



# A TALE OF TWO NETWORKS

Foto: Gustavo Fring via Pexels

De modieuze term *network medicine* refereert aan het gebruik van netwerken binnen de medische wetenschappen. Het gebruik van netwerken binnen dit domein staat nog in de kinderschoenen. Deels vanwege de wellicht terechte terughoudendheid van de medische wereld, deels omdat er weinig of geen netwerk-equivalenten bestaan van de statistische methodologie om de geëigende vragen uit dit veld te beantwoorden. Er is geen standaardtechniek, zoals de t-toets, die binnen de twee-steekproevencontext verschillen tussen netwerken identificeert. Hier volgt een tussentijdse rapportage van onze zoektocht naar zulke technieken, de voorlopige vruchten daarvan, en onze ervaringen met de toepassing van deze vruchten binnen het Amsterdam UMC.

WESSEL N. VAN WIERINGEN

De wetenschap is lang gedomineerd door de reductionistische werkwijze. Een aanpak die het geheel opdeelt en de delen apart bestudeert. Die aanpak heeft veel gebracht, maar kent beperkingen. De systeemaanpak poogt die beperkingen te omzeilen door de delen in hun totaliteit en samenhang te bestuderen. Deze aanpak heeft geleid tot nieuwe wetenschappelijke disciplines zoals systeembiologie die onder meer de complexe interacties binnen een biologische systeem als de cel poogt te doorgronden. Eerlijkheid gebiedt te vermelden dat binnen de systeembiologie omwille van de hanteerbaarheid vaak ingezoomd wordt op een *pathway*, een module binnen het regulatoire netwerk van de cel, die een specifieke functie vervult.

Een belangrijk ingrediënt van de systeemaanpak is de overdrachtelijk aantrekkelijke representatie van een systeem als een netwerk (zie figuur 1 voor een voorbeeld), dat in een oogopslag overzicht over een complex fenomeen verschaft. Een netwerk is een collectie punten die met lijnen verbonden zijn. De punten corresponderen

met de elementen van het systeem en de lijnen met hun interacties. Binnen de context van de cel representeren de element moleculen, bijvoorbeeld mRNAs, proteïnen, of metabolieten. Een interactie zou dan het aangaan van een chemische verbinding kunnen voorstellen.

Het netwerk is vaak onbekend en dient met behulp van beschikbare informatie gereconstrueerd te worden. Dat vergt een model dat netwerk en data koppelt. Dit wordt onder andere geboden door het Gaussische grafische model. Dit model veronderstelt dat de data een multivariate normale verdeling volgen, waarbij de covariantiematrix geparametriseerd wordt door zijn inverse, i.e. de precisie-matrix. Toegepast op de cel beschrijft het model de stochastische activiteit in statistische toestand van een verzameling moleculen waarbij hun interacties geoperationaliseerd zijn als paarsgewijze conditionele onafhankelijkheden. Het voordeel van voornoemde parameterisatie is dat een nul in de precisie-matrix onafhankelijkheid tussen het corresponderende random variabe-

