

Betydning af sædcellens epigenetik for befrugtning og fosterudvikling

Marte Saupstad, Emil Andersen & Romain Barrès

STATUSARTIKEL

Novo Nordisk
Foundation Center for
Basic Metabolic
Research, Københavns
Universitet

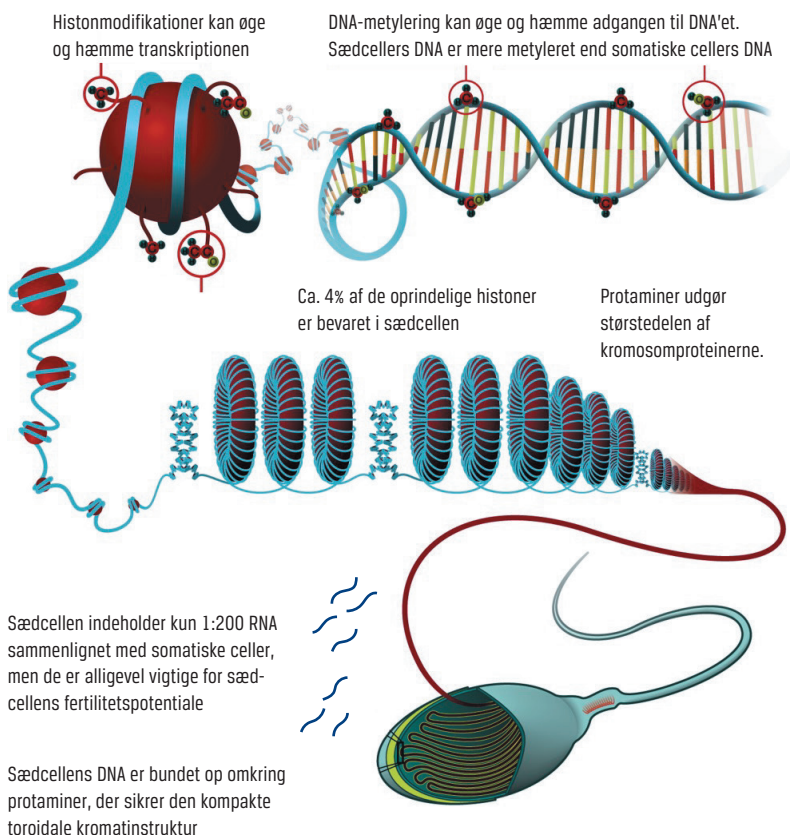
Ugeskr Læger
2018;180:V02180152

Den første fostercelle, zygoten, dannes ved sammensmeltning af to haploide kønsceller. Zygoten er derfor en kombination af DNA fra både ægcellen og sædcellen og indeholder genetisk information til at skabe et nyt individ. Foruden genetisk information indeholder sædcellen og ægcellen epigenetisk information. Begrebet epigenetik dækker over molekulære mekanismer, der regulerer, hvordan bestemte gener udtrykkes, uden at ændre den underliggende basesekvens. Epigenetik muliggør derfor omdannelsen af det samme genom til hundreder af forskellige epigenomer, hvilket kan forklare mangfoldigheden af humane celler. For sædceller spiller epigenetisk regulering en væsentlig rolle under både spermatogenesis, befrugtningen og embryogene-

sen. Ligeledes er abnorm sædcelleepigenetik associeret med forringet fertilitet. Sædcellens epigenetik er ikke statisk, men kan hos både mennesker og dyr ændres af livsstil. Dette er interessant, da man i flere dyrestudier har påvist, at epigenetiske mønstre kan nedarves fra en generation til den næste via kønsceller og have indflydelse på afkommets fænotype. I 2016 blev der for første gang lanceret en kommerciel test til kortlægning af sædcellers epigenetiske signatur. Virksomheden bag hævder, at testen kan give deres kunder bedre indsigt i deres sædcellers sundhed og chance for succes ved fremtidig in vitro-fertilisering. I denne artikel introduceres den nuværende viden om, hvordan sædcellens epigenetik kan have en effekt på sædcellens funktion, og hvorledes mandens livsstil påvirker epigenetikken. Vi vil endvidere diskutere anvendelsen af alternativer i udredningen af mandlig fertilitet.

