

Nederlandse samenvatting

Depressie, of Major Depressive Disorder (MDD), is wereldwijd een van de meest voorkomende oorzaken van psychisch en lichamelijk lijden, ziekteverzuim en directe en indirecte zorgkosten. Om de diagnose en behandeling van MDD te kunnen verbeteren, is het belangrijk om meer te weten te komen van de achterliggende mechanismes van de ziekte. Hoewel genetisch onderzoek heeft laten zien dat de erfelijkheid van MDD ongeveer 40% is, is de moleculaire ontstaanswijze nog grotendeels onbekend. In dit proefschrift was het overkoepelende doel om causale genetische varianten te vinden die mogelijk helderheid kunnen verschaffen over deze ontstaanswijze. Voor dit doel werden twee benaderingen gekozen: in Hoofdstuk 3 en 4 werd fine-mapping gebruikt om te onderzoeken of de genetische variant rs2522833 daadwerkelijk een causale variant is; in de hoofdstukken 5 en 6 werd een kandidaatgen- en pathway-benadering gekozen om genetische varianten te vinden die geassocieerd zijn met biologische waardes voor MDD en varianten die geassocieerd zijn met de bijwerkingen van antidepressiva.

MDD is een veel voorkomende complexe ziekte met zowel oorzaken uit de omgeving van het individu als genetische oorzaken. In **Hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van genetische benaderingen om geassocieerde genetische varianten te vinden. Onder andere linkage studies, kandidaatgenen en de GWAS-methode passeren hier de revue. De GWAS die gebruikt werd als basis voor de fine-mapping studies was de GWAS van Sullivan et al., die werd uitgevoerd op het GAIN-MDD cohort. Met deze GWAS werd in het *PCLO*-gen het single nucleotide polymorfisme (SNP) rs2522833 gevonden, welke na post-hoc analyse met een Australisch cohort significantie benaderde. Vele andere topsignalen uit deze GWAS bleken ook voort te komen uit het gebied waar *PCLO* zich bevindt. Dit gen codeert voor het eiwit Piccolo, wat zich bevindt in de presynaptische actieve zone van zenuwcellen. Van dit eiwit wordt gedacht dat het een rol speelt bij het transport van zogenaamde 'vesicles' die neurotransmitters bevatten. Een van de hypothesen betreffende de oorzaken van MDD stelt dat de ziekte veroorzaakt wordt door een onbalans van neurotransmitters. Daarom lijkt *PCLO* met zijn rol in het transporteren van vesicles een plausibel kandidaatgen. Echter, de chip die gebruikt werd voor de GWAS was niet ontworpen op een manier waarbij de genen centraal stonden, waardoor de dekking van deze chip voor vele genen niet optimaal was. In **Hoofdstuk 3** wordt een fine-mapping studie beschreven die rekening houdt met dit ontwerp. Ten eerste om additioneel bewijs te vinden dat rs2522833 daadwerkelijk de causale variant is in het GAIN-MDD cohort. Vanwege het gebrek aan volledige dekking in de originele GWAS, zou het ook kunnen zijn dat het signaal veroorzaakt wordt door een nabijgelegen SNP die overerft met rs2522833. Ten tweede waren er meerdere signalen die juist onder de drempelwaarde voor significantie bleven, welke ook voortkwamen uit genen die niet optimaal gedekt waren. Om de genotypische informatie van deze genen te maximaliseren, werden zogenaamde tag SNPs uitgezocht, waardoor de dekking van de genen opgehoogd werd naar 100% met een minor allele frequency (MAF) van 10% en een correlatiecoëfficiënt r^2 van 0,9. Wederom werden de laagste P-waardes gevonden in de onmiddellijke omgeving van rs2522833, bij de SNPs rs2715147 en rs2715148 ($P=1,2E-6$). In de individuele analyses van deze SNPs werd echter geen genoom brede significantie bereikt. Daarna werd een zogenaamde 'joint re-analysis' uitgevoerd van alle gegenotypeerde SNPs in *PCLO*. Wanneer er werd aangenomen dat rs2522833 de causale variant was, bleek de regressielijn in deze analyse het steilst. Dit ondersteunt de hypothese dat de causale variant óf rs2522833 is, óf een variant die naar alle waarschijnlijkheid tezamen met deze SNP overerft. In een volgende stap, werd een haplotype-analyse uitgevoerd van blokken met SNPs die naar alle waarschijnlijkheid samen overerven. Een haplotype leverde een lagere P-waarde dan de individuele SNP-analyses ($P=9,9E-7$). Hoewel dit resultaat geen genoom brede significantie

opleverde, suggereert het wel dat een nog onbekende variant in dit gebied causaal zou kunnen zijn voor het topsignaal uit de GAIN-MDD GWAS.

