

Nieuwe aanknopings- punten naar ontstaan eeneiige tweelingen

Een internationale groep onderzoekers, onder leiding van dr. Jenny van Dongen van de Vrije Universiteit Amsterdam, heeft een baanbrekende ontdekking gedaan. Deze kan leiden tot nieuwe inzichten in het ontstaan van eeneiige tweelingen. De onderzoekers vonden een uniek epigenetisch profiel bij eeneiige tweelingen, dat ze een epigenetische handtekening voor eeneiige tweelingen noemen. De bevindingen betekenen een enorme stap vooruit in ons begrip van hoe identieke tweelingen ontstaan.

Nick en Carl. Epigenetis: de sleutel om het mysterie van identieke tweelingen te ontgaten?

TEKST
DR. JENNY VAN DONGEN, UNIVERSITAIR DOCENT, NEDERLANDS TWEELINGEN REGISTER, AFDELING
AFSTEMMING EN VERBODEN VERHOUDINGEN, AFD. GENETIEK, NEDERLANDS TWEELINGEN REGISTER,
STUDENT AVERA INSTITUTE FOR HUMAN GENETICS, SIOUX FALLS, SOUTH DAKOTA. DR. ERK EHLI,
WETENSCHAPPELIJK DIRECTEUR, AVERA INSTITUTE FOR HUMAN GENETICS, SIOUX FALLS, SOUTH
DAKOTA. PROF. DR. DORRETT I. BOONSHA, HOOGLEERAAR, NEDERLANDS TWEELINGEN REGISTER,
AFDELING BIOLOGISCHE PSYCHOLOGIE, VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM

'De oorsprong en geboorte van identieke tweelingen zijn altijd een compleet mysterie geweest'

Identieke tweelingen, ook wel monozygote (MZ) tweelingen genoemd, kunnen veel verwarring veroorzaken bij ouders en vrienden. Ze leveren ook aantrekkelijk beeldmateriaal op voor tijdschriften en kunstenaars.

Ondanks een eeuw van enorme vooruitgang in de wetenschap hebben we nog steeds vrijwel geen idee hoe MZ tweelingen eigenlijk ontstaan. Ze lijken willekeurig op te duiken in families en komen over de hele wereld voor met een gelijke frequentie van ongeveer vier per duizend geboorten. Noch onderzoek naar een mogelijke genetische aanleg, noch studies naar omgevingsfactoren, hebben veel licht geworpen op de reden waarom MZ tweelingen ontstaan.

Daarentegen is er grote vooruitgang geboekt in het begrijpen van de biologische oorsprong van niet-identieke (dizygote/DZ) tweelingen, die in sommige families vaker voorkomen dan in andere. Dat wijst op genetische invloeden. Het is daarom niet verrassend dat genetische associatiestudies, waarin wordt gezocht naar associaties tussen het krijgen van DZ tweelingen en DNA-varianten, succesvol zijn gebleken in het identificeren van genen die bijdragen aan het ontstaan van DZ tweelingen. De mechanismes die leiden tot deze twee types van tweelingen zijn heel verschillend. DZ tweelingen ontstaan na een dubbele ovulatie bij de moeder, waarbij de genetische aanleg van de moeder een belangrijke rol speelt. Eenige tweelingen komen voort uit een enkel embryo dat zich in een vroeg stadium van de zwangerschap in tweeën splitst. Tot op heden is niet bekend waarom deze splitsing optreedt.

