

Epigenetisk påvirkning af fosterets udvikling

Ida Donkin¹, Romain Barrès¹ & Anja Pinborg²

STATUSARTIKEL

1) The Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Sundhedsvidenskabeligt Fakultet, Københavns Universitet
2) Gynækologisk/Obstetrisk Afdeling, Hvidovre Hospital

Ugeskr Læger
2016;178:V02160132

Fosterudviklingen er i de første dage af den embryonale periode særlig sensitiv over for ændringer i epigenetikken. Begrebet epigenetik dækker over molekylære forandringer, der finder sted omkring DNA'et og etableres og ændres som respons på omgivelserne, hvorved ekspresionen af de omkringliggende gener styres. Epigenetikken er således en af forklaringerne på, at klimagene kan differentiere ud til forskellige celletyper, trods cellernes ensartede genom og omgivende miljø, og de epigenetiske faktorer menes at spille en betydelig rolle, især i udvikling af kræft og livsstilssygdomme. Det er stadig uvist, om epigenetikken overføres fra sædcellen under befrugtningen og således er arvelig, og om faderens livsstil derigennem kan påvirke fosterets udvikling. In vitro-fertilisering (IVF) kan bruges som model til undersøgelse af epigenetikken rolle og karakter under den tidlige embryonale udvikling, hvilket kan gøre os klogere på, om fænomenet epigenetisk arvelighed finder sted hos mennesker. Hos nogle børn, der er født efter assisteret reproduktionsteknologi (ART), herunder IVF, ses der lav fødselsvægt, og undersøgelser af epigenetikken etablering i den embryonale periode kan hjælpe os til at forstå årsagsmekanismerne hertil. I denne artikel præsenteres en introduktion til den hidtidige forskning i fænomenet epigenetisk arvelighed og en præsentation af epigenetikken mulige rolle ved påvirkningen af børn, der er født efter ART.

EPIGENETIKKEN PÅVIRKES AF LIVSSTILSFAKTORER

Epigenetik er arvelige, men reversible forandringer i vores celler, der kan regulere og kontrollere, hvordan vores gener udtrykkes – uden at baseparrene i vores DNA ændres. De tre primære klasser af epigenetiske

faktorer er: 1) DNA-metylering, 2) små ikkekodende RNA-stykker og 3) histonmodificeringer, som alle har det til fælles, at de ændrer karakter efter vores livsstil og miljøet omkring os (**Figur 1**). DNA-metylering kan regulere genekspressionen ved enten at blokere for eller tiltrække transkriptionsfaktorerne til DNA'ets basepar. Modificeringer (f.eks. fosforylering, metylering og acetylering) af histonernes haler kan også påvirke transkriptionen direkte, og modificeringerne kan endvidere påvirke foldningen af DNA'et og derigennem ændre dets tredimensionelle struktur samt remodellere og relokalisere kromatinet. Ikkekodende RNA'er er RNA-molekyler, der ikke translateres til proteiner. I stedet kan de påvirke genekspressionen på flere niveauer – såvel transkriptionelt som posttranskriptionelt. Ud over de nævnte findes der adskillige andre molekyler og strukturer, som under betegnelsen »epigenetiske faktorer« regulerer genekspressionen på mangfoldige og oftest særdeles komplekse måder. De tre ovennævnte er dog de bedst beskrevne, selvom der næsten dagligt fremkommer nye aspekter af deres funktioner.

Eftersom alle vores celler i kroppen har samme DNA, er det bl.a. epigenetikken signaler, der er afgørende for differentieringen af de forskellige stamceller til de enkelte vævs- og cellefunktioner. Ligeså under den embryonale udvikling, hvor de epigenetiske faktorer spiller en særdeles vigtig rolle i dannelsen af embryonets enkelte væv [1]. Indtil for ganske nylig troede man, at eventuelle epigenetiske faktorer, der er etableret i gameterne som respons på vores livsstil og vores omgivende miljø, ville blive fjernet fra cellekernen inden gameternes fulde modning. De sidste par år er der dog fremkommet adskillige studier, der sandsynliggør, at størstedelen af de epigenetiske faktorer – i hvert fald for sædcellernes vedkommende – forbliver intakte gennem de sidste stadier af modningen, fertiliseringen og embryonets udvikling [2-4].

