

Cover Page



Universiteit Leiden

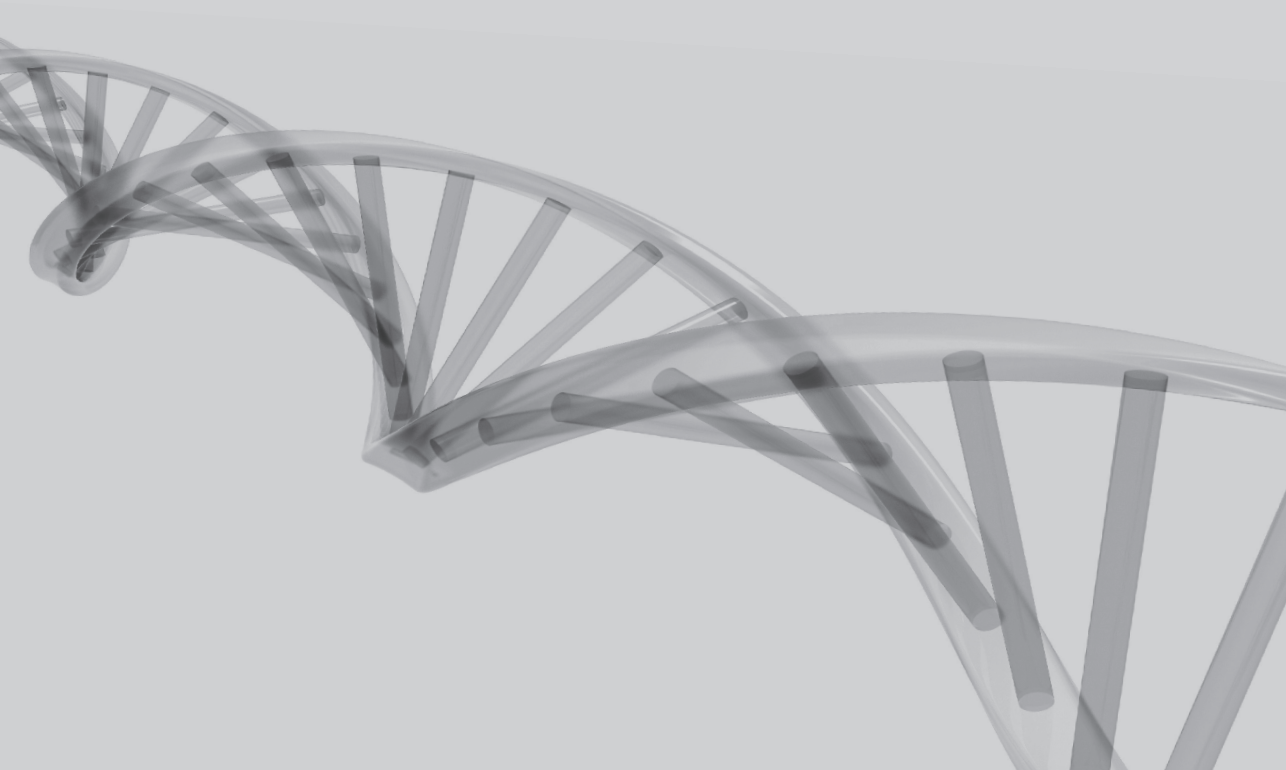


The handle <http://hdl.handle.net/1887/22071> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Verschuren, Jeffrey J.W.

