

# **Invloed van DNA-methylatie op gezondheid en ziekte van kinderen**

Janine F. Felix, Vincent W.V. Jaddoe, Liesbeth Duijts

## **Affiliaties**

Dr. Janine (J.F.) Felix, arts - epidemioloog, j.felix@erasmusmc.nl, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, afdelingen Generation R, Kindergeneeskunde en Epidemiologie, Postbus 2060, 3000 CB, Rotterdam. Geen relatie met farmaceutische industrie.

Prof. Dr. Vincent (V.W.V.) Jaddoe, kinderarts – epidemioloog, v.jaddoe@erasmusmc.nl, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, afdelingen Generation R, Kindergeneeskunde en Epidemiologie, Postbus 2060, 3000 CB, Rotterdam. Geen relatie met farmaceutische industrie.

Dr. (Liesbeth) L. Duijts, kinderarts pulmonoloog – epidemioloog, l.duijts@erasmusmc.nl, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, afdelingen Generation R, Kindergeneeskunde en Epidemiologie, subafdelingen Kinderlongziekten en Neonatologie, Postbus 2060, 3000 CB, Rotterdam. Geen relatie met farmaceutische industrie.

**Trefwoorden:** Epigenetica, epidemiologie, cohort studie, kind, ziekten

**Aantal woorden:** Samenvatting: 132; hoofdartikel: 1500; Tekstblok 1: 167; Tekstblok 2: 199.

## **Corresponderende auteur**

Dr. Janine F. Felix, j.felix@erasmusmc.nl, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, afdelingen Generation R, Kindergeneeskunde en Epidemiologie, Postbus 2060, 3000 CB, Rotterdam.

## **Erkenning**

Janine Felix wordt financieel ondersteund door het Horizon 2020 research and innovation programme van de Europese Unie, grant no. 633595 (DYNAHEALTH). Vincent Jaddoe ontving subsidie van NWO (VIDI 016.136.361) en een Consolidator Grant van de European Research Council (ERC-2014-CoG-64916). Liesbeth Duijts ontving subsidie van het Longfonds (no 3.2.12.089; 2012).

## **Samenvatting**

De ontwikkeling in de eerste fase van het leven is van groot belang voor de gezondheid van kinderen en volwassenen. Ongunstige invloeden in specifieke kritieke perioden tijdens de vroege ontwikkeling hebben nadelige effecten op de gezondheid op latere leeftijd. Er zijn steeds meer aanwijzingen dat vroege en permanente epigenetische veranderingen een belangrijke rol spelen in de onderliggende mechanismen. In dit artikel bespreken wij de rol van DNA-methylatie, het bekendste epigenetische mechanisme, op gezondheid en ziekte van kinderen. Wij gaan in op de achtergrond van DNA-methylatie, op factoren die hierop van invloed zijn en op gevolgen van DNA-methylatie. Onderzoek gericht op het identificeren van factoren tijdens en kort na de zwangerschap die via epigenetische mechanismen bijdragen aan de kans op ziekten, moet uiteindelijk leiden tot preventieprogramma's gericht op de vroegste fase van het leven.

## Inleiding

De eerste fase van het leven is van groot belang voor de gezondheid van kinderen en volwassenen. Ongunstige invloeden in specifieke kritieke perioden tijdens de vroege ontwikkeling hebben nadelige effecten op de gezondheid op latere leeftijd. Het *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) concept postuleert dat blootstelling aan een ongunstige omgeving in kritische perioden tijdens de foetale periode of vroege kinderleeftijd leidt tot permanente veranderingen in de structuur en de functie van organen en nadelige effecten heeft op de gezondheid in het latere leven (1). Het is bijvoorbeeld bekend dat blootstelling aan een ongunstig dieet, roken of stress in het vroege leven geassocieerd is met een hoger risico op obesitas, cardiovasculaire en chronische obstructieve pulmonale ziekten in het latere leven (1). Deze bevindingen suggereren dat het ontstaan van deze veelal chronische ziekten mogelijk deels voorkomen kan worden door de vroegste fase van het leven te optimaliseren. Er zijn steeds meer aanwijzingen dat vroege en permanente epigenetische veranderingen een belangrijke rol spelen in de gevonden relaties tussen vroege blootstellingen en latere gezondheid en ziekte. In dit artikel bespreken wij de rol van DNA-methylatie, het bekendste epigenetische mechanisme. Wij gaan in op de factoren die hierop van invloed zijn, op gevolgen van DNA-methylatie veranderingen en op DNA-methylatie onderzoek in cohort studies (**Fig. 1**) (2).

