

GENETICA VAN ALCOHOLGEBRUIK EN LEVERENZYMEN: NEDERLANDSE SAMENVATTING

1. Alcoholgebruik en gezondheid

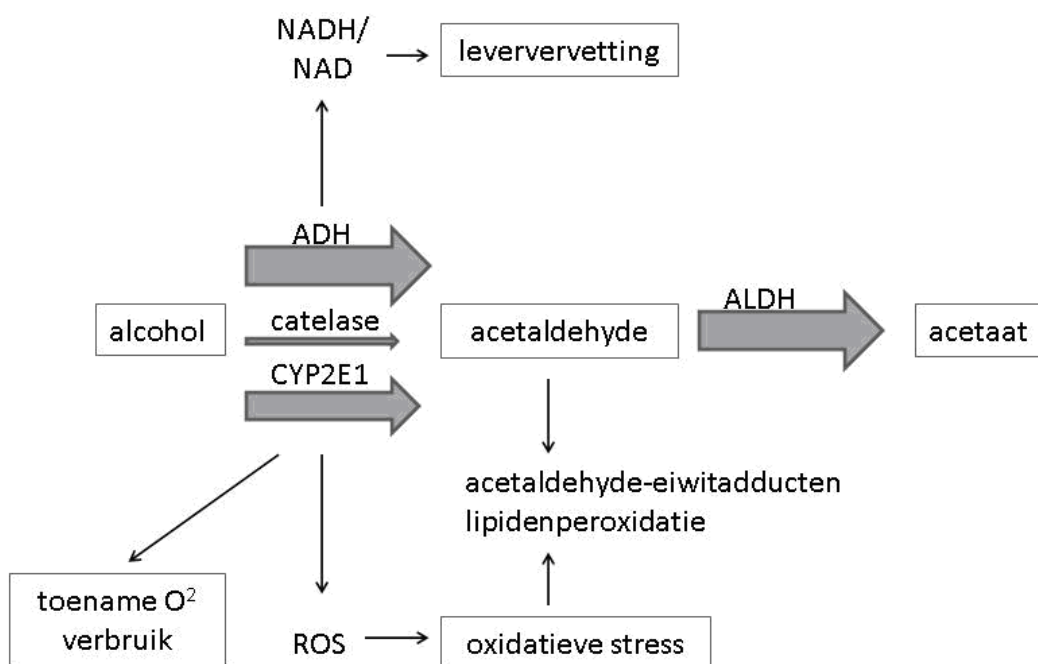
Alcoholgebruik vormt een risico voor de gezondheid. Hoewel licht tot matig alcoholgebruik geassocieerd is met een verlaagd risico op aandoeningen als coronaire hartziekte (CHD) en type 2 diabetes, is het netto-effect op de gezondheid nadelig. In Westerse landen wordt bij mannen 8-12% van de (in) directe nadelige effecten op de gezondheid toegeschreven aan alcoholgebruik (berekend in DALY's, disability-adjusted life years). Bij vrouwen is dit 0,5-3% (Rehm et al. 2003). De meest voorkomende doodsoorzaken waarbij alcohol een rol speelt, zijn kanker, cardiovasculaire stoornissen, levercirrose, diabetes en letselschade (bijv. vanwege rijden onder invloed) (Rehm et al. 2003). Inname van 35-45 gram alcohol per dag (~3 glazen) is al geassocieerd met een verhoogd sterfterisico. Een vergroot risico voor de gezondheid begint bij zo'n 25 gram alcohol per dag (voor aandoeningen als hoge bloeddruk, levercirrose, chronische alvleesklierontsteking, kanker), hoewel, zoals hierboven gerapporteerd, het risico op sommige aandoeningen bij licht tot matig alcoholgebruik juist lager ligt en voor deze aandoeningen het gezondheidsrisico pas bij een veel hogere alcoholinname ontstaat (>60 gram/dag voor type 2 diabetes, beroerte; >89 gram/dag voor CHD; d.w.z. bij >4 en >6 glazen) (Dawson 2011). Naast somatische gezondheidsrisico's, kan alcoholgebruik ook leiden tot sociale en psychiatrische problemen die samenhangen met problematisch alcoholgebruik, zoals verslaving, vermindering van arbeidsproductiviteit, agressie, geweld en het in aanraking komen met justitie (NIAAA 2000).