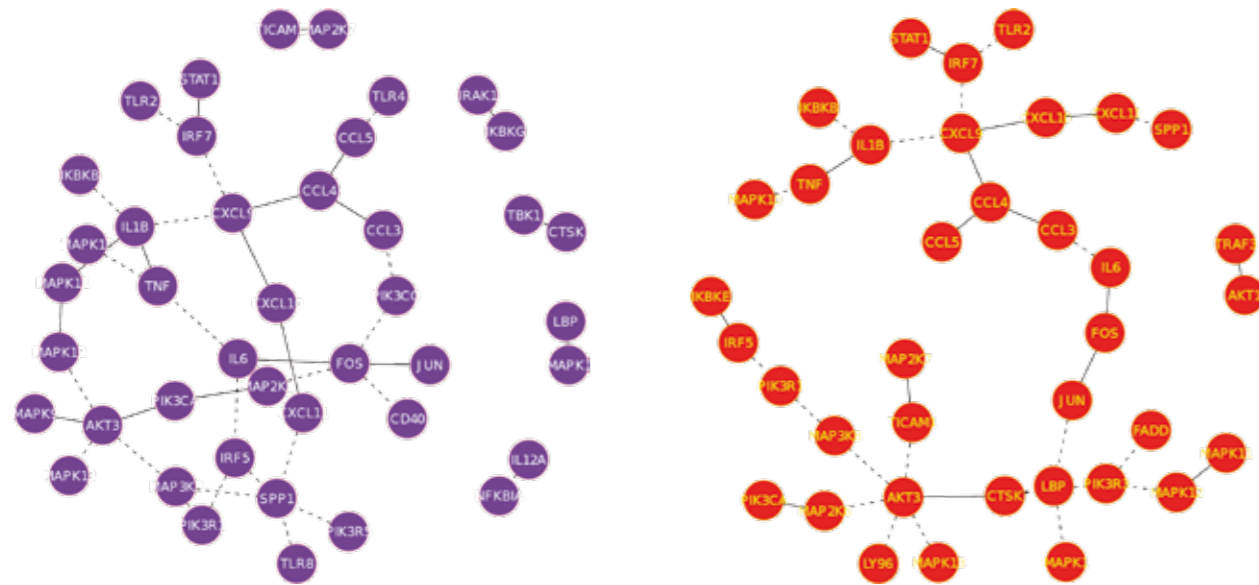
lenpaar, conditioneel op alle andere random variabelen in het model, impliceert. Dit is ook direct de link met het netwerk: twee punten, die de random variabelen geassocieerd met twee moleculen representeren, zijn niet/wel met een lijn-verbonden als zij conditioneel on/afhankelijk zijn. Met een statistisch model in de hand en data voorhanden kan het netwerk gereconstrueerd worden middels het schatten van de precisie-matrix. De geschatte precisie-matrix wordt gestandaardiseerd ten einde de partiële correlatiematrix, de matrix met paarsgewijze conditionele correlaties, te verkrijgen, op basis waarvan bepaald wordt welke elementen al dan niet gelijk aan nul zijn.

Medische onderzoekers raken gecharmeerd van een mooie netwerkvisualisatie, zeker als die op basis van hun data gegenereerd is. Die roze wolk drijft echter snel over als ze de praktische betekenis ervan proberen te duiden. Bijvoorbeeld omdat het gepresenteerde netwerk amper rijmt met de mentale voorstelling die de medische onderzoeker op basis van literatuur en ervaring zich ervan ge-

vormd had. Of, omdat de onderzoeker de vertaling naar de kliniek probeert te maken en één enkel netwerk geen inzicht in de verschillen tussen gezonde cel en kankercel met betrekking tot hun moleculaire interacties geeft, welke mogelijke aanknopingspunten voor een nieuwe behandeling zouden kunnen zijn. Panklare en uitgekristalliseerde methodologie voor het reconstrueren van meerdere netwerken gezamenlijk en/of hun contrast is nog niet breed gezaaid. Hieronder een schets van hoe wij daar tot nu toe een beginnend handvat aan hebben gegeven.

## Regularisatie

Data zijn binnen de medische context een schaars goed. Vaak zijn data van een beperkt aantal individuen beschikbaar, terwijl het aantal betrokken random variabelen van dezelfde orde – zo niet groter – is. Ter illustratie, het aantal kankerpatiënten met hetzelfde tumortype binnen het



Figuur 1. Gereconstrueerde netwerken van de 'toll-like receptor' pathway voor de kanker- (links, paarse punten) en metastasecel (rechts, rode punten). De gestreepte en doorgaande verbindingen representeren negatieve en positieve partiële correlaties

