

# Эпигенетическое репрограммирование ДНК в гаметах и доимплантационных эмбрионах человека

Тихонов А.В.<sup>1,2,3</sup>, Ефимова О.А.<sup>1,2</sup>, Пендина А.А.<sup>1,2,3</sup>, Баранов В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта; 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3, тел./факс 8(812)3280262, e-mail: tixonov5790@gmail.com

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

<sup>3</sup> Диагностический центр (медико-генетический), 194044 Санкт-Петербург, ул. Тобольская, д. 5.

В обзоре приведены новые данные об эпигенетическом репрограммировании генома в гаметогенезе и доимплантационном эмбриогенезе человека. Суммированы современные представления о динамических изменениях метилирования цитозина ДНК — ключевого механизма эпигенетической регуляции генома — в гаметах и у эмбрионов доимплантационных стадий развития. Рассмотрены различия в динамике и механизмах репрограммирования импринтированных и неимпринтированных участков ДНК в мужских и женских половых клетках.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, активное деметилирование ДНК, эпигенетическое репрограммирование генома, эмбриогенез человека.

**Финансирование.** Информационно-аналитическая работа по динамике репрограммирования у эмбрионов и аномалиям развития, связанными с нарушениями репрограммирования, выполнена А.В. Тихоновым, А.А. Пендиной, В.С. Барановым при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 16-04-01438\_a). Информационно-аналитическая работа по динамике репрограммирования в гаметах выполнена О.А. Ефимовой при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 16-34-60107\_мол\_a\_дк). А.В. Тихонов и О.А. Ефимова являются получателями стипендии Президента РФ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Epigenetic reprogramming in human gametes and preimplantation embryos

Tikhonov A.V.<sup>1,2,3</sup>, Efimova O.A.<sup>1,2</sup>, Pendina A.A.<sup>1,2,3</sup>, Baranov V.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Mendeleevskaya line, 3, 199034, St. Petersburg, Russia; tel. 8 (812)3280262, e-mail: tixonov5790@gmail.com

<sup>2</sup> St.Petersburg State University, Universitetskaya nab.7/9, 199034, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Center for Medical Genetics, Tobolskaya ul., 5, 194044, St. Petersburg, Russia

In this review, we present recent data on the epigenetic reprogramming in human gametogenesis and preimplantation embryogenesis. We summarize current knowledge on the dynamic changes of DNA methylation — the key mechanism of genome epigenetic regulation — in gametes and preimplantation embryos. We also discuss the differences in dynamics and mechanisms of imprinted and non-imprinted regions reprogramming in male and female germ cells.

**Key words:** DNA methylation 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine, active DNA demethylation, epigenetic genome reprogramming, human embryogenesis.

### Введение

Вопрос о механизмах дифференциальной экспрессии генов в индивидуальном развитии человека представляется крайне актуальным. Убедительно доказано, что ключевая роль в этом принадлежит эпигенетическим маркерам, которые уснавливаются в ходе эмбрионального развития и обеспечивают репрограммирование генома. Суть эпигенетического репрограммирования заключается в удалении старых эпигенетических модификаций и установления новых, соответствующих определенному периоду онтогенеза. Основные процессы, связанные с эпигенетическим репрограммированием генома, у млекопитающих и человека происходят в процессе гаметогенеза и во время делений дробления

оплодотворенной яйцеклетки, а также последующей дифференцировки эмбриональных органов и тканей (рисунок) [1, 2].

Ключевым механизмом эпигенетической регуляции эмбрионального развития является подавление экспрессии генов путем метилирования цитозина CpG-динуклеотидов в промоторных районах. Участие метилирования ДНК доказано во многих биологических процессах, включая феномен геномного импринтинга, инактивацию хромосомы X и репрессию мобильных элементов генома [3–6].

Процесс метилирования ДНК обратим. Удаление метильных групп из ДНК (деметилирование) может осуществляться двумя способами: пассивно и активно.

