

De vertaling van genetische risicovarianten naar moleculaire ziektemechanismen

G. Snijders, R. Snijders, L.D. de Witte

- Achtergrond** In geneticastudies heeft men grote aantallen genetische varianten gevonden die het risico op het krijgen van een neuropsychiatrische aandoening vergroten.
- Doel** Uitleg geven over hoe je kan onderzoeken wat het effect is van deze genetische varianten op de expressie van genen en of dit een rol speelt in de betreffende neuropsychiatrische ziekte.
- Methode** We bespreken een studie die wij recent hebben verricht waarbij associaties tussen genetische risicofactoren voor neuropsychiatrische ziekten en genexpressie werden onderzocht in microglia, de immuuncellen van de hersenen.
- Resultaten** Een deel van de risicovarianten voor neuropsychiatrische ziekten kon gerelateerd worden aan genexpressie in microglia. Met name voor neurodegeneratieve ziekten waren deze associaties sterk.
- Conclusie** Deze vertaalslag van genetische risicovarianten naar genexpressie zorgt ervoor dat we beter begrijpen welke moleculaire en cellulaire processen betrokken zijn bij neuropsychiatrische ziekten. Deze processen geven aanknopingspunten voor nieuwe behandelingen.

De genetica van neuropsychiatrische stoornissen heeft de laatste decennia grote resultaten geboekt (Sullivan e.a. 2018; Neuner e.a. 2020). Door intensieve inspanningen van internationale consortia is een groot aantal genetische varianten gevonden die het risico op het krijgen van een neuropsychiatrische aandoening significant vergroten. De consortia maakten hierbij gebruik van de zogeheten *genoomwijde associatiestudies* (GWAS'en) en *whole genome sequencing studies* (WGS). Deze genetische varianten kunnen onderverdeeld worden in *single nucleotide polymorphisms* (SNP's) en structurele varianten. Die laatste duiden variaties aan in een groter gedeelte van het genoom, terwijl SNP's verwijzen naar een verandering in één basenpaar.

De schat aan data die deze studies hebben opgeleverd, bestaat uit lange lijsten van SNP's en structurele varianten. Maar wat kunnen we met die lijsten? In deze bijdrage bespreken we hoe men met een 'QTL'-studie de vertaling kan maken van een lijst SNP's naar kandidaat-ziektegenen en betrokken celtypen. Als voorbeeld bespreken we onze studie met microglia, de immuuncellen van de hersenen, die we samen met collega's van het Mount Sinai ziekenhuis in New York verrichtten (Lopes e.a. 2022).

SNP's en loci: wat zijn dit en waarom zijn ze uitdagend?

Een SNP is een variant in een basenpaar (CG, GC, AT of TA) die minstens bij 1% van de populatie voorkomt. In het humane genoom zijn meer dan een miljoen SNP's beschreven. Bij een GWAS wordt geanalyseerd welke SNP's vaker voorkomen bij mensen met een bepaalde ziekte. Het resultaat wordt weergegeven in geassocieerde loci. Een locus is een groepje van SNP's die naast elkaar liggen en die samen deze associatie geven (Slatkin 2008). Zo zijn er momenteel voor schizofrenie 176 significant geassocieerde loci (Lam e.a. 2019) en voor bipolaire stoornis 64 loci (Mullins e.a. 2021) gevonden. Een lijst van geassocieerde loci en SNP's zegt echter nog niets over welke processen, op zowel cel- als moleculair niveau, anders verlopen bij personen met een verhoogd risico op de betreffende ziekte. Dit is van belang, aangezien dit de mechanismen zijn die ons meer inzicht kunnen geven over de onderliggende ziekteprocessen en ook eventuele aangrijpingspunten voor behandeling. Maar hoe kom je van een lijst met SNP's naar cellen en moleculaire functies?

DNA wordt overgeschreven tot mRNA ('transcriptie') en vervolgens afgelezen naar een keten van aminozuren ('translatie') die zich vouwen tot een eiwit dat zijn eigen

AUTEURS

Gijsje Sniijders, postdoctoraal onderzoeker, Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, en afd. Psychiatrie, Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam.

Renske Sniijders, arts, afd. Psychiatrie, Radboudumc, Nijmegen.