Amsterdam UMC, dat toestemming voor wetenschappelijk onderzoek met hun weefsel verleent, is in de orde van honderd, terwijl het aantal moleculen in de cel – in principe – vele malen groter is. Dit vertaalt naar netwerkconstructie zijn aanpassingen van de traditionele methoden geboden, bijvoorbeeld door regularisatie van de maximum likelihood-schatter van de precisiematrix. De twee dominante regularisatiesmaken zijn de  $l_1$ - en  $l_2$ -regularisatie, respectievelijk 'lasso'- en 'ridge'-regularisatie genaamd (zie Friedman et al., 2008; van Wieringen et al., 2016). De regularisatie behelst het toevoegen van een met een regularisatieparameter geschaalde som van de absolute waarde (lasso) of het kwadraat (ridge) van het element van de precisiematrix aan de loglikelihood-functie. De geregulariseerde schatter is vervolgens het argument dat maximalisatie van het geheel realiseert. De lasso-regularisatie is geliefd om zijn selectievermogen. Voor voldoende grote waarden van de voornoemde regularisatieparameter bevat de corresponderende schatting van de precisiematrix nul elementen. De facto selecteert de lassoregularisatie welke conditionele afhankelijkheden door de data onderbouwd worden. Dat is een aantrekkelijke en praktische eigenschap. Met een beperkte steekproefgrootte resulteert lasso-regularisatie echter vaak in een leeg netwerk. Ook kent de evaluatie van de lasso-schatter convergentieproblemen als de precisiematrix een te groot aantal niet-nul elementen herbergt. Ridge-regularisatie mag dan geen ingebouwde selectie kennen, er is wel een analytische uitdrukking voor de schatter beschikbaar. Hoewel een wiskundige toevalligheid, het heeft praktische waarde: geen convergentieproblemen. Belangrijker is dat post-hoc selectie op basis van

de  $l_2$ -geregulariseerde schatter, bijvoorbeeld met behulp van een probabilistisch gemotiveerd afkappunt, zelden onderdoet voor die van de lasso-tegenhanger. Tevens is de fit van de ridge-schatter vaak beter. In het vervolg beperken we ons derhalve tot de ridge-regularisatie, maar een lasso-variant is nooit ver weg.

Om tot een schatter te komen moet er een keuze voor de regularisatieparameter gemaakt worden. Deze wordt gekozen op basis van data, bijvoorbeeld middels een kruisvalidatieprocedure. Zo'n procedure kiest de waarde voor de regularisatieparameter die resulteert in de beste predictie op nieuwe data. Nieuwe data zijn echter niet altijd voorhanden. In dat geval wordt een deel van de beschikbare data apart gezet om de rol van 'nieuwe' data te vervullen. De schatter, voor een gegeven waarde voor de regularisatieparameter, wordt dan bepaald op basis van alle behalve de 'nieuwe data' en het met de schatter geassocieerde predictief vermogen wordt vervolgens geëvalueerd op de 'nieuwe' data. Vaak worden op deze wijze meermaals 'nieuwe' data gegenereerd om de afhankelijkheid van het toeval in de vorming van de oorspronkelijke 'nieuwe' data te reduceren. Het predictief vermogen wordt gemiddeld over alle versies van de 'nieuwe' data. Dit predictief vermogen is dan bepalend voor de optimale regularisatieparameter.

### Voorkennis

Als een medische onderzoeker een netwerk gepresenteerd wordt dat is gereconstrueerd op eigen data, is zijn of haar eerste reactie wellicht dat het niet – of in ieder geval niet volledig – overeenkomt met de netwerken die eerder in

de literatuur gerapporteerd zijn. Deels komt dat omdat de eigen data niet van een studie met identieke opzet afkomstig zijn: de populatie, de meetmethode, en de laboratoriumomstandigheden kunnen verschillen. Hoog-dimensionaal speelt steekproefvariatie ook een grote rol. Tevens zijn de in de literatuur aanwezige netwerken vaak op andere wijze, bijvoorbeeld met behulp van *text-mining*, gereconstrueerd. Hoewel deze excuses gerechtvaardigd zijn, gaan ze voorbij aan het impliciete punt van de medische onderzoeker, namelijk dat het terrein van moleculaire netwerken geen tabula rasa is. Zij dienen dan ook niet de novo gereconstrueerd te worden maar gebruik te maken van de reeds beschikbare kennis – hoe vaag en onbetrouwbaar ook – omtrent deze netwerken. Beschikbare kennis is beschikbaar middels literatuur maar ook als publiek beschikbare data van studies naar hetzelfde (of een vergelijkbaar) systeem in soortgelijke omstandigheden.