Der er efterhånden konsensus om, at epigenetikken har en primær rolle i forklaringen af samspillet mellem miljø og genetik i ætiologien af flere sygdomme. Særligt vedr. psykiatriske lidelser og kræft er det påvist, at epigenetikken er en stor del af patofysiologien, og i Danmark benyttes metyleringshæmmeren azacitidin til behandlingen af bl.a. myelodysplastisk syndrom og akut myeloid leukæmi. Indtil for nylig troede man, at epigenetik bestod af permanente forandringer i vores celler, men ny forskning viser, at de epigenetiske faktorer er særdeles dynamiske af karakter. En enkelt kort-

HOVEDBUDSKABER

- ▶ Sædcellers epigenetiske faktorer påvirkes af livsstil og det omgivende miljø. Man har mistanke om, at faktorerne kan arves ved befrugtning og derigennem påvirke fosterets udvikling.
- ▶ Det er uvist, om den øgede sygdomsrisiko hos børn, der er født efter in vitro-fertilisering (IVF), skyldes selve behandlingerne eller forældrenes subfertilitet.
- ▶ Epigenetikken rolle for fosterudviklingen belyses, og den nuværende forskning i fænomenet epigenetisk arvelighed beskrives.
- ▶ Mulige årsager til den let øgede sygdomsrisiko hos børn, der er født efter IVF, gennemgås med særligt fokus på epigenetikken rolle.
- ▶ Kortlægning af mulige epigenetiske påvirkninger af fosteret under IVF kan lede til optimerede protokoller, således at sygdomsrisici hos de pågældende børn mindskes.

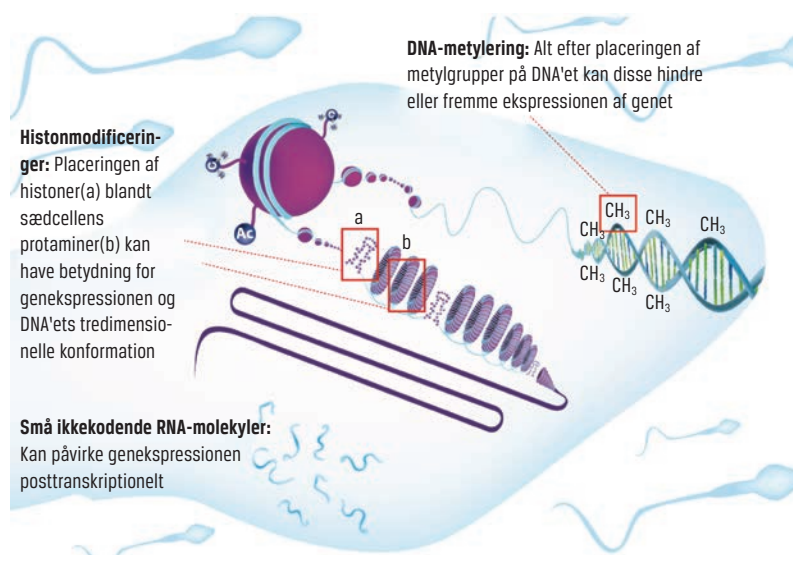
varig træningssession ændrer således DNA-metyleringen af specifikke gener i muskelcellerne allerede efter minutter, med efterfølgende ændringer i genekspressionen [5]. Dette fund var med til at åbne op for hypotesen om, at vi gennem ændringer i vores livsstil, f.eks. kost og motionsvaner, kan påvirke den epigenetiske signatur, vi sender videre til vores børn gennem vores gameter. I et nyligt publiceret studie fandt man, at overvægtige mænd har en anden epigenetisk profil i sædcellerne end normalvægtige mænd. Ved at undersøge sædceller fra overvægtige mænd, der ventede på en planlagt Roux-en-Y-gastrisk bypass-operation på Hvidovre Hospital, påviste man, at vægttabet efter operationen aktivt påvirkede DNA-metyleringen i sædcellerne [6]. Ændringerne i DNA-metyleringen var især relateret til gener, der indgik i udviklingen af det centrale nervesystem, og lokaliseret omkring genetiske varianter, der var associeret til fedme.