Ondanks de hierboven genoemde gezondheidsrisico's drinkt de meerderheid van de Nederlandse bevolking in meer of mindere mate alcohol. Dit is waarschijnlijk te verklaren vanuit het positieve effect van alcoholgebruik op het reduceren van spanning, het verhogen van de gemoedstoestand en het vergemakkelijken van het sociaal contact (NIAAA 2000). Volgens de Wereldgezondheidsraad (WHO) heeft 82% van de Nederlandse mannen en 64% van de Nederlandse vrouwen van 15 jaar of ouder wel eens alcohol gedronken in het afgelopen jaar. Gegevens van het Nederlands Tweelingen Register (NTR) geven aan dat 9-17% van de mannen en 3-11% van de vrouwen zwaar drinkt (respectievelijk >21 en >14 glazen per week voor personen ≥ 18 jaar) (Geels et al. 2013). Gezien deze prevalentiecijfers in combinatie met de hierboven genoemde gezondheidsrisico's is kennis van de oorzaken van individuele verschillen in (problematisch) alcoholgebruik belangrijk.

Effecten van alcoholgebruik op de gezondheid kunnen, althans gedeeltelijk, worden toegeschreven aan de effecten van alcoholafbraak in de lever. Alcoholmetabolisme verloopt bij

mensen via verschillende routes, waarvan die via het enzym alcoholdehydrogenase (ADH) het belangrijkste is. De oxidatie van alcohol door middel van ADH resulteert in de vorming van acetaldehyde, een zeer reactief en toxisch bijproduct dat met behulp van het enzym aldehyde dehydrogenase (ALDH) in de mitochondria kan worden omgezet in acetaat (Zakhari 2006).

De afbraak van alcohol kan op verschillende manieren leiden tot leverschade. Enerzijds is het tussentijdse afbraakproduct acetaldehyde toxisch, wat bijvoorbeeld de capaciteit van de mitochondria om acetaldehyde om te zetten in acetaat vermindert, daarmee tot hogere niveaus van acetaldehyde in de mitochondria leidt, wat vervolgens bijdraagt aan het ontstaan van alcoholgerelateerde weefselschade (Caballeria 2003). Anderzijds is alcoholmetabolisme geassocieerd met metabole veranderingen in de lever zoals een verhoogd zuurstofverbruik, oxidatieve stress en leververvetting die op zichzelf weer kunnen leiden tot leverschade. Figuur 1 geeft een samenvattend overzicht van de metabole veranderingen in de lever als gevolg van alcoholmetabolisme (overgenomen van Callallería, 2003).



Figuur 1: alcoholmetabolisme en metabole veranderingen in de lever (overgenomen van Caballería, 2003)

Allereerst gaat alcoholoxidatie gepaard met een toename in het zuurstofverbruik (Zakhari 2006). Als levercellen die dicht bij de verse bloedtoevoer zitten teveel zuurstof opnemen voor de afbraak van alcohol, kan dit leiden tot een zuurstoftekort voor levercellen die later op de route van zuurstof worden voorzien, waardoor deze cellen in een staat van hypoxie kunnen raken en kunnen afsterven (Caballeria 2003; Cunningham en Van Horn 2003).

De oxidatie van ethanol en acetaldehyde resulteert in de vorming van reactieve zuurstofdeeltjes (radicalen; de zogenaamde reactive oxidative species, ROS). Deze deeltjes zijn toxisch omdat ze reageren met macromoleculen zoals eiwitten, lipiden en DNA en deze daardoor kunnen beschadigen. Verschillende enzymen en (niet-enzymatische) antioxidanten kunnen de cel beschermen tegen ROS. Wanneer de hoeveelheid ROS-genererende factoren echter groter is dan de hoeveelheid beschermende factoren raakt de cel in een staat van oxidatieve stress.

De afbraak van alcohol gaat gepaard met een verandering in de redox (*reductie-oxidatie*) balans in het cytosol en de mitochondria (Zakhari 2006) wat tot leververvetting kan leiden, een overmaat van triglyceriden in de lever, via complexe mechanismen die de synthese en opslag van vetzuren in de lever bevorderen en de oxidatie van vetzuren verminderen (Caballeria, 2003). Deze verschillende metabole veranderingen in de lever kunnen vervolgens weer reacties van het immuunsysteem ontlokken die kunnen resulteren in leverschade (Wang et al. 2010).