Voorkennis kan behulpzaam zijn bij het leren van een Gaussisch grafische model (van Wieringen, 2019). Voorkennis kan kwalitatief en kwantitatief zijn. Kwalitatieve voorkennis betreft informatie omtrent de topologische eigenschappen van het netwerk. Bijvoorbeeld de aanwezigheid of afwezigheid van een verbinding, of een globale kettingstructuur. Kwantitatieve voorkennis komt in de vorm van een suggestie van (een deel van) de precisiematrix. Zo'n suggestie kan een schatting van de precisiematrix uit een in-house pilot-studie of uit publieke data van gerelateerde studies beschikbaar via online databases, zijn. De relevantie van deze voorkennis voor de parameters van het Gaussisch grafische model voor de voorhanden zijnde data is niet bekend. Derhalve incorporeren we de voorkennis niet expliciet in het model, maar indirect via regularisatie van de schatter. Daartoe is de regularisatie-term nu de som van het kwadraat van de elementen van het verschil van de precisiematrix en de suggestie, waarbij – in de meest algemene vorm – elk uniek kwadraat met een eigen regularisatieparameter geschaald wordt. Duidelijk moge zijn dat voor grote waarden van één van de regularisatieparameters het corresponderende element van de precisiematrixschatting een weinig verschilt van dat van de suggestie. In het bijzonder, is het corresponderende element van de suggestie gelijk aan nul, dan resulteert een hele grote waarde van de regularisatieparameter in een nul-element van de precisiematrixschatting. Op deze wijze kan voorkennis omtrent afwezige verbindingen geïncorporeerd worden. Natuurlijk is het ondoenlijk om voor elke parameter een regularisatieparameter te selecteren. Een oplossing hiervoor is om een laag-dimensionale parametrisatie van de regularisatieparameters te kiezen. Bijvoorbeeld, als vermoed wordt dat het netwerk

een kettingstructuur heeft, zou men de elementsgewijze regularisatieparameter van de vorm  $\lambda^\alpha$  met  $\lambda > 0$  en  $\alpha$  gelijk aan de afstand van het element tot de diagonaal van de precisiematrix kunnen kiezen, teneinde een schatting met een gestreepte structuur – welk met een kettingstructuur correspondeert – te stimuleren.

Veel kankeronderzoek richt zich op vroege detectie van de ziekte, omdat dan het aantal behandelingsmogelijkheden het grootst is en de overlevingskans het hoogst. Dit heeft tot gevolg dat kanker vaak voor het uitzaaï opgespoord is. Het gevolg daarvan is dat moleculaire informatie afkomstig van uitzaaïingen schaars is. Maar, omdat kanker een voorloperstadium van de uitzaaïing is, zal het moleculaire netwerk in de uitgezaaide cel niet totaal van dat van de kankercel verschillen, ook al muteert de kankercel gestaag verder. Ergo, een schatting van het/de netwerk/precisiematrix in de laatste, die doorgaans op een grotere steekproef gebaseerd is, kan als voorkennis voor de reconstructie van dat in/van de eerste dienen. Dit principe passen we toe in de reconstructie van het netwerk van de *toll-like receptor-pathway*, welk bijdraagt aan het uitzaaïen van de kankercel. Figuur 1 toont de aldus gereconstrueerde kanker- en metastase-netwerken. De netwerken kennen overeenkomstige verbindingen maar ook enkele verschillen. Reconstructie zonder suggestie resulteert in twee netwerken met schamele overeenkomsten, en wordt – hoewel de waarheid onbekend is – vanwege deze ongerijmdheid door de medische onderzoeker als minder plausibel gezien. Daarnaast is het geruststellend dat de reconstructie van figuur 1 een systeembioologisch principe reflecteert. In tegenstelling tot het kanker-netwerk bevat het metastase-netwerk geen cycli. Dit wijst mogelijk op de eliminatie van feedback-loops, iets dat geassocieerd wordt met verminderde controle, kenmerkend voor de evolutie van de kankercel.

