

<http://hdl.handle.net/1765/126158>

**Erasmus MC**

Universitair Medisch Centrum Rotterdam



## Summary / Samenvatting



## SUMMARY

**Chapter 1** gives a general introduction to this thesis. Facial skin aging has a large impact on the general population. Besides the clear cosmetic relevance, it reflects a person's general health and emotional well-being and it is associated with mortality. Skin aging is a compound phenotype, which can be assessed in many different ways. It is often divided in intrinsic (or innate) and extrinsic (or acquired) aging. There are distinctive characteristics between the two, but in practice it is difficult to separate them in UV-exposed areas such as the face. Their combined effects result in the compound phenotype facial skin aging, which can be divided into four major phenotypes: wrinkles, pigmented spots, telangiectasia and sagging. Another approach to investigate skin aging is by the phenotype perceived age (the estimated age of a person based on facial appearance). Skin aging is affected by multiple lifestyle and physiological factors. Given the complexity of facial aging, we decided to investigate determinants for different features of skin aging instead of focusing on the compound phenotype. In doing so, we aim to validate our digital measurement method used to quantify the different facial skin aging phenotypes. Furthermore, we aim to define main epidemiological determinants and genetic factors for the several skin aging features. In addition, we aim to clarify the relationship between vitamin D and skin aging. Lastly, we aim to understand the underlying correlation structure of skin aging. We performed the abovementioned epidemiological and genetic studies using data from the Rotterdam Study (RS), a large ongoing population-based cohort study in Ommoord (a suburb of Rotterdam in the Netherlands) with mainly northwestern European participants aged  $\geq 40$  years.

In **Chapter 2**, we validated a new digital image analysis technique to measure severity of different skin aging features including wrinkling, pigmented spots and telangiectasia. Within the RS, standardized three-dimensional facial photographs were taken. Two physicians independently graded 150 photographs for severity of wrinkles (full face, forehead, crow's feet, nasolabial fold, and upper lip), pigmented spots and telangiectasia, using photonumeric grading scales. Additionally, the affected percent of skin was digitally quantified. Sex-specific system optimization (N=50) and blinded validation using the photonumeric grades (N=100) were performed for each skin aging feature. The inter-rater reliability of the manual grading was good to excellent in all skin aging features (intra-class correlation coefficient between 0.65 and 0.93). A comparison of the digital and the manual approach showed excellent correlations between most features (Spearman's rho correlation coefficients between 0.52 and 0.89, except male upper lip wrinkling ( $p=0.30$ )). This shows that digitally quantified skin aging feature measures are comparable with the traditional manual measures, and therefore seem useful in future studies.

In **Chapter 3**, we investigated sex-specific determinants for facial wrinkles using the digitally quantified measures. We included standardized facial photographs of 3831 northwestern European participants of the RS (51-98 years, 58% female). Effect estimates from multivariable linear

regressions are presented as the percentage difference in the mean value of wrinkle area per unit increase of a determinant (% $\Delta$ ). Wrinkle area was higher in men (median 4.5%, interquartile range: 2.9-6.3) than in women (3.6%, interquartile range: 2.2-5.6). Age was the strongest determinant; current smoking (men: 15.5% $\Delta$ ; women: 30.9% $\Delta$ ) and lower BMI (men: 1.7% $\Delta$ ; women: 1.8% $\Delta$ ) were also statistically significantly associated with increased wrinkling. Pale skin color showed a protective effect (men: -21.0% $\Delta$ ; women: -28.5% $\Delta$ ) and, in men, sunburn tendency was associated with less wrinkling. In women, low educational levels and alcohol use were associated with more wrinkling, whereas female pattern hair loss and a higher free androgen index were associated with less wrinkling. Thus, we validated known and identified additional determinants for wrinkling.