**Title:** Genetic and pharmacogenetic determinants of cardiovascular disease

**Issue Date:** 2013-10-31



# **Nederlandse samenvatting en toekomstperspectieven**

---



## HOOFDBEVINDINGEN

Genetische variatie beïnvloedt de kans op het krijgen van hart- en vaatziekten (HVZ). Deze genetische factoren bepalen samen met meerdere klinische factoren (bijvoorbeeld diabetes mellitus en een verhoogd cholesterol) en omgevingsfactoren (bijvoorbeeld roken) het risico op het ontwikkelen van HVZ van de individu. Doordat al deze factoren in een ingewikkeld samenspel dit risico beïnvloeden worden HVZ onder de complexe ziektebeelden gerekend. Tot op heden zijn er meerdere genetische factoren in verband gebracht met verschillende aspecten van HVZ, maar consistente bevestiging van deze gerapporteerde bevindingen is schaars. Dit is waarschijnlijk voornamelijk te wijten aan het kleine aantal patiënten dat in de studies is onderzocht. Het doel van dit proefschrift was het verder uitzoeken van de genetische achtergrond van coronaire restenose en andere hart- en vaatziekten met behulp van grote, goed omschreven studie populaties. Bovendien onderzochten we de rol van genetische variatie op het verschil in respons op de behandeling met bepaalde medicijnen. Deze drie thema's worden respectievelijk behandeld in deel I, II en III van dit proefschrift.

Percutane coronaire interventie (PCI) is een veel gebruikte behandeling van patiënten met coronair lijden. Een complicatie van PCI is het opnieuw gaan dichtzitten van het behandelde coronair (kransslagvat), ook wel restenose genoemd. Hoewel de incidentie van coronaire restenose na PCI aanzienlijk is afgenomen de laatste jaren, met name na de introductie van drug-eluting stents (DES), kunnen we deze complicatie nog niet geheel voorkomen en blijft het een belangrijke oorzaak van morbiditeit en behoefte aan re-interventie. In de eerste 2 hoofdstukken van deel I wordt er een uitgebreid overzicht van alle huidige kennis met betrekking tot coronaire restenose beschreven. **Hoofdstuk 2** beschrijft de achtergrond en risicofactoren van restenose. Ondanks het vele onderzoek naar restenose weten we nog steeds niet precies welke mechanismen er ten grondslag van deze complexe ziekte liggen. Men denkt dat de ontstekingsreactie, veroorzaakt door vasculaire schade die tijdens de PCI kan ontstaan, een grote rol speelt. Deze overactieve inflammatoire staat activeert vervolgens verschillende andere processen zoals, proliferatie en migratie van vasculaire gladde spiercellen en extracellulaire matrix (ECM) vorming. Samen kunnen deze processen leiden tot het ontslaan van restenose. Niet iedereen heeft hetzelfde risico om restenose te ontwikkelen. Patiënten met diabetes hebben bijvoorbeeld een verhoogd risico. Verder blijkt uit meerdere studies dat bepaalde genetische factoren dit risico beïnvloeden. In **hoofdstuk 3** wordt met name ingegaan op de praktische kant van het probleem, zoals de verschillende ontwikkelingen om restenose te voorkomen en de behandeling van restenose. Veel innovatieve technologieën, waaronder DES en volledig biologisch afbreekbare stents, zijn reeds ontwikkeld en onderzoek naar de beste preventieve anti-restenose therapie, die zowel effectief en veilig is op de lange termijn, is nog steeds in volle gang. Mocht

dan toch restenose ontstaan, zijn er verschillende behandelopties. Voorbeelden hiervan zijn re-implantatie van ofwel een bare-metal stent of een DES, een bypass operatie of de recent ontwikkelde drug-eluting ballon. Er is vooralsnog geen eenduidig advies over welke behandeling in welke situatie de voorkeur heeft. De resultaten van lopende onderzoeken zullen hier mogelijk meer houvast in gaan bieden.

Zoals werd beschreven in de algemene inleiding, heeft genetisch onderzoek zich ontwikkeld van analyses van losse polymorfismen in kandidaat genen naar hypothesevrije analyses van het hele genoom met *genome wide association studies* (GWAS). In **hoofdstuk 4** beschrijven we de resultaten van de eerste GWAS die is gepubliceerd over restenose. Deze studie werd uitgevoerd in de *GENetic DEterminants of Restenosis* (GENDER) studie populatie. Na de analyses in GENDER werden de bevonden resultaten bevestigd in drie onafhankelijk studies, waarbij we uiteindelijk tot de conclusie kwamen dat er een, niet eerder beschreven, regio op chromosoom 12 geassocieerd was met restenose. De twee polymorfismen in deze regio werden behalve met restenose ook in verband gebracht met een verhoogd risico op sterfte in de GENDER studie en ook in de *PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk* study (PROSPER). Mogelijk heeft deze regio dus een bredere rol in HVZ. Omdat deze regio niet op een bepaald gen zit, maar tussen twee genen in ligt, denken wij dat het met name een rol speelt in de regulatie van genen. Verder onderzoek zal nodig zijn om dit uit te zoeken.