### Fusie

Een veel voorkomende vraag in medische context is het in een bepaald opzicht vergelijken van twee (of meerdere) groepen, bijvoorbeeld de subtypes van de ziekte DLBCL, een bepaalde vorm van bloedkanker. Zo'n vergelijk geschiedt doorgaans op basis van data afkomstig van een observationele studie waarin de betrokken individuen ongerelateerd zijn. Statistisch gezien is dit een meervoudige onafhankelijk steekproefprobleem, nu voor netwerken. Niet gehinderd door enige biologische voorkennis kan men veronderstellen dat binnen elk subtype de data gegenereerd zijn door een ander Gaussisch graphisch mo-

del. De precisiematrixen worden dan per subtype apart geschat. Deze schattingen vormen vervolgens de basis voor de reconstructie van de subtype-specifieke netwerken.

Wat niet weet, dat niet deert. Maar wellicht geven de data meer prijs als enige biologische kennis meegenomen wordt. Bijvoorbeeld dat de cellen van subtypes van een bepaalde kanker dezelfde origine kennen, nl. de gezonde cel van het betreffende weefsel. Vanuit die cel zijn de cellen van de verschillende subtypes geëvolueerd. Deze gezamenlijke oorsprong suggereert dat de regulatoire netwerken van de tot subtype geëvolueerde cellen mogelijk nog enige overeenkomst kennen. Met die kennis in het achterhoofd doet het simpelweg schatten van een precisiematrix per subtype mogelijk niet voldoende recht aan de biologie. De precieze relatie tussen de cel-specifieke netwerken is echter onbekend en kan derhalve niet expliciet gemodelleerd worden. Mogelijke overeenkomsten moeten dan op een meer heuristische wijze gevangen worden. Dit doen we door de gereguleerde log-likelihoodfunctie van een additionele regularisatie-term te voorzien. We gebruiken hiervoor een zgn. fusie-regularisatieterm (Bilgrau et al., 2020). Deze wordt wederom gevormd door een regularisatieparameter geschaalde som van het gekwadraterde elementsgewijze verschil tussen de groepspecifieke precisiematrixen. Voor grote waarden van de regularisatieparameter forceert fusie-regularisatie de schattingen van de precisiematrixen naar elkaar toe, terwijl voor kleine waarden deze schattingen vrij (voor zover niet ingeperkt door de reguliere, i.e. subtype-specifieke regularisatie) gekozen kunnen worden. Daar de regularisatieparameters met behulp van data geleerd worden, bepalen de data in hoeverre er gefuseerd wordt en daarmee of de schattingen van de verschillende precisiematrixen op elkaar lijken. Op deze wijze hebben de data uit de ene groep dus invloed op de schatting van de precisiematrix in de andere groep. Fusie-regularisatie biedt dus de mogelijkheid om informatie te 'lenen' tussen de subtypes.

Terug naar DLBCL. De ziekte kent drie subtypes, ABC, GCB en Type III, waarvan de laatste eerder tussen de twee andere inhangt dan dat het een op zichzelf staand homogeen subtype vormt. De ABC- en GCB-subtypes hebben een duidelijk verschillende klinische prognose. De vraag is of dit een moleculaire grond heeft. Zo ja, dan uit zich dat mogelijk in hun cellulaire netwerken, hetgeen een aanknopingspunt voor de ontwikkeling van effectievere behandelingen biedt. Met behulp van de fusie-regularisatie methode hebben we per subtype een Gaussisch grafische model uit gen-expressie/activiteit data afkomstig

