

Nederlandse samenvatting

In landen met een middelmatig tot hoog inkomen vormen complexe ziekten, in het bijzonder hart- en vaatziekten en psychische stoornissen, de belangrijkste oorzaak van ziektebelasting¹. Complexe ziekten vertonen geen duidelijk patroon van overerving en er wordt aangenomen dat ze het gevolg zijn van een samenspel tussen genetische factoren en omgevingsfactoren. De onderliggende ziektemechanismen kunnen waarschijnlijk het beste worden begrepen wanneer ze worden bestudeerd vanuit verschillende invalshoeken. In dit proefschrift worden verschillende methoden toegepast om complexe eigenschappen die aan ziekten gerelateerd zijn, met de nadruk op het metabool syndroom en inflammatoire markers, te bestuderen.

Het metabool syndroom

Het metabool syndroom is de benaming voor een combinatie van gezondheidsklachten die nauw samenhangen met overgewicht². Personen met metabool syndroom hebben een verdubbeld risico op hart- en vaatziekten en een meer dan vijfvoudig verhoogd risico op type 2 diabetes². Ook hebben zij een verhoogd risico op vele andere ziekten, waaronder depressie³. Een persoon krijgt de diagnose metabool syndroom als ten minste drie van de volgende kenmerken boven een bepaalde klinische drempel liggen: buikomvang, body-mass-index (BMI), taille-heup-ratio, glucoseniveau in bloed, insulineniveau in bloed, systolische bloeddruk, diastolische bloeddruk, HDL-cholesterol en/of triglyceriden. Het wordt algemeen verondersteld dat obesitas (in het bijzonder vet in de buikstreek) en insulineresistentie de belangrijkste onderliggende factoren zijn die het ziektebeeld van metabool syndroom veroorzaken. Meerdere studies suggereren dat de ziektes die verband houden met overgewicht (bijvoorbeeld type II diabetes en hart- en vaatziekten) het gevolg zijn van chronische over-activatie van cellulaire stress signaleringsmechanismen en ontstekingsreacties als gevolg van overmatige energie inname^{4, 5}. Bij personen met obesitas scheidt het vetweefsel zogenaamde pro-inflammatoire cytokines zoals TNF-alfa en IL-6 af^{6, 7}. Deze moleculen stimuleren vervolgens de afgifte van zogenaamde acute fase-eiwitten (bijvoorbeeld fibrinogeen en CRP)⁸. Als gevolg van obesitas en/of overmatige energieopname vinden ook ontstekingsreacties plaats in de lever, pancreas en hersenen die bijdragen aan obesitas gerelateerde aandoeningen⁹⁻¹¹. In Nederland heeft 14% van de bevolking metabool syndroom¹² en in de Verenigde Staten zelfs 37%¹³. Het metabool syndroom komt vaker voor onder mannen¹⁴ en onder oudere personen^{12, 15}. De toenemende prevalentie van het metabool syndroom is waarschijnlijk het gevolg van de stijgende prevalentie van obesitas¹⁶.

Obesitas en veranderingen in levensstijl

In de periode tussen 1980 en 2008 is de wereldwijde prevalentie van obesitas bijna verdubbeld; van 6,4% naar 12%¹⁷. In Nederland was de prevalentie van overgewicht en obesitas in 2008 respectievelijk 47,8% en 16,2% bij volwassenen (leeftijd 20+)¹⁸. Er is geen twijfel dat de uitbraak van overgewichtgerelateerde ziekten te maken heeft met de hedendaagse levensstijl. Wereldwijd is de gemiddelde calorie-inname per persoon toegenomen met 450 kcal per dag tussen de 1960 en eind jaren '90¹⁹. Volgens een publicatie uit 2012 is 31,1% van alle volwassen individuen wereldwijd (leeftijd 15+) "fysiek inactief"²⁰. Men denkt dat obesitas en vele andere hedendaagse complexe ziekten het gevolg zijn van een 'mis-match' tussen onze huidige leefstijl en onze evolutionaire geschiedenis, een onderwerp dat ik toelicht in **hoofdstuk 8** van mijn proefschrift.