2. Leverenzymen als markers voor leverschade

Dit proefschrift richt zich op de oorzaken van variatie in alcoholgebruik en in bloedwaarden van drie enzymen die een indicatie geven van de schade aan de lever: gamma-glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT) en aspartaat aminotransferase (AST). GGT is betrokken bij het instandhouden van een optimaal intracellulair niveau van glutathion, een van de belangrijkste lichaamseigen antioxidanten. GGT is daarmee van invloed op de bescherming van de cel tegen oxidanten die vrijkomen bij de afbraak van ethanol (Whitfield 2001). Bloedwaarden van AST en ALT vormen markers van leverschade die stijgen wanneer het celmembraan beschadigd raakt en daardoor een verhoogde hoeveelheid AST en ALT in de bloedsomloop terechtkomt (Pratt en Kaplan 2000). ALT is aanwezig in verschillende organen en spieren, maar vooral in de lever en is daarom meer specifiek voor leverschade dan AST dat wordt gevonden in de lever en skeletspier (Hannuksela et al. 2007), maar ook in het hart en de nieren (Pratt en Kaplan 2000). Bloedwaarden van GGT, ALT en AST zijn sterke voorspellers van leverziekte (Ruhl en Everhart 2009; Kazemi-Shirazi et al. 2007; Hyeon et al. 2004; Lee et al. 2008). Naast leverziekte zijn GGT en ALT ook met andere aandoeningen geassocieerd. GGT en ALT zijn geassocieerd met type 2 diabetes (Fraser et al. 2009) en GGT met hart- en vaatziekten (Targher 2009; Fraser et al. 2007), evenals kanker en chronische nierziekte (Targher 2009). Om hun rol in deze andere aandoeningen te verklaren zijn GGT en ALT voorgesteld als surrogaat markers van leververvetting (Targher 2009; Schindhelm et al. 2006) en GGT daarnaast als marker van oxidatieve stress (Lee et al. 2004).

3. Alcoholgebruik en de relatie tot leverenzymen

De rol van GGT bij het voorkomen van oxidatieve stress bij alcoholmetabolisme (metabole stress) en de relatie van AST en ALT tot leverschade veronderstelt een positieve verband tussen alcoholgebruik en leverenzymwaarden. Matig alcoholgebruik hangt inderdaad samen met verhoogde bloedwaarden voor GGT (Lee et al. 2001; Nakanishi et al. 2000; Higashikawa et al. 2005; Arndt et al. 1998; Liangpunsakul et al. 2010). De relatie tussen matig alcoholgebruik met de aminotransferases (AST en ALT) is echter zwak (Alatalo et al. 2009b; Liangpunsakul et al. 2010) of zelfs afwezig (Lee et al. 2001; Steffensen et al. 1997; Arndt et al. 1998). Bij zwaar alcoholgebruik is er wel een duidelijke verhoging te zien in GGT-bloedwaarden en zijn hier aanwijzingen voor bij AST en ALT (Conigrave et al. 2002; Arndt et al. 1998; Alatalo et al. 2009b). Ondanks dat bloedwaarden van GGT, ALT en AST oorspronkelijk waren geïntroduceerd als marker in de detectie van zwaar drinken (Whitfield 2001) is hun waarde hierin beperkt. De reden hiertoe is dat een toename van leverenzymen niet specifiek is voor zwaar drinken, en omgekeerd, dat niet bij iedere zware drinker de leverenzymwaarden zijn verhoogd (Peterson 2004).

Samenvattend lijken zowel matig als zwaar alcoholgebruik geassocieerd te zijn met GGT en zwaar alcoholgebruik daarnaast met ALT en AST. Er zijn verschillende mechanismen mogelijk die deze samenhang kunnen verklaren. Enerzijds is vanuit de relatie tussen AST en ALT met leverschade en de rol van GGT bij het beschermen van de cel tegen metabole stress een causaal effect van alcoholgebruik op leverenzymwaarden plausibel. Anderzijds kan worden verondersteld dat de samenhang tussen alcoholgebruik en leverenzymwaarden kan worden verklaard door een set genen die zowel verschillen in alcoholgebruik als verschillen in leverenzymwaarden beïnvloeden.