FIGUR 1

Sædcellens epigenetik adskiller sig fra epigenetikken i somatiske celler og ægceller. Tilladelse til brug af figur fra Elsevier Ltd [1].



EPIGENETISK REGULERING AF SPERMATO- OG EMBRYOGENESEN

Under spermatogenesis udvikles og modnes spermatoogonier til funktionelle spermatozoer i en kompleks proces, hvori der indgår store ændringer i epigenetikken. De mest undersøgte epigenetiske mekanismer er: 1) DNA-metylering, 2) histonmodifikationer og 3) små ikkekodende RNA. Den epigenetiske profil i sædcellerne adskiller sig fra den epigenetiske profil i somatiske celler på flere områder (**Figur 1**): 1) Reguleringen af DNA-metyleringsniveauet undervejs i sædcellens udvikling har stor betydning for omdannelsen fra germinalcelle til moden sædcelle [2, 3]. Sædceller har et højt niveau af DNA-metylering, hele 85%, hvor ægceller har omkring 50% [4]. Vigtigheden af DNA-metylering kan observeres i eksperimentelle dyrestudier, hvor kemisk hæmning resulterer i nedsat befrugtningsevne og et øget tab af embryoner inden implantation [5]. Efter befrugtning fjernes en stor del af DNA-metylgrupperne fra det paternelle genom ved forøget ten-eleven translocation-enzyme-aktivitet [6]. På trods af fjernelsen af metylgrupper kan metyleringsmønstre fra sædceller genfindes i somatiske celler hos afkommet hos dyr [7]. 2) Størstedelen af de oprindelige histoner bliver i modne sædceller udskiftet med proteiner kaldet protaminer. Protaminernes stærke ringformede struktur resulterer i nuklearkomprimering, der er nødvendig for sædcellens motilitet, beskyttelse af DNA'et og medvir-

kende til sædcellens transkriptionelle inaktivitet. I en metaanalyse fra 2016 påviste man, at mangel på protaminer var associeret med øget DNA-skade og mandlig subfertilitet [8], muligvis på grund af nedsat beskyttelse af DNA'et. 3) Som et resultat af sædcellers lave indhold af cytoplasma og den transkriptionelle inaktivitet indeholder sædceller op til 200 gange mindre RNA end ægceller og somatiske celler [9]. På trods af dette er der rapporteret om indhold af flere RNA-klasser, som mRNA, miRNA, piRNA og tRNA i sædceller. RNA-molekylerne bliver ved befrugtning overført til ægcellen, og fund i mus tyder på, at mangel på bestemte miRNA resulterer i forstyrret deling af zygoten [10].

Sædcellens specifikke epigenetik er derfor nødvendig for udviklingen af funktionelle sædceller igennem spermatogenesis og er samtidig et vigtigt element af embryogenesen.

INDFLYDELSEN AF LIVSSTIL PÅ SÆDCELLENS EPIGENETIK OG NÆSTE GENERATION

I observationelle, epidemiologiske kohortestudier har man afdækket, at forfædres manglende adgang til fødeinden en graviditet, kunne være forbundet med risiko for udvikling af sygdom hos børn og børnebørn [11, 12]. Epigenetisk arv er blevet foreslået som en mulig forklaring på, at miljøet i en generation kan have indflydelse på den næste generation. Den epigenetiske signatur er, modsat den genetiske, dynamisk og kan ændres som respons på faktorer i miljøet og livsstilen [4-7]. De seneste års dyrestudier har givet flere eksempler på, at kost, motion og stress kan påvirke sædcellernes epigenetik og helbredet i de følgende generationer. Tilsvarende forsøg med mennesker har indtil nu bekræftet, at skift i livsstil også hos mennesker kan ændre sædcellers epigenetik.

I to studier fra hhv. 2010 og 2016 blev hanrotter (F0-generationen) fodret med en fedtholdig diæt og parret med hunrotter, der havde fået en normal diæt [13, 14]. I begge studier havde hunrotterne i de næste to generationer (F1- og F2-generationen) en lavere glukosetolerans og pankreatisk β -cellemasse end kontrolrotterne [14, 15]. Observationen blev understøttet af transkriptionsanalyser, der viste, at hunrotter fra F1-generationen havde en ændret mængde gener, der var relateret til insulinproduktion [13]. I det nyeste af de to studier fandt forskerne derudover en ændret DNA-metylering og sammensætning af små ikkekodende RNA i sædcellerne i både F0- og F1-generationen sammenlignet med kontrolrotterne [14]. De eksperimentelle rottestudier matcher fund fra humane epidemiologiske studier, der viser en sammenhæng mellem BMI hos en far og afkommets helbred [15]. Ligeledes blev der i 2016 påvist en forskel i den epigenetiske signatur i sædceller fra normalvægtige mænd og overvægtige mænd [16]. Det samme studie viste endvidere, at vægt-

