

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22065> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Tobi, Elmar W.

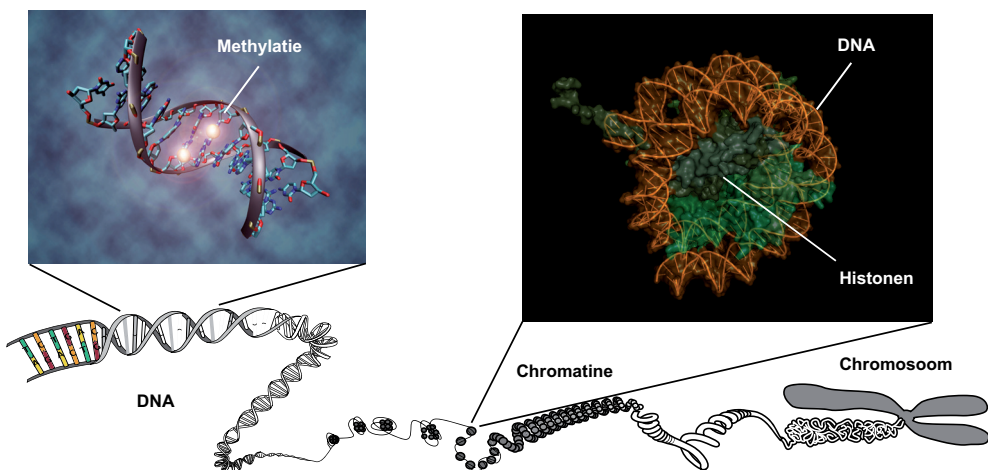
**Title:** Epigenetic differences after prenatal adversity : the Dutch hunger winter

**Issue Date:** 2013-10-29

# Samenvatting

## Introductie

Ons DNA bevat alle informatie die nodig is om alle cellen in het lichaam aan te maken en te laten functioneren. Gedurende de embryonale ontwikkeling worden delende cellen steeds meer in een keurslijf gedwongen totdat elke cel één functie krijgt, bijvoorbeeld die van een spiercel of een levercel. Hiervoor moeten delen van de genetische code die de juiste informatie bevatten voor dit celtype aan worden gezet en andere delen uit gezet. De meest bestudeerde mechanismen die dit bewerkstelligen zijn de methylatie van DNA en de aanpassing van histonen. DNA methylatie is een chemische verandering van de CG base paar combinaties in onze erfelijke code en histonen zijn eiwitten waar het DNA omheen gewikkeld is (**Figuur 1**). Beiden beïnvloeden ze hoe compact ons DNA in de celkern is opgeborgen en daarmee hoe toegankelijk dit is voor enzymen en eiwitten om de code 'aan de praat te krijgen' en de expressie van genen te bewerkstelligen. Ze zijn de software die bepalen welk deel van de supercomputer, het DNA, actief is.