Tegenwoordig leven we in welvarende landen allemaal in een omgeving die gewichtstoename bevordert. Omgevingen en banen beperken bijvoorbeeld de noodzaak om fysiek actief te zijn en voedsel met veel calorieën is beschikbaar voor iedereen. Toch ontwikkelt niet iedere personen obesitas en heeft niet iedere zwaarlijvige individu metabool syndroom. Dit suggereert dat individuen verschillen in hun gevoeligheid voor het ontwikkelen van overgewicht, obesitas en metabole ziekten.

Erfelijkheid

In samenlevingen waarin de meerderheid van de bevolking voldoende voedsel ter beschikking heeft worden verschillen in BMI tussen personen grotendeels verklaard door genetische factoren²¹. Hetzelfde geldt voor inflammatoire markers (zoals TNF-alfa en IL-6), cholesterolniveau, bloedglucose en bloeddruk²². In de laatste jaren zijn verschillende varianten in de DNA-code (risico allelen) ontdekt die individuele verschillen in deze eigenschappen veroorzaken²³⁻²⁵.

Naast het onderzoek naar de DNA-code zijn grote studies van menselijke populaties nu ook begonnen met het onderzoeken van andere vormen van moleculaire variatie die menselijke complexe eigenschappen beïnvloeden. Zo hebben recente studies gevonden dat BMI²⁶, type 2 diabetes²⁷ en vaatziekten²⁸ samenhangen met zogenaamde epigenetische variatie.

Epigenetica en DNA methylering

Bijna iedere cel in het menselijk lichaam bevat dezelfde DNA-code (het genoom) die een persoon erft van zijn/haar ouders. Op basis van dit ene genoom worden vele verschillende celtypes (bijvoorbeeld huidcellen en hersencellen) en organen gevormd doordat verschillende genen op het juiste moment worden aan- en uitgeschakeld in elke cel. Deze regulatie van genactiviteit ("genexpressie") wordt gecoördineerd in elke cel door talrijke mechanismen die gezamenlijk beïnvloeden hoe strak het DNA-molecuul

opgerold ligt²⁹. DNA methylatie is één van deze mechanismen, die ik bestudeer in deel 3 van mijn proefschrift. DNA methylatie houdt in dat een methyl-groep (CH₃) op bepaalde plekken aan het DNA molecuul wordt bevestigd. De mate van methylatie van een gen kan bepalen hoe actief dit gen is. Terwijl de genetica traditioneel de DNA-code bestudeert, heeft de epigenetica betrekking op de studie van de moleculaire mechanismen die genexpressie beïnvloeden³⁰.

De DNA-code verandert nauwelijks gedurende het leven. DNA-methylatie en andere epigenetische mechanismen kunnen wel veranderen gedurende de ontwikkeling³¹, als onderdeel van het ouder worden³², en als gevolg van specifieke omgevingsfactoren, zoals roken³³. Daarom kan het bestuderen van deze epigenetische mechanismen mogelijk licht werpen op ziektemechanismen die verborgen zouden blijven als we ons alleen focussen op de DNA-code. Epigenetische mechanismen kunnen mogelijk ook verklaren waarom eeneiige tweelingparen vaak “discordant” zijn voor complexe ziekten (wat betekent dat één van de twee tweelingen de ziekte heeft en de ander niet). Hoewel eeneiige tweelingen dezelfde DNA-code hebben, kunnen zij wel verschillen in de methylatie van hun DNA. Dit heb ik onderzocht in **hoofdstuk 7**.

Onderzoeksvragen

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek wordt gekenmerkt door twee belangrijke thema's: het eerste heeft betrekking op de vraag in welke mate verschillen tussen personen in inflammatoire markers en kenmerken van het metabool syndroom worden veroorzaakt door genetische factoren en omgevingsfactoren. De tweede belangrijke focus van dit proefschrift ligt op het onderzoeken van de rol van genen en omgeving in variatie tussen personen in DNA-methylatie. Deze onderzoeksthema's zijn het onderwerp van een reeks hoofdstukken waarin ik gegevens analyseer die werden verzameld in tweelinggezinnen die deelnemen aan onderzoek van het Nederlands Tweelingen Register. De rol van genen en omgeving wordt onderzocht met behulp van statische analyses waarin de gelijkenis van eeneiige en twee-eiige tweelingen en hun familieleden wordt vergeleken, en met behulp van analyses die gebruik maken van gemeten genetische varianten in de DNA-code.