Lot D. de Witte, psychiater en onderzoeker, Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, en afd. Psychiatrie, Radboudumc, Nijmegen.

Correspondentie

Dr. Gijsje Sniijders (Gijsje.sniijders@mssm.edu).

Geen strijdige belangen meegedeeld.

Het artikel werd voor publicatie geaccepteerd op 28-3-2022.

Citeren

Tijdschr Psychiatr. 2022;64(5):323-326

specifieke functies in een cel heeft. Als een SNP in het coderende gedeelte van een eiwit zit, dan kan dit de opbouw van het eiwit beïnvloeden. Het is in dit geval duidelijk welk gen en eiwit worden beïnvloed door de betreffende SNP. Vervolgens kan men met moleculaire experimenten onderzoeken hoe deze veranderingen in het eiwit de functie van het eiwit beïnvloeden. Echter, de meeste loci die geassocieerd zijn met neuropsychiatrische aandoeningen zitten juist buiten het coderende deel, vaak wel duizenden basenparen verder dan het eerste gen. Deze variaties kunnen indirect de genexpressie beïnvloeden, doordat ze de binding van factoren die genexpressie reguleren, veranderen. In dit geval is het niet duidelijk welk gen beïnvloed wordt en wat het effect is. Eerder werd gedacht dat dit het meest waarschijnlijk het dichtstbijzijnde gen op het genoom zou zijn, maar dat blijkt vaak niet het geval (Clyde 2017). Het bestuderen van ‘*expression quantitative trait loci*’ (eQTL’s) kan helpen om uit te vinden welk gen door welke SNP’s beïnvloed wordt (Morley e.a. 2004; Stranger e.a. 2007; Emilsson e.a. 2008).

QTL: wat zijn dit?

Voor de translatie van GWAS’en wordt met name gekeken naar eQTL’s. Een eQTL is de associatie tussen genetische variatie in een bepaalde locus en de expressie van een gen. Het effect van variatie in de locus op expressie van een gen is vaak orgaan- en celtypespecifiek (GTEx Consortium e.a. 2015). Het is daarom belangrijk om deze associaties te bestuderen in de juiste context. In het geval van neuropsychiatrische aandoeningen kijkt men daarom naar eQTL’s in hersenweefsel (Sieberts e.a. 2020).

Recenter worden vervolgstudies gedaan op verschillende type geïsoleerde hersencellen, waaronder neuronen, maar ook de microglia, zoals in onze studie (Lopes e.a. 2022). Hierbij kijkt men niet alleen in hersenweefsel van volwassenen, maar ook naar hersenweefsel gedu-

rende de gehele ontwikkeling, daar effect op genexpressie door de jaren kan veranderen (Cuomo e.a. 2020).

