

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30776> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Talens, Rudolf P.

Title: Studies into epigenetic variation and its contribution to cardiovascular disease

Issue Date: 2015-01-08

Nederlandse samenvatting

Epigenetische mechanismen reguleren het gebruik van de genen

De chromosomen in een menselijke cel bereiken kop-aan-staart gelegd een lengte van ongeveer 2 meter. Om in een celkern met een diameter van ongeveer 1 micrometer (= 0,001 mm) te passen moet het DNA worden opvouwen. Dit wordt bewerkstelligd door het DNA eerst te wikkelen rondom histon eiwitten. Het koppelen van verschillende kleine chemische groepen aan de histon eiwitten zorgt ervoor dat deze eiwit - DNA complexen elkaar aantrekken of afstoten wat een strakker of lossere opgevouwen stuk chromosoom tot gevolg heeft. Ook aan het DNA zelf kan op specifieke plaatsen een chemische groep, een methyl groep, gekoppeld worden wat de affiniteit beïnvloedt tussen DNA en DNA bindende eiwitten zoals transcriptiefactoren. Het geheel van chemische groepen aan en rondom het DNA wordt epigenetische informatie genoemd (Oud Grieks: epi = op).

Een cel maakt geen gebruik van genen die in strak opgevouwen stukken DNA liggen. Simpel gezegd wordt door epigenetische informatie bepaald onder welke omstandigheden de cel bepaalde genen überhaupt kan 'gebruiken' om biologische taken te verrichten. Wanneer we bijvoorbeeld eten wordt insuline alleen gemaakt in de eilandjes van Langerhans van de alvleesklier, terwijl elke cel in ons lichaam hetzelfde gen voor insuline bezit en vele cellen insuline nodig hebben. Tijdens de celdeling wordt zowel de genetische als epigenetische informatie van de oorspronkelijke cel correct doorgegeven aan beide dochtercellen. Echter, waar het genetisch gereguleerde gen gebruik vanaf de bevruchting vast staat voor elke cel in het lichaam, kan het epigenetisch gereguleerde gen gebruik van een cel veranderen. Een bekend voorbeeld van zulke epigenetische veranderingen is de ontwikkeling van gespecialiseerde cellen uit stamcellen (met een bevruchte eicel als de ultieme stamcel). Tijdens dit proces leiden omvangrijke epigenetische herstructureringen tot het strak opvouwen van verschillende stukken DNA in dochtercellen waardoor genetisch identieke cellen er toch anders uit zien, andere biologische functies verrichten en verschillend kunnen reageren op signalen uit de omgeving. In een gespecialiseerde cel is epigenetische informatie over het algemeen stabiel, maar de mogelijkheid tot veranderingen blijft. Willekeurige

epigenetische veranderingen kunnen spontaan voorkomen of ontstaan als gevolg van een schadelijke blootstelling, enigszins vergelijkbaar met genetische mutaties. Echter, in tegenstelling tot genetische mutaties, kunnen epigenetische veranderingen ook gericht optreden als onderdeel van een intern proces (b.v. wondgenezing) of als aanpassing op een omgevingsfactor (b.v. eetgedrag).

Doordat epigenetische processen betrokken zijn bij de wijze waarop de cel de genen gebruikt, is het ook te verwachten dat epigenetische veranderingen een rol spelen bij het ontstaan van ziekten. Aangetoond is dat de genen die celdeling en groei controleren epigenetisch volledig ontregeld zijn in tumoren, en ook in de hartspier zijn epigenetische verschillen gevonden tussen cellen in gezonde gedeelten en gedeelten die door een hartinfarct zijn aangetast. Of dit soort epigenetische verschillen oorzaak of gevolg zijn van de ziekte is nog onduidelijk. Wel is het zo dat een opeenstapeling van willekeurige en gerichte epigenetische veranderingen gedurende het leven algemeen wordt gezien als een belangrijke factor in het proces van veroudering en het ontstaan van ouderdomsziekten zoals ouderdomsdiabetes (diabetes type 2), hoge bloeddruk, hart- en vaatziekten (HVZ) en kanker.