Na het verkrijgen van de GWAS data wilden wij dit gebruiken om eerdere tegenstrijdige resultaten uit te zoeken over de rol van genetische variatie in twee ECM vormende genen, matrix metalloproteinase (MMP) 2 en 3. In **hoofdstuk 5** hebben we de genotypische data uit eerdere kandidaat-gen studies in GENDER gecombineerd met de beschikbare GWAS gegevens om zo nog een gedetailleerder overzicht van de genetische variatie binnen deze genen te krijgen. We concludeerden dat er geen duidelijke associatie was tussen de genetische variatie in MMP2 of MMP3 en restenose. Verder onderzoek hiernaar zal dus tot niets zinvols leiden en is dus nu niet langer nodig.

In **hoofdstuk 6** hebben we een andere statistische methode gebruikt om te kijken naar het gezamenlijke effect van meerdere polymorfismen. Aangezien we naar een complexe ziekte onderzoek doen, is het biologisch gezien plausibeler dat meerdere genen samenwerken in het ontstaan van restenose. Deze methode is dus mogelijk een betere manier om naar de relatie met restenose te kijken. In dit hoofdstuk hebben we meerdere polymorfismen, gelegen in alle eerder beschreven kandidaat-genen van restenose, tezamen geanalyseerd. We kwamen tot de conclusie dat het gecombineerde effect van de genetische variatie van 36 kandidaat-genen inderdaad is geassocieerd met restenose in de GENDER studie populatie, ondanks alle inconsistente resultaten uit eerdere studies.

In **hoofdstuk 7** hebben we deze techniek vervolgens toegepast om de invloed van hele biologische pathways op het ontstaan van restenose te onderzoeken. In deze studie

hebben we aangetoond dat er een mogelijke rol is van de cel-ECM interactie pathway in de ontwikkeling van restenose. Van de verschillende genen in deze pathway bleek het PARVB gen het sterkst geassocieerd met restenose. Verschillende polymorfismen in dit gen werden vervolgens ook gerepliceerd in een onafhankelijke studie populatie.

Tot slot presenteren we in het laatste hoofdstuk van deel I, **hoofdstuk 8**, de 10-jaars follow-up van de GENDER populatie. We laten zien dat ondanks eerdere publicaties, coronaire restenose na PCI niet is geassocieerd met een verhoogd risico op sterfte, niet op de korte termijn en ook niet op de lange termijn. Een aantrekkelijke conclusie zou kunnen zijn dat de huidige behandeling van patiënten met restenose is zo goed dat patiënten niet meer sterven aan deze aandoening en dat we ons daarom dus ook niet meer druk hoeven te maken over deze complicatie. Echter, ook al is dit misschien gedeeltelijk waar, restenose veroorzaakt nog steeds aanzienlijke morbiditeit. Dus is er nog steeds meer onderzoek naar restenose nodig.

In deel II van dit proefschrift richten we ons op andere cardiovasculaire en vasculaire aandoeningen. In **hoofdstuk 9** hebben we onderzoek gedaan naar de rol van processen die DNA schade herstellen in het ontstaan van een myocardinfarct of een beroerte. DNA schade en DNA herstel processen spelen mogelijk een rol in HVZ, maar slecht enkele studies hebben hier onderzoek naar gedaan. Ook in deze studie hebben we de analyses naar het gezamenlijke effect van meerdere polymorfismen gebruikt om de relatie van vijf DNA herstel pathways te analyseren in de GENDER en de PROSPER studie populaties. We laten zien dat de non-homologous end-joining pathway geassocieerd is met het optreden van een myocardinfarct in beiden populaties en dat deze associatie vooral werd veroorzaakt door de genetische variatie in het MRE11A gen. Dit gen heeft een belangrijke rol bij de herkenning van DNA schade en tevens een rol in de respons op dubbelstrengs breuken van het DNA. Dit is de eerste studie die een relatie laat zien van dit gen met HVZ. Aanvullende studies zullen nodig zijn om dit resultaat te bevestigen en om vervolgens deze mogelijke relatie verder biologisch uit te zoeken.