Om meer bewijs te verzamelen voor de hypothese uit Hoofdstuk 3 dat óf rs2522833 óf een nog onbekende variant uit hetzelfde gebied de causale variant is in het GAIN-MDD cohort, werd een tweede strategie van de fine-mapping benadering gebruikt in **Hoofdstuk 4**. De resultaten van de haplotype-analyse in Hoofdstuk 3 suggereerden dat een nog onbekende variant in het *PCLO*-gen wellicht verantwoordelijk kan zijn voor het topsignaal in de GAIN-MDD GWAS. Met de insteek om deze variant te vinden, werd het *PCLO*-gen gesequenced met behulp van next-generation sequencing methodes. Daarnaast werden ook twee andere kandidaatgenen voor MDD uit de literatuur gesequenced: *GRM7* en *SLC6A4*. *GRM7* codeert voor een metabotrope glutamaatreceptor. Functionele knock-outmodellen van deze receptor laten een antidepressief effect zien (Cryan et al., 2003). Ook gaf *GRM7* een van de topsignalen in een meta-analyse van drie GWAS naar MDD (Shyn et al., 2011). Het *SLC6A4*-gen codeert voor de serotoninetransporter. Deze transporter speelt een cruciale rol bij de beschikbaarheid van serotonine in de synaptische spleet: de transporter is gelokaliseerd op het presynaptische membraan en transporteert serotonine terug de presynaptische cel in, waarbij de neurotransmitter effectief gerecycled wordt voor gebruik door receptoren op het postsynaptische membraan. Met deze sequencing studie werden 961 nieuwe SNPs ontdekt. 71 van deze nieuw gevonden SNPs werden tezamen met 185 tag SNPs gebruikt voor verdere fine-mapping. De tag SNPs waren noodzakelijk omdat een opzet met louter de nieuw ontdekte SNPs de genen niet voor 100% kon dekken. Deze benadering van next-generation sequencen, gevolgd door fine-mapping, leidde niet tot een lagere P-waarde dan de originele GAIN-MDD GWAS, met de laagste P-waarde bij SNP rs2715147 van $P=1,5E-6$. Deze resultaten laten zien dat de onbekende varianten die gedetecteerd werden in dit onderzoek niet beter geassocieerd zijn met MDD dan rs2522833. Hoewel zeldzame varianten niet meegenomen zijn in deze studie, geeft Hoofdstuk 4 aanvullend bewijs dat rs2522833 de causale variant is in het GAIN-MDD cohort.

In de hoofdstukken 3 en 4 werd de fine-mapping benadering gebruikt, gebaseerd op de GAIN-MDD GWAS. Een GWAS gebruikt geen *a priori* hypothese in de zoektocht naar een geassocieerde variant. In de hoofdstukken 5 en 6 wordt een andere benadering gebruikt: de kandidaatgenbenadering. Bij deze methode worden genen geselecteerd op basis van eerder bekende functies of biologische connecties met een eigenschap. In **Hoofdstuk 5** werden genen uit drie verschillende biologische pathways gegenotypeerd in het NESDA cohort: de HPA-as, de HPT-as en vitamine D-metabolisme. In MDD is de HPA-as ontregeld, hetgeen leidt tot hogere waarden van het eindproduct cortisol. Ook bij de HPT-as worden afwijkingen gevonden bij MDD-patiënten, terwijl patiënten met hypothyroïdie juist vaak kenmerken van depressie laten zien. Vitamine D-waarden in het bloed zijn geassocieerd met depressie in diverse patiënten groepen, o.a. het NESDA-cohort en een cohort van ouderen. Binnen het NESDA-cohort zijn voor deze drie pathways biologische metingen beschikbaar, in de vorm van cortisolwaarden, schildklierhormoonwaarden en vitamine D-waarden. De meest prominente genen binnen deze pathways werden in kaart gebracht met behulp van tag SNPs, waarna associatieanalyses werden uitgevoerd op individueel SNP-niveau, op genniveau en op pathway-niveau. Er werd gecorrigeerd voor de biologische waarden, om andere oorzaken van variatie behalve dan genetische uit te sluiten. Ook werden deze analyses herhaald voor het meest extreme fenotype: terugkerende ernstige MDD. Deze methodiek leverde na het corrigeren voor meerdere tests geen significante resultaten op. Echter, voor de terugkerende ernstige groep ontstond benaderde één SNP significantie, hetgeen niet te zien was binnen de gehele groep MDD-patiënten. Ondanks deze observatie moet men

in ogenschouw nemen dat de groepsgrootte hierbij gereduceerd was tot 1200 patiënten, waardoor de statistische power zwak is. Ook op genniveau en op pathway-niveau werden geen significante resultaten gevonden, hetgeen laat zien dat een pathway-benadering in dit cohort geen toegevoegde waarde heeft voor het vinden van een associatie met MDD. Verder werd er gekeken of de gegenotypeerde varianten tezamen met depressie een gecombineerd effect hadden op de biologische uitkomstmaten van deze pathways. Hoewel er bij de HPA-as en bij vitamine D een verschil in uitkomstwaardes was, zoals bekend uit eerdere literatuur, werd dit effect niet versterkt door het aanwezig zijn van een bepaald genotype.