van DLBCL patiënten geschat. Hierin kiezen we ervoor om enkel een fusie-regularisatieparameter voor het verschil tussen ABC en GCB enerzijds en Type III anderzijds te gebruiken. De schatting van de precisiematrixen geassocieerd met de ABC- en GCB-subtypes kunnen dus enkel gelijk zijn als zij ook gelijk aan die van Type III zijn. De gekruisvalideerde fusie-regularisatieparameter is klein (t.o.v. van de subtype-specifieke regularisatieparameters) maar wel degelijk ongelijk van nul, i.e. de data van het ene subtype worden relevantie voor de precisiematrixschatting van het andere toegekend. Door een pragmatische post-hoc selectieprocedure worden vervolgens uit de schattingen van de precisiematrixen de netwerken verkregen. De gereconstrueerde netwerken van de ABC- en GCB-subtypes laten differentiële submodules zien, welke reeds bekende moleculaire interacties bevatten, en mogelijke clous voor de verschillende prognose tussen de subtypes vormen.

### Activatie

Het meervoudig steekproefprobleem resulteert in een lijst van elementen/verbindingen van de precisiematrix/netwerk die verschillend zijn tussen de subtypes. Hoewel ze charmant zijn vanwege hun netwerkperspectief, zijn de items uit deze lijst vaak weinig tastbaar voor medische onderzoekers. Voor hen is een conditionele (on)afhankelijkheid een lastig concept. Medische onderzoekers interpreteren de lijst doorgaans vanuit hun kennis over één van de twee moleculen, kennis die meestal gebaseerd is op marginale informatie omtrent hun (paarsgewijze) verdeling. Een additionele complicatie is dat er veel meer mogelijke verbindingen dan punten in een netwerk zijn. Als de voornoemde lijst lang is, verliest men door de veelheid aan (differentiële) verbindingen al snel zicht op het netwerk. Een probleem van een andere orde met de gevonden differentiële conditionele onafhankelijkheid is haar reproduceerbaarheid. Een gevonden verschil in de locatie van de activiteit van een molecuul laat zich met regelmaat niet valideren in het laboratorium, voor een differentiële conditionele relatie blijkt dit problematischer.

Bovenstaande problemen met de resultaten van de differentiële netwerkanalyse kunnen deels omzeild worden door de verbindingen/conditionele onafhankelijkheden niet op individueel maar op een geaggregeerd niveau te bestuderen (van Wieringen et al., 2018). Men doet dan derhalve eerder een uitspraak over het 'systeem' in plaats van over de delen. Zo betreft de overkoepelde vraag van medische onderzoekers niet de interactie tussen twee

moleculen, maar eerder of het pathway – waar het molecuulenkoppel, met vele anderen, deel van uit maakt – geactiveerd dan wel uitgeschakeld is. In extremis kan een uitgeschakeld pathway als een leeg netwerk, i.e. een netwerk zonder verbindingen, geportretteerd worden, terwijl een actief pathway juist verbindingen kent. De praktijk is eerder een grijsschaal tussen die twee uitersten, met een laag pitje, hoog vuur, en alles er tussenin. Anderzijds, vele moleculen zijn betrokken bij meerdere pathways, sommige actief en andere inactief. Het gereconstrueerde netwerk van een inactief pathway kan dus wel degelijk enige verbindingen vertonen. Ten einde een verzwakt/versterkt netwerk te detecteren hebben we het twee-steekproevenprobleem voor netwerken als volgt aangepast. We concentreren ons op de specifieke situatie waarin de partiële correlaties, dat wil zeggen de maat van de sterkte van de netwerkverbindingen, in een van de groepen in absolute zin systematisch kleiner/groter zijn. Systematisch zwakkere/sterkere partiële correlaties vertegenwoordigen biologisch een inactief/actief pathway. Om dit te modelleren wordt in elke groep wederom een Gaussisch graphisch model verondersteld, maar hun partiële correlaties zijn proportioneel en verschillen door een multiplicatieve factor, welke gemeenschappelijk is voor alle partiële correlaties. De factor reflecteert het algehele relatieve verschil in de sterkte van de conditionele afhankelijkheden tussen de groepen. De facto, delen de twee groepen dezelfde (gestandaardiseerde) precisiematrix op een multiplicatieve factor na. De modelparameters worden (deels) weer op gereguleerde wijze geschat. Een geschatte waarde van de factor ongelijk aan nul representeert dan een activiteitsverschil in de pathway tussen de twee groepen, wat door een permutatietoets formeel geëvalueerd kan worden. De methodologie is aangewend om een 'cellijn'-vondst in data afkomstig van de minder gecontroleerde omgeving van het menselijk lichaam te valideren. De cellijnstudie heeft aangetoond dat de Hedgehog signaleringspathway, verantwoordelijk voor cellulaire differentiatie, in prostaatkanker geactiveerd is. Data afkomstig van zes studies, die de genactiviteit in normaal en kanker-prostaatweefsel vergelijken, zijn gebruikt om te verifiëren of dit activiteitsverschil zich ook in vivo voordoet. Vier van de zes studies bevestigen dit middels een factor die significant van nul verschilt, één studie wijst in dezelfde richting maar haalt het significantieniveau niet, en de laatste vertoont geen enkel verschil (de factor wordt zelfs als nul geschat). Voor diagnostische doeleinde zijn vervolgens de ongerelateerde precisiematrixen van beide groepen met de gepresenteerde fusie-gereguleerde methode geschat. Op basis hiervan is de proportionali-