Пассивное деметилирование наблюдается в делящихся клетках и происходит вследствие отсутствия метилазной активности при репликации ДНК. Новосинтезированная нить ДНК не метилируется по образцу старой, что ведет к полуметилированию (гемиметилированию) дочерней ДНК. Следующий раунд репликации при отсутствии метилазной активности приводит к образованию уже полностью деметилированной ДНК [7]. Активное деметилирование представляет собой ферментативное превращение 5-метилцитозина (5mC) в цитозин независимо от процесса репликации [8–10]. Существует несколько механизмов активного деметилирования ДНК [11]. Один из них связан с семейством белков TET (Ten-Eleven-Translocation), которые гомологичны белкам трипаномы JBP1 и JBP2 — оксидазам метильной группы тимина [8]. В семейство TET входят три белка: TET1, TET2 и TET3. Все они катализируют превращение 5mC в 5-гидроксиметилцитозин (5hmC) [12]. Белки семейства TET также катализируют последовательное преобразование 5hmC в 5-формилцитозин (5fC) и в 5-карбоксилцитозин (5caC) [13, 14]. Для завершения процесса активного деметилирования необходимо удаление образовавшихся производных форм 5mC. В этом процессе принимает участие фермент эксцизионной репарации TDG, который распознает и вырезает из цепи ДНК 5fC и 5caC, не затрагивая при этом 5hmC [15].

Феномен эпигенетического репрограммирования генома хорошо изучен на модельных объектах, в первую очередь на мышах [16, 17]. Однако многие ключевые процессы эмбриогенеза являются видоспецифичными [18–21]. Это не позволяет экстраполировать данные, полученные на модельных объектах, непосредственно на человека. Динамика метилирования и деметилирования ДНК гамет и эмбрионов человека до недавнего времени оставалась практически не изученной из-за труд-

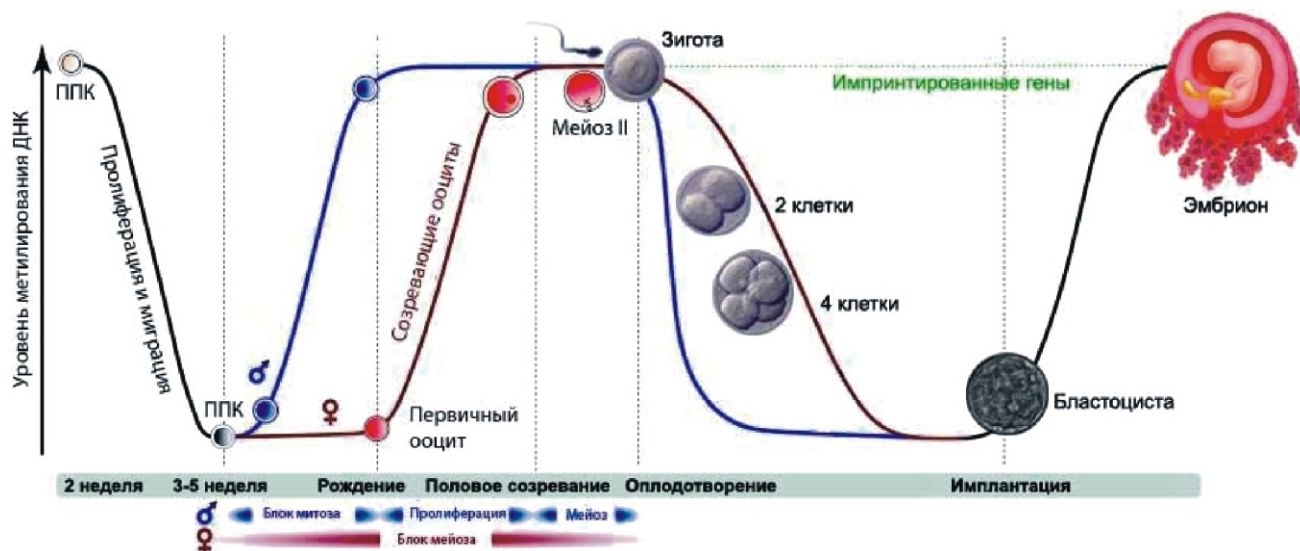
нодоступности материала. Однако новые исследования эпигенома гамет и эмбрионов доимплантационных стадий развития позволили получить важную информацию о репрограммировании генома в онтогенезе человека.