## Wat is epigenetica?

Epigenetische processen zijn veranderingen aan het DNA die geen invloed hebben op de basen-volgorde en die van invloed kunnen zijn op de expressie van genen (4). DNA-methylatie is het meest bestudeerde epigenetische mechanisme. DNA-methylatie omvat het binden van een methylgroep aan een cytosine in het DNA op plaatsen waar een cytosine naast een guanine in het DNA zit, een zogenaamde CpG(cytosine-phosphate-guanine)-site. Methylatie van een CpG-site verandert de lokale structuur van het DNA en kan daarmee de genexpressie beïnvloeden (**Fig. 2**) (3). Het humane genoom bevat ongeveer 28 miljoen CpG-sites. Een deel hiervan is geclusterd in CpG-eilanden, gebieden met een grote CpG-dichtheid, die zich vaak in promotor-regio's van genen bevinden. DNA-methylatie is een dynamisch proces dat behouden blijft tijdens mitotische celdelingen. DNA-methylatie kan veranderen onder invloed van factoren als leeftijd, voeding en (maternaal) roken (3). De eerste fase van leven, de vroege foetale fase, wordt gekenmerkt door zeer hoge DNA-methylatie veranderingen, die vele decennia kunnen persisteren. Recente technische ontwikkelingen hebben het mogelijk gemaakt om op genoom-breed niveau veranderingen in DNA-methylatie te bestuderen in grote populaties. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van epigenoom-brede associatiestudies (epigenome-wide association studies, EWAs), waarbij een groot aantal CpG-sites verspreid over het hele genoom wordt gemeten. De nadruk ligt

hierbij op CpG-sites in en om genen (4). Voor kinderartsen is het Beckwith-Wiedemann syndroom een voorbeeld van een syndroom dat deels veroorzaakt wordt door DNA-methylatie-veranderingen. Dit overgroei-syndroom wordt klinisch gekarakteriseerd door macrosomie, macroglossie, visceromegalie, buikwanddefecten en maligniteiten, en moleculair gekarakteriseerd door veranderde methylatie van het maternale chromosoom 11p15. Recent onderzoek heeft aangetoond dat DNA-methylatie ook een rol speelt bij vaker voorkomende ziekten.

### **Factoren van invloed op DNA-methylatie veranderingen**

Blootstelling aan ongunstige factoren in het foetale leven kan leiden tot veranderingen in DNA-methylatie. Een klassiek voorbeeld hiervan is het *Agouti* muismodel. Door het eten van een meer of minder methylrijk dieet tijdens de zwangerschap treden bij de nakomelingen DNA-methylatie-veranderingen op, die leiden tot verandering van expressie van het *Agouti* gen. Dat resulteert uiteindelijk bij de nakomelingen in een gele, in plaats van donkere, vacht en obesitas (2). In het Nederlandse Hongerwinter onderzoek is aangetoond dat foetale blootstelling aan hongersnood in het eerste trimester van de zwangerschap is geassocieerd met veranderingen in DNA-methylatie status van genen die geassocieerd zijn met geboortegewicht en LDL cholesterol vele decennia later (5). Dit suggereert dat het zeer vroege leven een kritieke periode is voor het vastleggen en behouden van DNA-methylatie kenmerken.

Recent onderzoek heeft laten zien dat ook tegenwoordige veel voorkomende ongunstige blootstellingen bij gezonde populaties kunnen leiden tot blijvende veranderingen in de DNA-methylatie status van het kind (6-9). Onvoldoende folaat-inname of foliumzuurgebruik, belangrijke methyl donors, tijdens de zwangerschap zijn geassocieerd met DNA-methylatie veranderingen bij het kind (6). Echter, dit betreft gen-specifieke bevindingen met vooralsnog onduidelijke gevolgen. Het effect van maternaal gebruik van andere supplementen of een specifieke dieet tijdens de zwangerschap op DNA-methylatie bij het kind, evenals de gevolgen van veranderingen in DNA-methylatie moeten nog worden onderzocht. Een prospectief Noors cohort van 1000 zwangere vrouwen en hun kinderen toonde als eerste aan dat bij kinderen de DNA-methylatie status van 10 genen, gemeten in navelstrengbloed, was veranderd door roken van moeder tijdens de zwangerschap (7). Aanvullend toonde een Engels populatie-gebaseerd cohort van 800 zwangere vrouwen en hun kinderen een dosis-respons-effect en een sterker effect op DNA-methylatie van maternaal dan paternaal roken aan, waarbij deze DNA-methylatie-veranderingen deels persisteerden tot op 17 jarige leeftijd (8). In een andere epigenoom-brede studie bleek dat maternaal ondergewicht en overgewicht geassocieerd waren met methylatieveranderingen bij het kind (9). Ook deze gevonden effecten waren sterker voor maternaal dan paternaal