Epigenetisch onderzoek naar hart- en vaatziekten

Er is veel interesse in onderzoek naar de relatie tussen epigenetische mechanismen en de ontwikkeling van ziekten, zoals ouderdomsziekten, waarbij embryonale omgeving, leefomgeving en levensstijl belangrijke risicofactoren in zijn. Onderzoek hiernaar in mensen geschiedt veelal via populatiestudies, waarvan er verschillende typen zijn. Er zijn talloze klinische studies die zich specifiek richten op onderzoek naar het effect van (nieuwe) medicatie op het risico om binnen enkele jaren de ziekte te ontwikkelen. Ook zijn er grootschalige populatiestudies die de levensloop, inclusief ziekte en gezondheid, van een grote groep individuen of families gedurende langere tijd onderzoeken. Er zijn zelfs enkele historische cohortstudies die zich concentreren op een specifieke gebeurtenis in het verleden, zoals een hongersnood, en de gevolgen daarvan voor de gezondheid gedurende het leven. Voor de meeste humane studies is biologisch materiaal van de deelnemers, vaak DNA uit bloed, goed beveiligd opgeslagen in zogenaamde

biobanken. Door technologische vooruitgang is epigenetisch onderzoek in humane cohorten, epigenetische epidemiologie genoemd, mogelijk geworden.

Op termijn zal epigenetische epidemiologie meer inzicht verschaffen in de manier waarop de epigenetische verschillen tussen mensen bijdragen aan het ontstaan van ouderdomsziekten. Dit proefschrift vormt een eerste stap in het onderzoek naar de rol van epigenetische processen bij de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (HVZ), en bevat twee aspecten. Ten eerste bestuderen en beschrijven we biologische eigenschappen van epigenetische informatie voor een set HVZ kandidaat genen, genen waarvan de betrokkenheid bij HVZ bekend is of vermoed wordt. We onderzochten voor deze genen de lange termijn effecten van ondervoeding voor de geboorte op epigenetische informatie (Hoofdstuk 3) en de veranderlijkheid van epigenetische informatie gedurende de volwassen periode (Hoofdstuk 4). Vervolgens onderzochten we of epigenetische informatie met betrekking tot de prentaal gevoelige set genen het risico op hart- en vaatziekte beïnvloedt (Hoofdstuk 5).

Embryonale omgeving beïnvloedt epigenetische informatie

Epigenetische veranderingen als gevolg van of aanpassing aan omgevingsfactoren kunnen gedurende het hele leven voorkomen. Echter, doordat omvangrijke epigenetische herstructureringen cruciaal zijn bij de embryonale ontwikkeling wordt dit proces gezien als een periode waarin epigenetische informatie erg gevoelig is voor omgevingsinvloeden zoals bijvoorbeeld voedings- of rookgedrag van de moeder (zie Figuur 1, Introductie). Dit geldt in feite ook voor de rijping van de geslachtscellen. Verschillende bevolkingsonderzoeken observeerden een relatie tussen slechte omstandigheden vroeg in het leven en het risico op ouderdomsziekten zoals HVZ, diabetes type 2 en hoge bloeddruk op latere leeftijd. Deze observaties leidden tot formulering van de Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothese die stelt dat een deel van het risico op hart- en vaatziekten bepaald wordt door omstandigheden van voor en vlak na de geboorte. Verder heeft onderzoek in proefdieren aangetoond dat blootstelling voor de geboorte aan bijvoorbeeld te weinig voedsel of voedsel van slechte kwaliteit leidt tot subtiele epigenetische veranderingen die samengaan met een hoger risico op deze

ziekten. Dit soort resultaten toont aan dat epigenetische aanpassing een geloofwaardig moleculair mechanisme is voor de DOHaD hypothese. Echter, doordat proefdieren vrij kort leven in vergelijking met mensen is wel nog onduidelijk hoe blijvend dit soort veranderingen zijn over een periode van tientallen jaren.

Eerder onderzoek van ons heeft aangetoond dat de epigenetische informatie voor een HVZ kandidaat gen blijvend veranderd kan zijn bij ouderen die prenataal blootgesteld waren aan de Hongerwinter van 1944-1945. We onderzochten of dit bij andere kandidaat genen ook het geval kon zijn (Hoofdstuk 3). We vonden dat 6 van de 15 onderzochte genen ook gevoelig waren voor ongunstige omstandigheden tijdens het begin van de zwangerschap. Hierbij viel op dat de richting van de epigenetische verandering niet voor elk gen gelijk was, in tegenstelling tot wat je zou verwachten bij een epigenetische beschadiging. Voor sommige genen was de methylering toegenomen, bij andere afgenomen ten opzichte van broers en zusters die niet prenataal waren blootgesteld aan de ongunstige omstandigheden. Verder was er voor 5 van de 6 genen een andere of geen epigenetische verandering te zien bij blootstelling aan de Hongerwinter tijdens het einde van de zwangerschap. Dit wijst erop dat de timing van de blootstelling medebepalend is voor het al of niet optreden van de verandering. Ook was het zo dat voor 3 van de 6 genen het effect specifiek in één geslacht voorkwam of veel sterker was ten opzichte van het andere geslacht. Al deze observaties wekken de indruk dat er blijvende epigenetische aanpassingen plaatsvinden in het DNA van cellen als gevolg van blootstelling aan omstandigheden voor de geboorte.