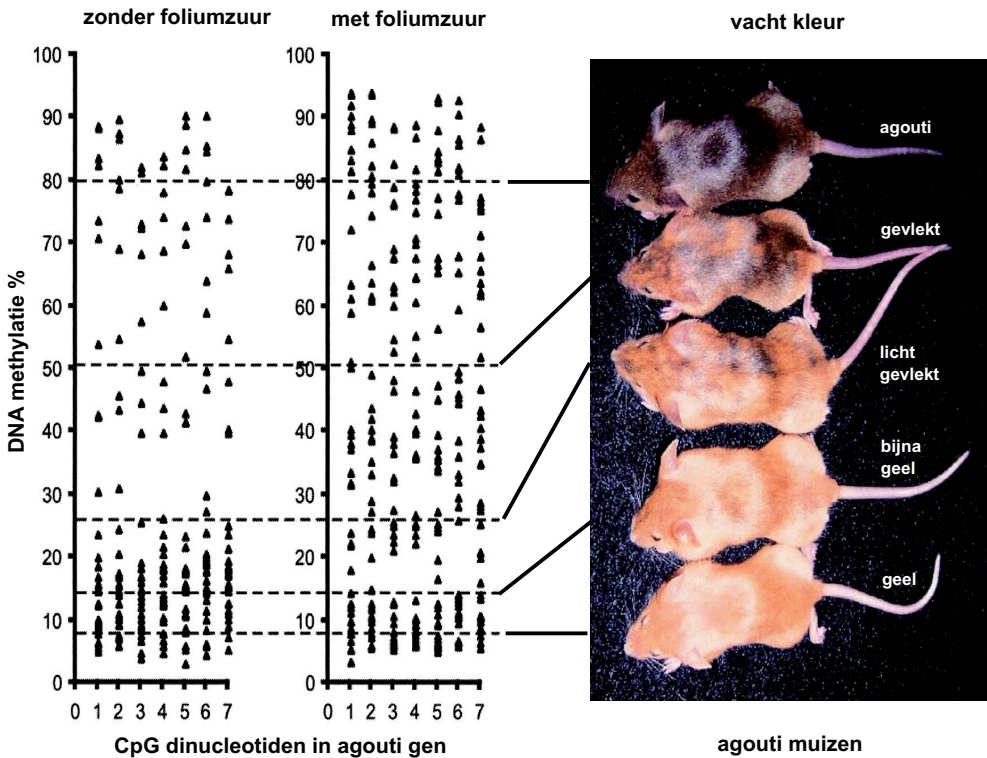
**Figuur 1.**

DNA methylatie beïnvloedt hoe dicht DNA wordt opgevouwen, doordat er dan wel of niet eiwitten en enzymen aan DNA kunnen plakken. DNA zit normaal opgerold om histonen, grote stukken eiwit, deze histonen kunnen met elkaar dichte rollen vormen (chromatine) die weer opgerold worden in grotere structuren, de chromosomen. ©C.Bock 2012, ©R.Breggen 2012, ©wikimedia

Al heel lang is bekend dat omgeving tijdens de zwangerschap en jeugd invloed heeft op de gezondheid in het latere leven. Dit zijn voorbeelden van biologische fenomenen die niet 1-2-3 te verklaren zijn met de erfelijkheidswetten. Dierstudies wijzen naar een mechanisme om deze relaties te verklaren. *Agouti* muizen kunnen een kleur hebben van geel naar bruin gevlekt tot geheel bruin. Deze kleur erft altijd over via de moederlijke lijn. Ook de hoeveelheid foliumzuur in het dieet van de zwangere muis kan de gemiddelde vachtkleur doen veranderen in het toekomstige nestje. In 2003 werd ontdekt dat deze vachtkleur bepaald wordt door de hoeveelheid DNA methylering van het vachtkleur gen en dat was afhankelijk van het foliumzuur in het dieet van de moeder. Er wordt geen gele kleur aangemaakt als er veel DNA methylering op het gen zit: de muis wordt bruin (**Figuur 2**). Deze verschillen konden ook nog eens naar een volgende generatie worden doorgegeven. De mogelijke moleculaire schakel tussen omgevingsfactoren tijdens de vroege ontwikkeling en gevolgen in het latere leven was ontdekt. Andere voedingsexperimenten bij muizen en ratten toonden vervolgens aan dat veranderingen van DNA methylering ook plaats vindt in genen die betrokken zijn bij de 'ziekte-eigenschappen' van hypertensie en diabetes. De hypothese werd geformuleerd dat dit principe ook wel eens bij de mens kon werken. De basis voor dit proefschrift was geboren.

## De Honger Winter

Veel mensen in Nederland hebben geleden onder de Honger Winter van '44-45. Mensen hadden zo weinig te eten dat ze op het dieptepunt minder dan 500 kilocalorieën per dag binnen kregen. Na de oorlog begon langzaam het onderzoek naar de gevolgen van de Honger Winter op de volksgezondheid. Allereerst door het bestuderen van gegevens verzameld door het Centraal Bureau voor de Statistiek en de medische keuring van jonge rekruten. Dit laatste leidde tot een belangrijke publicatie van Dr. Ravelli, Stein en Susser in het gezaghebbende *The New England Journal of Medicine* in 1976. Zij stelden vast dat rekruten die waren blootgesteld aan de Honger Winter tijdens de eerste helft van de zwangerschap vaker extreem overgewicht hadden op 19



**Figuur 2.**

Hier zie je dat met foliumzuur er meer plekken zijn in het DNA van de muis (1 t/m 7) waar de DNA methylatie hoog is. Als de DNA methylatie hoger is, dan is het muisje bruiner van kleur. Met foliumzuur in de voeding van de moedermuis zijn er meer muisjes in het uiteindelijke nestje met een hogere methylatie en dus bruinere kleur. Figuur aangepast uit Waterland *et al.* *MCB*, 2003, ©American Society of Microbiology 2003.