BAANBREKENDE ONTDEKKING

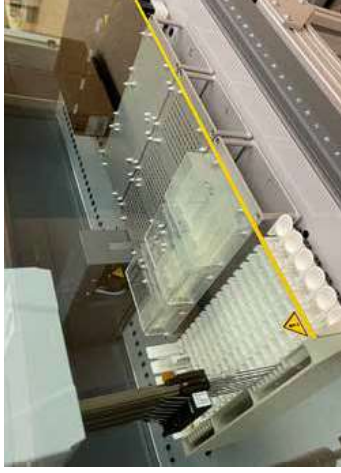
Een groep internationale onderzoekers heeft nu een belangrijke ontdekking gedaan: epigenetische informatie in de chromosomen verschilt tussen identieke tweelingen en andere personen. Deze epigenetische verschillen zitten niet in de DNA-code zelf, maar in kleine chemische groepen, methylgroepen, die aan het DNA vastzitten. Tweelingregisters uit Nederland,

Groot-Brittannië, Finland en Australië werkten samen in dit onderzoek. De onderzoekers maten het methylatieniveau op meer dan 400.000 plaatsen in het DNA van meer dan zesduizend tweelingen uit deze registers. De onderzoekers vonden 834 locaties in het DNA waar het methylatieniveau bij eenige tweelingen anders was dan bij dizygote- en niet-tweelingen. Dit is een baanbrekende ontdekking, want de oorsprong en geboorte van identieke tweelingen zijn altijd een compleet mysterie geweest. Het is een van de weinige eigenschappen waarin genetica geen of een zeer bescheiden rol lijkt te spelen. Dit is de eerste keer dat we een biologische marker van dit fenomeen bij mensen hebben gevonden. De verklaring lijkt niet in het genoom te liggen, maar in het epigenoom.

EPIGENOOM

Rondom de bouwstenen van DNA (de DNA-code) bevinden zich controle-elementen die bepalen hoe genen worden afgestemd en hoe sterk ze tot uiting komen. Epigenetische regulatie van genexpressie regelt de functionele activiteit van promotors van genen en andere regulerende gebieden van het genoom. DNA-methylatie is een van de epigenetische processen die genexpressie reguleren, door een methylgroep (CH₃) toe te voegen aan cytosine-fosfaat-guanine (CpG) dinucleotiden in het genoom (C en G zijn twee van de vier bouwstenen van de DNA-code). De aanhechting van een methylgroep aan de C5-positie van het cytosine is cruciaal voor genexpressie en weefsel-specifieke processen. Een bruikbare analogie is hoe het vasthouden van de Shift-toets op een toetsbord ervoor kan zorgen dat de letter 'a' een hoofdletter 'A' wordt, waardoor er meerdere mogelijkheden ontstaan hoe een letter of cijfer op het toetsbord wordt weergegeven. Evenzo regelt DNA-methylatie welke genen 'aan' zijn en welke genen 'uit' zijn in elke cel van het lichaam.

Ieder tweelingcohort in Europa en Australië heeft DNA-methylatieprofielen gemeten in bloedmon-



Linksboven beginnen, met de klok mee: (a) Illumina Infinium-arrays die drogen na de laatste voorbereidingsstap voordat ze worden gescand. (b) Illumina Infinium EPIC-arrays in beschermende glazen omhulsel voor het was-, kleur- en verlengingsproces. (c) Tecan Liquid Handler. Deze machine automatiseert het array-kleur- en extensie proces. (d) Illumina iScan en autoloader die de hoge resolutie afbeeldingen van de arrays maakt, die elke afzonderlijke probe op de array kunnen onderscheiden.