Epigenetische veranderingen tijdens het ouder worden

De resultaten uit de Hongerwinter studies waren gevonden in individuen van 60 jaar oud (Hoofdstuk 3). De mogelijkheid tot epigenetische veranderingen blijft echter gedurende het hele leven bestaan, waardoor we ons afvroegen in hoeverre epigenetische instabiliteit over een dergelijke periode doorwerkt op de HVZ kandidaat genen. Willekeurige epigenetische veranderingen, zowel spontane (bijvoorbeeld door een kopieerfoutje) als die ten gevolge van een schadelijke blootstelling (bijvoorbeeld een niet dodelijke vergiftiging), zijn meestal neutraal

van aard. Een ongecorrigeerde opeenstapeling ervan, “epigenetic drift” genoemd, kan op termijn wel leiden tot minder goed functionerende cellen en weefsels. Algemeen wordt aangenomen dat het vermogen om willekeurige epigenetische foutjes te corrigeren tijdens de veroudering vermindert.

We onderzochten in hoeverre epigenetische informatie voor deze HVZ kandidaat genen verandert gedurende de volwassenheid in een groep eeneiige tweelingen van 18 jaar tot 88 jaar oud (Hoofdstuk 4). We vonden een toename van epigenetische verschillen (variatie) met het ouder worden, zowel tussen niet de verwante individuen als binnen de eeneiige tweelingparen, die in principe genetisch identiek zijn. Dit duidt op een opeenstapeling van epigenetische veranderingen gedurende het leven. Of de veranderingen het gevolg zijn van externe omgevingsfactoren zoals beroep en leefstijl of dat het om willekeurige epigenetische veranderingen gaat was niet te achterhalen. Wel viel op dat niet elk kandidaat gen evenveel epigenetische veranderingen onderging, voor sommige genen was de epigenetische variatie niet veel groter in de oudste groep vergeleken met de jongvolwassenen, terwijl voor andere genen die variatie praktisch verdubbeld was. Verder viel op dat er zelfs in de oudste groep nog tweelingparen waren die epigenetisch nauwelijks van elkaar verschilden. Dit alles duidt erop dat epigenetische variatie verandert gedurende het leven, maar dat niet elk gen even sterk verandert en dat sommige individuen nauwelijks veranderen.

Epigenetische informatie is geassocieerd met risico op hartinfarct

In navolging van het onderzoek in proefdieren naar de betrokkenheid van epigenetische mechanismen in de relatie tussen omstandigheden voor de geboorte en het risico op HVZ (DOHaD hypothese) vroegen we ons af of de epigenetische veranderingen als gevolg van de hongerwinter (Hoofdstuk 3) ook betrokken kunnen zijn bij de ontwikkeling van HVZ. Uit verschillende onderzoeken zijn aanwijzingen gekomen dat individuen die voor de geboorte blootgesteld waren aan de Hongerwinter een hoger risico hebben op het ontstaan van HVZ. De Hongerwinter familiestudie is echter door haar unieke karakter (zie Box 1 Introduction) aan de kleine kant voor dit soort epidemiologisch onderzoek. Verder

hebben de blootgestelde individuen nog niet de leeftijd bereikt waarop de meeste mensen voor het eerst serieuze HVZ problemen ervaren, waardoor een degelijke vergelijking van hun epigenetische profiel met dat van niet blootgestelde individuen binnenkort pas een reële mogelijkheid is.

We onderzochten in een klinische studie in hoeverre de epigenetische informatie voor de zes HVZ kandidaat genen die gevoelig bleken voor omstandigheden voor de geboorte (Hoofdstuk 3), betrokken is bij het risico op het krijgen van een hartinfarct op latere leeftijd (Hoofdstuk 5). We vonden dat epigenetische informatie op 2 van deze genen verschilde tussen vrouwen die gedurende de vervolperiode van drie jaar een hartinfarct kregen en vrouwen met een vergelijkbaar HVZ risico die hiervan gevrijwaard bleven. Voor mannen vonden we geen verschillen. Verder vonden we dat diegenen met het epigenetische verschil op beide genen het hoogste risico hadden op een hartinfarct. Het epigenetische verschil was niet te verklaren door andere HVZ risicofactoren zoals zwaarlijvigheid en de bloedspiegels van het cholesterol. Dit alles duidt erop dat epigenetische informatie een nieuwe indicator voor het risico op hart- en vaatziekten kan zijn, die wellicht deels afhangt van omstandigheden voor de geboorte.

