

Imprintingstörungen in der Reproduktionsmedizin

Epigenetik und Imprinting

Epigenetische Informationen werden nicht von der DNA-Sequenz selbst kodiert, sondern durch biochemische Veränderungen der DNA und/oder Histonproteine, die bei der Zellteilung an die Tochterzellen (somatische Vererbung) und in Ausnahmefällen sogar in der Meiose von einer Generation an die nächste (transgenerationale Vererbung) weitergegeben werden. Die Methylierung von 5-Cytosin in CpG-Dinukleotiden ist die wichtigste Modifikation der DNA selbst. Sie geht mit posttranslationalen Histonmodifikationen einher, die eine lokal kondensierte Chromatinstruktur und transkriptionelle Inaktivität bedingen [10]. DNA-Methylierungsmuster sind äußerst plastisch; sie variieren in Raum und Zeit, zwischen Individuen und Spezies.

CpG-Inseln von 500–2000 Bp Länge in den Promotorregionen spielen bei der Regulation von Säugergenen eine wichtige Rolle. In somatischen Geweben sind diese CpG-Inseln vor Methylierung geschützt. Die Promotormethylierung bei Entwicklungs-, Differenzierungs- oder Krankheitsprozessen bedingt eine Inaktivierung des betreffenden Gens. Eine besondere Klasse von cis-regulatorischen Sequenzen sind die differenziell methylierten Regionen (DMRs) in geprägten Genen. Die genomische Prägung („Imprinting“) ist eine elternspezifische epigenetische Modifikation, durch die eines der beiden elterlichen Allele inaktiviert wird. Die allelspezifische Expression hängt von der Transmission durch die väterliche bzw. mütterliche Keimbahn ab [9, 16].

In der Gametogenese werden die primordialen Keimzellen zum Zeitpunkt der Einwanderung in die Genitalleiste voll-

ständig demethyliert, um einen äquivalenten epigenetischen Zustand in der männlichen und weiblichen Keimbahn herzustellen. Danach werden die keimbahnspezifischen Methylierungsmuster neu etabliert (■ **Abb. 1**). In der männlichen Keimbahn beginnt die Methylierung nach dem pränatalen mitotischen Arrest der Keimzellen und ist postnatal am Ende des Pachytänstadiums abgeschlossen. In der weiblichen Keimbahn erfolgt die Methylierung während der Transition von primordialen zu antralen Follikeln; die Imprints sind in späten Stadien der Eizellentwicklung vollständig etabliert.

Die genomische Prägung ist in der Säugerevolution wahrscheinlich aufgrund einer reproduktiven Auseinandersetzung zwischen den Geschlechtern entstanden, um die unterschiedlichen elterlichen Interessen bezüglich der Entwicklung der Nachkommen durchzusetzen. Viele geprägte Gene sind für das Wachstum von Fetus und Plazenta sowie die Entwicklung, insbesondere des Gehirns, essenziell. In der Zygote und im frühen Embryo findet eine zweite Reprogrammierungswelle statt, welche fast alle in der Keimbahn gesetzten Methylierungsmuster wieder entfernt und durch neue, auf beiden elterlichen Allelen identische somatische Muster ersetzt [16]. Nur 100–200 geprägte Gene von insgesamt etwa 25.000 Genen behalten ihre Keimbahnmuster und elternspezifische Aktivität während der gesamten Entwicklung bei (■ **Abb. 1**).

Epimutationen

Die meisten Epimutationen sind wahrscheinlich durch stochastische Fehler bei der Löschung, Etablierung und/oder Auf-

rechterhaltung der Methylierungsmuster bedingt. Die Epimutationsrate kann durch genetische und Umweltfaktoren beeinflusst werden [7]. In der Gametogenese und frühen Embryogenese finden dramatische epigenetische Veränderungen statt, in denen das gesamte Epigenom reprogrammiert wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesen zeitlich und räumlich hochkoordinierten Prozessen Fehler/Varianten entstehen, ist hoch. Da der frühe Embryo – insbesondere bei extrakorporaler Befruchtung – sehr viel schlechter vor Umwelteinflüssen geschützt ist als die Keimbahn, stellt die Präimplantationsentwicklung ein äußerst sensibles Zeitfenster für Epimutationen dar. Wahrscheinlich entsteht ein großer Teil der enormen epigenetischen Variabilität in dieser relativ kurzen, aber äußerst dramatischen Phase nach der Befruchtung bis zur Einnistung der Blastozyste in den Uterus.

Die postzygotische Entstehung impliziert, dass die meisten Epimutationen als Mosaik vorliegen. Es wird geschätzt, dass primäre Epimutationen mindestens 100-mal häufiger auftreten als somatische DNA-Sequenzmutationen. Epimutationen in geprägten Genen (falsche Methylierungsimprints) können Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), Prader-Willi-Syndrom (PWS)/Angelman-Syndrom (AS) und eine Reihe von anderen Imprintingkrankheiten verursachen [7]. Jedoch sind die pathologischen Auswirkungen nicht auf diese sehr seltenen Syndrome beschränkt. Epimutationen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs [4] und anderen komplexen Krankheiten [6]. Die funktionelle Haploidie und komplexe Regulation machen geprägte Gene besonders anfällig für Störungen. Die Bedeutung von Epimutatio-

nen für die normale phänotypische Variation und Krankheitssuszeptibilität im Erwachsenenalter wird gegenwärtig deutlich unterschätzt.

Epigenetische Effekte von ART im Tiermodell

Eine Vielzahl von tierexperimentellen Studien zeigt, dass assistierte Reproduktionstechniken, wie z. B. die Superovulation, die In-vitro-Maturation (IVM) von Eizellen, die In-vitro-Fertilisation (IVF), die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und insbesondere die Embryokultur mit der Methylierungsreprogrammierung in der Gametogenese und frühen Embryogenese (Präimplantationsentwicklung) interferieren können. Das Large-Offspring-Syndrom (LOS), das bei der In-vitro-Produktion von Rindern und Schafen gehäuft auftritt und dem fetalen Riesenwuchssyndrom (BWS) beim Menschen ähnelt, wird durch eine aberrante Methylierung und Expression des *IGF2R*-Gens erklärt [19]. Im Mausmodell können durch Superovulation und suboptimale Embryokulturbedingungen genomweite Reprogrammierungsdefekte induziert werden, die zum Embryoverlust führen [17]. Andere Arbeiten bringen verschiedene ART mit aberranten Methylierungs- und Expressionsmustern von geprägten Genen in Oozyten, Embryonen, Feten und/oder Plazenten in Verbindung [5]. Wegen erheblicher Speziesunterschiede in der Gametogenese und frühen Embryogenese ist es jedoch schwierig, tierexperimentelle Daten auf den Menschen zu übertragen. Eine mögliche Erklärung, warum das BWS bei ART-Kindern sehr viel seltener beobachtet wird als das LOS bei Nutztieren, könnte daran liegen, dass das *IGF2*-Rezeptorgen beim Menschen nicht geprägt ist.

Risiken von ART beim Menschen

Epidemiologische Studien zeigen, dass ART beim Menschen mit einem leicht erhöhten Risiko (Faktor 1,3–1,4) für angeborene Fehlbildungen, einem 2- bis 3-fach erhöhten Risiko für niedriges und sehr niedriges Geburtsgewicht und einem möglicherweise deutlich (3- bis 9-fach) erhöhten Risiko für BWS und AS einherge-

Zusammenfassung · Abstract

medgen 2010 · 22:424–428 DOI 10.1007/s11825-010-0248-6
© Springer-Verlag 2010

T. Haaf

Imprintingstörungen in der Reproduktionsmedizin

Zusammenfassung

Stochastische, Umwelt- und/oder genetisch bedingte Fehler (Epimutationen) bei der Genomreprogrammierung in den Keimzellen und unmittelbar nach der Befruchtung sind eine wichtige Quelle für phänotypische Variation und Krankheitssuszeptibilität. Tierexperimente belegen eindrucksvoll, dass assistierte Reproduktionstechniken (ART) mit sensitiven Phasen der epigenetischen Reprogrammierung interferieren. Epidemiologische Studien beim Menschen berichten über ein erhöhtes Risiko für Beckwith-Wiedemann- und Angelman-Syndrom, aber das absolute Risiko für ein ART-Kind mit Imprintingkrankheit bleibt gering. Zumindest einige Gene zeigen statistisch signifikante Methylierungsunterschiede innerhalb der normalen Methy-

lierungsvariabilität zwischen ART und Nicht-ART-Schwangerschaften. Das heißt, entweder ART selbst oder mit der elterlichen Infertilität assoziierte Faktoren haben Einfluss auf das Epigenom der nächsten Generation. Fehlerhafte Methylierungsmuster in geprägten Genen zeigen eine signifikante Assoziation mit abnormalen Spermaparametern. Dies unterstützt die Vermutung, dass Epimutationen von der Keimbahn in den Embryo transferiert werden können.

Schlüsselwörter

In-vitro-Fertilisation · DNA-Methylierung · Embryogenese · Epigenetische Prozesse · Genomische Prägung

Imprinting defects in reproductive medicine

Abstract

Stochastic, environmentally and/or genetically induced errors (epimutations) during genome reprogramming in germ cells and shortly after fertilization are an important source of phenotypic variation and disease susceptibility. Animal experiments provide convincing evidence that assisted reproductive technologies (ART) interfere with sensitive time windows for epigenetic reprogramming. Epidemiological studies in humans suggest an increased risk for Beckwith-Wiedemann and Angelman syndrome; however, the absolute risk of receiving an ART child with imprinting disorder remains small. At least some genes display statistically significant methylation differences within the

normal range of methylation variation between ART and non-ART pregnancies. Thus, either ART themselves or factors associated with parental infertility affect the epigenome of the next generation. Faulty methylation patterns in imprinted genes show a significant association with abnormal semen parameters. This supports the idea that epimutations can be transferred from the germline into the embryo.

Keywords

In vitro Fertilization · DNA methylation · Embryogenesis · Epigenetic processes · Genomic imprinting

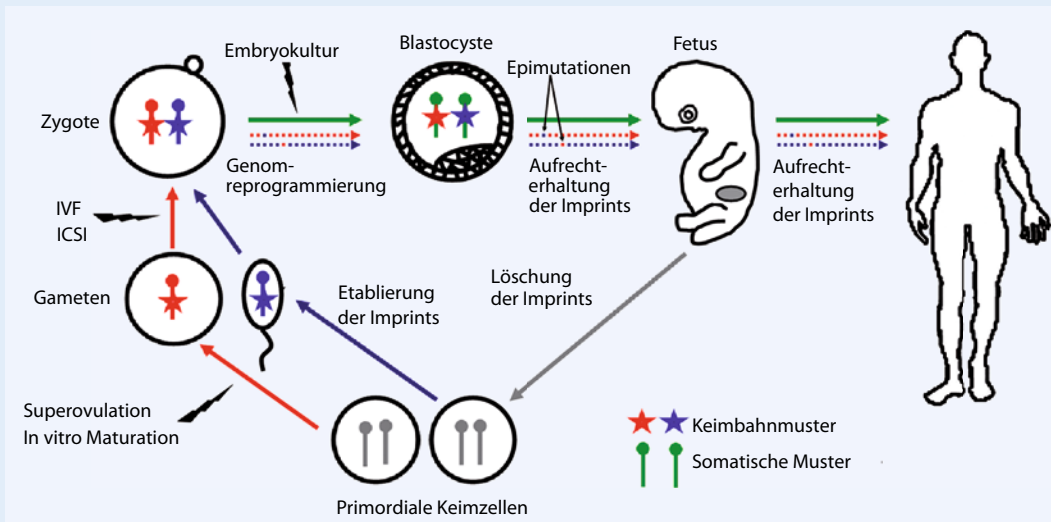


Abb. 1 ▲ Epigenetischer Reprogrammierungszyklus. In der väterlichen bzw. mütterlichen Keimbahn wird das gesamte Genom elternspezifisch (*blau* bzw. *rot*) modifiziert. In der Zygote treffen 2 sehr unterschiedliche Epigenome aufeinander. Während der Präimplantationsphase werden die beiden Keimbahngenome für die somatische Entwicklung reprogrammiert. Mit Ausnahme der geprägten Gene werden die Keimbahnmuster durch auf beiden Chromosomen identische somatische (*grüne*) Methylierungsmuster ersetzt. In den primordialen Keimzellen der fetalen Keimbahn werden sämtliche (somatische und Keimbahn)muster gelöscht. *IVF* In-vitro-Fertilisation; *ICSI* intrazytoplasmatische Spermieninjektion

hen [1, 8]. Da Imprintingkrankheiten sehr selten sind, bleibt das absolute Risiko für ein BWS oder AS nach ART jedoch gering (etwa 1:4000). Da die Fallzahlen insbesondere in den frühen Studien klein sind, ist die Abschätzung des ART-bedingten Risikos schwierig. Populationsbasierte Folgestudien [2, 3] finden zumindest keine stark erhöhten Inzidenzen für Imprintingkrankheiten nach ART. Da in verschiedenen Ländern z. T. sehr unterschiedliche ART-Protokolle (z. B. Embryokulturmedien mit oder ohne Serum) benutzt wurden, müssen die epigenetischen Risiken auch nicht notwendigerweise überall gleich sein. Es fällt auf, dass ART nur mit BWS und AS assoziiert ist, während andere Imprintingkrankheiten (z. B. PWS, Silver-Russel-Syndrom, maternale und paternale UPD14, Pseudohypoparathyreoidismus 1b und transienter neonataler Diabetes) nach ART nicht gehäuft beobachtet werden. Allerdings sind diese Krankheiten so selten, dass nur wenige Fälle das Bild verändern können.

Bei ART-Kindern mit BWS oder AS liegt der Krankheitsentstehung ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde, nämlich die abnormale Hypomethylierung eines normalerweise methylierten mütterlichen Allels [8]. Bei einem Teil von BWS-Kindern ist die Hypomethylierung

nicht auf die BWS-DMR2 (*LIT1*) in Chromosom 11p15 beschränkt, sondern betrifft auch geprägte Gene auf anderen Chromosomen [14], d. h. es liegt ein Hypomethylierungssyndrom vor. Das sensitive Zeitfenster für ART-induzierte Epimutationen beim Menschen ist unbekannt. Da die größten epigenetischen Veränderungen unmittelbar nach der Befruchtung stattfinden, kann vermutet werden, dass die Zygote besonders anfällig für stochastische oder durch Umweltfaktoren induzierte Reprogrammierungsfehler ist. Aus epigenetischer Sicht wäre eine möglichst kurze Embryokultur günstig, allerdings hat die Kultivierung bis zur Blastozyste den Vorteil, dass man Embryonen, die bereits in frühen Entwicklungsstadien arretieren, vom Transfer ausschließt. In den meisten Studien zeigt ICSI gegenüber IVF keine erhöhten Risiken, für Aussagen zur IVM sind die Fallzahlen zu klein. Bisher gibt es auch keine aussagekräftigen Daten, wie sich verschiedene Protokolle zur ovariellen Stimulation oder verschiedene Embryokulturbedingungen auf das menschliche Epigenom auswirken.

Während in Tiermodellen eindeutig belegt ist, dass durch ART selbst Epimutationen induziert werden, könnte beim Menschen auch die Subfertilität der Eltern für das Risiko, ein ART-Kind mit Imprin-

tingkrankheit zu bekommen, (mit)verantwortlich sein. In Spermaproben von subfertilen/infertilen Männern mit auffälligen Spermogrammen werden gehäuft abnormale Methylierungsmuster in geprägten Genen gefunden, die einen Indikator für Reprogrammierungsdefekte in der männlichen Keimbahn darstellen. Teilweise findet man ähnliche Epimutationen (z. B. eine Hypomethylierung des väterlich methylierten *H19*-Gens) in Spermaproben und Aborten nach IVF/ICSI mit diesen Spermien [13]. Da geprägte Gene nach der Befruchtung ihre Keimbahnmuster beibehalten, scheint es plausibel, dass Keimbahnepimutationen über das Spermium (bzw. die Eizelle) in den Embryo transferiert werden und zu den ART-assoziierten medizinischen Problemen beitragen. In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich interessant, väterliche Spermaproben von Kindern mit BWS oder anderen Imprintingdefekten epigenetisch zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurden einige systematische Methylierungsanalysen an Abortmaterial oder Geweben von neugeborenen ART-Kindern durchgeführt. Ein Vergleich der Methylierungsmuster von 7 geprägten und 3 nichtgeprägten Genen bei 42 Aborten/Fehlgeburten nach ART und 29 nach spontaner Konzeption er-

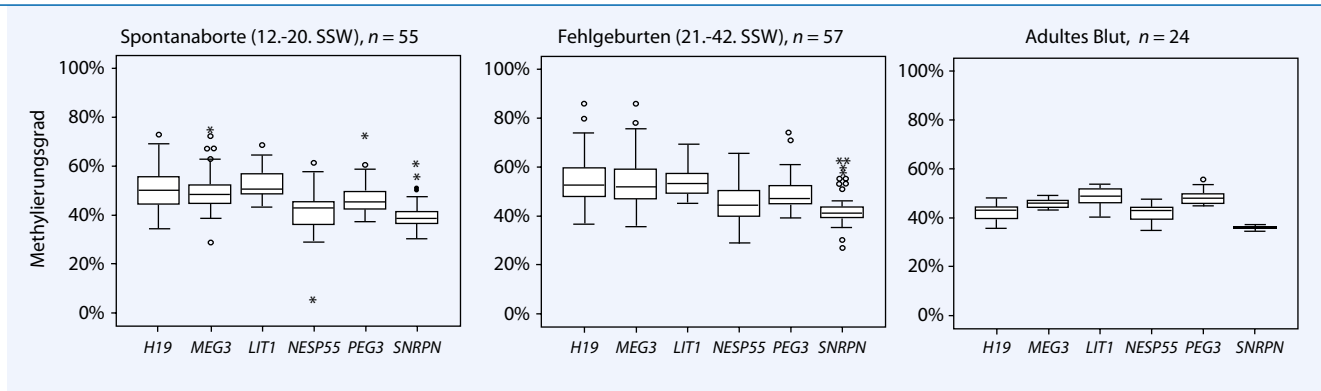


Abb. 2 ▲ Methylierung von 2 väterlich methylierten (*H19* und *MEG3*) und 4 mütterlich methylierten geprägten Genen (*LIT1*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN*) in 55 Spontanaborten (fetale Muskeln), 57 Fehlgeburten (fetale Muskeln) und 24 adulten Blutproben. *Box Plots* Verteilung der Methylierungswerte in den verschiedenen Gruppen, *horizontale Linie in der Box* Median. *Box* Bereich, in dem 50% der Werte liegen (25–75. Perzentile). Die *Länge der Antennen* beträgt maximal das 1,5fache des Interquartilabstands (*Länge der Box*). *Kreise* Ausreißer (Werte außerhalb der Antennen), *Sterne* extreme Ausreißer (Werte außerhalb des 3-fachen Interquartilabstands). Methylierungswerte innerhalb der Antennen werden als normal angesehen, Ausreißer und extreme Ausreißer repräsentieren potenzielle Reprogrammierungsdefekte. (Weitere Erläuterung s. Text)

gab keine erhöhte Rate von abnormalen Methylierungswerten in der ART-Gruppe [20]. Für einige Gene, z. B. *LIT1* konnten aber innerhalb der natürlichen DNA-Methylierungsvariabilität signifikante Gruppenunterschiede zwischen ART und Nicht-ART nachgewiesen werden. Kanber et al. [11] untersuchten 6 geprägte Gene bei 19 ICSI-Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht und 29 nicht durch ART gezeugten Kindern mit normalem Geburtsgewicht. Eines der ICSI-Kinder zeigte eine *LIT1*-Hypermethylierung. Tierling et al. [18] untersuchten 10 Loci in 77 ICSI-, 35 IVF- und 73 spontan gezeugten Kindern. In allen Gruppen wurde eine ähnliche DNA-Methylierungsvariabilität gefunden, lediglich für *MEST* gab es geringfügige Unterschiede. Bei einem genomweiten Vergleich von 10 ART- und 13 natürlich gezeugten Neugeborenen wurden in einer Reihe von geprägten und nichtgeprägten Genen ebenfalls geringfügige, aber statistische signifikante Methylierungsunterschiede gefunden [12].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durchschlagende Epimutationen (komplette Demethylierung oder Hypermethylierung einer DMR), die mit spezifischen Krankheitsbildern assoziiert sind, auch bei durch ART gezeugten Schwangerschaften/Kindern selten sind. Wegen der sehr niedrigen Inzidenzen von Imprintingkrankheiten ist es bisher aber nicht möglich, selbst ein deutlich erhöhtes Risiko auszuschließen. Die Tatsache, dass sich quantitative Methylierungs-

unterschiede (relative Hypo- oder Hypermethylierung, meist im Prozentbereich) innerhalb der normalen Methylierungsvariabilität nachweisen lassen, spricht dafür, dass ART das Epigenom der nächsten Generation und damit möglicherweise die phänotypische Variation und Krankheits susceptibility beeinflussen.

Epigenetik von Aborten

Spontanaborte sind ein häufiges medizinisches Problem, mindestens 10% aller klinisch erkannten Schwangerschaften gehen auf diese Weise verloren. Die Hauptursache für Aborte im ersten Schwangerschaftsdrittel sind Aneuploidien aufgrund von mütterlichen Meiosefehlern. Gendefekte (z. B. Trombophilien), endokrine und immunologische Faktoren, Uterusanomalien, Umweltfaktoren und Infektionen spielen ebenfalls eine Rolle. Nach wie vor bleibt aber ein großer Anteil der Fälle ungeklärt.

Bei einer systematischen epigenetischen Analyse von fetalen Muskeln (■ **Abb. 2**) zeigten 2 von 55 Spontanaborten und 10 von 57 Fehlgeburten eine Hypermethylierung in mehreren (sowohl väterlich als auch mütterlich) geprägten Genen [15]. Dies spricht für Störungen des bisher unbekanntes Mechanismus, der die unmethylierten Allele nach der Befruchtung vor De-novo-Methylierung schützt. Man kann allerdings die Möglichkeit nicht ausschließen, dass es sich bei diesen Methylierungsstörungen nicht um

die Ursache, sondern eine Folge des intrauterinen Fruchttods handelt. Auffällig ist darüber hinaus, dass über 80% der Aborte/Fehlgeburten mit abnormalen Methylierungsmustern männlich waren. Eine erhöhte Suszeptibilität von männlichen Embryonen für Reprogrammierungsdefekte könnte zu der erhöhten Mortalität von männlichen Feten beitragen. Zum Zeitpunkt der Befruchtung gibt es einen Überschuss an männlichen Embryonen, der durch eine erhöhte Verlustrate von männlichen Schwangerschaften bis zur Geburt teilweise kompensiert wird. Aborte/Fehlgeburten können wie andere komplexe Krankheiten auch durch ein Schwellenwertmodell erklärt werden. Der Phänotyp manifestiert sich, wenn die Summe abnormaler Methylierungswerte (Epimutationen in geprägten und/oder nichtgeprägten Genen) eine kritische Schwelle überschreitet [15, 20]. Neben epigenetischen Ursachen tragen auch genetische und Umweltfaktoren zu der Ätiopathogenese bei.

Die Gene für die systematische epigenetische Analyse von fetalen Muskeln in ■ **Abb. 2** wurden in erster Linie ausgewählt, weil deren Imprintingkontrollregionen und die funktionellen Auswirkungen von abnormalen Methylierungsmustern gut charakterisiert sind. Wie ■ **Abb. 2** zeigt, findet man in Spontanaborten und Fehlgeburten im Vergleich zu adulten Blutproben eine breitere Streuung der Methylierungswerte (erhöhte epigenetische Variabilität) und einen signifikant

Hier steht eine Anzeige.



(χ^2 -Test, $p < 0,05$) höheren Anteil an Ausreißern. Wegen der Gewebsspezifität von Methylierungsmustern ist Blut keine ideale Kontrolle, allerdings sind fetale Muskeln von normalen Schwangerschaften einer Analyse nicht zugänglich.

Fazit für die Praxis

Untersuchungen an genetisch identischen Individuen, z. B. monozygoten Zwillingen, isogenen Mäusen oder klonierten Tieren, haben eindrucksvoll gezeigt, dass nicht allein die Gene und die Umwelt für den Phänotyp verantwortlich sind. Eine dritte Quelle für die phänotypische Variabilität und die unterschiedliche Krankheits susceptibility bildet das Epigenom. In der Gametogenese und frühen Embryogenese finden dramatische epigenetische Reprogrammierungsprozesse statt, die eine enorme epigenetische Variabilität erzeugen, die sich nicht nur in Keimzellen und frühen Embryonen, sondern auch in der weiteren Entwicklung und im späteren Leben auswirken kann. Die Bedeutung von Epimutationen wurde bisher nur für einige seltene Imprintingkrankheiten und bei der Krebsentstehung im Detail erforscht. Man muss aber davon ausgehen, dass epigenetische Veränderungen auch für eine Vielzahl von anderen, relativ unspezifischen und/oder spätmanifestierenden Krankheiten (insbesondere Adipositas, Diabetes, Bluthochdruck, Psychosen und Verhaltensstörungen) eine Rolle spielen. Man sollte sich stets bewusst sein, dass bei der Therapie der menschlichen Infertilität in sensitive Phasen der epigenetischen Genomreprogrammierung eingegriffen wird und dass wir die ablaufenden Prozesse und die möglichen Konsequenzen bisher nur sehr unvollständig verstehen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. T. Haaf



Institut für Humangenetik
Biozentrum
Julius-Maximilians-Universität
Am Hubland, 97074 Würzburg
thomas.haaf@uni-wuerzburg.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Amor DJ, Halliday J (2008) A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 23:2826–2834
2. Bowdin S, Brueton L, Allen C et al (2007) A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 22:3237–3240
3. Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J et al (2007) Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 22:2476–2480
4. Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148–1159
5. Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C et al (2007) Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 7:116
6. Hatchwell E, Gready JM (2007) The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease. *Trends Genet* 23:588–595
7. Horsthemke B (2006) Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:45–59
8. Horsthemke B, Ludwig M (2005) Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 11:473–482
9. Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS (2008) Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res* 647:77–85
10. Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245–254
11. Kanber D, Buiting K, Zeschnick M et al (2009) Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *Eur J Hum Genet* 17:22–29
12. Katari S, Turan N, Bibikova M et al (2009) DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 18:3769–3778
13. Kobayashi H, Hiura H, John RM et al (2009) DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 17:1582–1591
14. Lim D, Bowdin SC, Tee L et al (2009) Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 24:741–747
15. Pliushch G, Schneider E, Weise D et al (2010) Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am J Pathol* 176:1084–1090
16. Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089–1093
17. Shi W, Haaf T (2002) Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63:329–334
18. Tierling S, Souren NY, Gries J et al (2010) Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human. *J Med Genet* 47:371–376
19. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG et al (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153–154
20. Zechner U, Pliushch G, Schneider E et al (2010) Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception. *Mol Hum Reprod* 16:704–713