tab efter en *Roux-en-Y*-gastrisk bypassoperation ændrede sammensætningen af små ikkekodende RNA og DNA-metyleringen af gener, der indgår i appetitregulering og udviklingen af det centrale nervesystem.

Fysisk aktivitet er også blevet påvist at kunne ændre sædcellens epigenetik. I et studie fra 2016 fandt man, at afkom af trænedede hanmus havde en højere kropsvægt og øget plasmainsulin end afkom af ikke-trænedede hanmus [17]. Observationen blev understøttet af fund af ændret DNA-metylering og miRNA i sædcellerne efter træning. I studier med mennesker har man bekræftet, at fysisk træning kan ændre sædcellens epigenetiske signatur. I det første studie, der blev publiceret i 2015, blev sædceller indhentet før og efter tre måneders træning fra en gruppe på 24 mænd [18]. I den efterfølgende epigenetiske analyse så man en ændret DNA-metylering blandt andet på gener, der indgår i udvikling af parkinsonisme og skizofreni. I et nyere studie fra Danmark fandt man ligeledes, at seks ugers aerob træning ændrede DNA-metyleringen i flere områder med gener, der indgår i neurogenese og neurondifferentiering, samt mængden af piRNA [19].

we hypothesized that endurance training changes the epigenome of human spermatozoa. Using small RNA (sRNA). Den funktionelle rolle for disse ændringer er endnu ikke undersøgt.

Stress er endnu en faktor, der kan påvirke sædcellens epigenetik og næste generations helbred [20, 21]. I et studie fra 2014 blev nyfødte hanmus udsat for traumatisk stress, hvilket senere i deres liv medførte en anden adfærd og metabolisk respons på stressende situationer end hos ikke-traumatiserede mus [21]. Dette mønster blev genfundet i afkom fra de traumatiserede mus. Interessant kunne forskerne ved at isolere ikkekodende RNA fra sædceller fra traumatiserede mus og injicere det i et uberørt befrugtet æg genskabe fænotypen i det resulterende afkom. Matchende fund blev gjort i et studie fra 2016, hvor forskerne ved at udsætte voksne hanmus for stress eller kortisoninjektioner fandt en ændret epigenetisk signatur i musenes sædceller, og deres afkom havde en forringet metabolisk profil [21]. Studier med mennesker har vist, at traumatiske oplevelser kan disponere afkom for stress [22].

HOVEDBUDSKABER

- ▶ Flere epigenetiske markører i sædcellen korrelerer med mandens reproduktive egenskaber. En ny kommerciel test af sædcellers DNA-metylering viser sammenhæng med både sædcelledannelse, befrugtningsevne og embryokvalitet.
- ▶ Sædcellers epigenetiske signatur påvirkes af miljø og livsstil, herunder kost, kropsvægt, fysisk aktivitet og stress.
- ▶ Studiet af sædcellers epigenetiske signaturer vil forventeligt give indsigt i de netværk, der kontrollerer mænds reproduktive egenskaber, men de nye test mangler stadig at blive integreret i udredningen af infertile par.

Overordnet indikerer resultaterne af dyrestudier, at ændringer i miljøet kan påvirke sædcellers epigenetik og herigennem næste generations helbred. Hos mennesker har epidemiologiske studier vist, at ændringer i miljøet kan have betydning for næste generations helbred, og i kliniske studier har man påvist, at sædcellers epigenetik ligeledes kan ændres (Figur 2).