Hoofdstuk 3 van dit proefschrift (over interleukine-6 receptorconcentratie in bloed) laat zien hoe deze verschillende benaderingen kunnen worden gecombineerd om de bijdrage van reeds geïdentificeerde genetische varianten aan een complexe eigenschap te schatten versus genetische varianten die nog ontdekt moeten worden.

Deel 1: Erfelijkheid van inflammatoire markers

In het eerste deel van dit proefschrift (**hoofdstuk 2 en 3**) heb ik de invloed van genetische factoren en omgevingsfactoren op de concentratie van inflammatoire markers in bloed onderzocht, waaronder pro-inflammatoire cytokines (IL-6 en TNF- α), een cytokine receptor (sIL-6R) en de acutefase-

eiwitten fibrinogeen en CRP. Door concentraties van deze moleculen te vergelijken tussen tweelingen, en hun broers, zussen en ouders, heb ik de erfelijkheid van deze eigenschappen geschat. De erfelijkheid geeft weer hoeveel procent van de variatie in concentraties tussen personen wordt verklaard door genetische verschillen. Ik vond dat de variatie in al deze inflammatoire markers in belangrijke mate verklaard wordt door genetische variatie. De niveaus van sIL-6R in bloed bijvoorbeeld waren zeer erfelijk (72% van de verschillen in concentraties tussen personen kwam door genetische verschillen). De bijdrage van specifieke varianten in de DNA-code aan de erfelijkheid van een eigenschap kan worden onderzocht door de klassieke schatting van erfelijkheid te combineren met de analyse van gemeten varianten in de DNA-code. In **hoofdstuk 3** heb ik deze combinatie van methoden toegepast op de concentratie van sIL-6R in bloed. De variatie in sIL-6R concentratie tussen personen wordt grotendeels verklaard door één enkele variant (rs2228145) in het *IL6R* gen die de productie van sIL-6R beïnvloedt. Voor de meeste complexe eigenschappen is het juist zo dat de variatie tussen personen door heel veel DNA-varianten wordt beïnvloed wordt en dat ieder van deze varianten afzonderlijk maar een heel klein effect heeft.

Deel 2: Invloed van genetische factoren en omgevingsfactoren op BMI en andere kenmerken van het metabool syndroom

In het tweede deel van mijn proefschrift heb ik de erfelijkheid van lengte en kenmerken van het metabool syndroom onderzocht, waaronder BMI, buikomvang, taille-heup-ratio, lipiden, bloed glucose en insuline en bloeddruk (**hoofdstuk 4**). Lengte, BMI en middelomtrek waren de meest erfelijke eigenschappen (erfelijkheid = 90%, 78%, en 76%). Lipiden en bloeddruk waren ook zeer erfelijk (erfelijkheid = 59% en 69%) en taille-heup-ratio, insuline niveau en glucose niveau waren matig erfelijk (erfelijkheid = 49%, 47%, en 53%).

In **hoofdstuk 5** heb ik de invloed van genen en omgeving op BMI op een andere manier bestudeerd, namelijk door het BMI van eenenige tweelingen die tussen 1991 en 2011 aan NTR onderzoek hebben meegedaan over de tijd heen te vergelijken. De belangrijkste bevinding was dat grote verschillen in BMI tussen eenenige tweelingen ("BMI discordantie", gedefinieerd als een verschil van tenminste 3 kg / m²), zeer zeldzaam zijn, zeker op de lange termijn. BMI discordantie kwam vaker voor op de latere tijdstippen van het onderzoek. Gedurende de periode van het onderzoek steeg ook het gemiddelde BMI en de leeftijd van tweelingparen (gemiddelde leeftijd bij vragenlijst 1 = 17 jaar, gemiddelde leeftijd bij vragenlijst 8 = 34 jaar). Ik vond dat van alle eenenige tweelingen die op een bepaald punt in hun leven discordant werden, de meesten later al snel weer een vergelijkbaar BMI hadden. Deze bevindingen suggereren dat mensen een bepaald "set-point" van BMI hebben welke sterk genetisch bepaald is en dat dit set-point kan vervagen na grote gewichtstoename, waardoor eenenige tweelingen naarmate zij zwaarder

worden ook meer van elkaar gaan verschillen. Een andere belangrijke bevinding van dit onderzoek was dat tweelingen die discordant zijn voor BMI ook verschillen vertoonden in de concentraties van metabole biomarkers (bijvoorbeeld bloedglucosewaarden) en inflammatoire markers in bloed. Deze verschillen waren niet aanwezig in eenige tweelingparen die pas later in hun leven discordant werden voor BMI. Deze bevindingen illustreren dat de concentraties van deze biomarkers niet voorspellen of een persoon een hoog BMI zal ontwikkelen, maar dat ongezonde niveaus van deze biomarkers het gevolg zijn van gewichtstoename.