gewicht wat een intra-uterien mechanisme suggereert. Gesuggereerd wordt dat ook maternale stress tijdens de zwangerschap geassocieerd is met DNA-methylatie bij het kind (3).

Maternaal roken, overgewicht en stress zijn belangrijke factoren die de gezondheid van het kind op korte en lange termijn beïnvloeden. Bovenstaande studies suggereren dat het DNA-methylatie profiel door deze factoren wordt beïnvloed.

### **Epigenetische veranderingen en ziekten**

Behalve dat blootstelling aan ongunstige factoren in het foetale leven kan leiden tot veranderingen in DNA-methylatie bij de geboorte, is DNA-methylatie bij de geboorte en daarna mogelijk ook geassocieerd met latere ziekten. Een recente studie toont aan dat gen-specifieke of globale DNA-methylatie veranderingen in navelstrengbloed geassocieerd zijn met adipositas of lichaamssamenstelling op de kinderleeftijd (10). Studies die de rol van epigenetica op de ontwikkeling van respiratoire uitkomsten bestudeerden lieten zien dat DNA-methylatie status van specifieke genen geassocieerd is met longfunctie, astma en andere atopisch ziekten (1). Toekomstige studies zijn nodig om de relatie van niet alleen gen-specifieke maar ook epigenoom-brede DNA-methylatie gemeten op diverse leeftijden van het vroege leven tot aan de jong volwassenheid met ziekten op latere leeftijd te bestuderen.

### **Epigenetica in populatie-gebaseerde studies**

Populatie-gebaseerde cohort studies vormen een ideaal platform voor het bestuderen van epigenetische veranderingen. Deze studies bestuderen een breed spectrum aan blootstellingen, gezondheidsuitkomsten en mogelijke confounders die herhaaldelijk op meerdere leeftijden tijdens de follow-up gemeten worden. Zwangerschaps- of geboortecohorten hebben het bijkomende voordeel dat ook de associaties van blootstellingen op verschillende momenten in de zwangerschap met DNA-methylatie van het kind bestudeerd kunnen worden.

DNA-methylatie kan verschillen tussen individuen en tussen cellen en weefsels binnen hetzelfde individu (3). In populatie-gebaseerde studies hebben onderzoekers meestal alleen de beschikking over makkelijk toegankelijk en in afname weinig belastend lichaamsmateriaal, zoals bloed. Daarom worden de meeste EWAs in populatie-gebaseerde studies uitgevoerd met DNA uit leukocyten. Bij de interpretatie van studies naar verbanden tussen DNA-methylatie en blootstellingen of ziekten moet er rekening mee worden gehouden dat DNA-methylatie in leukocyten niet per definitie DNA-methylatie in het voor het fenotype relevante weefsel (bijvoorbeeld longweefsel bij het verband van DNA-methylatie met astma) vertegenwoordigt. Daarnaast is, anders dan bij genoom-brede associatie studies (GWAs), de causaliteit en de richting van het verband niet altijd eenduidig. Zo kan een verandering in

DNA-methylatie op een specifieke locatie in het genoom de body mass index (BMI) beïnvloeden, maar kan BMI ook effect hebben op de DNA-methylatie. Statistische technieken zoals Mendelian Randomization, waarbij genetische varianten gebruikt worden als proxy voor een specifieke blootstelling of voor DNA-methylatie, evenals longitudinale analyses met meerdere metingen van blootstellingen en DNA-methylatie over de tijd, kunnen een rol spelen bij het ophelderen van de causaliteit en de richting van het effect.