4. Onderzoeksvraag

In dit proefschrift worden een aantal vragen onderzocht die volgen uit de hierboven geschetste relatie tussen alcoholgebruik en leverenzymen. Eerst worden de oorzaken in variatie in alcoholinname onderzocht. Vervolgens kijk ik naar de oorzaken van variatie in symptomen van alcoholmisbruik. Daarna wordt de genetica van leverenzymen belicht, en wordt de relatie tussen alcoholgebruik en de relatie met GGT-bloedwaarden gemodelleerd als een functie van pleiotrope genetische effecten die deze samenhang zouden kunnen verklaren. De bovenstaande vragen worden beantwoord door gebruik te maken van statistische technieken uit de genetische epidemiologie. De laatste twee hoofdstukken onderzoeken het belang van direct gemeten genetische varianten.

5. Onderzoeksmethodologie

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de gegevens over alcoholgebruik en leverenzymwaarden die in dit proefschrift zijn geanalyseerd. Dit hoofdstuk introduceert ook de statistische methoden die werden toegepast om de erfelijkheid van alcoholgebruik en leverenzymwaarden te bepalen op basis van tweelingfamilie- en genetische markerdata. Met het tweelingfamiliedesign is de erfelijkheid van eigenschappen geschat op basis van de bekende genetische verwantschap tussen één- en twee-eiige tweelingen, hun ouders en hun broers en zussen. De erfelijkheid kan geschat worden aangezien de onderlinge genetische verwantschap verschilt tussen één-eiige tweelingen en twee-eiige tweelingen en hun familieleden. Vervolgens is met genetische markerdata (hier single nucleotide polymorphisms, SNPs) geschat welk deel van de erfelijkheidsschatting zoals deze op basis van het tweelingfamiliedesign is bepaald, kan worden toegeschreven aan de effecten van gemeten en geïmputeerde genetische varianten. Daarnaast is met genetische markerdata (SNPs) in een genetische associatiestudie getracht specifieke risicovarianten voor alcoholgebruik te lokaliseren. Gegevens over alcoholgebruik en leverenzymwaarden die binnen dit proefschrift werden geanalyseerd zijn afkomstig van volwassen deelnemers van Nederland Tweelingen Register (Adult NTR; ANTR) (Boomsma et al. 2002c; Willemsen et al. 2013) en de Nederlandse Studie naar Depressie en Angst (NESDA) (Penninx et al. 2008).

6. Genetische invloeden op alcoholgebruik en leverenzymwaarden op basis van tweeling(familie)studies

In **Hoofdstuk 3** is het belang van genetische en omgevingsinvloeden onderzocht in het verklaren van individuele verschillen in alcoholgebruik onder volwassenen. De erfelijkheid van alcoholgebruik (uitgedrukt in aantal grammen alcohol per dag) werd geschat op 53%, waarbij een aanzienlijk deel van de verschillen in alcoholgebruik werd verklaard door nonadditieve genetische invloeden (30%) (zie tabel 1). Nonadditieve genetische invloeden beschrijven effecten die niet simpelweg bestaan uit een optelsom van elk van de afzonderlijke effecten van de genen, maar uit effecten van genen die onderling interacteren.

Naast effecten van genetische transmissie, werden effecten van culturele transmissie onderzocht van ouder op kind. Heeft de mate waarin ouders alcohol gebruiken invloed op dat van hun kinderen, bijvoorbeeld via 'social modeling', wanneer rekening wordt gehouden met effecten van genetische risicofactoren die de samenhang in alcoholgebruik tussen ouder en kind (deels) verklaren? Uit een eerdere studie was bekend dat effecten van culturele transmissie van alcoholgebruik aanwezig zijn in de adolescentie (Koopmans and Boomsma 1996). Uit deze studie bleek dat effecten van culturele transmissie bij alcoholgebruik onder volwassenen geen rol (meer) spelen.

Hoewel mannen meer alcohol dronken dan vrouwen, was de relatieve invloed van genetische effecten op alcoholgebruik voor mannen en vrouwen gelijk. Deze relatieve invloed van genen was ook vergelijkbaar over verschillende leeftijdsgroepen. Ouder-kindparen leken even sterk in hun alcoholgebruik op elkaar als tweeling-/broer- en/of zuspren (hoewel de eerste gekenmerkt worden door een groter leeftijdsverschil dan de laatste). Ook partners lijken op elkaar in hun niveau van alcoholgebruik (correlatie tussen echtgenoten: 0.39, 95% betrouwbaarheidsinterval, CI, 0,34-0,44). Deze gelijkheid was echter niet gecorreleerd met de duur van hun relatie (bij $\alpha=0,01$, $p=,011$), wat suggereert dat de gelijkheid tussen partners vooral komt door een fenomeen wat fenotypische selectie ('phenotypic assortment') wordt genoemd. Hierbij kiezen mensen hun partner uit (mede) op basis van (factoren die verband houden met) zijn of haar fenotype, zoals alcoholgebruik, of een eigenschap die samenhangt met alcoholgebruik.