In **Chapter 4**, we searched for genetic variants associated with facial wrinkles using the digitally quantified measures. We performed a genome-wide association study in 3513 northwestern European participants of the RS (51-98 years). Replication analyses were performed in an independent Dutch cohort (Leiden Longevity Study, N=599), making use of photonumerically graded photographs. For the most significant single-nucleotide polymorphisms (SNPs) we performed sensitivity analyses to determine the effect of BMI, sex and site-specific wrinkling (crow's feet, forehead and in women upper lip wrinkles). None of the SNPs showed a genome-wide significant effect in the RS cohort, nor in the sensitivity analyses. However, one SNP, rs10476781, showed a genome-wide significant association with global facial wrinkling in the meta-analysis of the two cohorts ( $P=2.19 \times 10^{-8}$ ). This intergenic SNP is located between the Neuromedin U Receptor 2 (*NMUR2*) gene and a non-protein coding RNA gene (*LINC01933*). *NMUR2* is expressed in the brain, which may suggest nervous system effects on facial wrinkling. Further studies are needed to validate the findings and understand their biological relevance.

In **Chapter 5**, we searched for genetic variants associated with pigmented spots using the digitally quantified measure. We performed a genome-wide association study in 2844 northwestern European participants of the RS. Age, female sex and pale skin color were associated with more pigmented spots. The percentage of affected facial skin area (mean  $1.5\% \pm 0.9$ ) was significantly associated with three genetic loci: *IRF4* (rs12203592,  $P=1.8 \times 10^{-27}$ ), *MC1R* (compound heterozygosity score,  $P=2.3 \times 10^{-24}$ ), and *RALY/ASIP* (rs6059655,  $P=1.9 \times 10^{-9}$ ). Additionally, after adjustment for the other three top associated loci the *BNC2* locus demonstrated significant association (rs62543565,  $P=2.3 \times 10^{-8}$ ). The association signals observed at all four loci were successfully replicated ( $P < 0.05$ ) in an independent Dutch cohort (Leiden Longevity Study, N=599). Although the four genes have previously been associated with skin color variation and skin cancer risk, all associations remained highly significant ( $P < 2 \times 10^{-8}$ ) when conditioning the association analyses on skin color. We conclude that genetic variation in *IRF4*, *MC1R*, *RALY/ASIP* and *BNC2* contribute to the acquired amount of facial pigmented spots during aging, through pathways independent of the basal melanin synthesis.

In **Chapter 6**, we investigated lifestyle and physiological factors associated with facial telangiectasia using the digitally quantified measure. We included standardized facial photographs of 2842 northwestern European participants of the RS (51-98 years, 57% female). Effect estimates from multivariable linear regressions are presented as the percentage difference in the mean value of telangiectasia area per unit increase of a determinant (% $\Delta$ ). Significant determinants were older age (1.7% $\Delta$  per year), female sex (18.3% $\Delta$ ), smoking (current versus never 38.4% $\Delta$ ; former versus never 11.6% $\Delta$ ), a high susceptibility to sunburn (10.2% $\Delta$ ) and light skin color (pale vs. white-to-olive 31.4% $\Delta$ ; white vs. white-to-olive 9.2% $\Delta$ ). In this large cohort study, we confirmed known and described new determinants of facial telangiectasia.

In **Chapter 7**, we searched for genetic variants associated with facial perceived age, estimated from standardized facial photographs of 2693 northwestern European participants of the RS (51-87 years). We performed a genome-wide association study of perceived age, analyzing over eight million SNPs. The strongest genetic associations with perceived age were found for multiple SNPs in the *MC1R* gene ( $P < 1 \times 10^{-7}$ ). This effect was enhanced for a compound heterozygosity marker constructed from four pre-selected functional *MC1R* SNPs ( $P = 2.69 \times 10^{-12}$ ), which was replicated in an independent Dutch cohort (Leiden Longevity Study,  $N = 599$ ;  $P = 0.042$ ) and among 1173 Europeans of the TwinsUK Study ( $P = 3 \times 10^{-3}$ ). Individuals carrying the homozygote *MC1R* risk haplotype looked on average up to two years older than non-carriers. This association was independent of age, sex, skin color, wrinkling and pigmented spots. Furthermore, it persisted through different sun-exposure levels. Hence, a role for *MC1R* in youthful looks independent of its known melanin synthesis function is suggested. Our study uncovers the first genetic evidence explaining why some people look older for their age and provides new leads for further investigating the biological basis of this.