DEN KLINISKE ANVENDELSE AF EPIGENETIK I INFERTILITETSDIAGNOSTIK

Analyse af sædkvalitet er en essentiel procedure i den kliniske undersøgelse af infertile par. Den nuværende standardprocedure, der er anbefalet af WHO, indbefatter en undersøgelse af sædcelleantallet, motiliteten og mængden af morfologisk normale celler i en prøve [23]. Selv om man ved hjælp af testen kan redegøre for mandens evne til at producere motile sædceller, kan man kun i specifikke tilfælde sige noget om mandens reproduktive potentiale [24]. For at en sædcelle kan befrugte en ægcelle kræves der, ud over motilitet, en række intakte funktioner som: 1) kapacitering, 2) evnen til at binde til zona pellucida, 3) akrosomreaktion for at penetrere zona pellucida og 4) evnen til at sammensmelte med ægcellen, hvilket kræver intakt DNA. Flere af disse funktioner kan undersøges i separate test, og netop en test for intakte akrosomer er for nylig blevet beskrevet af en dansk forskergruppe på Rigshospitalet [25].

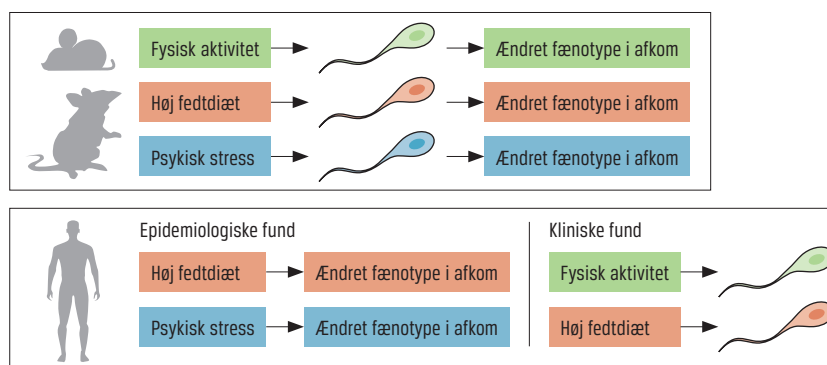
Parallelt med udviklingen af test for sædcellens funktion har den teknologiske udvikling medført, at den epigenetiske analyse er kommet tættere på klinikken. Flere epigenetiske markører bliver nu testet for deres rolle i infertilitet, bl.a. sammensætningen af protaminer, histonmodifikationer, ikkekodende RNA og DNA-metylering [26]. Netop DNA-metylering er i to nyere studier fra samme forskergruppe blevet undersøgt på næsten en halv million steder henover genomet. Her fandt man, at man vha. DNA-metyleringen kunne forudsige henholdsvis mandens fertilitetsstatus og sand-

synlighed for med hans sæd at udvikle sunde embryoer [27, 28]. Den prædiktative værdi for testen viste en sensitivitet (82%) og en specificitet (99%), der lægger sig op ad andre test af sædcellens funktion, som for eksempel DNA-skade- og akrosomreaktionstest, der ligeledes mangler sensitivitet til forudsigtelse af infertilitet [24]. Forskerne bag har nu udviklet den første epigenetiske test på markedet og påstår at have en bioinformatisk model til beregning af den relative risiko for komplikationer. Testen er på nuværende tidspunkt væsentlig dyrere og mere kompliceret end de tidligere test og har lignende prædiktativ værdi. Især implementeringen af disse nye test i den kliniske praksis bliver derfor spændende at følge for at finde ud af, om screening af DNA-metylering i sædceller i samspil med andre test kan forbedre den kliniske udredning for infertilitet ved at identificere patienter, der ellers ikke ville være blevet diagnosticeret. Andre epigenetiske markører bliver på nuværende tidspunkt også undersøgt. Et studie fra 2016 viste, at fertile og infertile mænd med normal sædproduktion havde forskellig sammensætningen af miRNA [29]. Andre forskergrupper har ligeledes forsøgt at identificere specifikke miRNA som mulige biomarkører for infertilitet, men i disse forsøg gav målingen af de specifikke miRNA ikke øget klinisk værdi [30].

Overordnet bringer de nye teknologier og de epigenetiske datasæt ny viden om sædcellens biologi, dens reproduktive potentiale og dens potentielle indflydelse på den næste generations helbred. De nye studier viser, at sædcellens epigenetik kan associeres til både livsstil og fertilitet, men der er på nuværende tidspunkt ikke studier med mennesker, hvor man kan bekræfte kausaliteten mellem livsstil, sædcellens epigenetik og fertilitet. Det bliver spændende at følge, om man i nye studier vil påvise, hvordan de nye diagnostiske alternativer som epigenetiske test kan supplere den kliniske udredning hos infertile par, og det bliver spændende at følge, om de i fremtiden kan forbedre det kliniske udfald ved at personalisere behandlinger eller livsstilsændringer.