Het bestuderen van eQTL’s

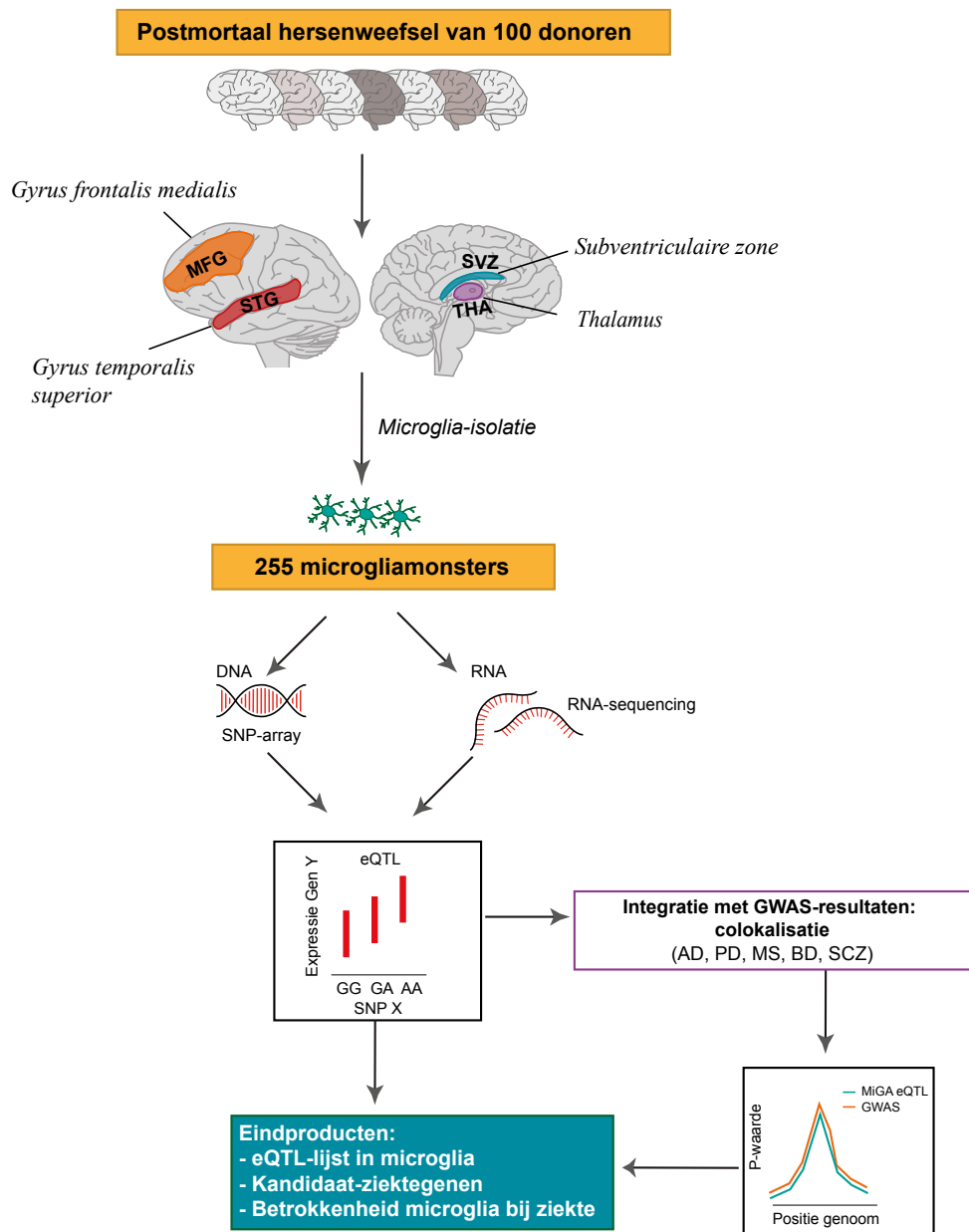
Het principe van een eQTL-studie is eenvoudig. Je verzamelt monsters van een groot aantal individuen, het liefst honderden. Op die monsters doe je een SNP-analyse om voor een groot aantal SNP’s te kijken welke variant het individu heeft. Vervolgens bepaal je genexpressie in hetzelfde monster. Vaak kijkt men hierbij naar expressie van alle genen, door gebruik te maken van *microarrays* of *RNA-sequencing*. Vervolgens bepaal je voor elke SNP of deze geassocieerd is met de expressie van genen die zich in de regio van deze SNP bevinden, de zogeheten eQTL’s. Het principe van deze analyse is eenvoudig, maar computationeel is het ingewikkeld om deze analyses uit te voeren, mede door de vele kwaliteitsstappen die nodig zijn. Je eindproduct van een dergelijke eQTL-studie is een lijst van significante SNP x genassociaties.

eQTL’s in microglia: waarom microglia?

Microglia zijn de immuuncellen van de hersenen. Ze zijn betrokken bij het reguleren van inflammatie in het centrale zenuwstelsel, maar ook bij de ontwikkeling en neurotransmissie (Paolicelli e.a. 2011; Kettenmann e.a. 2011). Er zijn steeds meer aanwijzingen dat microglia een rol spelen bij het ontstaan van neurodegeneratieve en psychiatrische ziekten. Echter, of en hoe het genetisch risico op deze ziekten gerelateerd kan worden aan een veranderde microgliafunctie is nog niet opgehelderd.

Wij onderzochten daarom de relatie tussen genetische variatie en genexpressie bij humane microglia met het doel om eerdere eQTL’s te valideren, nieuwe eQTL’s te identificeren en vervolgens te analyseren of de eQTL’s geassocieerd kunnen worden met het risico op de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson, multiple sclerose, schizofrenie en bipolaire stoornis.