In **Chapter 8**, we investigated whether there are causal associations between 25-hydroxyvitamin D concentrations and features of skin aging in a bidirectional Mendelian randomization study. In the RS ( $N = 3831$ ; 58.2% women, median age 66.5 years) and Leiden Longevity Study ( $N = 661$ ; 50.5% women, median age 63.1 years), facial skin aging features (wrinkles, pigmented spots, perceived age) were assessed either manually or digitally using standardized facial photographs. Associations between 25-hydroxyvitamin D and skin aging features were tested by multivariable linear regression. Mendelian randomization analyses were performed using SNPs identified from previous genome-wide association studies. After meta-analysis of the two cohorts, we observed that higher serum 25-hydroxyvitamin D was associated with a higher perceived age ( $P = 3.6 \times 10^{-7}$ ), more skin wrinkling ( $P = 2.6 \times 10^{-16}$ ), but not with more pigmented spots ( $P = 0.30$ ). In contrast, a genetically determined 25-hydroxyvitamin D concentration was not associated with any skin aging feature ( $P > 0.05$ ). Furthermore, a genetically determined higher degree of pigmented spots was not associated with higher 25-hydroxyvitamin D ( $P > 0.05$ ). Our study did not indicate that associations between 25-hydroxyvitamin D and features of skin aging are causal.

In **Chapter 9**, we analyzed the underlying phenotypic correlation structure between seven features for facial aging: global wrinkles, perceived age (PA), Griffiths' manual photodamage grading, pigmented spots, telangiectasia, actinic keratosis (AK), and keratinocytic cancer (KC). Data on AK and KC were obtained via a full-body skin examination and the other features via standardized facial photographs of 1790 northwestern European participants of the RS with complete data on all of these features. We used principal component analysis (PCA) to derive principal components (PCs) of common variation between the features. We performed multivariable linear regressions between age, sex, BMI, smoking, and UV-exposure and the PC scores derived from PCA. We also tested the association between the main PC scores and 140 SNPs previously associated with skin aging phenotypes. Three main PCs explained 73% of the total variance of the aging phenotypes: a hypertrophic/wrinkling component (PC1: global wrinkling, PA and Griffiths' grading), an atrophic/skin color component (PC2: pigmented spots and telangiectasia) and a cancerous component (PC3: AK and KC). The associations between lifestyle and physiological determinants differed per PC. The strength of SNP associations also differed per component with the most SNP associations found with the atrophic component (e.g. the *IRF4* SNP (rs12203592);  $P$ -value= $1.84 \times 10^{-22}$ ). Thus, using a hypothesis-free approach, we identified three major underlying phenotypes associated with skin aging. Associations between determinants for skin aging differed in magnitude and direction per component.

In **Chapter 10**, a general overview of the main findings is provided. The thesis shows that skin aging is a complex phenotype. Four different features of skin aging were analyzed, namely wrinkles, pigmented spots, telangiectasia, and perceived age. In doing so, mainly continuous digital measurements were used, as this is a feasible approach and offers objective and consistent outcomes. I have replicated known and identified additional lifestyle and physiological determinants for the different skin aging features. The varying associations of light skin color with the different skin aging features (less wrinkles, more pigmented spots and more telangiectasia) strengthen the concept that different skin types age in a different manner. Fair-skinned individuals tend to show more atrophic signs of aging (e.g. PS and telangiectasia), whereas darker-skinned individuals show more hypertrophic signs of aging (e.g. wrinkles). This is also confirmed by the principal component analysis. With the genome-wide association studies for wrinkles, pigmented spots and perceived age, associated gene variants were identified, with varying results per feature. Skin color genes were associated with pigmented spots and perceived age, but surprisingly not with wrinkles. This emphasizes the hypothesis that different skin aging features have different genetic architectures; that of wrinkles seems more complex. Furthermore, I presented a view on future skin aging research.