Praktische strategieën voor een nieuw onderzoeksveld

Naast het biologische aspect bevat dit proefschrift ook een tweede, meer methodologisch aspect, waarin we praktische strategieën beschrijven voor het uitvoeren van epigenetisch onderzoek op humane cohortstudies. Dit nieuwe onderzoeksveld wordt epigenetische epidemiologie genoemd en is volop in ontwikkeling. Recent is er een aantal projecten gelanceerd om biobanken die specifiek ontworpen zijn voor epigenetisch onderzoek op te zetten met materiaal uit meerdere toegankelijke weefsels zoals bloed, wangslimvlies, en opperhuid. Het opzetten van biobanken kost echter veel tijd en middelen, waardoor epigenetisch epidemiologische studies vooralsnog zijn aangewezen op het materiaal van de bestaande biobanken die veelal ontworpen zijn voor genetisch onderzoek. Ondanks dat zulk epigenetisch onderzoek technisch uitvoerbaar is, zijn er een aantal praktische complicaties die samenhangen met de dynamische eigenschappen van epigenetische informatie. Waar een genetische bepaling informatie geeft over de genetische code in elke cel van het lichaam gedurende

het hele leven, is dit voor een epigenetische bepaling niet vanzelfsprekend. Ook is het aantal toegankelijke weefsels van levende mensen voor epidemiologisch onderzoek beperkt, en hebben die toegankelijke weefsels (zoals bloed en wangslimvlies) vaak een beperkte rol bij het ontstaan van ziekte. Dit houdt in dat onduidelijk is welke epigenetische onderzoeksvragen beantwoord kunnen worden middels epidemiologisch onderzoek en voor welke vragen celculturen en diermodellen noodzakelijk zijn.

Tijdens de totstandkoming van de huidige biobanken is bij het verzamelen van het genetisch materiaal geen rekening gehouden met een mogelijke toepassing in epigenetisch onderzoek. We onderzochten in hoeverre en onder welke voorwaarden de enorme collecties biologisch materiaal in deze biobanken, meestal DNA uit bloed, geschikt is voor epigenetisch onderzoek (Hoofdstuk 2). Hiervoor beschreven we eerst de normale variatie en patronen van epigenetische informatie voor 16 HVZ kandidaat genen aan de hand van DNA uit bloed van 30 gezonde individuen tussen 21 en 73 jaar oud (Hoofdstuk 2). Daarna vonden we dat een substantieel deel van deze kandidaat genen voldoet aan de voorwaarden voor gebruik in epigenetische epidemiologie (Hoofdstuk 2). Op geschikte genen is de variatie in epigenetische informatie tussen personen stabiel gedurende de vervolperiode van een studie (Hoofdstuk 2). Verder wordt de epigenetische variatie niet beïnvloed door persoonlijke verschillen in de samenstelling van het bloed in de vele typen (witte) bloedcellen (Hoofdstukken 2 en 4). Genen die aan deze criteria voldoen kunnen gebruikt worden als indicatoren voor een schadelijke blootstelling en het risico op ziekten (Hoofdstukken 3 en 5).

Het koppelen van een epigenetisch mechanisme aan de ontwikkeling van een ziekte vereist ook kennis over epigenetische informatie in het (interne) weefsel waarin de ziekte ontstaat. Omdat bloed als weefsel niet direct betrokken is bij het ontstaan van veel ziekten dient de epigenetische informatie in bloed wel representatief te zijn voor het aan ziekte gerelateerde weefsel. In een verkennende genoomwijde studie op autopsiemateriaal (bloed, skelet spier, onderhuids vet, buikholte vet, lever, nier, alvleesklier en milt) vonden we dat epigenetische informatie in bloed gedeeltelijk representatief kan zijn voor deze interne weefsels (Hoofdstuk 6). In de meeste gevallen leek de overeenkomst

in epigenetische variatie afhankelijk te zijn van de combinatie van meetpunt en weefsels. Grondige genoomwijde herhaling van al deze experimenten op grotere populaties met monsters van meerdere toegankelijke weefsels zal op termijn van alle kandidaat genen de geschiktheid voor epigenetisch epidemiologisch onderzoek aantonen.

