laag geboortegewicht en concentratieproblemen. Omdat eerder studies hebben gesuggereerd dat het negatieve effect van een laag geboortegewicht verklaard kan worden door de gevolgen van een snelle inhaalgroei na de geboorte, hebben we gekeken naar tweelingparen die beiden een laag geboortegewicht hadden, maar waarvan de één een snelle inhaalgroei doormaakte tijdens de eerste twee levensjaren en de ander niet. De scores op concentratieproblemen waren in deze tweelingen vergelijkbaar. De verklaring voor de invloed van het lage geboortegewicht moet dus eerder gezocht worden in een slechte voedingstoestand in de baarmoeder.

Eerdere studies hebben laten zien dat kinderen die borstvoeding krijgen hoger scoren op intelligentietests en beter presteren op school. Men veronderstelt dat dit verband

toe te schrijven is aan de positieve invloed van bepaalde vetzuren die in borstvoeding aanwezig zijn. In hoofdstuk vier wordt de relatie tussen borstvoeding en intelligentie en schoolprestaties onderzocht, en tevens gekeken naar het effect van borstvoeding op attentieproblemen en hyperactiviteit. Daarnaast werd onderzocht of dit verband beïnvloed wordt door genetische variatie in het FADS2 gen, een gen dat betrokken is bij het metabolisme van vetzuren. Na correctie voor opleidingsniveau van de moeder werd een effect gevonden van borstvoeding op schoolprestaties op leeftijd 12, overactief gedrag op leeftijd 3 en intelligentie gedurende de leeftijd van 5 tot 12 jaar, hoewel het effect op intelligentie slechts marginaal significant was ($p=0.05$). Er werd geen hoofdeffect gevonden van de FADS2 polymorfismen op de onderzochte kenmerken, ook was er geen interactie-effect tussen de FADS2 polymorfismen en borstvoeding. Hiermee werd een eerdere hypothese over het belang van deze interactie ontkracht.

In het afgelopen decennium is er belangrijke technische vooruitgang geboekt die het mogelijk maken om bij grote groepen mensen genetische varianten over het gehele genoom te typeren (single nucleotide polymorphisms; SNPs). In zogenaamde genom-brede associatiestudies (genome-wide association studies; GWAS) kan onderzocht worden of specifieke varianten geassocieerd zijn met menselijke kenmerken en aandoeningen, bij elkaar 'fenotypes' genoemd. In het tweede deel van dit proefschrift worden GWA studies besproken die gericht zijn op het identificeren van genen voor ADHD en een aantal andere fenotypes in kinderen. Ook wordt gekeken naar de specifieke bijdrage die SNPs leveren in het verklaren van de variantie in ADHD.

In hoofdstuk vijf werd onderzocht of er een genetische overlap is tussen de klinische vorm van ADHD en continue maten van concentratieproblemen en hyperactiviteit in de algemene populatie. In een groep kinderen uit het NTR werden polygenetische risicoscores voor ADHD berekend; deze scores vatten het genetisch risico van een individu samen op basis van de resultaten van een eerdere GWA studie. De polygenetische risicoscores op basis van de resultaten van een studie van kinderen met een ADHD diagnose bleken voorspellend voor continue scores van concentratieproblemen in dit onafhankelijke sample kinderen uit de algemene populatie. Deze resultaten bevestigen dat er een relevant signaal aanwezig is in de GWA studie van kinderen met ADHD; hoewel er nu nog geen specifieke genen voor ADHD gevonden zijn, zullen deze dus waarschijnlijk wel gevonden worden in GWA studies van een grotere omvang. Tevens wordt op deze wijze aangetoond dat er een genetische overlap is tussen een klinische ADHD diagnose en continue maten van concentratieproblemen in de algemene bevolking. Deze data ondersteunen daarmee de hypothese dat ADHD het best te begrijpen is als het extreme uiteinde van een continue verdeling van concentratieproblemen en hyperactiviteit.