### Деметилирование ДНК первичных половых клеток

ДНК первичных половых клеток (ППК) человека гиперметилирована. Первый раунд деметилирования ДНК происходит во время миграции ППК в мезенхиму половых валиков формирующейся гонады (рисунок) [22]. Этот процесс имеет крайне важное значение для стирания родительских импринтов, реактивации хромосомы X, реорганизации хроматина и активации программы транскрипции мейоза.

Эпигенетическое репрограммирование генома охватывает изменения на уровне как ДНК, так и хроматина. Деметилирование связано с изменениями в количестве и распределении метилированного лизина в 9-м положении гистона H3 (H3K9me). ДНК-связывающие белки KAP1/ZFP57 способны привлекать метилазы H3K9 [23]. Таким образом, метилирование гистонов не только обеспечивает установление репрессированного состояния хроматина в отсутствие метилирования ДНК [24], но, по-видимому, может регулировать метилирование специфических сайтов в геноме. Связь между этими двумя процессами обеспечивает белок UHRF1 — фактор, необходимый для работы метилтрансферазы DNMT1 [25]. UHRF1 способен связывать метилированную ДНК через домен SRA с метилированным лизином в гистоне H3 [26, 27].

Согласно исследованиям метилирования генома (метилома) методом полногеномного бисульфитного секвенирования (WGBS — whole-genome bisulfite sequencing), геном мужских ППК гипометилирован на



Изменения уровня метилирования ДНК в гаметогенезе и доимплантационном развитии эмбрионов человека.

7—8 неделях развития: доля метилированного цитозина от общего числа цитозина в исследованной последовательности ДНК составляет всего 20—30% [28—30]. Снижение уровня метилирования происходит постепенно, достигая минимального значения (4—12%) к 9—13 неделе [28, 29]. Такой же уровень метилирования наблюдали в экспериментах с ППК, полученными из эмбриональных стволовых клеток *in vitro* [31]. Согласно данным одних исследователей, минимальный уровень метилирования сохраняется до 19 недели [29]. Согласно другим авторам, к 20 неделе развития уровень метилирования повышается до 41,5%, что свидетельствует о включении процесса метилирования *de novo* [30].

В женских ППК на 5—6 неделях эмбрионального развития отмечают низкий уровень метилирования (16%), который к 7 неделе снижается до минимального (~5%) и остаётся низким на 11 неделе [28, 29]. В то же время, в другом исследовании наблюдали повышенный уровень метилирования ДНК вплоть до 8 недели (38%) [30]. В 16—17 недель развития в женских ППК метилирование ДНК все еще остается на низком уровне и составляет 11—17% [29, 30]. Таким образом, деметилирование ДНК ППК человека начинается, вероятно, до 5—6 недели [28] и продолжается в течение 7—10 недель развития.

Быстрое снижение уровня метилирования ДНК в течение относительно короткого срока, позволяет предположить наличие активного деметилирования. В женских ППК в течение 4—9 недель развития и в мужских ППК в течение 8—13 недель развития отмечено высокое содержание белка TET1. Примечательно, что соматические клетки предпочтительно экспрессируют короткую изоформу TET1, лишённую N-концевого домена СХХС. Экспрессия полноразмерного TET1 происходит только в ранних эмбрионах и ППК и требуется для удаления импринтов в ППК [32]. Помимо этого в течение 4—11 недель развития как в женских, так и в мужских ППК активно экспрессируются компоненты системы эксцизионной репарации (BER) [28—30, 33], которая также участвует в активном деметилировании ДНК. В подтверждение вышесказанному, продукт окисления 5mC — 5hmC — обнаружен в женских ППК на 4-й неделе развития, но его уровень минимален на 7—10 неделях эмбриогенеза человека [28, 29]. Содержание 5hmC в мужских ППК снижается до ~2% к 10 неделе развития [29].