## SAMENVATTING

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding op dit proefschrift. Huidveroudering in het gelaat heeft een grote invloed op de samenleving. Naast de duidelijke cosmetische relevantie, weerspiegelt het de algemene gezondheid van een persoon alsook de emotionele gesteldheid. Bovendien is het geassocieerd met mortaliteit. Huidveroudering is een samengesteld fenotype, dat op verschillende manieren kan worden geëvalueerd. Vaak wordt het gecategoriseerd in intrinsieke (aangeboren) en extrinsieke (verworven) veroudering. Er zijn kenmerkende verschillen tussen deze twee, maar in de praktijk is het moeilijk om ze van elkaar te onderscheiden in een UV-blootgesteld gebied zoals het gelaat. Het samengestelde fenotype huidveroudering kan worden ingedeeld in vier hoofdkenmerken: rimpels, pigmentvlekken, teleangiëctasieën en ‘verzakking’. Een andere invalshoek om huidveroudering te benaderen is door het fenotype geschatte leeftijd (waargenomen leeftijd van iemand gebaseerd op uiterlijke kenmerken in het gelaat). Huidveroudering wordt beïnvloed door vele leefstijl en fysiologische determinanten. Vanwege de complexiteit van huidveroudering hebben wij besloten om niet het samengestelde fenotype, maar de afzonderlijke hoofdkenmerken te analyseren. Hiertoe gebruiken we digitale meetmethoden die we in dit proefschrift streven te valideren. Verder beogen we de belangrijke epidemiologische en genetische determinanten van de afzonderlijke huidverouderingskenmerken te definiëren. Tevens onderzoeken we de relatie tussen vitamine D en huidveroudering. Tot slot geven we de onderlinge verhoudingen tussen de verschillende huidverouderingskenmerken weer. Bovengenoemde vraagstukken hebben we beantwoord middels epidemiologische en genetische studies binnen de Rotterdam Studie (RS). Dit is een groot prospectief bevolkingsonderzoek in de Rotterdamse wijk Ommoord, met deelnemers van veelal Noordwest-Europese afkomst van 40 jaar en ouder.

In **Hoofdstuk 2** valideren we een nieuwe digitale beeldanalyse techniek, die de ernst van verschillende huidverouderingskenmerken kan meten, namelijk rimpels, pigmentvlekken en teleangiëctasieën. In de RS werden gestandaardiseerde driedimensionale foto's van het gelaat gemaakt. Twee artsen scoorden onafhankelijk 150 foto's op ernst van rimpels (hele gelaat, voorhoofd, kraaienvoetjes, neuslippenplooi en bovenlip), pigmentvlekken en teleangiëctasieën, handmatig met behulp van foto-numerieke schalen. Vervolgens werd het aangedane percentage huid digitaal gekwantificeerd. Geslachtsspecifieke optimalisatie van het systeem (N=50) en geblindeerde validatie met behulp van de foto-numerieke schalen (N=100) werd uitgevoerd voor elk huidverouderingskenmerk. De betrouwbaarheid tussen verschillende scorers ('inter-rater reliability') van de handmatige scores was voor alle huidverouderingskenmerken goed tot uitstekend (intra-klasse correlatiecoëfficiënt tussen 0,65 en 0,93). De vergelijking tussen de digitale en handmatige methode liet een uitstekende correlatie zien voor de meeste kenmerken ('Spearman's rho' correlatie coëfficiënten tussen 0,52 en 0,89; behalve voor de bovenlip rimpels in mannen ( $p=0,30$ )). Dit laat zien dat digitaal gekwantificeerde huidverouderingsmaten overeenkomen met traditionele handmatige maten en daarom bruikbaar lijken voor toekomstig onderzoek.

In **Hoofdstuk 3** onderzoeken wij geslachtsspecifieke determinanten voor rimpels in het gelaat, gebruikmakend van de digitaal gekwantificeerde uitkomstmaten. We includeerden gestandaardiseerde foto's van het gelaat van 3831 Noordwest-Europese deelnemers van de RS (51-98 jaar, 58% vrouw). De effectmaten van de multivariabele lineaire regressie worden gepresenteerd als het percentage verschil in gemiddeld rimpel oppervlak (% $\Delta$ ) per eenheid toe- of afname van een determinant; voor BMI bij mannen betreft dit -1,7% $\Delta$ . Dit houdt in dat per BMI punt hoger een man 1,7% minder rimpel oppervlak in het gelaat heeft. Rimpel oppervlak was overigens hoger bij mannen (mediaan 4,5%, interkwartielafstand [2,9-6,3]) dan bij vrouwen (mediaan 3,6%, interkwartielafstand [2,2-5,6]). Leeftijd was de sterkste determinant. Roken (mannen: 15,5% $\Delta$ ; vrouwen: 30,9% $\Delta$ ) en lager BMI (mannen: 1,7% $\Delta$ ; vrouwen: 1,8% $\Delta$ ) waren ook statistisch significant geassocieerd met toegenomen rimpels. Lichte huidskleur toonde een beschermend effect (mannen: -21,0% $\Delta$ ; vrouwen: -28,5% $\Delta$ ) en bij mannen was zonovergevoeligheid geassocieerd met minder rimpels. In de groep vrouwen waren laag opleidingsniveau en alcoholgebruik geassocieerd met meer rimpels, terwijl haarverlies volgens het vrouwelijk patroon en een hogere hoeveelheid androgenen (gemeten als vrije androgenen index) geassocieerd waren met minder rimpels. Concluderend hebben we in deze studie bekende determinanten voor rimpels bevestigd en nieuwe determinanten beschreven.