In **hoofdstuk 10** maken we een uitstap naar de nierziekten om onderzoek te doen naar het falen van dialyse fistels. Dit probleem lijkt namelijk op veel vlakken op restenose en mogelijk spelen dus ook dezelfde mechanismen een rol in het ontstaan van het falen van deze fistels. In dit onderzoek hebben we diverse polymorfismen onderzocht, gelegen in kandidaat genen voor dialyse fistel falen, maar ook in genen eerder geassocieerd met restenose en aneurysma formatie van de aorta. Voor deze studie hebben we gebruik gemaakt van de *Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis* (NECOSAD) populatie. Van alle onderzochte polymorfismen waren alleen rs1466535 in het LRP1 gen en de factor V Leiden mutatie significant geassocieerd met fistel falen. In vergelijking met restenose spelen genetische factoren bij fistel falen mogelijk een kleinere rol. Lokale factoren, zoals de abnormale hemodynamiek en vaatschade, zijn mogelijk meer van invloed op het ontslaan van fistel falen.

Deel III van dit proefschrift richt zich op de farmacogenetica van cardiovasculaire medicijnen. Farmacogenetica is het onderzoek naar genetische variatie die de respons beïnvloedt van een individuele patiënt op een bepaald geneesmiddel. De belangrijkste toepassing van deze farmacogenetische kennis is de ontwikkeling van gepersonaliseerde behandeling, doordat op basis van de genetische achtergrond het beste middel geselecteerd zou kunnen worden. In **hoofdstuk 11** wordt een uitgebreid overzicht beschreven van de beschikbare farmacogenetische gegevens van de vijf belangrijkste groepen van cardiovasculaire geneesmiddelen. Er wordt in detail ingegaan op de variabiliteit in het effect van statines en hun risico op myopathie, de genetische determinanten van resistentie tegen plaatjesaggregatieremmers, de dosering problemen van orale anticoagulantia, de genetische variatie met betrekking tot suboptimale reacties op  $\beta$ -blokkers en de variabele respons van de bloeddruk en klinische uitkomstmaten bij patiënten die angiotensine convertende enzyme (ACE)-remmers gebruiken. De algemene conclusie van dit overzicht is dat, ook al nemen we steeds kleine stapjes in de vooruitgang, er genoeg redenen zijn om optimistisch te zijn dat de tijd waarin we farmacogenetica kunnen gebruiken in de klinische praktijk om de behandeling van de individuele patiënt te optimaliseren in zicht komt.

Tenslotte hebben we in **hoofdstuk 12** de acht best geschreven polymorfismen, die van invloed zijn op de werking van aspirine en clopidogrel, geanalyseerd in een grote ongeselecteerde populatie van patiënten met ST-segment elevatie myocardinfarct. We hebben onderzocht of deze polymorfismen waren geassocieerd met trombotische uitkomsten en we laten zien dat het \*2 risico allel van het CYP2C19 gen inderdaad sterk geassocieerd was met nieuwe trombotische complicaties na het myocardinfarct. Daarnaast werd er ook een relatie gezien met het -842A>G polymorfisme in het COX1 gen. Vooral patiënten die twee of meer risico allelen van deze twee polymorfismen dragen hadden een hoog risico. Met deze studie laten we zien dat in patiënten die gezien worden in de dagelijkse klinische praktijk het testen op deze polymorfismen waardevol kunnen zijn bij de identificatie van de patiënten met een verhoogd risico op nieuwe cardiovasculaire problemen.

## TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Tijdens de laatste decennia is er enorme progressie geboekt in het genetische onderzoek en onze kennis van de genetische achtergrond van veel ziekten is aanzienlijk toegenomen. Na de voltooiing van het *Human Genome Project* in 2003 en de ontwikkeling van GWAS in 2005 zijn er al ruim 1500 van deze studies gepubliceerd over bijna alle denkbare ziektebeelden. Echter, gedurende laatste jaren hebben we een punt bereikt waarop we onze gedachten weer moeten verbreden buiten de traditionele GWAS ana-

lyses. Deze analyses hebben geleid tot vele interessante en nieuwe bevindingen, maar gezien het feit dat de meeste veelvoorkomende ziekten door meerdere genen worden beïnvloed, zijn andere meer geavanceerde statistische methoden waarschijnlijk meer geschikt om de GWAS data te analyseren. In dit proefschrift hebben we een aantal van deze nieuwere statistische methoden toegepast om naar het gezamenlijke effect van meerdere polymorfismen te kijken. Ook al zijn we nu een stap verder met deze analyses, we zijn nog verre van de ultieme analyse methode om de grote hoeveelheid informatie, die gegenereerd wordt tijdens een GWAS, volledig mee te analyseren. Toekomstige ontwikkelingen zullen zeker nog betere en meer geavanceerde methoden opleveren die ons bij de interpretatie van deze gegevens helpen. Tot nu toe blijft echter de variantie die verklaard wordt met de genetische variatie beperkt en ook is de grootte van het effect van de losse polymorfismen laag waardoor grote studie populaties nodig zijn om relaties aan te tonen. De vorming van consortia waarbinnen de gegevens van meerdere studies gecombineerd worden zullen dan ook meer betrouwbare resultaten opleveren dan de individuele studies.

Een andere recente ontwikkeling in het genetisch onderzoek is de beschikbaarheid van next-generation sequencing, waarmee in nog meer detail het genoom geanalyseerd kan worden. Voor ons volledige begrip van de biologische achtergrond van HVZ zal het analyseren van alleen genetische data echter niet voldoende zijn. Integratie met andere onderzoeksgebieden, zoals eiwitanalyses en epigenetica, zal nodig zijn om daadwerkelijk de biologische processen te begrijpen. Een groot probleem van de meeste genetische associaties studies is dan ook om de gevonden genetische associaties te vertalen naar biologische processen. Vooral de top hits van de GWAS studies zijn van polymorfismen met een onbekende functie, die niet in een gen liggen maar tussen genen in of zelfs gen-*deserts*. Het is heel gemakkelijk om te concluderen dat meer 'functionele' studies moeten worden uitgevoerd om deze relaties verder uit te zoeken. Deze studies zijn echter vaak zeer tijdrovend en duur en leiden vaak niet tot het gewenste resultaat. Daarom zal het bewijs van een genetische associatie overtuigend genoeg moeten zijn voordat er met verder onderzoek gestart wordt. Enkele voorbeelden van mogelijke follow-up analyses omvatten het onderzoeken of de polymorfismen de expressie of functie van een gen beïnvloeden, bijvoorbeeld met mRNA expressie analyses of allelische expressie onbalans. Sequentiebepaling van een regio kan leiden tot de identificatie van een functionele variant die in linkage disequilibrium is met het geassocieerde polymorfisme. Wanneer een functioneel gen of regio met voldoende bewijs is geïdentificeerd kunnen experimentele modellen *in vitro* of *in vivo*, in diermodellen indien beschikbaar, worden toegepast.

Echter ook zonder ons volledige begrip van het exacte effect van een polymorfisme, zouden we deze genetische gegevens al wel in de praktijk kunnen toepassen in de vorm van risicovoorspelling. Risicovoorspelling is een belangrijk aspect tijdens de preventie



en behandeling van HVZ. Door de jaren heen zijn er meerdere risicoscores ontwikkeld voor verschillende ziektebeelden voor het voorspellen van het risico van de individuele patiënt, allemaal met behulp van klinische parameters. Onze kennis van de moleculaire achtergrond van HVZ zou kunnen bijdragen aan de verbetering van de huidige risicomodellen. De tot op heden gepubliceerde studies naar de toegevoegde waarde van genetische polymorfismen op klinische risicoscores, rapporteren echter gemengde resultaten. Er zijn dus meer studies nodig. Met name genetische markers met een groot effect, zoals CYP2C19\*2 op trombotische uitkomsten tijdens clopidogrel behandeling, aangetoond in hoofdstuk 12, hebben waarschijnlijk de grootste kans om de klinische risicoscores voor de betreffende eindpunten te verbeteren.