jarige leeftijd. Later zijn er studies opgezet door onderzoekers in Amsterdam, zoals Dr. Lumey, om specifiek die mensen te bestuderen die de Honger Winter hebben doorgemaakt in de baarmoeder. Het bleek dat deze mensen niet alleen een hoger risico hebben op zwaarlijvigheid, maar ook op een ongunstige cholesterol spiegel en een verhoogde kans op diabetes. We weten dankzij geboortegegevens wanneer en hoelang specifieke mensen in de baarmoeder zijn blootgesteld aan extreme ondervoeding. Dit is van belang omdat blootstelling gedurende bepaalde periodes geassocieerd is met een hogere kans op specifieke gezondheidsklachten later in het leven.

Zo hebben mensen die verwekt zijn tijdens de Honger Winter een verhoogd risico op schizofrenie.

Tijdens de Honger Winter functioneerden de ziekenhuizen, waardoor we van sommige mensen aan de hand van hun geboortegegevens met zekerheid kunnen achterhalen gedurende welke periode ze zijn blootgesteld. Verder was de blootstelling heftig en van toepassing op de hele populatie, dit maakt dat de ramp van de Honger Winter een schat van informatie kan opleveren over de invloed van prenatale ondervoeding op de gezondheid in het latere leven en de moleculaire mechanismen die hier een rol bij spelen.

## De basis: wat te meten, en de eerste stappen

Koelkasten en vriezers vol, veel onderzoeksinstituten hebben DNA opgeslagen, maar monsters waar nog histonen in gemeten kunnen worden zijn helaas heel schaars. Ook is de technologie om DNA methylatie te meten heel erg verbeterd zodat er nu veel meer genen en mensen tegelijkertijd kunnen worden gemeten. We zijn aan het begin van dit proefschrift eerst gaan onderzoeken of er verschillen zijn in DNA methylatie tussen normale mensen en hoe stabiel deze DNA methylatie is (**Hoofdstuk 2**).

Daarna wilden we weten of omgevingsfactoren tijdens de ontwikkeling invloed kunnen hebben op DNA methylatie van belangrijke genen in de mens. We kozen voor het groei-gen *IGF2*. Dit gen speelt een cruciale rol tijdens de vroege ontwikkeling. *IGF2* regelt de overdracht van voeding via de placenta naar de foetus. Verder erft DNA methylatie van dit gen via de moeder over. Onze hypothese was dat vooral blootstelling rond de conceptie en het eerste trimester van invloed kon zijn op DNA methylatie van dit gen. De Honger Winter Familie studie bood ons de mogelijkheid dit uit te zoeken. Voor het epigenetisch onderzoek hebben we DNA verkregen uit bloed van 122 mensen die verwekt waren of al in het laatste trimester van de embryonale ontwikkeling waren tijdens de Honger Winter. We vergeleken de DNA methylatie van het *IGF2* gen tussen de mensen die in de baarmoeder zijn blootgesteld en hun broer of zus die niet in de baarmoeder zijn blootgesteld (**Hoofdstuk 3**). Degenen die heel vroeg in de ontwikkeling waren blootgesteld

hadden minder DNA methylatie dan hun broer of zus, terwijl degenen die laat in de baarmoeder waren blootgesteld (doordat de moeder al zwanger was toen de Hongerwinter begon) geen verschil met hun broer of zus hadden. Op deze manier konden we als eerste onderzoeksgroep aantonen dat ondervoeding vroeg in de ontwikkeling de DNA methylatie in mensen kan beïnvloeden.

## Hoe verhoudt dit zich tot de medische bevindingen?

Mensen die blootgesteld zijn aan de Honger Winter in de baarmoeder hebben 60 jaar later een hoger risico op zwaarlijvigheid, een ongunstige cholesterol spiegel en diabetes. Deze associaties zijn vaak specifiek voor een specifieke prenatale blootstellingsperiode of zijn alleen gevonden in vrouwen of mannen. Volgen DNA methylatie veranderingen dezelfde patronen? Daarom keken we vervolgens in nog eens 15 kandidaat genen die een rol spelen in de vroege ontwikkeling en de stofwisseling in dezelfde mensen als voor *IGF2* (**Hoofdstuk 4**). Wederom vonden we genen met een andere DNA methylatie na een Honger Winter blootstelling. Nu vonden we echter ook toenames in DNA methylatie, die vaak ook nog eens alleen in mannen of alleen in vrouwen bleken voor te komen. Ook was één gen, leptine (*LEP*), zowel verhoogd in de vroeg als laat in de zwangerschap blootgestelde mensen. De meeste genen waren gevoelig voor de vroege blootstellings periode, maar de DNA methylatie veranderingen volgden dezelfde patronen als de epidemiologische bevindingen over o.a. diabetes.