Figuur 1. Overzicht van de microglia genomics atlas(MiGA)-studie



Microglia werden geïsoleerd uit postmortaal hersenweefsel van 100 verschillende donoren uit vier verschillende hersengebieden: subventriculaire zone, thalamus, gyrus frontalis medialis en gyrus temporalis superior. SNP-array en RNA-sequencing werden uitgevoerd op monsters (n = 255) om te bepalen of de SNP geassocieerd is met de expressie van genen die zich in de regio van deze SNP bevinden, de zogeheten eQTL's. De boxplot toont een versimpelde representatie van een eQTL. SNP AA correleert significant met genexpressie. De significante 'eQTL's' werden geïntegreerd in lijsten van SNP's die significant zijn bevonden in GWAS'en van neuropsychiatrische ziekten om te bekijken of er overlap is met deze kandidaat-ziektegenen.

eQTL's in microglia: methode

Voor deze studie hebben we microglia geïsoleerd van postmortaal hersenmateriaal van 100 donoren van de Nederlands Hersenbank en de Mount Sinai Brain Bank. We isoleerden de cellen uit verschillende hersengebieden en verkregen hiermee cellen van in totaal 255 hersenmonsters. We deden vervolgens een *SNP-array* en *RNA-sequencing* op al deze monsters. Hierna onderzoch-

ten we welke SNP's een significante associatie vertoonden van de expressie van een gen in de regio van deze SNP. We verrichtten een meta-analyse van de resultaten in de verschillende hersengebieden, maar keken ook naar eQTL's in individuele hersengebieden. Vervolgens analyseerden we of dezelfde effecten ook in andere microgliastudies, studies van perifere immuuncellen (monocyten) of in studies van hersen-

weefsel gezien werden. Tot slot analyseerden we of de resultaten gerelateerd konden worden aan het genetische risico op neuropsychiatrische ziekten.

QTL's in microglia: resultaten

We identificeerden 3611 'eGenes', genen waarbij er wat betreft hun expressie een significante associatie met één of meerdere SNP's gevonden werd. Een deel van deze eGenes werd gevonden in alle hersengebieden en een deel van de eGenes liet effecten in specifieke hersengebieden zien. We zagen significante overlap tussen de eQTL-resultaten in monocyten en microglia. Een deel van de eQTL's was specifiek voor microglia. We zagen minder overlap tussen de eQTL's in microglia en eQTL's in hersenweefsel.

Voor de ziekte van Alzheimer en de ziekte van Parkinson zagen we dat een groot gedeelte (10-30%, afhankelijk van het significantieniveau) van de geassocieerde loci colocaliseerde met een eQTL. We repliceerden de associaties met genen eerder beschreven voor deze ziekten, zoals *BIN1*, maar vonden ook nieuwe kandidaat-ziektegenen, zoals *USP6NL* en *P2RY12*.

Voor multiple sclerose, bipolaire stoornis en schizofrenie was het percentage van overlap tussen risico op de ziekte en microglia-eQTL's een stuk lager. Voor schizofrenie vonden we de kandidaat-ziektegenen *IRFD1*, *CTSH* en *IMMP2L* en voor multiple sclerose *MIEN1*, *PLXNB2* en *PP1R15A*. Voor bipolaire stoornis vonden we geen kandidaat-ziektegenen.

QTL's in microglia: validatie

De gevonden eQTL's in microglia zijn enkel en alleen gebaseerd op statistische evidentie. Celexperimenten zijn belangrijk om te valideren of een bepaalde locus of een specifieke SNP inderdaad de genexpressie beïnvloedt. Met *genome editing* hebben we daarom de locus die geassocieerd is met genexpressie van *USP6NL* verwijderd in pluripotente stamcellen. We differentiëren deze stamcellen nu tot microglia om te bekijken of de locus inderdaad de genexpressie beïnvloedt.

Conclusie en toekomstige stappen

We concluderen dat onze studie meer inzicht heeft gegeven in hoe het genetisch risico voor neuropsychiatrische ziekten gerelateerd is aan genexpressie in microglia. Ons onderzoek met 100 donoren en 255 monsters is de grootste studie tot nu toe, mede gezien de uitdaging van het isoleren van microglia uit postmortaal hersenweefsel (Melief e.a. 2016). We verwachten dat vervolgstudies en meta-analyses meer significante associaties zullen geven.