Деметилирование ДНК в ППК может также происходить пассивно, поскольку DNMT3A, которая является основным ферментом метилирования *de novo*, и ДНК-связывающий белок UHRF1 в женских ППК на 4—9 неделях развития и в мужских — на 8—11 неделях развития не обнаружены [28, 30]. Пассивный механизм удаления паттернов 5mC и 5hmC косвенно подтверждает отсутствие в ППК других производных цитозина (5fC, 5caC), а также тиминовой ДНК-гликозилазы TDG, которая является ключевым ферментом эксцизионной репарации [28].

### Деметилирование импринтированных участков ДНК ППК

В геноме человека есть особая группа генов со специфическим паттерном метилирования, для которых характерен геномный импринтинг. Геномный импринтинг — это эпигенетический феномен, при котором экспрессия гена ограничивается только одним из родительских аллелей [5, 34]. Импринтированные гены организованы в кластеры, экспрессия которых зависит от метилирования CpG-динуклеотидов, организованных в дифференциально метилированные районы (ДМР) [35]. Делеции или нарушения характера метилирования ДМР приводят к исчезновению эффекта геномного импринтинга [36].

Информация о времени деметилирования импринтированных доменов в ППК противоречива. Некоторые данные свидетельствуют о том, что деметилирование импринтированных доменов проходит по той же схеме, что и глобальное деметилирование. В женских ППК к 5—6 неделе развития импринтированные ДМР метилированы на 20—40% (метилирован только один родительский аллель, поэтому максимальный уровень метилирования составляет 50%). Это свидетельствует о том, что в некоторых импринтированных ДМР происходит деметилирование ДНК [28]. Деметилирование импринтированных ДМР продолжается с 10 до 16 недель развития в женских и до 19 недели — в мужских ППК [28, 29]. Однако ДМР генов *IGF2R* и *PEG10* остаются метилированными вплоть до 17—19 недели развития [28, 29].

Согласно данным других исследователей, деметилирование импринтированных ДМР в ППК отстаёт на несколько недель от глобального деметилирования [30, 33]. В мужских ППК ДМР генов *H19*, *GTL2*, *PEG3* и *KCNQ1OT1* гиперметилированы на 9 и 16 неделях развития. В ДМР генов *PEG3* и *KCNQ1OT1* уровень метилирования снижается на 16—17 неделях, в ДМР гена *H19* — на 16—20 неделях, а ДМР гена *GTL2* гиперметилирован на 17—20 неделях [33]. На 24 неделе в просперматогониях ДМР генов *H19* и *MEST* неметилированы, что свидетельствует о стирании импринтов в этих генах между 20 и 24 неделями развития [37]. В женских ППК ДМР генов *H19*, *GTL2* и *MEST* гиперметилированы, в отличие от ДМР гена *KCNQ1OT1*, который деметилирован на 9—10 неделях [33]. Деметилирование ДМР гена *H19* завершается к 14—15 неделе, а ДМР генов *GTL2* и *KCNQ1OT1* — к 16—17 неделям [33]. Таким образом, деметилирование ДМР в женских ППК завершается к 16 неделе развития, а в мужских — только к 20 неделе [30]. Деметилирование импринтированных ДМР происходит позже, чем неимпринтированных участков ДНК ППК. Подобная задержка деметилирования наблюдается не только у человека, но и у мышей [38].

Деметилирование импринтированных доменов происходит активным путём. Окисление 5mC до 5hmC было показано для гена *PEG3* на 12—17 неделях развития в мужских ППК и на 14—16 неделях в женских ППК [28, 33]. Задействован ли при этом пассивный путь деметилирования, неизвестно.