Hoofdstuk 4 beschrijft een studie naar de ontwikkeling van de symptomen van alcoholmisbruik en afhankelijkheid (AAD) gedurende de adolescentie en jongvolwassenheid, een belangrijke periode voor de ontwikkeling van alcoholgebruik, en hoe deze ontwikkeling kan worden verklaard. Voor dit onderzoek zijn longitudinale vragenlijstgegevens van de CAGE (Ewing 1984) geanalyseerd als maat voor de frequentie van symptomen van AAD. De CAGE, een acroniem, bestaat uit vier vragen die informeren naar vier symptomen van AAD: gevoel te moeten stoppen met drinken (Cutdown), lastiggevalen worden met kritiek op het drinkgedrag (Annoyed), slecht of schuldig voelen over drinkgedrag (Guilty), 's ochtends drinken tegen de zenuwen of kater (Eye Opener). De CAGE-data zijn verzameld bij tweelingen die toen tussen de 15-32 jaar oud waren en werden onderverdeeld in zes leeftijdsgroepen van elk drie jaar (van 15-17 tot 30-32 jaar), naar de leeftijd waarop de tweelingen de vragenlijst hadden ingevuld. Vervolgens is onderzocht wat de relatieve bijdrage was van genetische en omgevingseffecten op de ontwikkeling van symptomen van AAD in de adolescentie en jonge volwassenheid. Daarnaast is onderzocht of deze ontwikkeling kan worden verklaard door één set van genen of dat er nieuwe genen tot expressie komen gedurende de adolescentie en jongvolwassenheid (genetische innovatie), bijvoorbeeld rond de periode waarin adolescenten gewoonlijk het ouderlijk huis verlaten.

AAD-symptomen werden aanzienlijk vaker door mannen dan vrouwen gerapporteerd. Er waren geen sekseverschillen in de erfelijkheid van het risico op een of meerdere AAD-symptomen. De ontwikkeling in het risico op het hebben van een of meer AAD symptomen gedurende de adolescentie en jongvolwassenheid werd verklaard door een set genen, waarvan de invloed groter werd naarmate de respondenten ouder werden. Er was dus geen sprake van genetische innovatie, maar van een vergroting van genetische invloeden die reeds aanwezig waren in de adolescentie.

Op de leeftijd van 15-17 jaar verklaarden genetische effecten 28% van de variantie, en waren omgevingsfactoren die werden gedeeld onder tweelingen belangrijker dan genetische invloeden. Naarmate de respondenten ouder werden, namen genetische invloeden in belang toe terwijl de relatieve invloed van gedeelde omgevingseffecten daalde. Op 21-23 jarige leeftijd, werd de invloed van genetische effecten op het risico op het hebben van een of meer AAD-symptomen geschat op 58%. In de jaren daarna bleef de invloed van genen hoog (52-56% gedurende de leeftijd van 24-32 jaar).

Hoofdstuk 5 beschrijft in hoeverre individuele verschillen in bloedwaarden van de leverenzymen GGT, ALT en AST aan genetische effecten kunnen worden toegeschreven. Er werden kwantitatieve sekseverschillen gevonden in de erfelijkheid van GGT en ALT (maar niet van AST), waarbij de erfelijkheid van ALT hoger was bij mannen en die van GGT hoger was bij vrouwen (zie tabel 1). De erfelijkheidsschatting (gebaseerd op additieve + nonadditieve genetische effecten) voor GGT was 30% voor mannen en 60% voor vrouwen. Voor ALT was de erfelijkheidsschatting 40% en 22% voor mannen en vrouwen respectievelijk. Wat betreft AST kon 43% van de variantie worden verklaard door genetische invloeden (voor zowel mannen als vrouwen). Niet-additieve genetische effecten speelden een rol bij AST (beide geslachten 15%) en GGT bij vrouwen (28%), maar niet voor ALT (beide geslachten) en GGT bij mannen.