## Relevantie voor de huidige dag?

Er bestaat veel epidemiologisch onderzoek waarin men een verband aantoonde tussen een laag geboortegewicht of een prenatale groei beperking en dezelfde problemen op middelbare leeftijd als bij mensen die in de baarmoeder aan de Honger Winter waren blootgesteld. Er wordt dan ook gesuggereerd dat een laag geboortegewicht wijst op een slechte overdracht van voeding van de moeder naar het kind. Een redelijk controversiële

aanname. Echter, diersmodellen die deze relaties moeten nabootsen omvatten vaak toch interventies in de voeding van zwangere proefdieren. Echter, een verstoring in de bloedsomloop in de placenta kan ook prenatale groei beperking veroorzaken. Deze ‘placentale insufficiëntie’ heeft echter andere gevolgen op genen dan voedingsinterventies in dieren.

We vroegen ons dan ook af of prenatale groei beperking lijkt op ondervoeding qua DNA methylatie veranderingen in de mens. We vergeleken de DNA methylatie van 4 genen waarvan we in ons onderzoek hadden gevonden dat deze gevoelig waren voor de Honger Winter blootstelling in het DNA van een groep jong volwassenen die te vroeg geboren waren en die meededen in de zogenaamde POPS studie. De ene helft had een prenatale groei beperking en de andere helft niet (**Hoofdstuk 5**). We bestudeerden te vroeg geboren jong volwassenen omdat blootstelling vroeg in de zwangerschap het meeste gevolgen leek te hebben op DNA methylatie. We vonden geen DNA methylatie verschillen tussen mensen met en zonder prenatale groei beperking.

Kunnen deze DNA methylatie verschillen dan niks zeggen over moderne zwangerschappen en hun complicaties? Andere onderzoekers hebben DNA methylatie verschillen gevonden met andere blootstellingen. Zo is DNA methylatie van leptine (**Hoofdstuk 4**) ook geassocieerd met zwangerschaps diabetes en met een lage sociaal economische status van de moeder en de duur van borstvoeding geven. *IGF2* methylatie (**Hoofdstuk 3**) van het kind is ook geassocieerd met de hoeveelheid vitamine B<sub>12</sub> in het bloed van de moeder en haar rookgedrag vroeg in de zwangerschap. Deze laatste bevinding is al in 2 studies opnieuw gedaan. De studie van de Honger Winter lijkt dus wel degelijk relevant voor het hier en nu in Nederland. Daarnaast komen hongersnoden helaas nog vaak voor in de wereld.

## Klein maar veel; Nurture & Nature

De meeste DNA methylatie verschillen zijn klein en we wilden graag weten hoe dit genen zou kunnen beïnvloeden. Zijn ze misschien met velen? Daarom breidden we onze metingen uit in de 60 mensen met een Honger



Winter blootstelling vroeg in de zwangerschap. We keken naar bijna alle stukken DNA rond het *IGF2* gen (**Hoofdstuk 6**) waarvan bekend is dat ze de werking van het *IGF2* gen beïnvloeden. Verder bekeken we ook hoe groot de invloed was van de genetische variatie op DNA methylatie van *IGF2*. Want is klein wel klein en niet gewoon normaal? DNA methylatie van bijna alle stukken DNA was geassocieerd met de Honger Winter blootstelling. Dit kan mogelijk verklaren hoe DNA methylatie de activiteit van genen beïnvloedt: veel kleine veranderingen maken samen het verschil. De invloed van variatie in de DNA code zelf bleek even groot als de invloed van de Honger Winter blootstelling. DNA methylatie van sommige stukken rond het bestudeerde gen was geassocieerd met zowel DNA variaties als de honger winter blootstelling. Deze associaties waren onafhankelijk van elkaar. Nature en Nurture lijken elkaar niet in de weg te zitten.