FIGUR 2

Fund fra dyrestudier viser, at ændring i miljø og livsstil kan have en indvirkning på både sædcellers epigenetik og afkomets fænotype. Hos mennesker har epidemiologiske og kliniske studier vist, at ændringer i miljøet kan ændre henholdsvis helbredet i næste generation og sædcellers epigenetik, men kausaliteten er endnu ikke undersøgt.



SUMMARY

Marte Saupstad, Emil Andersen & Romain Barrès:

The importance of sperm epigenetics for conception and embryology

Ugeskr Læger 2018;180:Vo2180152

The epigenetic signature of spermatozoa is important for spermatogenesis, fertilisation and embryogenesis. New research indicates, that the epigenetic signature of spermatozoa can be altered following environmental changes, and that epigenetic patterns are heritable and can affect offspring health. Epigenetic markers of sperm correlate with the fertility status of men. These markers are not yet sufficiently integrated in the clinic to increase prediction of infertility, but there is a possibility, that the markers will play an important role in the future diagnosis of infertility.

KORRESPONDANCE: Emil Andersen. E-mail: andersen@sund.ku.dk

ANTAGET: 7. juni 2018

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 20. august 2018

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

LITTERATUR

- Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012;97:267-74.
- Joana Marques C, Pinho MJ, Carvalho F et al. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 2011;6:1354-61.
- Ni K, Dansranjavin T, Rogenhofer N et al. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Hum Reprod* 2016;31:1411-24.
- Zhu P, Guo H, Ren Y et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 2018;50:12-9.
- Doerksen T, Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod* 1996;55:1155-62.
- Oswald J, Engemann S, Lane N et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000;10:475-8.
- 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.
- Ni K, Spiess A-N, Schuppe H-C et al. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2016;4:789-99.
- Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods Mol Biol* 2013;927:385-96.
- Liu W-M, Pang RTK, Chiu PCN et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:490-4.
- Veenendaal M, Painter R, de Rooij S et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 2013;120:548-54.
- Pembrey M, Saffery R, Bygren LO. Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. *J Med Genet* 2014;51:563-72.
- Ng S-F, Lin RCY, Laybutt DR et al. Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010;467:963-6.
- de Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab* 2016;5:184-97.
- Lake JK, Power C, Cole TJ. Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: associations with parental obesity. *Arch Child* 1997;77:376-80.
- Donkin I, Verstehey S, Ingerslev LR et al. Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab* 2016;23:369-78.
- Murashov AK, Pak ES, Koury M et al. Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. *FASEB J* 2016;30:775-84.
- Denham J, O'Brien BJ, Harvey JT et al. Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics* 2015;7:717-31.
- Ingerslev LR, Donkin I, Fabre O et al. Endurance training remodels sperm-borne small RNA expression and methylation at neurological gene hotspots. *Clin Epigen* 2018;10:12.
- Wu L, Lu Y, Jiao Y et al. Paternal psychological stress reprograms hepatic gluconeogenesis in offspring. *Cell Metab* 2016;23:735-43.
- Gapp K, Jawaid 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.
- Yehuda R, Daskalakis NP, Lehrner A et al. Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene in holocaust survivor offspring. *Am J Psychiatry* 2014;171:872-80.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, 2010.
- Esteves SC, Zini A, Aziz N et al. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology* 2012;79:16-22.
- Egeberg Palme DL, Rehfeld A, Bang AK et al. Viable acrosome-intact human spermatozoa in the ejaculate as a marker of semen quality and fertility status. *Hum Reprod* 2. jan 2018 (e-pub ahead of print).
- Schagdarsurengin U, Steger K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol* 2016;13:584-95.
- Aston KI, Uren PJ, Jenkins TG et al. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertil Steril* 2015;104:1388-97.
- Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril* 2016;105:51-57.
- Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F et al. Spermatozoa from normozoospermic fertile and infertile individuals convey a distinct miRNA cargo. *Andrology* 2016;4:1028-36.
- Trzybulska D, Bobjer J, Giwercman A et al. Serum microRNAs in male subfertility - biomarkers and a potential pathogenetic link to metabolic syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:1277-82.