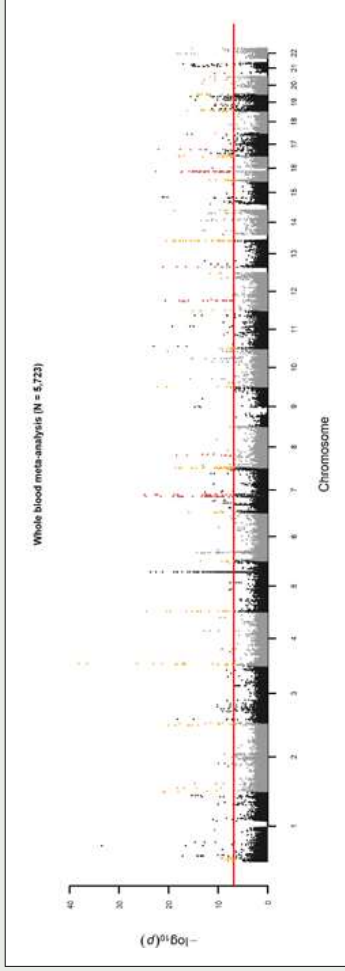
sters van tweelingen met Illumina-methylatie-arrays, voornamelijk met de Illumina Infinium 450K-array, maar ook met de Illumina Infinium EPIC-array, waarop zich ongeveer 850k probes bevinden. Deze metingen worden meestal uitgevoerd in laboratoria die gespecialiseerd zijn in moleculair genetische laboratoriumprocessen. De monstern uit het Nederlands Tweelingen Register zijn gemeten bij het Avera Institute for Human Genetics en bij de Human Genomics Facility van het Erasmus MC in Rotterdam.

Het gebruik van DNA-methylatie-microarrays is aantrekkelijk, omdat het wetenschappers in staat stelt om locatiespecifieke DNA-methylatie in het genoom van een individu te onderzoeken, terwijl ook een hoge sample throughput mogelijk is. De Illumina Infinium 450k-array is op grote schaal toegepast in het onderzoeksveld en meet ~ 450.000 CpG-sites over het hele genoom. De Illumina Infinium EPIC DNA-methylatie-array is de opvolger van de 450k-array en meet meer dan

850.000 CpG plekken en verhoogt met name de dekking van regulatorische gebieden in het genoom, terwijl ook meer dan 90 procent van de CpG-sites uit de 450k-array worden gemeten. Dit stelt onderzoekers in staat om gegevens van de twee arrays te combineren.

MEERDAAGS LABORATORIUMPROCES

Hoewel de twee arrays qua inhoud verschillen, zijn de laboratoriumprocessen en moleculaire technologieën die worden gebruikt om de individuele CpG's te meten hetzelfde. De verwerking van de monsters bestaat uit een meerdaags laboratoriumproces dat, na isolatie van DNA uit bijvoorbeeld bloed- of wangslim, een DNA-bisulfietconversie, amplificatie van het hele genoom,



FIGUUR 3 Manhattan-plot met de chromosomale locaties van differentieel gemethyleerde posities in identieke tweelingen. De Manhattan-plot laat de resultaten zien van een meta-analyse van DNA-methylatieprofielen in bloedmonsters van monozygote (MZ) die werden vergeleken met dizygote (DZ) tweelingen. Dit figuur wordt een Manhattan-plot genoemd, omdat de torens lijken op de skyline van New York met torens die differentieel gemethyleerde regio's aangeven. Elke stip vertegenwoordigt één CpG-site met zijn p-waarde uitgezet op de -log₁₀-schaal. Punten boven de rode lijn (die overeenkomt met een p-waarde lager dan 1x10⁻⁵) zijn CpGs met een significant DNA-methylatieverschil tussen MZ en DZ tweelingen na multiple-testingcorrectie. Multiple-testingcorrectie

wordt toegepast om vals-positieve resultaten te voorkomen in genomebrede DNA-methylatiestudies waar honderdduizenden locaties worden getest. De rode stippen geven locaties in de buurt van centromeren aan – de centrale delen van chromosomen en gele stippen vertegenwoordigen locaties in de buurt van telomeren – dat wil zeggen de uiteinden van chromosomen; regio's met relatief hoog percentage differentieel gemethyleerde sites. De reden voor de verrijking in de buurt van telomeren en centromeren is nog onbekend. *Figuur aangepast met toestemming van Van Dongen, J. et al. Identical twins carry a persistent epigenetic signature of early genome programming. Nat Commun. 2021 Sep 28;12(1):5698. doi: 10.1038/s41467-021-25653-7.*

'Een brandende vraag is nu of de methyleringssignatuur een oorzaak, gevolg of bijproduct is van de vroege splitsingsgebeurtenis'

DNA-fragmentatie, DNA-precipitatie, DNA-re-suspensie, DNA-hybridisatie aan de array en een enkelvoudige extensie en kleuring van de monsters inhoudt. Zodra deze stappen zijn voltooid, worden de arrays gescand met behulp van de Illumina iScan, die hoge resolutiebeelden van de fluorescentie voor elke array vastlegt.