### Реметилирование неимпринтированных участков ДНК половых клеток

Метилирование *de novo* (реметилирование) ДНК половых клеток происходит на поздних стадиях гаметогенеза, асинхронно в мужских и женских половых клетках. В семенниках число клеток без 5mC постепенно уменьшается в период с 15 по 40 неделю беременности, и ДНК практически всех мужских гамет при рождении метилирована [39]. Уже к 19 неделе развития по данным одних авторов в семенниках начинается процесс метилирования *de novo*, и уровень метилирования повышается до 41,5% [30]. Согласно другим наблюдениям, уровень метилирования ДНК гамет на этом сроке беременности все еще очень низок и составляет около 6,5% [29]. Необходимы дополнительные исследования метилирования ДНК эмбриональных зародышевых клеток, чтобы точно определить динамику реметилирования. В зрелых сперматозоидах уровень метилирования цитозина варьирует от 54% до 75% [40–43].

В отличие от мужских гамет, ооциты I порядка в примордиальных фолликулах остаются неметилированными внутриутробно и в течение 3 лет после рождения [39]. Метилирование цитозина происходит во время роста ооцитов. После стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle — GV)/стадии метафазы первого деления мейоза (MI) к стадии метафазы второго деления мейоза (MII) метилирование ДНК растущего ооцита достигает 50–55% глобального уровня метилирования [40, 43]. Общий уровень метилирования CpG-островков примерно одинаков в сперматозоидах (~12%) и в ооцитах (~17%) [44].

### Реметилирование импринтированных участков ДНК половых клеток

Изучение реметилирования импринтированных участков ДНК клеток сперматогенного ряда проведено только на биоптатах яичка взрослых индивидов. Установлено, что ген *H19* метилирован в 75% зрелых сперматогониев, во всех премейотических сперматоцитах [37], во всех сперматогониях типа A [45]. Этот ген также метилирован в первичных и вторичных сперматоцитах, в круглых и удлинённых сперматидеях и в зрелых сперматозоидах [37, 45–49]. Таким образом, метилирование импринтированного гена *H19* устанавливается в митотически делящихся зрелых сперматогониях и сохраняется в премейотических, постмейотических, дифференцирующихся и зрелых клетках сперматогенного ряда в семенниках взрослых индивидов [37, 45]. Транскрипты *DNMT1* и *DNMT3A* обнаружены в сперматогониях типа A, сперматоцитах I и II порядка, круглых сперматидеях и сперматозоидах, транскрипты *DNMT3B* присутствуют в сперматогониях типа A, сперматоцитах I порядка и круглых сперматидеях, в то время как все три транскрипта отсутствуют в удлинённых сперматидеях. Ферменты DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, в свою

очередь, обнаружены во всех клетках семенников взрослых индивидов [45]. В отличие от мышей, у человека транскрипт *DNMT3L* не обнаружен ни в одном из типов сперматогенных клеток [45]. Таким образом, ДНК-метилтрансфераза-подобный белок DNMT3L не участвует в метилировании *de novo* импринтированных генов у человека.

Метилирование импринтированных доменов в оогенезе происходит позже, чем в сперматогенезе [50–55]. Некоторые исследования показали, что метилирование импринтированных генов *SNRPN* и *KCNQ1OT1* уже завершено к стадии зародышевого пузырька [53, 55, 56]. Однако в другом исследовании было показано, что ген *KCNQ1OT1* метилируется постепенно во время мейотического созревания, так как уровень метилирования составляет 62%, 67% и 90% на стадиях развития ооцитов GV, MI и MII соответственно [51]. В оогенезе транскрипты *DNMT3A* обнаружены на стадии примордиальных фолликулов и вплоть до ооцитов на стадии MII. Транскрипты *DNMT3B* обнаружены во вторичных фолликулах и в MII ооцитах [57]. Ферменты DNMT3A и DNMT3B локализованы в основном в цитоплазме GV, MI и MII ооцитов [57]. Однако метилирование ооцитов до стадии GV до сих пор почти не изучено. Предполагается, что метилирование *de novo* должно происходить преимущественно на ранних стадиях оогенеза. Транскрипт гена *DNMT3L* [40, 43, 58, 59] и белок DNMT3L [57] не обнаружены в фолликулах и ооцитах человека, что исключает роль гена *DNMT3L* в метилировании *de novo*.

К моменту оплодотворения паттерны метилирования как в мужских, так и в женских гаметах очень сходны. Исключение составляют только импринтированные гены, эпигенетические метки которых устанавливаются в соответствии с полом особи [22].