In **Hoofdstuk 4** zijn we op zoek gegaan naar genetische varianten geassocieerd met rimpels in het gelaat, gebruikmakend van de digitaal gekwantificeerde uitkomstmaten. We verrichtten een genomewijde associatie studie (GWAS, 'genome-wide association study') in 3513 Noordwest-Europese deelnemers van de RS (51-98 jaar). Replicatie analyses werden uitgevoerd in een onafhankelijk Nederlands cohort (Leiden LangLeven Studie; LLS, N=599), gebruikmakend van handmatig foto-numeriek gescoorde foto's. Voor de meest significante enkel nucleotide polymorfismen (SNP's, 'single-nucleotide polymorphisms'; varianten in het DNA) hebben we sensitiviteitsanalyses verricht om het effect van BMI, geslacht en locatie van rimpels (kraaienpootjes en rimpels t.p.v. van voorhoofd en in vrouwen bovenlip) te bepalen. Geen van de SNP's toonden een genoom-wijd significant effect in het RS cohort, noch in de sensitiviteitsanalyses. Desondanks toonde in een meta-analyse van de twee cohorten één SNP (rs10476781) een genoom-wijd significante associatie met rimpels in het gehele gelaat ( $P=2,19 \times 10^{-8}$ ). Deze SNP ligt tussen 2 genen in: het Neuromedin U Receptor 2 (*NMUR2*) gen en een non-eiwit-coderend RNA gen (*LINC01933*). *NMUR2* wordt tot expressie gebracht in het brein, wat suggereert dat het zenuwstelsel een rol zou kunnen spelen bij rimpels in het gelaat. Meer studies zijn echter nodig om deze bevindingen te valideren en de biologische relevantie te kunnen doorgronden.

In **Hoofdstuk 5** zijn we op zoek gegaan naar genetische varianten geassocieerd met pigmentvlekken, gebruikmakend van de digitaal gekwantificeerde uitkomstmaat. We verrichtten een GWAS in 2844 Noordwest-Europese deelnemers van de RS. Leeftijd, vrouwelijk geslacht en lichte huidskleur waren alle geassocieerd met meer pigmentvlekken. Het percentage aangedaan ge-



laatsoppervlakte (gemiddeld  $1,5\% \pm 0,9$ ) was significant geassocieerd met 3 genetische loci: *IRF4* (rs12203592,  $P=1,8 \times 10^{-27}$ ), *MC1R* (samengestelde heterozygositeits score,  $P=2,3 \times 10^{-24}$ ) en *RALY/ASIP* (rs6059655,  $P=1,9 \times 10^{-9}$ ). Bovendien werd na aanpassing voor deze top 3 geassocieerde loci een associatie met het *BNC2* locus ontdekt (rs62543565,  $P=2,3 \times 10^{-8}$ ). De associaties van deze vier loci werden succesvol gerepliceerd ( $P < 0,05$ ) in een onafhankelijk Nederlands cohort (LLS,  $N=599$ ). Hoewel de vier genen eerder een associatie met huidskleur en huidkanker risico hebben vertoond, bleven alle associaties sterk significant ( $P < 2 \times 10^{-8}$ ) na aanpassing voor huidskleur. Wij concluderen dat de genetische varianten in *IRF4*, *MC1R*, *RALY/ASIP* en *BNC2* bijdragen aan de verworven hoeveelheid pigmentvlekken in het gelaat gedurende veroudering, via mechanismen onafhankelijk van de basale melanine aanmaak.