Familieleden van gelijke sekse leken even sterk op elkaar in hun leverenzymwaarden als familieleden van tegenovergesteld geslacht, wat aangeeft dat voor mannen en vrouwen dezelfde genen van invloed zijn op bloedwaardeniveaus van leverenzymen. Met andere woorden, er is bewijs voor kwantitatieve, maar niet voor kwalitatieve sekseverschillen in de genetica van leverenzymwaarden. Voor ouder- en kindparen en broer-/zusparen was de gelijkenis in ALT- en AST-niveaus even groot, wat aangeeft dat voor deze leverenzymen, de genen die bijvoorbeeld op 20-jarige leeftijd van invloed zijn op ALT- en AST-niveaus grotendeels dezelfde zijn als die op 50-jarige leeftijd. Voor GGT waren er kwantitatieve leeftijdsverschillen in het relatieve belang van genetische en omgevingseffecten. Dit was het gevolg van omgevingsinvloeden op GGT die gedeeld werden tussen (tweeling)broers (c^2 28%), maar niet tussen ouders en hun kinderen. Deze gezamenlijke omgevingseffecten konden niet worden verklaard vanuit bijvoorbeeld seizoensinvloeden die weliswaar aanwezig waren voor ALT en AST maar niet voor GGT.

7. Associatie tussen alcoholgebruik en leverenzymwaarden

Een toename in alcoholgebruik is voorspellend voor een toename in GGT (mannen: $r=0,17$; vrouwen: $r=0,09$; **Hoofdstuk 6**). Alcoholgebruik was echter niet consistent geassocieerd met ALT en AST (dat is, er waren verschillen tussen NTR en NESDA-deelnemers en mannen en vrouwen; **Hoofdstuk 8**). Dit is waarschijnlijk te verklaren vanuit het feit dat het NTR/NESDA sample relatief gezond is qua alcoholgebruik. Onder de mannen kon 9,6% gecategoriseerd

worden als zware drinker (>21 glazen alcohol/week;> 42 gram alcohol /dag). Onder de vrouwen was dit 6,4% (>14 glazen alcohol/week;> 28 gram alcohol/dag). Dit bevestigt de bevinding uit eerdere studies dat AST en ALT-waarden verhoogd zijn onder zware drinkers, maar niet of nauwelijks onder matige drinkers (Arndt et al. 1998; Alatalo et al. 2009b; Liangpunsakul et al. 2010). GGT laat daarentegen een toename zien bij zowel matig drinken als zwaar drinken.

In **Hoofdstuk 6** is vervolgens onderzocht hoe de associatie tussen alcoholinname en GGT het beste kan worden verklaard. Hebben individuen verhoogde GGT waarden omdat ze meer alcohol drinken? Met andere woorden: veroorzaakt alcoholgebruik verhoogde GGT-niveaus? Of is er een gemeenschappelijke oorzaak, bijv. gedeelde genetische factoren die van invloed zijn op zowel alcoholgebruik als variatie in GGT die de associatie tussen alcoholgebruik en GGT op populatieniveau kan verklaren (genetische pleiotropie)? Gegevens over alcoholinname en GGT bij tweelingen en hun familieleden kunnen hierin inzicht geven.

De associatie van alcoholgebruik met GGT op populatieniveau kon het beste worden verklaard door een effect van genetische pleiotropie. Genetische invloeden op alcoholgebruik waren gecorreleerd met die op GGT ($p < 0,001$), terwijl de correlatie tussen omgevingseffecten op alcoholinname en GGT niet significant was (bij $\alpha = 0,01$, $p = ,041$), wat het meest in overeenstemming is met een effect van gedeelde genen, hoewel een causaal effect van alcoholgebruik op GGT niet kan worden uitgesloten. Deze bevinding is niet noodzakelijk in tegenspraak met de bevinding dat alcoholgebruik GGT verhoogt in experimentele settings (Conigrave et al. 2003), maar stelt dat in deze relatief gezonde populatie de genen die alcoholgebruik beïnvloeden, ook variatie in leverenzymen veroorzaken, waardoor een correlatie tussen alcohol drinken en verhoogde leverenzymen op populatieniveau ontstaat. Interessant is dat de genetische effecten op alcoholgebruik en GGT voornamelijk niet-additief op elkaar inwerkten, wat kan wijzen op interacterende risicoallelen (vanuit genetische dominantie of epistase). Wat betreft de specifieke bijdrage van deze genen, kon bij mannen 7,6% van de variantie in GGT en bij vrouwen 4,6% van variantie worden verklaard door (niet-additieve) genetische effecten die werden gedeeld met die op alcoholgebruik.