Waar bij de eerdere hoofdstukken met name gefocust werd op het vinden van varianten die geassocieerd zijn met MDD, wordt in **Hoofdstuk 6** de behandeling van MDD met antidepressiva onder de loep genomen. Deze studie was, evenals Hoofdstuk 5, gebaseerd op de kandidaatgenbenadering. Ook hier werden genen geselecteerd waarvan de functie reeds bekend was uit de literatuur. Bij de behandeling van MDD met antidepressiva zijn bijwerkingen een obstakel. In het NESDA-cohort werd bij de 64% van de 927 patiënten die één antidepressivum gebruikten gemiddeld 2,9 bijwerkingen gerapporteerd, waarbij tricyclische antidepressiva (TCA) geassocieerd waren met meer bijwerkingen dan selectieve serotonine heropnameremmers (SSRI). Interessant genoeg was het aantal bijwerkingen geassocieerd met de ernst van de depressie, hogere doseringen en het vóórkomen van meerdere psychiatrische diagnoses (Bet et al., 2013). In een studie van meer dan 400 patiënten die met SSRI's behandeld werden, ervoer 55% van de patiënten bijwerkingen in de eerste twee weken van de behandeling (Hu et al., 2004). Een andere beperking bij het behandelen van MDD is dat een substantieel deel van de patiënten geen remissie van symptomen laat zien bij het gebruik van antidepressiva. In een onderzoek met 2900 patiënten was de respons op de SSRI citalopram 47%, met daadwerkelijke remissie in 28-33% van de patiënten (Trivedi et al., 2006). Bij de behandeling met antidepressiva moet een balans gevonden worden tussen het bereiken van een therapeutische dosering en het voorkomen van een dosis waarbij bijwerkingen optreden. In Hoofdstuk 6 wordt gehypothetiseerd dat varianten in het leverenzym *CYP2C219* en in het medicatietransporter gen *ABCB1* effect kunnen hebben op het aantal bijwerkingen door het verhogen of verlagen van de concentratie van een antidepressivum in het bloed. Een significante associatie werd gevonden tussen een veel voorkomende variant in *ABCB1* en het aantal bijwerkingen bij patiënten die medicatie gebruiken die afhankelijk is van het de PgP-transporter. Het A-allel van rs2032588 was geassocieerd met een lager aantal bijwerkingen wanneer gecorrigeerd werd voor leeftijd, geslacht, duur van de therapie en dosering ($B=-0,44$, $P=1,22E-4$). Deze significantie bleef ook behouden na controle voor vals positieven (false discovery rate, FDR) ($B=-0,44$, $q=4,6E-3$). Deze associatie werd niet gevonden in patiënten die géén antidepressivum gebruikten dat afhankelijk is van de PgP-transporter. De studie in Hoofdstuk 6 is een van de eerste die een associatie tussen genetische varianten en aantal bijwerkingen laat zien in een naturalistische setting met een substantiële grootte van het cohort, maar idealiter zouden de resultaten nog gerepliceerd moeten worden in een vergelijkbaar cohort.

Samenvattend, hoewel het werk in dit proefschrift de hypothese lijkt te ondersteunen dat rs2522833 de causale variant is in het GAIN-MDD-cohort, werden geen significante resultaten behaald met deze fine-mapping benadering. Dit valt waarschijnlijk te wijten aan de grootte van het cohort. Inmiddels wordt geschat dat een echte associatie zeer waarschijnlijk pas haalbaar is bij een cohort bestaande uit ongeveer 100.000 patiënten. Ook voor de pathway-benadering werden geen significante resultaten gevonden. Ook hier zou men idealiter een velen malen groter cohort willen gebruiken om de statistische power voor een valide ontdekking te kunnen verhogen. Tevens werd een associatie gevonden met een veel voorkomende variant in het *ABCB1*-gen en het aantal bijwerkingen bij

patiënten met een PgP-afhankelijk antidepressivum. Deze resultaten dienen echter nog wel gerepliceerd te worden in een vergelijkbaar cohort, voordat men mogelijk zou kunnen denken aan een praktische toepassing van deze resultaten om medicatie verder toe te spitsen op de individuele patiënt.