De wetenschappelijke waarde van EWAs wordt sterk verbeterd door het combineren van cohorten in consortia, in lijn met de strategie die voor GWAs inmiddels standaard is. Door meta-analyse van de resultaten van meerdere cohorten ontstaat meer power om de kans op toevalsbevindingen te verkleinen of eventuele kleinere effecten te kunnen aantonen. Daarnaast vergemakkelijken consortia de replicatie in andere cohorten, op andere leeftijden of in andere weefsels. Op dit moment hebben ongeveer 20 internationale zwangerschaps-, geboorte- en kindercohorten zich verenigd in het Pregnancy And Childhood Epigenetics (PACE) consortium, dat als doel heeft EWAs resultaten van individuele studies te combineren om zo sterkere conclusies te kunnen trekken.

## **Conclusie**

Blootstelling aan ongunstige factoren vroeg in het leven is geassocieerd met ziekten op latere leeftijd. Epigenetische mechanismen zoals DNA-methylatie zouden hierin een belangrijke rol kunnen spelen. Tot dusver hebben studies voornamelijk gekeken naar gen-specifieke epigenetische veranderingen, en zijn niet alle bevindingen in andere studies bevestigd. Daarnaast is nog niet bekend welke specifieke blootstellingen, in welke specifieke kritieke ontwikkelingsperioden van het foetale leven tot aan de jong volwassenheid leiden tot epigenetische veranderingen, gen-expressie veranderingen, veranderingen in orgaan structuur en functie, en uiteindelijke ziekte. Populatie-gebaseerde cohort studies vormen door hun longitudinale metingen van DNA-methylatie, gedetailleerde functie en ziekte uitkomsten en multiple confounders, een ideaal platform voor EWAs. Samenwerking in internationale consortia zal de wetenschappelijke waarde van dergelijke EWAs versterken. Uiteindelijk kunnen, door het identificeren van factoren tijdens en kort na de zwangerschap die via epigenetische mechanismen bijdragen aan de kans op ziekten, preventieprogramma's ontwikkeld worden gericht op de vroegste fasen van het leven om de kans op latere ziekten te verkleinen.

## **Leesadvies**

Groom A, Elliott HR, Embleton ND, Relton CL. Epigenetics and child health: basic principles. Arch Dis Child 2011;96(9):863-9.

### **Aparte tekstblokken:**

1. Analyse van EWAs: In EWAs wordt de DNA-methylatie-status van een groot aantal CpG-sites gemeten. De meest gebruikte manier om dit te doen in populatie-gebaseerde cohort studies is op dit moment door middel van een “methylatie-array”, waarmee tegelijkertijd de DNA-methylatiestatus van ongeveer 485,000 CpG-sites in DNA uit leukocyten gemeten kan worden (voor meer informatie, zie de online referenties). De verwachting is dat dit aantal met het voortschrijden van de techniek op korte termijn omhoog zal gaan. Iedere CpG-site is óf wel, óf niet gemethyleerd. Voor iedere deelnemer wordt DNA uit een groot aantal cellen gebruikt. De DNA-methylatie voor iedere CpG-site wordt weergegeven als een zogenaamde “beta-waarde”, een waarde tussen de 0 en de 1, of 0 en 100 procent, die aangeeft in welk percentage van de cellen die specifieke site gemethyleerd is. Deze beta-waardes kunnen dan gebruikt worden in regressie-analyses, waarin de methylering van 485,000 CpG-sites geassocieerd wordt met factoren van invloed of ziekten. Hierbij wordt een stringentere afkapwaarde voor significantie gebruikt ( $P$ -waarde  $< 1.0 \times 10^{-7}$ ).
2. Confounding in EWAs: In EWAs moet rekening gehouden worden met biologische en technische confounders. Voorbeelden van biologische confounders zijn sociaal-economische status, leeftijd van moeder en kind, roken, en celtype. EWAs in cohortstudies gebruiken voornamelijk DNA uit leukocyten. Het totaal aantal leukocyten omvat verschillende subtypes, zoals granulocyten en B-cellen. Per subtype kan de DNA-methylatie verschillen en hiermee moet in de statistische analyses rekening worden gehouden. Hiervoor kunnen gemeten waardes gebruikt worden, als deze zijn gemeten in bloed dat is afgenomen tegelijk met het bloed voor DNA-methylatie, of waardes die berekend zijn op basis van referentiepopulaties (voor meer informatie, zie de online referenties). Technische confounders komen voort uit de laboratorium-technische bepaling van DNA-methylatie, bijvoorbeeld doordat materiaal van deelnemers niet willekeurig over de arrays verdeeld is. Zo kunnen deelnemers op basis van leeftijd, geslacht of het hebben van een bepaalde ziekte geordend zijn. Als dit samengaat met de procedures in het laboratorium, kan dat effect hebben op de metingen. Deze “batch effecten” moeten zo veel mogelijk voorkomen worden bij het plannen van de studie, bijvoorbeeld door deelnemers over de arrays te randomiseren. Ook zal in de statistische analyses rekening gehouden moeten worden met batch effecten, net als met de biologische confounders.

### Referenties in print

- (1) Duijts L, Reiss IK, Brusselle G, de Jongste JC. Early origins of chronic obstructive lung diseases across the life course. *Eur J Epidemiol* 2014;29(12):871-85.
- (2) Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3(6):567-73.
- (3) Groom A, Elliott HR, Embleton ND, Relton CL. Epigenetics and child health: basic principles. *Arch Dis Child* 2011;96(9):863-9.
- (4) Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 2011;98(4):288-95.
- (5) Tobi EW, Goeman JJ, Monajemi R, Gu H, Putter H, Zhang Y, et al. DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nat Commun* 2014;5:5592.
- (6) Haggarty P, Hoad G, Campbell DM, Horgan GW, Piyathilake C, McNeill G. Folate in pregnancy and imprinted gene and repeat element methylation in the offspring. *Am J Clin Nutr* 2013;97(1):94-9.
- (7) Joubert BR, Haberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2012;120(10):1425-31.
- (8) Richmond RC, Simpkin AJ, Woodward G, Gaunt TR, Lyttleton O, McArdle WL, et al. Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the lifecourse: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Hum Mol Genet* 2015;24(8):2201-17.
- (9) Sharp GC, Lawlor DA, Richmond RC, Fraser A, Simpkin A, Suderman M, et al. Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Int J Epidemiol* 2015;44(4):1288-304.
- (10) Relton CL, Groom A, St Pourcain B, Sayers AE, Swan DC, Embleton ND, et al. DNA methylation patterns in cord blood DNA and body size in childhood. *PLoS One* 2012;7(3):e31821.

### Additionele referenties online

1. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311(6998):171-4.
2. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 Suppl):1344S-52S.
3. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006;31(2):89-97.



4. Relton CL, Davey Smith G. Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med* 2010;7(10):e1000356.
5. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2393S-400S.
6. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice. *FASEB J* 1998;12(11):949-57.
7. Breton CV, Byun HM, Wang X, Salam MT, Siegmund K, Gilliland FD. DNA methylation in the arginase-nitric oxide synthase pathway is associated with exhaled nitric oxide in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(2):191-7.
8. Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(5):462-7.
9. Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4(11):e7845.
10. Vidal AC, Benjamin Neelon SE, Liu Y, Tuli AM, Fuemmeler BF, Hoyo C, et al. Maternal stress, preterm birth, and DNA methylation at imprint regulatory sequences in humans. *Genet Epigenet* 2014;6:37-44.
11. Vangeel EB, Izzi B, Hompes T, Vansteelandt K, Lambrechts D, Freson K, et al. DNA methylation in imprinted genes IGF2 and GNASXL is associated with prenatal maternal stress. *Genes Brain Behav* 2015 (Epub ahead of print).
12. Armstrong DA, Lesueur C, Conradt E, Lester BM, Marsit CJ. Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy: implications for children's health research. *FASEB J* 2014;28(5):2088-97.
13. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med* 2008;27(8):1133-63.

## Legenda Figuren

**Figuur 1** Paden leidend van blootstellingen aan ongunstige factoren in het vroege leven en epigenetica tot groei en orgaan adaptaties en ziekten in het latere leven.

BPD: Bronchopulmonale dysplasie, DM2: diabetes mellitus type 2, CVZ: cardiovasculaire ziekten, COPD: chronisch obstructieve pulmonale ziekte.

**Figuur 2** Schematische weergave van methylatie van CpG-sites in het DNA.

CpG: Cytosine-phosphate-Guanine; EWAs: Epigenome-wide association studies (epigenoom-brede associatiestudies). M: Methylgroep; mRNA: messenger RNA.