### Динамика метилирования ДНК у доимплантационных зародышей

В период доимплантационного развития человека происходит активная эпигенетическая реорганизация генома. При этом изменяются исходные профили метилирования ДНК гамет, и устанавливается собственный эмбриональный паттерн метилирования ДНК, направляющий первичную дифференцировку бластомеров и их последующее развитие во всё многообразие типов клеток и тканей организма [60].

Эпигенетическое репрограммирование начинается на стадии зиготы. Сразу после оплодотворения яйцеклетки происходит деконденсация хроматина сперматозоида, в котором протамины заменяются на гистоны, и формируется нуклеосомная структура хроматина, способствующая транскрипции и другим процессам, характерным для соматических клеток [61].

Вскоре после оплодотворения начинается деметилирование ДНК [18, 43, 62–66]. В этом процессе задейст-

вованы механизмы как активного, так и пассивного деметилирования [67]. В зиготах человека хромосомы отцовского происхождения характеризуются низким содержанием 5mC и высоким содержанием 5hmC по сравнению с хромосомами материнского происхождения [18, 62—65, 68, 69]. Такая асинхронность метилирования родительских геномов свидетельствует о том, что активное деметилирование в зиготе в большей степени характерно для генетического материала, унаследованного от отца. Катализирует активное деметилирование в зиготе фермент ТЕТ3, который в большом количестве присутствует в ооцитах и зиготах. Несмотря на высокий уровень ТЕТ3, содержание 5hmC в хроматине материнского происхождения значительно ниже, по сравнению с отцовским. До конца не ясно, каким образом материнский геном избегает интенсивного ферментативного деметилирования, и как фермент ТЕТ3 узнаёт отцовский геном. Известно, что в защите материнского генома от активного деметилирования участвует белок DPPA3 (developmental pluripotency-associated 3, также известен как Stella и PGC) [70]. Ген *DPPA3* экспрессируется в яйцечке [71, 72]. При отсутствии DPPA3 в материнском геноме регистрируют наличие 5hmC. Тем не менее, конкретная роль и механизм действия DPPA3 в защите материнской ДНК от ферментативного деметилирования ещё не определены. Ген *ZFP57* (zinc-finger protein 57) также участвует в установлении специфического метилирования в геноме зародыша и играет важную роль в поддержании материнского и отцовского паттернов метилирования у ранних эмбрионов [73, 74].

На метафазных хромосомах зигот 5hmC локализован сегментспецифично [65]. В хромосомах мужских пронуклеусов наблюдается преимущественная локализация 5hmC в R-сегментах, имеющих четко визуализируемые границы. В хромосомах из женских пронуклеусов районы, обогащенные 5hmC, четко не идентифицируются. На хромосомах как из мужских, так и женских пронуклеусов сильнее всего гидроксиметилированы T-сегменты [65] — подгруппа R-сегментов, наиболее обогащенная GC-парами и генами [75, 76]. Прицентромерные блоки всех хромосом, в том числе и самые крупные гетерохроматиновые блоки 1q12, 9q12, 16q11.2 и Yq12 не содержат 5hmC. В отличие от 5hmC, 5mC распределён вдоль плеч хромосом почти равномерно, с более высоким уровнем метилирования в теломерных районах. Все прицентромерные блоки гетерохроматина, включая 1q12, 9q12, 16q11.2 гипометилированы или неметилированы [64]. Таким образом, 5hmC и 5mC распределены преимущественно в эухроматиновых районах метафазных хромосом зиготы [65], а прицентромерный гетерохроматин гипометилирован и негидроксиметилирован на протяжении всего периода доимплантационного развития [64, 65]. Такой статус метилирования цитозина, по всей вероятности, важен как для регуляции активности генов [77], так и для формирования пространственно-структурной организации ядра [3, 78]. В то же время

5hmC, скорее всего, вовлечен в регуляцию экспрессии генов, так как гидроксиметилирование характерно исключительно для R-сегментов.