teitsaannname op relatie van de partiële correlaties tussen beide groepen geëvalueerd en in de meeste datasets onproblematisch gebleken. Tevens faciliteren deze schattingen het opsporen van de verbindingen met de grootste verschillen in sterkte om zo het activiteitsverschil verder te ontleden.

### Conclusie

Het bovenstaande illustreert de vruchtbare wisselwerking tussen twee disciplines. De vragen en het commentaar van medische onderzoekers op gepresenteerde netwerkresultaten inspireren nieuw methodologisch onderzoek naar netwerk-methodes. De toepassing van de nieuwe methodes op medische data genereert nieuwe resultaten, welke weer nieuwe vragen van de medische onderzoekers oproepen, die enkel beantwoord kunnen worden met nieuwe statistiek, enzovoort. Inderdaad is er nog veel werk te verzetten. Zo beperkt het bovenstaande zich tot het Gaussische domein. Anderzijds, kunnen de data van een studie met longitudinale opzet afkomstig zijn, hetgeen afhankelijkheden tussen de observaties introduceert. Het bovenstaande concentreert zich op modelleren en schatten. Een goed paradigma voor hypothese toetsen binnen de netwerkcontext, waarbij medische vragen leidend zijn voor de relevante hypothesen, is echter ook onontbeerlijk. Kortom, wordt vervolgd.

### LITERATUUR

- Bilgrau, A. E., Peeters, C. F., Eriksen, P. S., Bogsted, M., & van Wieringen, W. N. (2020). Targeted fused ridge estimation of inverse covariance matrices from multiple high-dimensional data classes. *Journal of Machine Learning Research*, 21(26), 1–52.
- Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2008). Sparse inverse covariance estimation with the graphical lasso. *Biostatistics*, 9(3), 432–441.
- van Wieringen, W. N. (2019). The generalized ridge estimator of the inverse covariance matrix. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 28(4), 932–942.
- van Wieringen, W. N., & Peeters, C. F. W. (2016). Ridge estimation of the inverse covariance matrix from high-dimensional data. *Computational Statistics and Data Analysis*, 103, 284–303.
- van Wieringen, W. N., Peeters, C. F. W., de Menezes, R. X., & van de Wiel, M. A. (2018). Testing for pathway (in)activation by using Gaussian graphical models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 67, 1419–1436.

WESSEL N. VAN WIERINGEN werkt als universitair hoofddocent bij de afdeling Epidemiologie en Data Science van het Public Health research institute van het Amsterdam UMC, en de afdeling Wiskunde van de Vrije Universiteit Amsterdam. E-mail: w.n.van.wieringen@vu.nl