

SAMENVATTING

Het doel van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift was het identificeren van DNA polymorfismes die een gedeelte van de variatie in cognitief vermogen tussen mensen kunnen verklaren. Met behulp van familiale data uit twee leeftijdscohorten werden effecten van genetische varianten in vantevoren geselecteerde kandidaat genen onderzocht. Tevens werd onderzocht of de geselecteerde genetische varianten in verschillende leeftijdscohorten differentiele effecten laten zien.

Beschrijving van de onderzoeksgroep

Voor het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift waren twee cohorten beschikbaar: een jong cohort (Polderman *et al.*, 2006a; 2006b) en een volwassen cohort (Posthuma *et al.*, 2005). Beide cohorten bestaan uit tweelingen die opgenomen zijn in het Nederlands Tweelingen Register en hun broers of zussen (Boomsma *et al.* 2006; Boomsma *et al.* 2002) (zie Tabel 8.1). Deelnemers van het Nederlands Tweelingen Register kunnen vrijwillig toestemming geven voor het verzamelen van DNA uit wangslimvlies. Bij alle unisex-tweelingen werd de zygositeit vastgesteld door het genotyperen van 11 polymorfe microsatelliet markers (heterozygositeit > 0.80). Genotyperingen werden uitgevoerd zonder kennis van de familiale status en fenotypische data .

Tabel 1 Zygositeit van de individuen in het jonge en het volwassen cohort uit deze studie

		Jonge Cohort		Volwassen Cohort	
		Gezinnen	Personen	Gezinnen	Personen
MZM	Tweelingparen	35	80	25	66
	Incomplete paren	-	-	15	17
MZF	Tweelingparen	28	65	20	46
	Incomplete paren	-	-	15	16
DZM	Tweelingparen	48	116	15	40
	Incomplete paren	-	-	14	17
DZF	Tweelingparen	23	47	28	71
	Incomplete paren	-	-	28	45
DOS	Tweelingparen	26	60	23	59
	Incomplete paren	-	-	-	-
Enkel tweeling		3	3	12	14
Totaal cohort		163	371	195	391

IQ Phenotypes

Psychometrisch IQ werd in het jonge cohort gemeten met zes subtesten van de WISC-R (Wechsler, 1986), namelijk Rekenen, Cijferreeksen, Blokpatronen, Figuur Leggen, Overeenkomsten en Woordenschat. In het volwassen cohort werd IQ gemeten met 11 subtesten van de WAIS-III (Wechsler, 1997): Onvolledige Tekeningen, Rekenen, Blokpatronen, Overeenkomsten, Cijfers en Letters Nazeggen, Informatie, Matrix Redeneren, Symbool Substitutie – Coderen, Symbool Substitutie – Paren Associëren, Symbool Substitutie – Vrije Reproductie en Woordenschat (zie tabel 8.1a). Erfelijkheidsschattingen voor Totaal IQ (TIQ), Verbaal IQ (VIQ) en Performaal IQ (PIQ) staan in Tabel 8.2b. De gevonden erfelijkheidsschattingen zijn vergelijkbaar met eerdere genetische studies naar IQ in jonge en volwassen cohorten in de Nederlands populatie (Bartels *et al.* 2002; Posthuma *et al.* 2001).

Table 8.2a Subtesten van de WAIS^A en de WISC^B

	Subtest	Description
Verbaal	1 Informatie ^A	Algemene feitelijke kennis, lange termijn geheugen
	2 Overeenkomsten ^{A,B}	Abstract redeneren, categoriseren, relaties leggen
	3 Rekenen ^{A,B}	Aandacht, concentratie, numeriek redeneren
	4 Woordenschat ^{A,B}	Woordenkennis, verbale taalbeheersling
	5 Begrijpen ^A	Sociale regels en concepten begrijpen
	6 Cijferreeksen ^{A,B}	Auditief korte termijn geheugen, concentratie
Performaal	7 Onvolledige	Aandacht voor essentiële details
	8 Symbool Substitutie	-Visuele motorische coördinatie, snelheid, concentratie
	9 Plaatjes Ordenen ^A	Sequentieel, logisch nadenken
	10 Blokpatronen ^B	Ruimtelijk inzicht, abstract visuele problemen oplossen
	11 Figuur Leggen ^B	Visuele analyse, samenstelling van objecten
	12 Symbool Zoeken ^A	Verwerking van nieuwe informatie
	13 Mazes ^A	Fijne motorische coördinatie, planning van richtingen

Table 8.2b Erfelijkheidsschattingen (h^2) voor Totaal IQ (TIQ), Verbaal IQ (VIQ) en Performaal IQ (PIQ) voor het jonge en volwassen cohort

Eigenschap	Subtest(en)	Erfelijkheidsschattingen (h^2)
TIQ jonge cohort	2, 3, 4, 6, 10, 11	0.80 (0.72-0.85)
TIQ volwassen cohort	1, 2, 3, 4, 10, 12, 13	0.78 (0.72-0.83)
VIQ jonge cohort	2, 3, 4, 6	0.70 (0.59-0.78)
VIQ volwassen cohort	1, 2, 3, 4	0.78 (0.72-0.83)
PIQ jonge cohort	10, 11	0.73 (0.63-0.80)
PIQ volwassen cohort	10,12,13	0.71 (0.62-0.77)

Het muscarine acetylcholine receptor type 2 (CHRM2) gen en variatie in cognitief vermogen

Muscarine acetylcholine receptoren (mAChR) behoren tot een groep van receptoren met zeven transmembraandomeinen waar adrenerge receptoren ook toe behoren. Deze receptoren geven signalen van buiten de cel door via interactie met intracellulaire GTP-bindende eiwitten. Er zijn verschillende macromoleculaire interacties betrokken bij de respons op activatie van muscarinerge receptoren (Hulme 1990), variërend van de remming van adenylyl cyclase tot stimulatie van hydrolyse van fosfoinositide en de regulatie van kaliumkanalen (Caulfield 1993). Promotors van neuronale eiwitten bevatten een bindingsplaats voor diverse transcriptie factoren waarvan de expressie verhoogd wordt door mAChR activatie (Nitsch *et al.* 1998; Von der Kammer *et al.* 1999).

Het *CHRM2* gen is bijzonder interessant voor ons onderzoek omdat het een autoreceptor activiteit heeft in hersenstructuren zoals de hippocampus, die van fundamenteel belang is voor geheugen en leerprocessen (Iannazzo & Majewski 2000). Het gen zou betrokken kunnen zijn bij de fijne afstemming van de terugkoppeling van inhibitie na geheugenvorming (Miranda *et al.* 2000; Orsetti *et al.* 1996). In het onderzoek beschreven in dit proefschrift is onderzocht of er een verband bestaat tussen genotypische variatie in het *CHRM2* gen en variatie in cognitieve fenotypes (Hoofdstukken 2 en 3).

In het volwassen cohort vonden we in intron 4 van het *CHRM2* gen een associatie met variatie in perfoormaal IQ (PIQ) ($\chi^2=9.14$, $P=0.003$; 6.89 IQ punten bewerkstelligt in perfoormaal IQ). In het jonge cohort vonden we een associatie van een gedeelte van het gen dat intron 5 bevat (het laatste intron voorafgaand aan de coderende sequentie) met variatie in totaal IQ (TIQ) ($\chi^2=7.14$, $P=0.008$; 5.35 IQ punten bewerkstelligt in totaal IQ) en verbaal IQ (VIQ) ($\chi^2=9.50$, $P=0.002$; 5.30 IQ punten bewerkstelligt in verbaal IQ). Deze associaties bevestigen de resultaten van andere onafhankelijke studies waarin ook werd gevonden dat *CHRM2* een rol speelt in cognitie (Comings *et al.* 2003; Dick *et al.* 2006; Dick *et al.* 2007). Omdat in het jonge cohort een associatie werd gevonden met een ander gedeelte van het *CHRM2* gen dan in het volwassen cohort, zou men kunnen veronderstellen dat de beide regio's regulatoire elementen bevatten die verschillend gebruikt worden in verschillende levensstadia. In een eerste gen-expressie studie (hoofdstuk 3) werd vooralsnog geen verschil gevonden tussen de gen expressie van de verschillende genetische varianten van *CHRM2*.

Het belang van de beschikbaarheid van choline tijdens de hersenontwikkeling en in het bijzonder de ontwikkeling van de hippocampus, wordt ondersteund door een grote hoeveelheid literatuur (Blusztajn and Wurtman 1983; Blusztajn *et al.* 1998;

Glenn *et al.*, 2007; Mellot *et al.*, 2007). Cermak en collega's (Cermak *et al.* 1998) vonden bijvoorbeeld bij muizen een significante associatie tussen de beschikbaarheid van choline en de prestatie in hippocampus-gerelateerde taken. De snelheid van turnover van ACh (d.w.z. synthese, afbraak en choline gebruik) die ten grondslag ligt aan deze associatie leek vroeg in het leven geprogrammeerd te zijn door de hoeveelheid beschikbare ACh tijdens kritieke ontwikkelingsstadia. De hippocampus van muizen met een prenatale choline deficiëntie werd bijvoorbeeld gekarakteriseerd door een versnelde ACh turnover, wat mogelijk wijst op een adaptieve respons op de verlaagde beschikbaarheid van ACh in utero (Cermak *et al.*, 1998). Een dergelijke "metabool imprinting" hypothese is aantrekkelijk vanuit het oogpunt van de epigenetica omdat de hypothese rekening houdt met omgevingsinvloeden die in utero hun uitwerking hebben en die een verklaring kunnen bieden voor het gebrek aan replicatie van associatie studies waarin uitsluitend genetische factoren bestudeerd worden (Niculescu *et al.* 2006).

De rol van het "synaptosomal protein of 25 kDa" (SNAP-25) gen in synaptische plasticiteit en cognitieve vaardigheden

Het "synaptosomal protein of 25 kDa" (*SNAP-25*) gen was één van de kandidaat genen die in deze studie is onderzocht (Hoofdstuk 4 en 5). Verschillende studies hebben een associatie gevonden tussen dit gen en verstoord cognitief functioneren, variërend van ADHD tot schizofrenie. *SNAP-25* is actief in verschillende organen en weefsels. In de hersenen, en met name in de hippocampus, is *SNAP-25* noodzakelijk voor 'long-term potentiation' (LTP) en het geheugen (Hou *et al.* 2004; Hou *et al.* 2006). In de hersenen komen de isoformen *SNAP-25a* en *SNAP-25b* voor, deze zijn ontstaan door alternatieve splicing van exon 5 (Bark & Wilson 1991). Tijdens de ontwikkeling is *SNAP-25a* de meest voorkomende isoform. Deze isoform is onder andere betrokken bij synaptogenese. Echter, in het volwassen brein is *SNAP-2b* de meest voorkomende isoform. Dit eiwit vormt een zogenaamd "fusion machinery complex" (SNARE) samen met syntaxine en de twee synaptische vesicle proteïnen synaptobrevine en synaptotagmine. Deze eiwitten faciliteren exocytose van neurotransmitters uit synaptische vesicles in de synaptische spleet. Beide isoformen zijn noodzakelijk om de balans tussen de vorming van synapsen en het vrijkomen van neurotransmitter vesicles te bewaren. In de hoofdstukken 4 en 5 wordt een genomische variatie geschreven in intron 1 van het *SNAP-25* gen dat geassocieerd wordt met een variatie in het IQ fenotype (d.w.z. Totaal IQ (TIQ): $\chi^2 = 15.99$ $P = 0.0001$, 3.28 IQ punten bewerkstelligt in totaal IQ, Verbaal IQ (VIQ): $\chi^2 = 13.01$ $P = 0.0003$, 2.76 IQ punten bewerkstelligt in verbaal IQ, en Performaal IQ (PIQ): $\chi^2 = 11.22$ $P = 0.0008$, 3.21 IQ punten bewerkstelligt in perfoormaal IQ).

Deze (niet-)coderende variant in intron 1 is mogelijk betrokken bij de regulatie van de expressie van de verschillende isoformen, omdat alle geassocieerde SNPs gelokaliseerd zijn in mogelijke “transcription factor binding sites” (TFBS). *Quantitative trait loci* (QTL) met klein effect kunnen complexe aandoeningen verklaren. Het is hierdoor ook mogelijk dat variaties in niet-coderende gebieden een effect hebben op regulatieve sequenties (bv. TFBS, promoters, enhancers). De regulatie van gen expressie kan op deze manier subtieler beïnvloed worden dan door polymorfismen in coderende gebieden.

Naast de verklaring dat deze geassocieerde varianten biologisch relevant zijn, is er ook een andere mogelijkheid. Namelijk, dat deze geassocieerde varianten in “linkage disequilibrium” (LD) zijn met de *causale* polymorfisme(n). Functionele studies zijn noodzakelijk om uit te zoeken of deze polymorfismen inderdaad functionele varianten zijn die variatie in cognitie kunnen verklaren.

Functionele niet-synonieme polymorfisme onder positieve evolutionaire selectie ligt aan basis van fenotypische verschillen in cognitief vermogen

Op basis van een vergelijkende genoom analyse werd een tweedelig studieopzet voorgesteld waarbij in genen, die een verhoogde snelheid van eiwit evolutie laten zien in primaten, gezocht werd naar het voorkomen van niet-synonieme coderende SNPs die verschillen tussen de huidige menselijke populatie en de chimpansee (Hoofdstuk 6). Deze studie was gericht op genen die tot expressie komen in het centraal zenuwstelsel, omdat onze belangstelling uitging naar het vinden van genen die betrokken zijn bij fenotypische verschillen in cognitief vermogen. Omdat er in het algemeen wordt aangenomen dat genen die onder positief selectieve druk staan tussen primaten de verschillen tussen mens en chimpansee bewerkstelligen ligt het voor de hand om te veronderstellen dat amino zuur substituties op deze positief geselecteerde eiwitposities fenotypische verschillen tussen mensen zouden kunnen verklaren. Na dergelijke kandidaatgenen geselecteerd te hebben werd een associatie studie tussen cognitief vermogen en de β -2 adrenerge receptor uitgevoerd. De β -2 adrenerge receptor behoort tot de G-eiwit gekoppelde receptor superfamilie en bemiddelt in verschillende weefsels (Liggett 2000) enkele fysiologische effecten van catecholamines (noradrenaline en adrenaline) als gevolg van activatie door noradrenaline (NA) (Kobayashi & Kobayashi 2001). Verschillende studies hebben de betrokkenheid van ADRB2 bij geheugenformatie en leervermogen vastgesteld. “long-term potentiation” (LTP) in de hippocampus neemt toe na activatie van de β -2 receptor, en deze activatie induceert op zijn beurt LTP (Hillman *et al.* 2005). In overeenstemming met deze bevinding is aangetoond dat het gebruik van β 2- agonisten (Gibbs & Summers 2000) prestaties in geheugen- en leervermogen toetsen verhoogd, terwijl β 2-

antagonisten het vasthouden van geheugen verstoren (Gibbs & Summers 2005). Voor deze studie zijn twee niet-synonieme coderende SNPs (rs1042713 and rs1042714) in de β -2 adrenerge receptor gekozen om een genetische associatiestudie met IQ uit te voeren in twee onafhankelijke Nederlandse cohorten van verwanten. Het is treffend dat werd gevonden dat juist de mens-specifieke variant van de receptor (rs1042713) een toename van 8 IQ punten bewerkstelligt in verbaal IQ. Enige terughoudendheid bij deze vinding is wel op zijn plaats aangezien effect groottes in relatief kleine sample vaak worden overschat.

Positieve heterosis en gen-gen interactie bij het functioneren van het werkgeheugen

In Hoofdstuk 7 hebben we getest of er een associatie van het Val^{108/158}Met polymorfisme in catechol O-methyl transferase (COMT) met werkgeheugen (WG) was. Met/Val heterozygoten bleken beter te presteren in de WG taken dan homozygoten. Met andere woorden: we vonden aanwijzingen voor positieve heterosis. De associatie werd gevonden in het volwassen cohort, maar niet in het jonge cohort. In een longitudinale studie van Harris en collega's (2005) werden leeftijdsafhankelijke effecten van positieve heterosis gevonden. In de literatuur is gesuggereerd dat het COMT polymorfisme een niet-lineair effect heeft op de beschikbaarheid van DA in de prefrontale cortex (PFC) (Mattay *et al.* 2003). Daarnaast is gevonden dat het verband tussen DA signalering en cognitief vermogen een omgekeerde U-vormige curve volgt, waarbij zowel suboptimale als supra-optimale DA activiteit het functioneren van de prefrontale cortex belemmert (Cools & Robbins 2004). Onze bevinding van heterosis is in overeenstemming met deze ideeën. De DA activiteit hangt echter niet alleen af van de afbraaksnelheid (COMT), maar ook van de aanwezigheid van DA receptoren. Cognitief vermogen zou daarom ook sterk af kunnen hangen van de D1/D2 bindingsratio, waarbij een relatief tekort aan D1 signalering impulsiviteit, aandachtstekort en slecht werkgeheugen veroorzaakt, met schizofrenie aan het extreme einde van het spectrum (Winterer *et al.* 2004). Een relatief tekort aan D2 signalering zou het verwerken van informatie over beloning kunnen verstoren. De PFC heeft dit signaal nodig om het werkgeheugen bij te kunnen werken (Weinberger *et al.* 2001). Individuele verschillen in zowel DA beschikbaarheid als D2 receptor gevoeligheid kunnen daarom een rol kunnen spelen bij de prestatie op WG taken. Deze hypothese hebben wij getest met een tweede analyse, waarin we onderzochten of er interactie was tussen een DRD2 tagging SNP (rs2075654) en het COMT polymorfisme. Er werd geen significant hoofdeffect gevonden van de rs2075654 tag-SNP op WG, noch in het jonge cohort, noch in het volwassen cohort. Er was