Можно предполагать, что появлению такого специфичного рисунка гидроксиметилирования хромосом предшествовал сегментспецифический паттерн метилирования ДНК. При запуске активного деметилирования, расположенный преимущественно в R-сегментах 5mC, ферментативными системами трансформируется в 5hmC. Это приводит к гомогенному распределению метилированной ДНК вдоль плеч хромосом и сегментспецифичной локализации гидроксиметилированной ДНК [65].

Снижение уровня метилирования ДНК метафазных хромосом продолжается при последующих делениях дробления эмбрионов человека вплоть до стадии бластоцисты. Во время делений дробления, деметилирование ДНК, вероятно, происходит преимущественно пассивным, зависимым от репликации, путём. Одна из гомологичных хромосом менее метилирована (вероятно, это отцовская хромосома), и обе родительские хромосомы подвергаются пассивному деметилированию, начиная со стадии двух клеток и до стадии бластоцисты [64, 65]. Число метафазных хромосом с асимметрично распределенным на хроматидах 5mC уменьшается со стадии 2 клеток до стадии бластоцисты, что согласуется с механизмом пассивного деметилирования ДНК, зависящего от репликации [64, 65]. К стадии бластоцисты, уровень 5mC начинает возрастать [62, 64, 65]. В бластоцисте устанавливаются специфические для внутренней клеточной массы и трофэктодермы паттерны метилирования ДНК. Распределение 5-метилцитозина на хромосомах бластоцисты становится сходным с таковым в соматических клетках — в лимфоцитах [62, 67, 69, 79, 80]. Информация о метилировании интерфазных ядер клеток внутренней массы и трофэктодермы противоречива. Согласно одним данным, интерфазные ядра клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) метилированы в меньшей степени по сравнению с ядрами клеток трофэктодермы [62]. Однако, другие авторы сообщают противоположное: трофэктодерма остаётся гипометилированной по сравнению с клетками ВКМ [81, 82]. Дифференцировка клеток ВКМ с образованием трех зародышевых листков сопровождается установлением специфичного для каждого из них характера метилирования ДНК за счёт локальных изменений. Таким образом, формируется специфический для каждого типа клеток паттерн метилирования ДНК, определяющий набор функционально активных генов и регулирующий процессы дифференцировки и развитие зародыша [6].

Подобно метилированию, паттерн гидроксиметилирования хромосом меняется с каждым делением. Появляются хромосомы с асимметричным распределением гидроксиметилированной ДНК, в которых яркий сигнал 5hmC присутствует только на одной из двух сестринских хроматид. Хроматида, содержащая меньше

5hmC, метилирована слабее. В гидроксиметилированных хроматидах наблюдали сегмент-специфичную локализацию 5hmC, не отличающуюся от таковой на стадии зиготы. Такие асимметричные (или гемигидроксиметилированные) хромосомы присутствуют на всех стадиях дробления вплоть до стадии бластоцисты [65]. На стадии двух клеток в 100% хромосом выявляли 5hmC только в одной хроматиде каждой хромосомы. При делении клетки по одной сестринской хроматиде, обогащенной 5hmC, уходит в каждую из дочерних клеток. Вновь синтезированная ДНК не содержит 5hmC, и таким образом число хромосом, обогащенных 5hmC, уменьшается вдвое после каждого клеточного цикла [83], притом, что их абсолютное число (суммарно во всех бластомерах зародыша) остается неизменным. При дальнейших делениях абсолютное число хроматид, обогащенных 5hmC, не изменяется, что приводит к постепенному снижению общего уровня гидроксиметилирования в каждом бластомере [65]. Это позволяет предположить, что потеря 5hmC происходит зависимым от репликации способом, как это было ранее доказано для 5mC. Подобная картина динамики метилирования и гидроксиметилирования описана и у мышей [83].

Таким образом, после каждого деления дробления в геноме доимплантационного зародыша человека происходят существенные изменения паттерна метилирования и гидроксиметилирования ДНК, которые отражают глобальные изменения генома зародыша, связанные с его репрограммированием и дальнейшей дифференцировкой. Деметилирование ДНК у эмбрионов человека происходит как за счет активного деметилирования с образованием 5hmC на стадии зиготы, так и за счет пассивной потери образовавшегося 5hmC, а также пассивной потери 5mC при последующих делениях дробления [65].