Deel 3: Bovenop de DNA-code: Epigenetica

Een toenemend aantal studies wijst op het belang van epigenetische mechanismen, zoals DNA methylering, voor de in deel 1 en 2 van mijn proefschrift onderzochte eigenschappen. In deel 3 van dit proefschrift heb ik de oorzaken van variatie tussen mensen in de mate van methylering van hun DNA onderzocht. In **hoofdstuk 6** beschrijf ik dat het methylering-niveau op vele plekken van het DNA in bloed erfelijk is en dat er ook veel locaties zijn waar een groot deel van de variatie is toe te schrijven aan niet-genetische invloeden, waaronder de omgeving van een persoon en stochastische processen. In dit hoofdstuk onderzocht ik niet alleen de 'totale erfelijkheid' van DNA-methylering niveaus maar onderzocht ik ook hoeveel van de verschillen in DNA methylering tussen personen verklaard kunnen worden op basis van alle varianten in de DNA-code die wij bij personen hebben gemeten. De totale erfelijkheid van DNA-methylering niveau was gemiddeld 22%. Gemiddeld 7% van de variatie in DNA methylering werd verklaard door alle gemeten varianten in de DNA-code. In hoofdstuk 6 liet ik ook zien dat er een groot aantal plekken in het genoom is waar de erfelijkheid van DNA methylering afneemt met leeftijd, een kleiner aantal plekken waar de erfelijkheid toeneemt met leeftijd, en ik vond plekken waar de erfelijkheid van DNA methylering verschilt tussen mannen en vrouwen. Deze bevindingen kunnen mogelijk inzicht geven in ziektes die pas op latere leeftijd ontstaan en ziektes die vaker in mannen of vrouwen voorkomen.

Grootschalige epigenetische studies in levende mensen zijn alleen mogelijk als DNA wordt verkregen uit gemakkelijk bereikbaar weefsel. In **hoofdstuk 6** onderzocht ik DNA-methylering in bloedmonsters en in **hoofdstuk 7** bestudeerde ik methylering van DNA verkregen uit wangslimvlies van eenige tweelingparen. Wangstrijkjes zijn makkelijker te verzamelen dan bloedmonsters, zeker bij (jonge) kinderen. De resultaten uit **hoofdstuk 7** lieten zien dat DNA methylering in wangslimvlies, vergelijkbaar met mijn bevindingen in bloed, beïnvloed wordt door zowel genetische factoren als omgevingsfactoren. Ook vond ik in **hoofdstuk 7** dat methylering van sommige locaties in het DNA in eenige tweelingen meer verschilt dan op andere locaties. Mogelijk zijn locaties die meer verschillen in eenige tweelingen gevoeliger voor veranderingen door de omgeving of voor stochastische invloeden.

Deel 4: Tweelingstudies en complexe eigenschappen: Toekomst en verdere overwegingen

Voor complexe ziekten en eigenschappen zoals type II diabetes, insuline niveau en cholesterol zijn al vele genen geïdentificeerd. Studies naar psychische stoornissen waren aanvankelijk minder succesvol in het identificeren van genen. Voor schizofrenie bijvoorbeeld, verklaren de tot nu toe ontdekte genetische varianten slechts een heel klein deel van de totale variatie. Mogelijk is het zo moeilijk om genetische varianten te vinden die een groot deel van het risico op psychiatrische stoornissen verklaren door de evolutionaire geschiedenis van deze aandoeningen. Hierover gaat **hoofdstuk 8**, waarin ik een samenvatting heb gemaakt van evolutionaire theorieën die zijn voorgesteld om te verklaren waarom schizofrenie, een van de meest ernstige en meest erfelijke psychische stoornissen, blijft voortbestaan in de populatie ondanks dat patiënten vaak geen (of minder) kinderen krijgen. Voorgestelde evolutionaire verklaringen zijn 'balancing selection', 'fitness trade-offs', wisselende omgevingen, seksuele selectie, mutatie-selectie balans en genomische conflicten.