EPIGENETISK ARVELIGHED

Gennem de seneste år er forskningen i såkaldt epigenetisk arvelighed – det fænomen, at epigenetikken overføres fra den ene generation til den næste – i særdeleshed revolutioneret. Indtil for ganske nyligt var hypotesen om arveligheden af erhvervede egenskaber (en teori, der oprindeligt blev fremsat af den franske evolutionsteoretiker Jean-Baptiste Lamarck, 1744-1829) primært baseret på fund fra epidemiologiske studier, hvor bedsteforældrenes ernæringstilstand før graviditeten sås at påvirke børnebørnenes dødelighed og risiko for sygdomme [7, 8]. De seneste par år har dyrestudier dog resulteret i egentlige forklaringsmodeller på, hvordan miljøet omkring den ene generation kan påvirke sygdomsrisikoen hos de følgende. Hos hanrotter, der fedes op med fedtholdig kost i ugerne op til parring (generation F0), vil der ikke kun ske ændring af DNA-metyleringen og ekspresionen af de små ikke-kodende RNA'er i sædcellerne. Deres rotteunger (generation F1) vil også have en lavere fødselsvægt og et ændret betacelleareal i pancreas og vil senere hen udvikle en ændret glukose- og lipidmetabolisme [9, 10]. Særligt interessant er det, at de epigenetiske faktorer i rotteungernes (F1) sædceller også påvirkes, og at den metaboliske fænotype forbliver ændret i den følgende generation (F2). Injicerer man ikkekodende RNA, der er isoleret fra overvægtige hanmus' sædceller ind i en *wild type*-blastocyst (befrugtet æg fem dage efter fertilisering), vil museungerne ligeså få metaboliske forstyrrelser [11, 12]. Den herskende hypotese på feltet er således, at der som respons på mandens livsstil og omgivende miljø etableres forskellige epigenetiske faktorer i sædcellerne, som overføres ved fertilisering for derigennem at påvirke de(n) følgende generation(er)s fænotype. Fænomenet epigenetisk arvelighed er dog endnu ikke påvist hos mennesker, og de nævnte stu-

FIGUR 1

De tre primære klasser af epigenetiske faktorer.



dier, hvor man undersøgte epigenetiske faktorer i sædceller hos overvægtige og normalvægtige mænd udført i samarbejde mellem Københavns Universitet og flere af hovedstadens sygehuse, er således et af de første studier med mennesker, hvor man har påvist, at vi aktivt kan ændre den signatur, vi overfører til vores børn – og derigennem sandsynligvis påvirke vores børns udvikling og risiko for sygdom. Hvis vores diæt som vorde forældre kan påvirke epigenetikken i vores gameter og derigennem ændre fosterets udvikling, kan det forklare, hvorfor børn af overvægtige mænd har en større risiko for selv at blive overvægtige, uafhængigt af moderens kropsvægt [13].

PÅVIRKNING AF BØRN FØDT VED ASSISTERET REPRODUKTION

15-20% af alle par oplever problemer med infertilitet, og ca. 5.000 børn – omkring 6% af en årgang – bliver årligt født i Danmark efter brug af ART [14, 15]. Børn, der er født efter ART, har en smule større risiko for at få sygdom senere hen end børn, der er født efter naturlig befrugtning. I de senere år har der været særligt fokus på metaboliskassocierede lidelser såsom kardiovaskulære sygdomme samt ændret lipid- og glukosemetabolisme, som man i en række mindre studier har fundet øget forekomst af hos individer, der er undfanget ved ART [16-19], også når der korrigeres for eventuel underliggende subfertilitet hos forældrene [20]. Derudover ses der en øget risiko for præterm fødsel og en øget forekomst af perinatale komplikationer [21]. De forskellige in vitro-fertiliseringsmetoder er endvidere forbundet med ændret fødselsvægt hos børnene. Såle-