Tabel 1 Percentage van de variantie in alcoholinname en leverenzymwaarden die kan worden toegeschreven aan genetische effecten: additief (A) of nonadditief (genetische dominantie) (D) en omgevingseffecten: gedeeld tussen tweelingen/broers/zussen (C) en/of individu-specifiek (E) (met 95% betrouwbaarheidsintervallen)

		Correlatie tussen partners ^a	Proportie van fenotypische variantie verklaard door			
			A	D	C	E
Alcohol- inname	mannen+		23,4%	29,9%		46,7%
	vrouwen	,39	(19,1 – 27,5)	(23,9 – 36,0)		(43,1 – 50,7)
GGT	mannen		29,6%		28,5%	41,9%
	vrouwen	,00	(19,8 – 40,2)		(19,2 – 37,5)	(35,6 – 49,1)
ALT	mannen		40,4%	27,7%		59,6%
	vrouwen	,00	(23,4 – 41,4)	(17,8 – 37,5)		(35,3 – 45,7)
AST	mannen+	,15	(31,9 – 51,8)			(51,8 – 68,0)
	vrouwen	,15	(16,6 – 28,5)			(71,6 – 83,7)
AST	mannen+		28,0%	14,7%		57,3%
	vrouwen	,15	(22,6 – 33,5)	(7,1 – 22,3)		(51,8 – 63,5)

^a gelijkennis tussen partners in alcoholinname of leverenzymwaarden

8. Genetische invloeden op alcoholgebruik, leverenzymwaarden en hun samenhang op basis van genetische markerdata

Hoofdstuk 7 en 8 presenteren studies die gebruikmaken van SNP-data. SNPs zijn genetische varianten waarbij het DNA op één nucleotide (adenine, A; cytosine, C; thymine, T; guanine, G) kan verschillen van het DNA uit de referentieset (van een populatie).

In **hoofdstuk 7** is een kandidaatgenstudie uitgevoerd naar de associatie van SNPs in het ADH-gencluster en verschillende maten van alcoholgebruik. Het ADH-gencluster bestaat uit zeven genen, waarvan de ADH1B en ADH1C genen functionele varianten herbergen die in eerder onderzoek zijn geassocieerd met het risico op alcoholisme (Edenberg 2007). Aangezien relatief weinig bekend was over genetische varianten in de andere ADH-genen en hoe deze betrekking hebben op andere maten van alcoholgebruik dan alcoholisme, is in hoofdstuk 7 onderzocht of SNPs binnen dit gencluster samenhangen met frequentie en mate van alcoholgebruik, lichamelijke reacties na alcoholgebruik, symptomen van AAD en leeftijd bij aanvang van het alcoholgebruik. Er werden significante associaties gevonden ($\alpha=0,007$) voor reacties na alcoholgebruik met een SNP in ADH5 (rs6827292) en een SNP net stroomopwaarts van ADH5 (rs6819724), dat in een sterke samenhang (linkage disequilibrium, LD) verkeerde met SNP rs6827292. Daarnaast was de associatie tussen leeftijd bij aanvang van regelmatig alcoholgebruik en een SNP net stroomopwaarts van ADH7 (rs2654849) significant. Er werden geen significante associaties gevonden voor alcoholgebruik en symptomen van AAD. Hoewel SNP-associaties uit een eerdere studie (Macgregor et al. 2009) niet werden gerepliceerd, wijzen de drie nieuwe SNP-associaties op het belang van het ADH-gencluster in het verklaren van verschillen in maten van alcoholgebruik.

In **Hoofdstuk 8** werd geschat welk deel van de variantie in leverenzymwaarden kan worden verklaard door het gezamenlijke effect van alle SNPs en of een deel van deze variantie wordt gedeeld met die van alcoholgebruik. Hiertoe werden twee relatief nieuwe methoden toegepast. Met de genetische verwantschap Matrix (GRM) methode, werd de paarsgewijze genetische verwantschap tussen individuen geschat op basis van SNP-data. Deze paarsgewijze verwantschap werd opgenomen als random effect in een linear mixed model, geïmplementeerd in het softwarepakket genome-wide complex trait analysis (GCTA) (Yang et al. 2011a). Hiermee werd de variantie geschat op basis van additieve SNP-effecten. De dichtheidsschatting (DE) methode, voorgesteld door So et al. (2011), is gebaseerd op het vergelijken van de effectgroottes van SNP-associaties afkomstig uit GWA- of GWA meta-analyse studies met de verwachte verdeling van effectgrootten onder de nulhypothese van geen effect. Data waren afkomstig uit drie bronnen: (a) ongerelateerde deelnemers aan het NTR-onderzoek, (b) ongerelateerde deelnemers aan de NESDA-studie (Penninx et al. 2008), en (c) een groot consortium van waaruit

GWA meta-analyseresultaten beschikbaar waren over SNP-associaties voor GGT en ALT (Chambers et al. 2011).