De array bestaat uit een glasplaatje met daarin geëtsde microscopisch kleine putjes. Elk putje bevat een kraal ('bead') die is gelabeld met oligonucleotide-probes voor een specifieke locatie (één CpG-plaats) in het genoom. Het platform gebruikt twee typen probes ('Type I en Type II').³ Type I-probes bestaan eigenlijk uit twee probes, één die aan gemethyleerd DNA hecht en één die aan ongemethyleerd DNA hecht. Type II-probes gebruiken slechts één probe om één CpG-plaats te meten. Door gebruik te maken van een balans van deze twee probes, behouden de arrays een optimale balans tussen locatiespecifieke gevoeligheid en genomebrede dekking.

Na het meten van de DNA-methylatieprofielen wordt kwaliteitscontrole (QC) uitgevoerd. Een gebruiksvriendelijke en uitgebreide workflow voor QC, voorbewerking en analyse van DNA-methylatie-arraysgegevens is in Nederland ontwikkeld

door het Nederlandse Biobank-Based Integrative Omics Study (BIOS) consortium.⁴

ASSOCIATIESTUDIE

Deze studie bij MZ tweelingen is een doorbraak in het onderzoek naar hun ontstaan. Na het meten van arrays, werd een epigenomebrede associatiestudie (EWAS) uitgevoerd, waarbij methylatieniveaus over het hele genoom heen werden vergeleken. Het project begon in het Nederlandse Tweelingen Register, waarbij DNA-methylatieprofielen in bloedmonsters van Nederlandse MZ en DZ tweelingen werden vergeleken. De DZ

tweelingen werden geselecteerd als de optimale controles in deze studie, omdat ze ook dezelfde prenatale omgeving hebben en de onderzoekers dus konden controleren voor eventuele effecten van het tegelijkertijd delen van een baarmoeder.

In een volgende stap vergeleken de onderzoekers MZ tweelingen ook met niet-tweelingcontroles. Er werd een zeer groot aantal zeer sterke signalen gevonden, dat wil zeggen verschillen tussen MZ tweelingen en andere personen, veel meer dan typisch wordt waargenomen in EWAS-projecten.

Bovendien kwamen de signalen voor in niet-wij-lekeurige clusters, bijvoorbeeld nabij de uiteinden van chromosomen. Om te voorkomen dat het grote aantal bevindingen een artefact zou kunnen zijn, werden replicatiestudies uitgevoerd in gegevens van vier andere tweelingcohorten uit Australië, Finland en twee cohorten uit het Verenigd Koninkrijk. De replicatieanalyses toonden bijna identieke methyleringspatronen.

Alle replicaties werden uitgevoerd in DNA van perifere bloedmonsters. Meta-analyse van de resultaten (zie figuur 3) identificeerde differentieel methylering op meer dan achthonderd locaties in genen die betrokken zijn bij verschillende

functies, waaronder vroege embryonale ontwikkeling en celadhesie, wat zou kunnen verklaren waarom er spontane splitsing is van een zich vroeg ontwikkelend embryo in twee identieke helften.

Een volgende stap was replicatie in DNA, vertegen uit wangslijmcellen, dat voornamelijk bestaat uit epitheelcellen die afkomstig zijn uit een andere embryonale cellaag dan bloedcellen. Een voorbeeld van wangslijmcellen is dat ze gemakkelijk te verzamelen zijn, vooral bij kinderen. Het afnameprotocol hiervoor van het Nederlands Tweelingen Register is online beschikbaar.⁵ Ook hier was de mate van replicatie net zo hoog als in de cohorten die de methyleringsprofielen in bloed analyseerden. Een vergelijkbare EWAS werd ook uitgevoerd om DNA-methylatieprofielen tussen tweelingen en niet-tweelingen te vergelijken, met heel duidelijk bevestigde dat er een uniek profiel in MZ tweelingen is, dat wil zeggen de resultaten

weerspiegelen niet 'een tweeling zijn' maar 'een MZ tweeling zijn'.