Onze data suggereren dat microglia een belangrijke causale rol spelen bij neurodegeneratieve ziekten. Voor schizofrenie, bipolaire stoornis en multiple sclerose lijkt de impact van het genetische risico voor de ziekten minder sterk via de microglia te verlopen. We hebben voor de ziekte van Alzheimer en de ziekte van Parkinson

eerdere kandidaat-ziektegenen gerepliceerd, maar ook nieuwe gevonden.

Met vervolggexperimenten met cel- en diermodellen wordt de rol van deze genen verder onderzocht in relatie tot het ziekteproces. Ook kijkt men of deze genen nieuwe aangrijpingspunten kunnen zijn voor behandeling. Hierbij kijkt men naar medicijnen die specifiek deze risicogenen/eiwitten beïnvloeden, zoals antistoffen gericht tegen de eiwitten. Ook onderzoekt men medicijnen die de cellulaire functies van microglia beïnvloeden die door deze genen worden gereguleerd (Lewcock e.a. 2020). Voor de ziekte van Alzheimer zijn zowel de academische instituten als de farmaceutische industrie volop bezig met het onderzoeken van therapeutische behandelingen die microglia beïnvloeden in preklinische en klinische studies.

LITERATUUR

- Clyde D. Transitioning from association to causation with eQTLs. *Nat Rev Genet* 2017; 18: 271.
- Cuomo AS, Seaton DD, McCarthy DJ, e.a. Single-cell RNA-sequencing of differentiating iPSCs reveals dynamic genetic effects on gene expression. *Nat Commun* 2020; 11: 1-14.
- Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, e.a. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature* 2008; 452: 423-8.
- GTE Consortium, Ardlie KG, Deluca DS, Segrè AV, e.a. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science* 2015; 348: 648-60.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, e.a. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91: 461-553.
- Lam M, Chen CY, Li Z, e.a. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations. *Nat Genet* 2019; 51: 1670-8.
- Lewcock JW, Schlepckow K, Di Paolo G, e.a. Emerging microglia biology defines novel therapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron* 2020; 108: 801-21.
- Lopes KDP, Snijders GJ, Humphrey J, e.a. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. *Nat Genet* 2022; 54: 4-17.
- Melief J, Sneeuwerd MAM, Litjens M, e.a. Characterizing primary human microglia: A comparative study with myeloid subsets and culture models. *Glia* 2016; 64: 1857-68.
- Morley M, Molony CM, Weber TM, e.a. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* 2004; 430: 743-7.
- Mullins N, Forstner AJ, O'Connell KS, e.a. Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nat Genet* 2021; 53: 817-29.
- Neuner SM, Julia TCW, Goate AM. Genetic architecture of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2020; 143: 104976.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, e.a. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333: 1456-8.
- Sieberts SK, Perumal TM, Carrasquillo MM, e.a. Large eQTL meta-analysis reveals differing patterns between cerebral cortical and cerebellar brain regions. *Sci Data* 2020; 7: 340.
- Slatkin M. Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 477-85.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, e.a. Population genomics of human gene expression. *Nat Genet* 2007; 39: 1217-24.
- Sullivan PF, Agrawal A, Bulik CM, e.a. Psychiatric genomics: an update and an agenda. *Am J Psychiatry* 2018; 175: 15-27.

SUMMARY

The translation of genetic risk variants to molecular disease mechanisms

G. Snijders, R. Snijders, L.D. de Witte

Background Genetic studies have found large numbers of genetic risk variants that increase the risk to develop neuropsychiatric disorders.

Aim We aim to explain how to investigate the effects of these genetic risk variants on the expression of genes and whether this plays a potential role in neuropsychiatric disorders.

Method We describe the main findings of a study that we recently performed to study the association between genetic risk factors for neuropsychiatric disorders and gene expression in microglia, the immune cells of the brain.

Results Part of the risk variants for neuropsychiatric disorders could be related to gene expression in microglia. These associations were particularly strong for neurodegenerative disorders.

Conclusion Our study provided more insight into how genetic risk to neuropsychiatric disorders is related to gene expression in microglia. These findings show suggestions for potential new treatment options.