Al decennia lang geeft het klassieke tweelingmodel inzicht in de rol van genen en omgeving in verschillen in menselijke complexe eigenschappen, zoals ziekte en gedrag. In **hoofdstuk 9** beschrijf ik onderzoeksvragen die kunnen worden onderzocht door het klassieke tweelingmodel of het discordante tweelingmodel toe te passen op moleculaire karakteristieken, zoals "metabolomics", genexpressie, het microbioom en epigenetische mechanismen. Discordante eeneiige tweelingparen kunnen in de toekomst bijdragen aan nieuwe inzichten in de rol van epigenetische mechanismen in complexe ziekten.

Referentielijst

1. Mathers,C., Fat,D.M., & Boerma,J.T. *The global burden of disease: 2004 update*(World Health Organization,2008).
2. Cornier,M.A. *et al.* The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **29**, 777-822 (2008).
3. Pan,A. *et al.* Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Diabetes Care* **35**, 1171-1180 (2012).
4. Ozcan,U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461 (2004).
5. Stienstra,R., Tack,C.J., Kanneganti,T.D., Joosten,L.A., & Netea,M.G. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab* **15**, 10-18 (2012).
6. Berg,A.H. & Scherer,P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **96**, 939-949 (2005).
7. Hotamisligil,G.S., Arner,P., Caro,J.F., Atkinson,R.L., & Spiegelman,B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **95**, 2409-2415 (1995).
8. Shoelson,S.E., Lee,J., & Goldfine,A.B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **116**, 1793-1801 (2006).
9. Cai,D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* **11**, 183-190 (2005).
10. De Souza,C.T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192-4199 (2005).
11. Ehses,J.A. *et al.* Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 2356-2370 (2007).
12. Bos,M.B. *et al.* The prevalence of the metabolic syndrome in the Netherlands: increased risk of cardiovascular diseases and diabetes mellitus type 2 in one quarter of persons under 60. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* **151**, 2382-2388 (2007).
13. Cameron,A.J., Shaw,J.E., & Zimmet,P.Z. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **33**, 351-375 (2004).
14. Dekker,J.M. *et al.* Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation* **112**, 666-673 (2005).
15. Oosterwerff,M.M., van Schoor,N.M., Lips,P., & Eekhoff,E.M. Osteocalcin as a predictor of the metabolic syndrome in older persons: a population-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **78**, 242-247 (2013).
16. National Institutes of Health. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/ms/>. Accessed on 03/11/. 2014.
17. Stevens,G.A. *et al.* National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul. Health Metr.* **10**, 22 (2012).
18. World Health Organization. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/. Accessed on 12/06/. 2014.
19. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World agriculture: towards 2015/2030 (Summary report). 2012. Rome.
20. Hallal,P.C. *et al.* Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet* **380**, 247-257 (2012).
21. Elks,C.E. *et al.* Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol. (Lausanne)* **3**, (2012).

22. Pilia,G. *et al.* Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians. *PLoS Genet* **2**, e132 (2006).
23. Dupuis,J. *et al.* New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* **42**, 105-116 (2010).
24. Global Lipids Genetics Consortium Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* **45**, 1274-1283 (2013).
25. Speliotes,E.K. *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* **42**, 937-948 (2010).
26. Dick,K.J. *et al.* DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet* **383**, 1990-1998 (2014).
27. Dayeh,T. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS. Genet.* **10**, e1004160 (2014).
28. Connelly,J.J. *et al.* Epigenetic regulation of COL15A1 in smooth muscle cell replicative aging and atherosclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 5107-5120 (2013).
29. Goldberg,A.D., Allis,C.D., & Bernstein,E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-638 (2007).
30. Bird,A. Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**, 396-398 (2007).
31. Reik,W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425-432 (2007).
32. Horvath,S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14**, R115 (2013).
33. Philibert,R.A., Beach,S.R., Lei,M.K., & Brody,G.H. Changes in DNA methylation at the aryl hydrocarbon receptor repressor may be a new biomarker for smoking. *Clin. Epigenetics.* **5**, 19 (2013).