De toekomst van epigenetische epidemiologie

In dit proefschrift hebben we een eerste verkennende stap gezet in het epidemiologische onderzoek naar de rol van epigenetische processen bij de ontwikkeling van HVZ. We vonden dat het dynamische aspect van epigenetische informatie wel beperkingen oplegt aan de praktische uitvoering en interpretatie van dit type onderzoek, maar het niet onmogelijk maakt (Hoofdstukken 2 - 6). Zo vonden we kandidaat genen waarvan de epigenetische variatie in twee weefsels stabiel is over een periode van 20 jaar (Hoofdstuk 2). De opvolgperiode van de meeste klinische studies is veel korter dan dit, wat inhoudt dat deze kandidaat genen als epigenetische indicator kunnen dienen voor het risico op ziekten (Hoofdstuk 5). Verder vonden we dat blootstelling aan de extreme omstandigheden van de Hongerwinter tijdens de embryonale ontwikkeling blijkt te leiden tot een permanente beschadiging of aanpassing van epigenetische informatie op sommige kandidaat genen (Hoofdstuk 3). In een tweede studie vonden we dat epigenetische informatie op dit soort kandidaat genen ook een indicator kan zijn van het risico op HVZ (Hoofdstuk 5), een ziekte waarvan het ontstaan dikwijls in verband gebracht is met omstandigheden vroeg in het leven (DOHaD hypothese). Ook voor minder extreme omstandigheden tijdens de zwangerschap, zoals bijvoorbeeld roken of verminderde functie van de placenta, is gevonden dat epigenetische veranderingen een gevolg kunnen zijn. In dit proefschrift vonden we dat juist epigenetisch onderzoek geschikt blijkt om via een combinatie van verschillende studies in kaart te brengen wat de uiteindelijke gevolgen van deze omstandigheden op latere leeftijd zijn (Hoofdstukken 3 - 5).

De resultaten in dit proefschrift kunnen ook van waarde zijn voor het aanleggen van nieuwe biobanken of het uitbreiden van bestaande biobanken om er meer epigenetische vragen mee te kunnen beantwoorden. Het is voor grotere populatiestudies onhaalbaar om elk

celtype van een weefsel apart te meten, en dat hoeft voor de meeste kandidaat genen ook niet (Hoofdstuk 2). Wel is het van belang dat er per individu gegevens zijn over de aantallen van de belangrijkste celtypen in bloed, om rekening te kunnen houden met de invloed van onderlinge verschillen in de cellulaire compositie die aan epigenetische verschillen tussen mensen ten grondslag kunnen liggen (Hoofdstukken 2 en 4). Verder geven onze resultaten aan dat via het verzamelen van meerdere toegankelijke weefselmonsters meer epigenetische informatie te ontrafelen is over ontoegankelijke, maar ziekte gerelateerde weefsels (Hoofdstuk 6). Bij het verzamelen van informatie over de deelnemers lijkt het waardevol om informatie over dieet en leefomstandigheden in de vroege kindertijd (Hoofdstuk 3), aan het beroep gerelateerde omgevingsfactoren, of aan de gekozen leefstijl te vragen. Verder komt uit dit proefschrift sterk naar voren dat er behoefte is aan databases waarmee de genomwijde epigenetische variatie tussen personen, tussen de weefsels binnen een persoon en de veranderlijkheid van deze variatie binnen een weefsel over de tijd geraadpleegd kan worden. Er wordt op dit moment veel geïnvesteerd in het creëren van zulke databases waardoor het te verwachten is dat dit soort informatie in de nabije toekomst steeds beter voorhanden is.

Desalniettemin zal niet elke epigenetische vraag middels humane populatiestudies beantwoord kunnen worden. Het zou ook teveel zijn dit te verwachten. Dit proefschrift toont echter aan dat met aanpassing van bekende (klassieke) epidemiologische studieontwerpen en het zorgvuldig combineren van populatiestudies er epigenetisch onderzoek mogelijk is waarin omstandigheden en ziekten over een heel leven aan elkaar kunnen worden gekoppeld. Als daarbij ook de kennis van genetische erfelijkheid en genexpressie geïncorporeerd kan worden, kunnen een aantal belangrijke vragen over het ontstaan van verouderingsziekten systematisch worden onderzocht. Samenvattend belooft de epigenetische epidemiologie in de nabije toekomst een boeiende en betekenisvolle bijdrage te leveren aan het ontrafelen van de complexe interactie tussen gen en omgeving die uiteindelijk de sleutel vormt voor het ontstaan van complexe verouderingsziekten zoals HVZ.