Deze bevindingen geven aan dat het ontstaan van MZ tweelingen een gebeurtenis is die jaren later nog steeds wordt weerspiegeld in het epigenoom, aangezien het oudste tweelingcohort deelnemers had met een gemiddelde leeftijd van 58 jaar. Over het algemeen wordt aangenomen dat de splitsing van het embryo plaatsvindt tussen drie tot tien dagen na de conceptie. Een brandende vraag is nu of de methyleringssignatuur een oorzaak, gevolg of bijproduct is van de vroege splitsingsgebeurtenis. Deze resultaten bieden een startpunt voor verder onderzoek naar het ontstaan van eenzelfde tweelingen. Ook kunnen de resultaten leiden tot een beter begrip van aangeboren afwijkingen die vaker voorkomen bij eenzelfde tweelingen, waaronder neutrale buisdefecten en bepaalde imprinting stoornissen, zoals het Beckwith-Wiedemann-syndroom.

BELANGRIJKE DOORBRAAK

De studie maakt het ook mogelijk om met redelijke nauwkeurigheid uit het DNA-methylatieprofiel van een persoon te bepalen of hij/zij een identieke tweeling is. Dit geldt voor personen die weten dat ze een MZ tweeling zijn, maar ook zeer waarschijnlijk voor personen die vroeg in de zwangerschap een eenzijdige tweelingbroer of -zus hebben verloren. De medische gemeenschap verwijst naar dit fenomeen als 'verdwijend (vanishing) tweelingsyndroom'; overlevenden van dergelijke zwangerschappen gebruiken vaak de term 'alleengeboren tweeling'. Voor verschillende aandoeningen die veel vaker voorkomen bij MZ tweelingen is gesuggereerd dat patiënten die zich niet presenteren als MZ tweelingen de overlevenden zijn van een MZ zwangerschap.

Dergelijke hypothesen kunnen nu worden getest door het DNA van patiënten te screenen op de aanwezigheid van een MZ epigenetica signatuur. Het voorspellingsalgoritme was gebaseerd op het trainen van een algoritme op bloed-DNA-methylatiegegevens om MZ tweelingen te herkennen. Het algoritme daarvoor haalde een gevoeligheid van ongeveer 75 procent (correcte identificatie van MZ tweelingen) en een specificiteit van ongeveer 60 procent (correcte identificatie van niet-MZ tweelingen) in onafhankelijke datasets, met vergelijkbare prestaties op bloed- en mondmonsters. Met grotere datasets kan deze test in de toekomst nog verder worden verbeterd.

Het artikel '*Identical twins carry a persistent epigenetic signature of early genome programming*' verscheen op 28 september 2021 in *Nature Communications*.⁶

REFERENTIES

1. Marek, Hamdi, et al. Identification of common genetic variants influencing spontaneous dizygotic twinning and female fertility. *The American Journal of Human Genetics* 98.5(2016): 899-906.
2. Van Dongen, J. et al. Identical twins carry a persistent epigenetic signature of early genome programming. *Nat Commun.* 12(1):5698(2021). doi: 10.1038/s41467-021-25653-7.
3. Illumina HD Assay Methylation Protocol Guide (2016) Illumina. <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-hits/infinium-methylation-epic.html>. 2020
4. Shike, Lucy, van Ierssen, Maarten, Cars, Davy, Slieker, Roderick, & Heijmans, Bert. (2018). DNA-methylatie workflow for the quality control, normalization, and analysis of Illumina methylation array data (2.1). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3355932>
5. Data Protocols <http://www.action-project.eu/content/data-protocols>