TABEL 1

Obstetriske og perinatale risikofaktorer for enfoldsfødsler ved forskellige interventioner, der benyttes ved assisteret reproduktion, sammenlignet med fødsler efter naturlig befrugtning.

| Reproduktionsmetode | Perinatale risikofaktorer |
|-----------------------------------|--|
| IVF | Præeklampsi, præterm fødsel, lav fødselsvægt, SGA, medfødte misdannelser |
| ICSI | Præeklampsi, præterm fødsel, lav fødselsvægt, SGA, medfødte misdannelser, kromosomabnormaliteter |
| Nedfrysning/optøning af embryoner | LGA, medfødte misdannelser |
| Ægdonation | Præeklampsi, præterm fødsel |

ICSI = intracytoplasmatiske sædcelleinjektion; IVF = in vitro-fertilisering; LGA = *large for gestational age*; SGA = *small for gestational age*.

des giver oplægning af friske, befrugtede æg i den hormonstimulerede cyklus en gennemsnitlig lavere fødselsvægt hos børnene end hos børn, der er født efter naturlig befrugtning, mens oplægning af nedfrosne/optøede æg giver højere risiko for fødsel af fostre som er *large for gestational age* (LGA) [22] (Tabel 1). Det kan ikke udelukkes, at en del af den øgede risiko for sygdom kan skyldes forældrenes egne reproduktive sygdomme. I flere lignende studier har man ikke justeret for denne mulige konfounder, hvilket det er vigtigt at være opmærksom på ved gennemgang af litteraturen, og ved fremtidige undersøgelser [23, 24]. Flere epidemiologiske studier og adskillige dyreforsøg tyder dog på, at selve de interventioner, der benyttes ved de forskellige former for ART, også udgør en del af de tilgrundliggende årsager til børnenes ændrede sygdomsrisiko. Der er således forskel på barnets risikoprofil, alt efter om det befrugtede æg (embryonet) opsættes friskt eller efter nedfrysning/optøning, og om der udføres in vitro-fertilisering (IVF), intracytoplasmatiske sædcelleinjektion eller intrauterin insemination [22, 23, 25, 26]. Selve hormonstimuleringen af kvinden mistænkes også for at kunne påvirke barnets risikoprofil [27], men der er endnu ikke fundet egentlige årsagsmekanismer for, hvordan de forskellige metoder, der benyttes ved assisteret reproduktion, kan påvirke fosterets udvikling og derigennem barnets risiko for sygdom senere hen.

EPIGENETISK PÅVIRKNING AF FOSTERUDVIKLINGEN VED ASSISTERET REPRODUKTIONSTEKNOLOGI

Flere ting tyder på, at en ændret epigenetik som resultat af håndteringen og manipuleringen af embryonet ved assisteret reproduktion er nøglen til at forstå den ændrede sygdomsrisiko hos børn, der er født efter ART. Hos mus er det påvist, at hormonstimulation påvirker fosterets epigenetik, og det er observeret, at IVF påvirker de epigenetiske faktorer i placenta hos mus under graviditeten [27, 28]. Ved kultivering af musembryoner kan selve indholdet af dyrkningsmediet ændre expressionen af de imprintede gener i blastocyststadiet og

påvirke ungerens udvikling og adfærd senere hen [29]. Det er dog stadig uvist, om de epigenetiske faktorer, der induceres som respons til interventionerne under de enkelte ART-metoder, er årsag til de rapporterede ændringer i sygdomsrisiko, der ses hos børn, som er født efter ART. I et samarbejde mellem Metabolismecenteret (NNFCBMR, Københavns Universitet), Gynækologisk/Obstetriske Afdeling (Hvidovre Hospital), og Fertilitetsklinikken (Rigshospitalet) er man netop ved at undersøge, om epigenetikken kan forklare det ændrede perinatale resultat og den let øgede sygdomsrisiko, der ses senere hen. Er dette tilfældet, er der stor mulighed for, at vi på længere sigt kan udvikle metoder, der påvirker den ændrede epigenetik, og derigennem nedsætte den let øgede risiko for sygdom hos de ca. 5.000 børn, der årligt fødes efter assisteret reproduktion.