In **Hoofdstuk 6** onderzoeken wij leefstijl en fysiologische determinanten geassocieerd met teleangiëctasieën in het gelaat, gebruikmakend van de digitaal gekwantificeerde uitkomstmaat. We includeerden gestandaardiseerde foto's van het gelaat van 2842 Noordwest-Europese deelnemers van de RS (51-98 jaar, 57% vrouw). De effectmaten van de multivariabele lineaire regressie worden gepresenteerd als het percentage verschil in gemiddeld teleangiëctasieën oppervlak (% $\Delta$ ) per eenheid toe- of afname van een determinant. Significante determinanten waren leeftijd, (1.7% $\Delta$  per jaar), vrouwelijk geslacht (18.3% $\Delta$ ), roken (huidig t.o.v. nooit 38.4% $\Delta$ ; vroeger t.o.v. nooit 11.6% $\Delta$ ), zonovergevoeligheid (10.2% $\Delta$ ) en lichte huidskleur (zeer licht t.o.v. olijfkleurig 31.4% $\Delta$ ; licht t.o.v. olijfkleurig 9.2% $\Delta$ ). In dit grote cohort onderzoek hebben we bekende determinanten voor teleangiëctasieën in het gelaat bevestigd en nieuwe determinanten beschreven.

In **Hoofdstuk 7** zijn we op zoek gegaan naar genetische varianten geassocieerd met geschatte leeftijd. Deze schatting werd gebaseerd op uiterlijke kenmerken in het gelaat op gestandaardiseerde foto's van 2693 Noordwest-Europese deelnemers van de RS (51-87 jaar). We verrichtten een GWAS van geschatte leeftijd, waarbij we meer dan acht miljoen SNP's analyseerden. De sterkste genetische associaties met geschatte leeftijd werden gevonden voor meerdere SNP's in het *MC1R* gen ( $P < 1 \times 10^{-7}$ ). Dit effect was versterkt voor een samengestelde heterozygositeits score, gecreëerd m.b.v. vier voorgeselecteerde functionele *MC1R* SNP's ( $P=2,69 \times 10^{-12}$ ). Dit werd gerepliceerd in een onafhankelijk Nederlands cohort (LLS,  $N=599$ ,  $P=0,042$ ) en in 1173 Europese deelnemers van de 'TwinsUK' studie ( $P=3 \times 10^{-3}$ ). Individuen met een homozygoot *MC1R* risico haplotype werden gemiddeld 2 jaar ouder geschat dan individuen die dit haplotype niet hadden. Deze associatie was onafhankelijk van leeftijd, geslacht, huidskleur, rimpels en pigmentvlekken. Het effect bleef significant onafhankelijk van verschillende maten van zon-expositie. Dit suggereert een rol voor *MC1R* in een jeugdig uiterlijk, onafhankelijk van zijn bekende functie in basale melanine aanmaak. Deze studie toont het eerste genetische bewijs dat verklaart waarom sommige mensen er ouder uitzien voor hun leeftijd. Verder biedt het aanknopingspunten voor het ontrafelen van de biologische basis van dit fenomeen.

In **Hoofdstuk 8** onderzoeken wij of er een causaal verband is tussen 25-hydroxyvitamine D en de verschillende huidverouderingskenmerken in een bidirectionele Mendeliaanse randomisatie studie. In de RS (N=3831; 58,2% vrouw, mediane leeftijd 66,5 jaar) en LLS (N=661; 50,5% vrouw, mediane leeftijd 63,1 jaar) werden huidverouderingskenmerken (rimpels, pigmentvlekken, geschatte leeftijd) digitaal dan wel handmatig gescoord o.b.v. gestandaardiseerde foto's van het gelaat. Associaties tussen 25-hydroxyvitamine D en huidverouderingskenmerken werden getest middels multivariabele lineaire regressie. Mendeliaanse randomisatie analyses werden uitgevoerd met SNP's die geïdentificeerd zijn uit eerdere genomwijde associatie studies. Na meta-analyse van de twee cohorten zagen wij dat een hoger serum 25-hydroxyvitamine D geassocieerd was met een hogere geschatte leeftijd ( $P=3,6 \times 10^{-7}$ ) en meer rimpels ( $P=2,6 \times 10^{-16}$ ), maar niet met meer pigmentvlekken ( $P=0,30$ ). Een genetisch vastgestelde 25-hydroxyvitamine D concentratie was daarentegen niet geassocieerd met de huidverouderingskenmerken ( $P>0,05$ ). Voorts was een genetisch vastgestelde hogere mate van pigmentvlekken niet geassocieerd met een hogere 25-hydroxyvitamine D concentratie ( $P>0,05$ ). Derhalve toonde onze studie niet aan dat de associaties tussen 25-hydroxyvitamine D en de huidverouderingskenmerken causaal waren.