Ongeveer 15-17% van de variantie in GGT, 2-15% van de variantie in ALT en 13% van de variantie in AST kon worden verklaard door het gezamenlijke effect van alle SNPs, in de NTR/NESDA data. Voor alcoholgebruik was dit 15%, waarbij een aanzienlijk deel van de variatie werd verklaard door chromosomen 4 en 15 (elk ~4,5%). Deze schattingen geven aan dat ~50% van de erfelijkheidsschattingen (op basis van additief genetische effecten) van leverenzymen en alcoholgebruik verklaard kan worden door de effecten van de gemeten en geïmputeerde SNPs. Deze bevindingen wijzen erop dat SNPs inderdaad informatie bevatten aangaande de onderliggende genetische risicoallelen voor alcoholinname en leverenzymen. Verder methodologisch onderzoek moet zich concentreren op SNP-gebaseerde erfelijkheidsschattingmethoden die ook niet-additieve genetische effecten op de variatie meenemen. Opvallend was dat de DE-methode in veel lagere erfelijkheidsschattingen van GGT en ALT resulteerde wanneer deze werden gebaseerd op de GWA meta-analyseresultaten (GGT 8%, ALT 5%) dan gebaseerd op de NTR/NESDA data. Dit kan mogelijk worden verklaard vanuit heterogeniteit in effectgroottes van SNPs tussen de verschillende samples uit de meta-analyse.

Tenslotte is onderzocht of de variatie in GGT die kon worden toegeschreven aan SNP-effecten, gedeeld werd met SNP-effecten voor alcoholgebruik. Zowel met de GRM- als met de DE-methode werd geen evidentie gevonden voor gemeenschappelijke SNP-variantie. Dit kan mogelijk worden verklaard door een lage power van de SNP-gebaseerde methoden of dat een ander ziektemodel de relatie tussen alcoholinname en GGT beschrijft dan zoals in de studie verondersteld (een causaal effect van alcoholinname op GGT i.p.v. gedeelde genen en/of nonadditief genetische effecten en/of leeftijdsinteractie i.p.v. additief genetische effecten). Met polygenetische risicoscores op basis van de GWA meta-analyseresultaten kon alcoholinname in de NTR/NESDA set wel worden voorspeld, maar de hoeveelheid verklaarde variantie was niet hoger dan 0,25%.

9. Conclusies

Een aanzienlijk deel van de individuele verschillen in alcoholgebruik (o.a. alcoholinname, symptomen van alcohol afhankelijkheid) en leverenzymwaarden onder Nederlanders kan worden toegeschreven aan genetische variatie, zoals bepaald met het tweeling(familie)design en met nieuwere technieken als de GRM- en DE-methode. Met de laatste technieken is een deel van de genetische basis van alcoholgebruik en leverenzymwaarden herleid tot variatie in de DNA-sequentie (SNPs). Wat betreft de relatie tussen alcoholinname en leverenzymwaarden, was alcoholinname voorspellend voor GGT-niveaus, maar geen robuuste voorspeller van ALT- of AST-niveaus. Met het tweelingfamiliedesign kon worden vastgesteld dat de associatie tussen

alcoholinname en GGT op populatieniveau in elk geval gedeeltelijk kan worden toegeschreven aan een effect van gedeelde genen.

De bevinding dat verschillen in alcoholgebruik alswel leverenzymwaarden gedeeltelijk zijn toe te schrijven aan SNP-effecten, geeft aan dat de huidige SNP-platforms informatie bevatten over risicoallelen die ten grondslag liggen aan verhoogd alcoholgebruik en leverenzymwaarden. Aangezien de invloed van nonadditieve genetische effecten op alcoholgebruik en leverenzymwaarden aanzienlijk is, zal toekomstig onderzoek zich moeten richten op methoden die ook nonadditieve genetische effecten meenemen in de SNP-gebaseerde erfelijkheidsschattingen. Deze informatie kan leiden tot het opsporen van nieuwe biologische paden die ten grondslag liggen aan alcoholgebruik, leverenzymen en hun samenhang.