## Het hele genoom

Op welke stukken DNA is DNA methylatie nu gevoelig voor omgevings invloeden tijdens de (vroeg) ontwikkeling? Om deze vraag te beantwoorden hebben we metingen verricht aan een veel groter gedeelte van het DNA (een veel groter deel van ons genoom zeggen we dan) dan de paar genen die we tot nu toe hadden bestudeerd. Deze opschaling kon worden bewerkstelligd door de allernieuwste techniek te gebruiken om DNA methylatie te meten. We konden 24 van de 60 vroeg blootgestelde mensen en hun broer of zus meten (**Hoofdstuk 7**). Op iets meer dan 1.2 miljoen plekken werd DNA methylatie gemeten.

Uit de analyse van deze data bleek dat de blootstelling aan de Honger Winter vooral een effect had op DNA methylatie in stukken van het genoom die meer en vaker 'aan' staan en een regelende functie hebben. Ook delen van het genoom die actief zijn rond en na de innesteling van het embryo in de baarmoeder waren aangedaan. Verrassend genoeg bleken de meeste aangedane delen midden in genen te zitten, terwijl onderzoekers tot nu toe vaak alleen de delen vlak voor een gen bestuderen. We deden nog een opmerkelijke ontdekking: de mensen die verwekt waren laat in de Honger

Winter bleken de gevonden DNA methylatie verschillen niet te hebben. In deze mensen bleek de Honger Winter geen spoor op hun DNA achter te laten.

De DNA methylatie veranderingen waren verrijkt in groepen genen die samen de insuline en vet huishouding regelen en betrokken zijn in de vroege groei en ontwikkeling. Dit is een interessante observatie omdat een vroege prenatale Honger Winter blootstelling niet leidt tot een afname in geboortegewicht, terwijl het risico later in het leven op zwaarlijvigheid, een ongunstige cholesterol spiegel en diabetes wel hoger is. DNA methylatie in het *CPT1A* gen bleek geassocieerd met zowel de Honger winter blootstelling als 'slecht' LDL cholesterol en DNA methylatie in de insuline receptor (*INSR*) was geassocieerd met zowel de Honger Winter blootstelling als geboortegewicht. De relatie tussen *CPT1A* methylatie en LDL was hetzelfde in de blootgestelde individuen en de controle broers en zussen. De hogere DNA methylatie bij *CPT1A* zou dus potentieel kunnen bijdragen aan het risico op een hoger LDL cholesterol bij de mensen die prenataal zijn blootgesteld aan de Honger Winter.

## Toekomst

We weten nu meer over hoe de Honger Winter DNA methylatie beïnvloedt van mensen die zijn blootgesteld in de baarmoeder. We weten hoe groot deze verschillen zijn en in wat voor stukjes DNA ze het vaakst voorkomen en dat DNA waarschijnlijk pas na de bevruchting gevoelig is. Maar we begrijpen nog niet hoe het komt dat de honger heeft bewerkstelligd dat er ook toenames in DNA methylatie worden gevonden. De karige rantsoenen bevatte ten slotte mogelijk te weinig vitamines en foliumzuur, noodzakelijk om DNA te methyleren, dus we verwachtten eerder een afname in DNA methylatie. Experimenten waarbij we zich ontwikkelende cellen tijdelijk blootstellen aan tekorten en te veel suikers en essentiële vetten, aminozuren en vitamines moeten hier uitsluitsel over geven.

We weten ook nog niet genoeg over de relatie van de DNA methylatie verschillen met de verhoogde risico's op overgewicht, diabetes en schizofrenie.

Onze allereerste associaties met LDL cholesterol en geboortegewicht zijn dan wel interessant, maar moeten nog herhaald en verder uitgediept worden. Hiervoor moeten we veel meer mensen meten om genoeg kracht te hebben in onze analyses en de bevindingen moeten bevestigd worden in onafhankelijke studies. Verder maken de Honger Winter kinderen zich zorgen of er een effect kan worden doorgegeven aan hun eigen kinderen. We willen dan ook graag gaan onderzoeken of er ook DNA methylatie verschillen te vinden zijn in deze kinderen. Met al deze zaken zijn we inmiddels al druk in de weer; de wetenschap is nooit klaar.