In **Hoofdstuk 9** analyseren we de onderliggende fenotypische correlatie tussen zeven huidverouderingskenmerken: rimpels in het gehele gelaat, geschatte leeftijd, Griffiths' handmatige foto-numerieke huidverouderingsmaat, pigmentvlekken, teleangiëctasieën, actinische keratosen (AK) en keratinocyten huidkanker (KC, basaalcel- en plaveiselcelcarcinoom). Data over AK en KC werden verkregen middels volledig huidonderzoek en de andere kenmerken via gestandaardiseerde foto's van het gelaat. Wij onderzochten 1790 Noordwest-Europese deelnemers van de RS met complete onderzoeksgegevens. We verrichtten een hoofdcomponentenanalyse (PCA, 'principal component analysis') om de hoofdcomponenten (PC's, 'principal components') van de gezamenlijke variantie van de huidverouderingskenmerken te verkrijgen. We verrichtten tevens multivariabele lineaire regressie voor de verkregen PC scores en leeftijd, geslacht, BMI, roken en UV-blootstelling. We onderzochten ook de associaties tussen de hoofd PC scores en 140 SNP's die eerder geassocieerd werden met huidverouderingsfenotypes. Drie hoofd PC's verklaarden 73% van de totale variantie van de huidverouderingsfenotypes: een hypertrofische/rimpel component (PC1: rimpels in het gehele gelaat, geschatte leeftijd, Griffiths' handmatige foto-numerieke huidverouderingsmaat), een atrofische/huidskleur component (PC2: pigmentvlekken en teleangiëctasieën) en een cutane (pre-)maligniteit component (PC3: AK en KC). De associaties tussen leefstijl en fysiologische determinanten verschilden per PC. De sterkte van de SNP associaties verschilden ook per PC; de meeste SNP associaties werden gevonden in de atrofische component (bijv. *IRF4* SNP (rs12203592);  $P=1,84 \times 10^{-22}$ ). Concluderend identificeerden wij middels een hypothese-vrije benadering drie onderliggende basis fenotypes geassocieerd met huidveroudering. Associaties met de determinanten verschilden zoals verwacht in richting en sterkte per component.

**Hoofdstuk 10** geeft een algemeen overzicht weer van de belangrijkste bevindingen. Dit proefschrift laat zien dat huidveroudering een complex fenotype is. Er zijn vier verschillende huidverouderingskenmerken onderzocht, namelijk rimpels, pigmentvlekken, teleangiëctasieën en geschatte leeftijd. Daarbij zijn er voornamelijk continue digitale huidverouderingsmaten gebruikt aangezien dit objectieve en consistente uitkomsten biedt. Voor de verschillende huidverouderingskenmerken zijn bekende leefstijl en fysiologische determinanten bevestigd en nieuwe determinanten beschreven. De variërende associaties van lichte huidskleur met de verschillende huidverouderingskenmerken (minder rimpels, meer pigmentvlekken en meer teleangiëctasieën) bekrachtigen het concept dat verschillende huidtypes op verschillende manieren verouderen. Individuen met een lichte huid hebben de neiging om meer atrofische huidverouderingskenmerken te ontwikkelen (bijv. pigmentvlekken en teleangiëctasieën), terwijl individuen met een donkerdere huid meer hypertrofische kenmerken vertonen (bijv. rimpels). Dit wordt ook bevestigd door de hoofdcomponenten analyse. Met de GWAS voor rimpels, pigmentvlekken en geschatte leeftijd zijn er genetische varianten getoond met verschillende uitkomsten per kenmerk. Huidskleurgenen zijn geassocieerd met pigmentvlekken en geschatte leeftijd, maar verrassend genoeg niet met rimpels. Dit benadrukt de hypothese dat de verschillende huidverouderingskenmerken een verschillende genetische opmaak hebben; daarbij lijkt die van rimpels complexer. Voorts heb ik een visie op toekomstig huidverouderingsonderzoek gepresenteerd.