SUMMARY

Ida Donkin, Romain Barrès & Anja Pinborg:

Epigenetic influence on embryonic development

Ugeskr Læger 2016;178:V02160132

The epigenome is sensitive to environmental changes and can sustainably alter gene expression, notably during embryonic development. New research indicates that epigenetic factors are heritable, which is why paternal lifestyle may affect fetal development and risk of disease. Children conceived by assisted reproduction technology (ART) have an increased risk of peri- and postnatal complications, and as specific ART protocols associate with specific risk profiles, the procedures themselves may cause epigenetic changes contributing to the altered outcomes of the 5,000 Danish children annually conceived by ART.

KORRESPONDANCE: Ida Donkin. E-mail: ida.donkin@sund.ku.dk

ANTAGET: 29. juni 2016

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 12. september 2016

INTERESSEKONFLIKTER: ingen. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

LITTERATUR

- Cantone I, Fisher AG. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:282-9.
- Peat JR, Dean W, Clark SJ et al. Genome-wide bisulfite sequencing in zygotes identifies demethylation targets and maps the contribution of TET3 oxidation. *Cell Rep* 2014;9:1990-2000.
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008;8:34.
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME et al. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2538-43.
- Barrès R, Yan J, Egan B et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 2012;15:405-11.
- Donkin I, Versteheyne S, Ingerslev LR et al. Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab* 2016;23:369-78.
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 2006;14:159-66.
- Veenendaal MV, Painter RC, de Rooij SR et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 2013;120:548-53.
- Ng SF, Lin RC, Laybutt DR et al. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010;467:963-6.

10. Barbosa TCI, Ingerslev LR, Alm PS et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Molecul Metab* 2015;5:184-97.
11. Gapp K, Jawaaid A, Sarkies P et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci* 2014;17:667-9.
12. Chen Q, Yan M, Cao Z et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 2016;351:397-400.
13. Lake JK, Power C, Cole TJ. Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: associations with parental obesity. *Arch Dis Child* 1997;77:376-81.
14. Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2016;31:233-48.
15. Rostad B, Schmidt L, Sundby J et al. Infertility experience and health differentials – a population-based comparative study on infertile and non-infertile women (the HUNT Study). *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014;93:757-64.
16. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Prein J et al. Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8-18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. *Hum Reprod* 2009;24:2788-95.
17. Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S et al. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Hum Reprod Update* 2014;20:840-52.
18. Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation* 2012;125:1890-6.
19. Hart R, Norman RJ. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I – General health outcomes. *Hum Reprod Update* 2013;19:232-43.
20. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP et al. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1682-8.
21. Malchau SS, Loft A, Henningsen AK et al. Perinatal outcomes in 6,338 singletons born after intrauterine insemination in Denmark, 2007 to 2012: the influence of ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2014;102:1110-6 e2.
22. Pinborg A, Henningsen AA, Loft A et al. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod* 2014;29:618-27.
23. Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? *Hum Reprod Update* 2013;19:87-104.
24. Luke B, Stern JE, Hornstein MD et al. Is the wrong question being asked in infertility research? *J Assist Reprod Genet* 2016;33:3-8.
25. Wennerholm UB, Henningsen AK, Romundstad LB et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod* 2013;28:2545-53.
26. Kallen B, Finnstrom O, Lindam A et al. Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? *Fertil Steril* 2010;94:1680-3.
27. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002;63:329-34.
28. Sui L, An L, Tan K et al. Dynamic proteomic profiles of in vivo- and in vitro-produced mouse postimplantation extraembryonic tissues and placentas. *Biol Reprod* 2014;91:155.
29. Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5880-5.