Hoofdstuk zes beschrijft de resultaten van de eerste GWA meta-analyse van continue scores van ADHD symptomen in groepen kinderen uit de algemene bevolking. Deze

analyse werd uitgevoerd binnen het EAGLE (Early Genetics and Lifecourse Epidemiology) consortium; in totaal waren data beschikbaar voor 17,560 kinderen uit negen Europese studies. Continue scores van ADHD symptomen waren beschikbaar op grond van leerkracht of ouderbeoordelingen op de kinderleeftijd. De beschikbare SNP datasets werden geïmputeerd met behulp van de maart 2012 release van de 1000 Genomes referentieset, waarbij informatie uit de referentieset wordt gebruikt om niet gemeten varianten te schatten bij alle deelnemers. Dit maakt het mogelijk om een meta-analyse uit te voeren over cohorten die verschillende SNP datasets gegenotypeerd hebben. In elk cohort werden de ADHD scores voorspeld uit genotype score, geslacht, leeftijd en een set principale componenten die onder andere corrigeren voor populatiestructuur. Vervolgens werd een meta-analyse uitgevoerd op basis van p-waardes. Geen van de genetische varianten bereikte een p-waarde die significant was na correctie voor het grote aantal uitgevoerde tests. Ook een analyse van de data op het niveau van genen en biologische netwerken resulteerde niet in significante resultaten. Grotere studies zijn dus nodig om genetische varianten voor ADHD te identificeren; de inclusie van al bestaande cohort studies naast data uit klinische studies kan helpen om deze aantallen te bereiken. De laagste p-waardes werden gezien voor varianten in de genen PBX4 en WASL, die beide tot expressie komen in het brein. Met name de lage p-waarde voor WASL is hierbij een interessante bevinding, dit gen speelt een rol in de vorming van het celskelet van neuronen, onder andere door het verlengen van de uitlopers ervan. Een eerdere analyse van gepubliceerde ADHD GWA studies kwam met een overeenkomstig resultaat, namelijk dat genen die betrokken zijn in de groei van uitlopers van neuronen een belangrijke rol spelen in het ontstaan van ADHD.

Naast deze analyses naar ADHD heb ik tijdens mijn aio-periode ook verschillende GWA analyses uitgevoerd voor meta-analyses die werden verricht binnen twee grote internationale consortia, waar ook de hierboven geschetste aanpak van imputatie, GWA en meta-analyses wordt gehanteerd. Deze worden beschreven in hoofdstuk zeven. Voor het EAGLE en EGG (Early Growth Genetics) consortium werden analyses uitgevoerd op een aantal fenotypes op de kinderleeftijd zoals geboortegewicht, body mass index (BMI), lengte, eczeem, puberteitsstadia en motorische ontwikkeling. Een aantal van deze studies hebben geleid tot identificatie van genen die niet eerder geassocieerd waren met deze fenotypes, voor andere studies worden de resultaten van de meta-analyse nog verwacht. In dit hoofdstuk wordt ook de data cleaning beschreven van een grote genotypische dataset van jonge tweelingen en hun familieleden uit het NTR die gegenotypeerd werden in het kader van het DETECT project (Developmental Trajectories in Twins); deze dataset vormt de basis voor de beschreven GWA analyses.

De laatste jaren hebben ongekende mogelijkheden gebracht voor het identificeren van specifieke genetische varianten die de erfelijkheid van aandoeningen zoals ADHD

bepalen. De toepassing van genoom-brede analyses heeft veel succes gehad en geleid tot identificatie van nieuwe genen, zoals bijvoorbeeld voor eczeem. Voor ADHD zijn echter nog geen specifieke genen gevonden. Dit komt waarschijnlijk door de fenotypische en genetische heterogeniteit van de aandoening, de kleine effecten van individuele genetische varianten en de grote aantallen deelnemers die daarom nodig zijn om genen te detecteren. Een grotere statistische power is in de toekomst wellicht te realiseren door het samenvoegen van resultaten van klinische samples met cohorten uit de algehele bevolking en het analyseren van continue scores in plaats van klinische diagnoses.

Ook nu er grote stappen gemaakt worden in het genetisch onderzoek blijft onderzoek naar omgevingsfactoren van belang. Als een omgevingsfactor geassocieerd is met ADHD, is het belangrijk aannemelijk te maken dat een causaal verband onderliggend is aan een associatie, tweelingdata kunnen hierbij behulpzaam zijn. Wanneer zowel de genetische als de omgevingsfactoren voor ADHD overtuigend zijn vastgesteld kan onderzoek naar specifieke gen-omgevingsinteracties en onderliggend biologische mechanismes verder voortgang vinden. Zo kan helderheid worden verkregen over de etiologie van de aandoening en kan een bijdrage worden geleverd aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden.