

9 | Samenvatting

Inleiding

Hart- en vaatziekten zijn de meest voorkomende doodsoorzaak in Westerse landen. Do hoofdoorzaak van hart- en vaatziekten is het ophopen van vet in de wand van slagaders in combinatie met een ontstekingsreactie. Dit proces wordt atherosclerose genoemd, ook wel aderverkalking. Omdat de vetten cholesterol en triglyceriden, ook lipiden genoemd, niet oplosbaar zijn in water, worden ze door het bloed getransporteerd in bolletjes die lipoproteïnen worden genoemd. Er zijn lipoproteïnen die lipiden van de lever naar de spieren en organen brengen (*Very Low Density Lipoproteins* en *Low Density Lipoproteins*) en lipoproteïnen die overtollige lipiden weer terug brengen naar de lever (*High Density Lipoproteins*). Op de oppervlakte van de lipoproteïnen zijn eiwitten aanwezig die zorgen dat de verschillende soorten lipoproteïnen op de juiste bestemming aankomen. Deze eiwitten noemen we apolipoproteïnen. Op de VLDL- en LDL-deeltjes zijn als belangrijkste wegwijzers de apolipoproteïnen B en E aanwezig en op de HDL-deeltjes de apolipoproteïnen A1 en A2. De voornaamste risicofactoren voor de ontwikkeling van aderverkalking zijn verhoogde bloedplasmaspiegels van de lipiden LDL-cholesterol, totaal-cholesterol, triglyceriden, en de apolipoproteïnen B en E, en verlaagde bloedplasmaspiegels van het lipide HDL-cholesterol en de apolipoproteïnen A1 en A2. Deze risicofactoren zijn een voorbode van hart- en vaatziekten en representeren het vetmetabolisme als één van de betrokken processen die leiden tot hart- en vaatziekten. Om meer inzicht te krijgen in welke rol genen spelen bij het ontstaan van hart- en vaatziekten, zijn lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels onderzocht als risicofactoren voor hart- en vaatziekten. De studies beschreven in dit proefschrift zijn gericht op het vinden van genen die een belangrijke rol spelen in het bepalen van de lipiden- en apolipoproteïnen-bloedplasmaspiegels in de algemene bevolking.

In deze studies zijn vier tweelingpopulaties onderzocht; één populatie van adolescente Nederlandse tweelingen, één van volwassen Nederlandse tweelingen, één van volwassen Zweedse tweelingen en één van volwassen Australische tweelingen. Deze vier populaties kunnen worden gebuikt om te onderzoeken of een resultaat gerepliceerd kan worden en of in elk van de tweelingpopulaties dezelfde genen een rol spelen bij de variatie in lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels.

Erfelijkheid van plasma spiegels van cholesterol en apolipoproteïnen

Om de grootte van de invloed van genen en omgeving op de variatie in bloedplasma spiegels van lipiden en apolipoproteïnen te onderzoeken, is de erfelijkheid van deze eigenschappen geschat in de vier tweelingpopulaties (Hoofdstuk 2). Dit kan door de gelijkheid van de spiegels van eeneiige en twee-eiige tweelingen met elkaar te vergelijken. Eeneiige tweelingen hebben identiek DNA materiaal en twee-eiige tweelingen hebben gemiddeld de helft van hun DNA materiaal gemeenschappelijk. Wanneer de bloedplasma spiegels van eeneiige tweelingen meer gelijk zijn dan de bloedplasma spiegels van twee-eiige tweelingen, dan mag geconcludeerd worden dat bij twee-eiige tweelingen meer verschil in de hoogte van de spiegels is, omdat er meer verschil in het DNA materiaal is. Dit houdt in dat variatie in genen bijdraagt aan de hoogte van de lipiden- en apolipoproteïnen spiegels, dus dat die erfelijk is. Wij vonden dat tussen de 48 en 87% van de variatie in bloedplasma spiegels van lipiden en apolipoproteïnen wordt veroorzaakt door genetische factoren. Ook de erfelijkheid van apolipoproteïne E en apolipoproteïne A2 spiegels, die tot nu toe slechts zelden zijn beschreven, is vrij hoog, net zoals dat van de andere cholesterol en apolipoproteïnen spiegels. Familieomgeving, zoals bijvoorbeeld het voedingspatroon of sociaal economische klasse, is niet van invloed op deze risicofactoren voor hart- en vaatziekten en de erfelijkheid van de spiegels is niet verschillend voor mannen en vrouwen, maar is wel verschillend in de vier landen. In de Nederlandse tweelingen is de erfelijkheid het hoogst en in de Australische tweelingen het laagst. Het verschil in erfelijkheid van de cholesterol en apolipoproteïnen spiegels zou kunnen komen doordat de invloed van de omgeving, zoals bijvoorbeeld eetpatronen, groter is in Australië of doordat verschillende factoren uit de omgeving een interactie aangaan met de genen.

In het algemeen blijkt echter dat de variatie in de lipiden- en apolipoproteïnen spiegels tussen mensen voor een heel groot deel bepaald wordt door de variatie in genen. De tweelingpopulaties uit drie verschillende landen vormen uniek materiaal om te onderzoeken welke genen invloed hebben op de hoogte van de lipiden- en apolipoproteïnen spiegels.

Protocol voor het scannen van het totale genoom

Erfelijkheid speelt dus een belangrijke rol in het bepalen van de plasma spiegels van cholesterol en apolipoproteïnen, maar welke genen deze rol precies vervullen is nog onduidelijk. Er zijn ongeveer 30.000 genen aanwezig in het menselijk genoom, dat is het complete menselijke DNA. Het zou te veel moeite kosten om al die genen één voor één te onderzoeken en daarom zijn we begonnen met een systematische scan van het hele genoom. In een totale genomscan kunnen chromosomale gebieden gevonden worden waar genen liggen die bepalend zijn voor lipiden- en apolipoproteïnen spiegels.

Voor een genomscan is het nodig dat wordt onderzocht welke chromosomale gebieden twee-eiige tweelingen gemeenschappelijk hebben geërfd van hun ouders. Twee-eiige tweelingen hebben net als een gewoon broer-broer, broer-zus en zus-zus paar gemiddeld de helft van hun genetisch materiaal gemeenschappelijk. Maar op specifieke delen van een chromosoom kunnen ze genetisch helemaal gelijk, ongelijk of voor de helft gelijk zijn. Om de mate van genetische gelijkheid op specifieke chromosoom gebieden te onderzoeken, worden op regelmatige afstand van elkaar genetische markers gemeten. Genetische markers zijn stukjes DNA die van lengte kunnen variëren zonder dat het een schadelijk uitwerking heeft. Wanneer een tweeling een genetische marker van dezelfde lengte heeft, dan is het met grote zekerheid te zeggen dat ze dat

stukje DNA van dezelfde ouder geërfd hebben, dus gemeenschappelijk hebben. Meer over het principe van de genetische analyse volgt later in deze samenvatting.

Normaal gesproken worden in een totale genoomscan 400 van dit soort DNA stukjes bekeken, waarvan de onderlinge afstand ongeveer 10 centiMorgan is. De centiMorgan is een maat voor genetische afstand en 1 centiMorgan komt overeen met ongeveer 1 miljoen basenparen, de bouwstenen van het DNA. Aangezien binnen onze studie 1000 individuen moeten worden gescand, zouden 400.000 bepalingen nodig zijn. Daarom is onderzocht wat een optimale onderlinge afstand van de markers is, om te komen tot een optimale balans tussen de hoeveelheid metingen en de kans op het lokaliseren van genen met een belangrijk effect op de plasmaspiegels van lipiden en apolipoproteïnen (Hoofdstuk 3).

Uit berekeningen bleek dat als genetische markers een onderlinge afstand hebben van ongeveer 20 centiMorgan, de helft van het aantal bepalingen nodig is, terwijl de kans op het vinden van een interessant chromosomaal gebied toch nog voldoende hoog is. Vandaar dat we een aangepast protocol hebben ontwikkeld om sneller het genoom af te zoeken naar genen. We hebben 229 genetische markers geselecteerd met een gemiddelde onderlinge afstand van 18.3 centiMorgan. Het protocol is zo aangepast dat ongeveer 3 genetische markers in dezelfde reactie kunnen worden gemeten, zodat slecht 2.5 µg DNA nodig is om het hele genoom te onderzoeken, dat uitzonderlijk weinig is voor een totale genoom scan.

Door nieuwe geautomatiseerde technieken is de snelheid van de metingen nu al veel hoger dan ten tijde van deze studie. Met dezelfde inspanning zouden we tegenwoordig een genoomscan kunnen uitvoeren met genetische markers met een onderlinge afstand van ongeveer 5 tot 10 cM.

Koppelingsanalyse met lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels

In de vier tweelingpopulaties zijn DNA markers gemeten op de chromosomen 1, 2, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 17 en 19 met een onderlinge afstand van gemiddeld 18.3 centiMorgan, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Genetische analyses zijn gedaan op 83 adolescente Nederlandse twee-eiige tweelingen, 117 volwassen Nederlandse twee-eiige tweelingen, 44 volwassen Zweedse twee-eiige tweelingen en 249 volwassen Australische twee-eiige tweelingen. Met gebruik van deze DNA markerdata en de lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels in de tweelingpopulaties kan onderzocht worden of de lokatie bepaald kan worden van genen die een effect hebben op één van de lipiden- of apolipoproteïnen-spiegels.

Het principe van koppelingsanalyse is als volgt; wanneer variatie in een bepaald gen zorgt voor variatie in bijvoorbeeld LDL-cholesterolspiegels, dan zullen twee-eiige tweelingen die dezelfde variant van dat gen geërfd hebben van hun ouders, een meer gelijke LDL-cholesterolspiegel hebben dan wanneer ze beiden een andere genvariant geërfd hebben. Door te bepalen welke stukjes DNA de tweelingen gemeenschappelijk hebben geërfd, hopen we een deel van het menselijk genoom te kunnen identificeren waar twee-eiige tweelingen met een vergelijkbaar LDL-cholesterolspiegel hetzelfde genetische materiaal dragen. Of omgekeerd: een deel van het menselijk genoom waar twee-eiige tweelingen met verschillen in de LDL-cholesterolspiegel van elkaar verschillen in genetische materiaal. Van elk chromosomaal gebied kan worden berekend hoe groot de waarschijnlijkheid is dat het een gen bevat dat één van de bloedplasmaspiegels beïnvloedt. Deze waarschijnlijkheid wordt uitgedrukt in een LOD score. Een LOD score van 1 geeft weer dat er een aanwijzing is dat in dat gebied een gen ligt dat een rol speelt in de lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels. Een LOD score van 2.2 geeft weer dat er een suggestie voor bewijs is en een LOD van 3.6 wordt gezien als bewijs dat in dat chromosomale gebied een gen ligt dat

bepalend is voor de bloedplasmaspiegels. De koppelingsanalyses zijn gedaan voor de chromosomen 1, 2, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 17 en 19 met bloedplasmaspiegels van lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels in alle vier de tweelingpopulaties (Hoofdstuk 4).

Om te bevestigen dat de genomscan met markers met een gemiddelde onderlinge afstand van 18.3 centiMorgan tot betrouwbare resultaten kan leiden, is de lange arm van chromosoom 6, waar het *LPA* gen ligt, onderzocht. Van dit gen is bekend dat het ongeveer 90% van de variatie in de spiegels van lipoproteïne(a) bepaalt. Lipoproteïne(a) is een LDL-deeltje met een extra apolipoproteïne op de oppervlakte, namelijk apolipoproteïne(a). In alle vier de populaties is een koppeling gevonden tussen chromosoom 6 en lipoproteïne(a) spiegels. In de adolescente Nederlandse en de Zweedse tweelingen vonden we een aanwijzing voor koppeling en in zowel de volwassen Nederlandse als de Australische tweelingen vonden we zelfs sterk bewijs voor koppeling tussen chromosoom 6 en lipoproteïne(a) spiegels. Het feit dat hetzelfde resultaat gevonden wordt in onafhankelijke populaties, is een zeer sterk bewijs dat op deze lokatie een gen moet liggen dat lipoproteïne(a) spiegels beïnvloedt. Wanneer alle vier de populaties tezamen worden geanalyseerd, dan vinden we een LOD score van 9.8, wat aangeeft dat we heel sterk bewijs hebben dat hier een gen ligt dat lipoproteïne(a) spiegels beïnvloedt, dan dat het gen lipoproteïne(a) spiegels niet beïnvloedt.

Om te onderzoeken of we met het door ons ontwikkelde genomscan protocol, een chromosomaal gebied kunnen vinden waar een gen zou moeten liggen met een niet al te groot effect, testten we het gebied waar het *APOE* gen ligt. Het *APOE* gen is het gen dat codeert voor apolipoproteïne E en is gelokaliseerd op de lange arm van chromosoom 19. Tussen de 9 en 20% van de variatie in apolipoproteïne E spiegels is toe te schrijven aan genetische variatie in het *APOE* gen. In dit gebied vonden we een aanwijzing voor koppeling in de adolescente en de volwassen Nederlandse tweelingen, hoewel minder sterk dan bij het *LPA* gen. We vonden geen bewijs voor koppeling in de Australische tweelingen. Koppelingsanalyse kon niet worden uitgevoerd in de Zweedse tweelingpopulatie, omdat daarin geen apolipoproteïne E spiegels zijn gemeten. Wanneer de drie tweelingpopulaties tezamen werden geanalyseerd, was de LOD score 1.0, een score is die per toeval ongeveer 8 keer zou kunnen voorkomen in een totale genom scan. Hieruit concluderen we dat we niet in staat zijn om het *APOE* gen te detecteren in de drie tweelingpopulaties als een gen dat een matig effect heeft op apolipoproteïne E spiegels. Dus gebruik makend van ons protocol voor een genomscan met markers met een onderlinge afstand van 18.3 centiMorgan, zijn we alleen in staat om genen met een groot effect op de bloedspiegels te detecteren en zullen we genen met een klein effect mogelijk niet kunnen herkennen.

Na de koppelingsanalyse van de eerste 10 chromosomen vonden we 11 gebieden waar mogelijk een gen zou kunnen liggen dat betrokken is bij één van de cholesterol of apolipoproteïne spiegels; 4 chromosomale gebieden lijken betrokken bij lipoproteïne(a) spiegels, 3 gebieden bij apolipoproteïne A1 spiegels, 2 gebieden bij apolipoproteïne B spiegels en 2 gebieden bij LDL-cholesterolspiegels. Van deze 11 gebieden, zijn 3 gebieden in meer dan 1 tweelingpopulaties gevonden. Voor 2 gebieden op chromosoom 1 en 2 was een suggestie voor bewijs voor koppeling met lipoproteïne(a) spiegels in zowel de Zweedse als de Australische tweelingpopulatie en voor 1 gebied op chromosoom 19 vonden we een suggestie bewijs voor koppeling met LDL-cholesterolspiegels in de volwassen Nederlandse en een aanwijzing voor koppeling in de Australische tweelingpopulatie. Hoewel de erfelijkheid van totaal cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceriden en apolipoproteïne E spiegels heel erg hoog is, vonden we geen bewijs voor koppeling in deze 10 chromosomen. Dit zou kunnen betekenen dat de genen die een

groot effect op deze bloedplasma'spiegels hebben op andere chromosomen liggen, of dat veel genen met kleine effecten invloed hebben op deze bloedplasma'spiegels, die we door onze onderzoeksbenadering mogelijk niet hebben kunnen detecteren.

Gerepliceerde koppeling met lipoproteïne(a) spiegels

Voor het gebied op chromosoom 2 vonden wij bewijs voor koppeling met lipoproteïne(a) spiegels in de Zweedse en Australische tweelingpopulaties. In dit gekoppelde chromosomale gebied is het *APOB* gen gelokaliseerd, dat codeert voor apolipoproteïne B, een eiwit dat een belangrijk onderdeel vormt van het lipoproteïne(a) deeltje. Het zou zo kunnen zijn dat afwijkend apolipoproteïne B een effect heeft op lipoproteïne(a) spiegels. Het feit dat in de twee Nederlandse tweelingpopulaties totaal geen bewijs voor koppeling van chromosoom 2 met lipoproteïne(a) spiegels is gevonden, maakt het *APOB* gen echter een stuk minder interessant als kandidaat-gen voor het bepalen van de variatie in lipoproteïne(a) spiegels.

Het gebied op chromosoom 1 dat gekoppeld lijkt te zijn met lipoproteïne(a) spiegels vinden we ook in slechts twee van onze tweelingpopulaties, maar Broeckel *et al.* vond in zijn populatie ook bewijs voor de koppeling van dit gebied met lipoproteïne(a) spiegels. Broeckel concludeerde dat op chromosoom 1 een gen moest liggen dat een effect heeft op lipoproteïne(a) spiegels onafhankelijk van het grote effect van het bekende *LPA* gen op de lange arm van chromosoom 6. Om te onderzoeken of inderdaad het gen op chromosoom 1 en het *LPA* gen beiden effect hebben op lipoproteïne(a) spiegels, zijn de effecten tegelijkertijd in één analyse bestudeerd. Zo'n analyse is nog nauwelijks toegepast in de wetenschappelijke literatuur. De analyse van chromosoom 1 voor de vier tweelingpopulaties tezamen resulteerde in een LOD score van 1.6. Het gen dat mogelijk betrokken is bij lipoproteïne(a) spiegels zou 44% van de variatie in lipoproteïne(a) spiegels kunnen verklaren, hoewel het *LPA* gen op chromosoom 6 zelf al 82% van de variatie in lipoproteïne(a) spiegels verklaart. Het is een bekend verschijnsel dat als chromosomale gebieden apart worden geanalyseerd, het cumulatieve effect van de gebieden meer dan 100% kan zijn. Daarom is het nodig om in één analyse de twee gebieden op chromosoom 1 en 6 tegelijkertijd te analyseren, zodat de gebieden tezamen maximaal 100% van de variatie kunnen verklaren (Hoofdstuk 5). Het resultaat van deze zogenaamde twee-locus analyse was dat 82% van de variatie in lipoproteïne(a) spiegels te verklaren is door de genetische variatie in het *LPA* gen op chromosoom 6 en dat de koppeling op chromosoom 1 een vals positief resultaat was in onze tweelingpopulaties. Los van de uitkomst geeft dit resultaat een indicatie dat met behulp van een twee-locus analyse vals positieve resultaten gedetecteerd zouden kunnen worden.

Fijn kartering van chromosoom 19

Op chromosoom 19 was een suggestie voor bewijs voor koppeling gevonden met LDL-cholesterolspiegels in de volwassen Nederlandse en een aanwijzing voor koppeling in de Australische en Zweedse tweelingen. Deze bevindingen in drie onafhankelijke populaties maken het gebied op chromosoom 19 aantrekkelijk om nader te onderzoeken.

Van de 23 chromosomen zijn nu 10 chromosomen bestudeerd en het blijkt dat een breed gebied op chromosoom 19 een belangrijke rol speelt in het bepalen van LDL-cholesterolspiegels. In een poging om het gebied te verkleinen en om de betrouwbaarheid van de resultaten te toetsen, zijn extra DNA markers getypeerd in alle vier de tweelingpopulaties. Uiteindelijk is de gemiddelde onderlinge afstand tussen de markers 6 centiMorgan in de twee Nederlandse populaties geworden en 8 centiMorgan in de Zweedse en Australische populaties. Het bewijs voor koppeling werd

door deze extra DNA-markerinformatie aanzienlijk groter in de volwassen Nederlandse, Zweedse en Australische tweelingpopulaties. In de adolescentie Nederlandse tweelingen vonden we echter geen bewijs voor koppeling tussen chromosoom 19 en LDL cholesterolspiegels (Hoofdstuk 6). Hoewel het bewijs voor koppeling versterkt is, is het koppelingsgebied niet smaller geworden door het typeren van extra DNA markers. Dit kan verklaard worden door het feit dat wanneer twee-eiige tweelingen eenmaal een stuk genetische materiaal gemeenschappelijk hebben geërfd, het dan direct een groot stuk DNA is. Wanneer meerdere tweelingparen in een koppelingsanalyse worden betrokken, dan is het koppelingsgebied het overlappende gebied van gemeenschappelijke gebieden in alle paren. Hoe meer tweelingparen, des te kleiner is het overlappende gebied van alle gemeenschappelijke chromosomale gebieden. Een koppelingsgebied als resultaat van een tweelingstudie, kan dus niet smaller worden gemaakt door het typeren van extra genetische markers, wat ten tijde van deze studie nog niet duidelijk was. Daarbij zou een breed koppelingsgebied verklaard kunnen worden doordat koppelingsresultaten mogelijk het opgetelde resultaat zijn van de effecten van meerdere genen in het koppelingsgebied. Het resultaat wordt dan niet veroorzaakt door het grote effect van één gen, zoals een koppelingsresultaat gewoonlijk geïnterpreteerd wordt.

De analyse van de drie volwassen tweelingpopulaties tezamen resulteert in een LOD score van 5.7 op 60 centiMorgan vanaf de top van chromosoom 19. Dit is zeer sterk bewijs dat in dit gebied een gen ligt dat invloed heeft op LDL-cholesterolspiegels dan dat het een vals positief resultaat is. In de Nederlandse, Zweedse en Australische tweelingen zou de genetische variatie van dit gen meer dan de helft van de variatie in LDL-cholesterolspiegels verklaren. Op chromosoom 19 ligt dus een gen met een grote effect op LDL-cholesterolspiegels. Omdat apolipoproteïne B een onderdeel vormt van het LDL-deeltje, zijn apolipoproteïne B spiegels sterk gecorreleerd met LDL cholesterolspiegels. Om te onderzoeken of dit gen ook invloed heeft op apolipoproteïne B spiegels, hebben we een analyse gedaan waarbij zowel het effect op LDL cholesterol spiegels als op apolipoproteïne B spiegels wordt bekeken. De analyse bevestigde dat dit gen ook een effect heeft op apolipoproteïne B spiegels.

Eerder is door anderen ook bewijs voor koppeling tussen chromosoom 19 en totaal cholesterol en LDL-cholesterolspiegels gevonden in respectievelijk Pima Indianen en Hutterieten. Dit zijn twee genetisch geïsoleerde bevolkingsgroepen uit Noord Amerika. Pima Indianen en leiden een boeren bestaan en Hutterieten leven in streng gelovige gemeenschappen, zonder radio of televisie. Door hun specifieke leefstijlen mengen deze bevolkingsgroepen niet snel met andere bevolkingsgroepen. De resultaten uit onze studie vormen een belangrijke aanwijzing dat het chromosomale gebied op chromosoom 19 niet alleen in zulke beperkte bevolkingsgroepen een rol speelt, maar ook bij het grote aantal mensen van Europese afkomst. Andere studies die ook de niet-geïsoleerde bevolking onderzochten vonden ook aanwijzingen voor koppeling van chromosoom 19 met totaal cholesterol of LDL-cholesterolspiegels, maar vaak waren dit niet de belangrijkste bevindingen in hun totale genomscans. Aangezien wij en anderen steeds uitkomen op chromosoom 19, is het zeer waarschijnlijk dat daar een gen ligt dat bepalend is voor LDL-cholesterolspiegels. In het gebied liggen een aantal genen waarvan al bekend is dat ze een rol spelen bij het lipidenmetabolisme. De volgende stap is na te gaan of genetische variatie in deze genen inderdaad heeft bijgedragen aan het koppelingsresultaat. Dit kan op de manier zoals is beschreven in hoofdstuk 7 door middel van gecombineerde associatie- en koppelingsanalyse.

Op chromosoom 19 liggen een aantal genen die een kandidaat zijn voor het beïnvloeden van LDL-cholesterolspiegels. De meest opvallende kandidaat-genen zijn de genen die coderen voor

de LDL receptor en het LDL receptor gerelateerd eiwit en ook het genencluster dat codeert voor de apolipoproteïnen E, C1, C4 en C2. Van deze genproducten, behalve van het LDL receptor gerelateerd eiwit, is het bekend dat ze een rol spelen in het vetmetabolisme. Omdat echter het LDL receptor gerelateerd eiwit uit dezelfde genfamilie komt als de LDL receptor, wordt gespeculeerd dat het ook een rol speelt binnen het vetmetabolisme.

De bijdrage van deze genen aan het koppelingsresultaat zou kunnen worden onderzocht met behulp van een gecombineerde associatie en koppelingsanalyse zoals die beschreven is in Hoofdstuk 7. Omdat het bekend is dat zeldzame mutaties in het LDL receptor gen hypercholesterolemie kunnen veroorzaken, hebben we de drie tweeling paren die het meest bijdroegen aan het koppelingsresultaat onderzocht op mutaties in dit gen. In deze paren had één helft van de tweeling een heel hoge LDL cholesterolspiegel en de andere helft een heel lage LDL cholesterolspiegel. In één tweeling met een hoge LDL-cholesterolspiegel vonden we inderdaad een mutatie, die één keer eerder is gevonden in een Engelse patiënt met een matig verhoogde LDL-cholesterolspiegel. Het bleek echter dat zijn tweelingbroer met een lage LDL-cholesterolspiegel ook drager was van deze mutatie. Deze mutatie kon dus niet de oorzaak zijn van het verschil in LDL-cholesterolspiegel binnen deze tweeling. Zeldzame mutaties in het LDL receptor gen spelen dus geen rol in de variatie in LDL-cholesterolspiegels.

De bijdrage van de *APOEε2/ε3/ε4* genvarianten aan het koppelingsresultaat met LDL cholesterolspiegels is inmiddels onderzocht in een gecombineerde associatie- en koppelingsanalyse, zoals beschreven in hoofdstuk 7. Deze genvarianten verklaarden inderdaad een deel van de koppeling tussen chromosoom 19 en LDL-cholesterolspiegels. LDL cholesterolspiegels worden dus voor een deel beïnvloed door de *APOEε2/ε3/ε4* genvarianten, maar op chromosoom 19 liggen nog onbekende genen die het grootste deel van het effect op LDL-cholesterolspiegels verklaren.

Gecombineerde associatie- en koppelingsanalyse

Na de fijn-kartering van chromosoom 19 is opnieuw de koppelingsanalyse gedaan van chromosoom 19 en apolipoproteïne E spiegels. In de adolescentie Nederlandse tweelingen en in de Australische tweelingen vonden we hetzelfde resultaat als voor de fijn-kartering, maar het bewijs voor koppeling van het gebied waar het *APOE* gen is gelokaliseerd was in de volwassen Nederlandse tweelingen flink sterker geworden. Het is bekend dat variatie in het *APOE* gen de variatie in apolipoproteïne E spiegels beïnvloedt. Een bekende variatie in het *APOE* gen wordt ook wel de *APOEε2/ε3/ε4* variatie genoemd, dat 3 versies van het apolipoproteïne E onderscheidt. Om te onderzoeken in welke mate deze variatie in het *APOE* gen bijdraagt aan het koppelingsresultaat, kan een gecombineerde associatie- en koppelingsanalyse gedaan worden. We hebben deze methode toegepast op de Nederlandse tweelingpopulaties, waar we koppeling vonden tussen chromosoom 19 en apolipoproteïne E spiegels (Hoofdstuk 7).

Eerst wordt met behulp van associatieanalyse onderzocht of één van de *APOEε2/ε3/ε4* genvarianten van invloed is op de hoogte van apolipoproteïne E spiegels. Het blijkt dat de dragers van de *APOEε2* vorm van apolipoproteïne E hogere apolipoproteïne E spiegels hebben dan dragers van de *APOEε3* vorm. De dragers van de *APOEε4* vorm hebben juist lagere apolipoproteïne E spiegels dan de dragers van de *APOEε3* vorm. De *APOEε2/ε3/ε4* genvariatie is dus geassocieerd met apolipoproteïne E spiegels. Vervolgens is in een gecombineerd associatie- en koppelingsanalyse onderzocht in welke mate dit *APOEε2/ε3/ε4* effect bijdraagt aan de koppeling tussen chromosoom 19 en apolipoproteïne E spiegels.

Wanneer in de adolescente tweelingen het effect van de associatie verdisconteerd wordt in de koppelingsanalyse dan verdwijnt de koppeling in zijn geheel. Dit houdt in dat geen andere genetische variatie op chromosoom 19 invloed heeft op apolipoproteïne E spiegels in adolescente Nederlanders. In de volwassen tweelingen ligt de situatie iets anders. Wanneer het effect van de associatie verdisconteerd werd in de koppelingsanalyse, bleef een groot deel van de koppeling tussen chromosoom 19 en apolipoproteïne E spiegels over. Met andere woorden, andere genetische variatie, in of buiten het *APOE* gen, draagt ook bij aan de variatie in apolipoproteïne E spiegels in de volwassen Nederlandse tweelingpopulatie.

Het is dus zo dat de variatie in apolipoproteïne E spiegels op adolescentie leeftijd door alleen de *APOE* ϵ 2/ ϵ 3/ ϵ 4 genvarianten wordt beïnvloed, terwijl op latere leeftijd ook andere genvarianten een rol gaan spelen. Dit komt overeen met eerder onderzoek waarin beschreven wordt dat later in het leven andere genen gaan bijdragen aan verschillen in lipiden- en apolipoproteïnen-spiegels.

Conclusie

De studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat cholesterol en apolipoproteïne spiegels in grote mate erfelijk zijn. Wij zijn in staat geweest om een aantal chromosomale gebieden aan te wijzen waar mogelijk één of meerdere genen liggen die een effect hebben op de spiegels van één van de bloedparameters uit het vetmetabolisme. Onze belangrijkste bevinding is dat op chromosoom 19 één of meerder genen liggen die bepalend zijn voor LDL-cholesterolspiegels. Identificatie van de onderliggende genen dankzij het toepassen van de gecombineerde associatie- en koppelingsanalyse kan uiteindelijk een belangrijke bijdrage leveren aan preventie van hart- en vaatziekten.