echter wel een significante interactie tussen het DRD2 genotype en het effect van het COMT polymorfisme op WG wanneer de jonge en volwassen groep werden gecombineerd. In het onderzoek beschreven in Hoofdstuk 7 werd gevonden dat de Met/Val heterozygoten uitsluitend beter presteerden dan Met/Met en Val/Val homozygoten wanneer ze tenminste één A1 allel droegen. Een dergelijk patroon is eerder beschreven door Reuter *et al.* (2005), die een significante interactie vonden tussen het DRD2 Taq IA polymorfisme en het COMT polymorfisme bij de mate van respons interferentie in de Stroop kleur-woord test. Zowel bij dieren (Lee *et al.* 2001) als bij mensen (Kaasinen & Rinne 2002) is bewijs gevonden voor leeftijdsafhankelijke veranderingen in DA metabolisme in de PFC, waarbij verondersteld wordt dat er op latere leeftijd een verhoogd DA metabolisme is (bv. MAO, COMT; (Gottfries 1990), terwijl het aantal DA receptoren afneemt met de leeftijd (Suhara *et al.* 1991; Volkow *et al.* 1996; Wong *et al.* 1984). De volledige genetische bijdrage aan dopaminerge variatie in frontale executieve functies zal afhangen van veel complexere interacties tussen polymorfismen in genen die coderen voor receptoren (bv. DRD1, DRD2, DRD4), transporters en enzymen (bv. DAT, COMT, MAO) (Berman & Noble 1995; Bertolino *et al.* 2006; Tsai *et al.* 2002; Williams & Castner 2006). Zulke interacties dienen verder bestudeerd te worden om een duidelijker overzicht te krijgen van de rol van de dopaminerge pathway bij het presteren in geheugen taken.

Dopaminerge en serotonerge kandidaatgenen

Veel voorkomende varianten in andere vermeende kandidaatgenen uit het dopaminerge (*DBH*, *DRD2*, *DRD3* en *TH*) en serotonerge (*HTR2A* en *SERT*) systeem werden ook onderzocht in dit proefschrift. Wegens het uitvoeren van meerdere statistische testen en de vergrootte kans die daardoor ontstaat op het vinden van vals-positieve uitkomsten, is een strenge correctie op de statistische significantie uitgevoerd. Geen van bovengenoemde genen liet na deze correctie een significant effect zien. Een complete tabel met uitkomsten van deze analyse opgenomen in de bijlage zie Tabellen in bijlage I).

Samenvattend zijn er in een kandidaatgenstudie twee typen polymorfismen gevonden die associatie vertonen met variatie binnen verschillende cognitieve vaardigheden: coding oftewel functionele polymorfismen (in *COMT* en *ADRB2*) en (non)coding polymorfismen (in *CHRM2*, *SNAP-25* en *DRD2*). Effecten van het eerste type impliceren veranderingen die op eiwit niveau geobserveerd kunnen worden (zoals b.v. enzymactiviteit), terwijl het andere type beschouwd moet worden als onderdeel van een groter spectrum van regulatoire elementen waarvan de genetische contributie, alhoewel klein in omvang, noodzakelijk is voor het

uiteindelijke fenotype. Toekomstige functionele studies, in combinatie met analyse van gen expressie profielen van verschillende hersengebieden, kunnen helpen in het verkrijgen van inzicht in de rol van genetische varianten en hun relatie met synaptische plasticiteit die ten grondslag ligt aan cognitie, leer- en attentieproblemen.