#### Динамика метилирования импринтированных участков ДНК в доимплантационном развитии

В отличие от глобального деметилирования ДНК на доимплантационных стадиях развития, импринтированные участки длительное время сохраняют свой «гаметический» характер метилирования [40, 41, 43].

Высокое содержание DPPA3 в ооцитах человека и других млекопитающих [41, 59, 84] предполагает консервативную роль этого белка в защите импринтированных локусов от ферментативного деметилирования ДНК в зиготе. Поддержание уровня метилирования ДНК во время делений дробления обеспечивают ооцит-специфичная DNMT1 $\alpha$  и соматическая DNMT1 $\beta$ , которые присутствуют на протяжении всего доимплантационного развития эмбриона [57, 58]. Фермент DNMT1 обладает значительной активностью в отношении неметилированной нити ДНК, причем предпочтительным субстратом для него является гемиметилированная ДНК. С DNMT1 взаимодействует белок ZFP57, распознаю-

щий шестинуклеотидные последовательности [23, 85], которые, в свою очередь, присутствуют в большинстве импринтированных доменов [23, 86]. Мутации в гене *ZFP57* у человека ведут к гипометилированию многих импринтированных участков, связанных с развитием различных заболеваний, в том числе транзиторного неонатального сахарного диабета [87].

Также влияние на метилирование импринтированных участков оказывают белки семейства NLRP. Некоторые белки этого семейства активно экспрессируются в ооцитах [88]. В частности, транскрипты *NLRP7* накапливаются в ооцитах и участвуют в эпигенетическом репрограммировании и развитии эмбриона до того как происходит активация эмбрионального генома. Мутации в материнском аллеле *NLRP7* являются причиной развития биродительского полного пузырного заноса, при котором происходит угнетение развития плода и чрезмерное разрастание трофобласта. В этом случае имеется набор хромосом как у здорового эмбриона, т.е. по одному гаплоидному набору от отца и от матери, но из-за мутации в гене *NLRP7* пузырный занос развивается по андрогенному типу [89, 90]. При этом нарушается метилирование ДМР только на материнских аллелях — они оказываются гипометилированы, в отцовских же аллелях метилирование ДМР не изменяется. Показано, что белок *NLRP7* связывается с факторами, участвующими в метилировании ДНК [91]. Другой белок того же семейства, *NLRP5*, играет важную роль в раннем эмбриогенезе: участвует в активации эмбрионального генома и деградации материнских продуктов. Мутации гена *NLRP5* вызывают мозаичное гипометилирование, влияющее как на материнский, так и на отцовский геном. Таким образом, *NLRP7* оказывает влияние на метилирование в ооците, а действие *NLRP5* может быть постзиготическим [92].

#### Заключение

Эпигенетическим модификациям, в частности 5mC и 5hmC, принадлежит важная роль в установлении и поддержании особых структурно-функциональных состояний хроматина, необходимых для корректной реализации программы индивидуального развития. Любые нарушения паттерна метилирования, индуцированные повреждающим действием экзогенных или эндогенных факторов, могут приводить к патологическим изменениям, нарушающих нормальные запрограммированные функции генома. Так, аномалии эпигенетического репрограммирования ДНК в эмбриогенезе могут быть причиной различных нарушений, в том числе аномалий развития, прерывания беременности и возникновения болезней геномного импринтинга, таких, как синдром Беквита—Видеманна [93—97], синдром Энжелмена [96, 98], синдром Прадера—Вилли [99] и синдром Сильвера—Расселла [97, 99—103].

Поэтому эта тема актуальна в свете развития и все более широкого применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В развитых странах до 4% родов, случаются вследствие применения ВРТ [104, 105]. Методы ВРТ применяются в критические фазы эпигенетического репрограммирования генома — во время гаметогенеза и доимплантационного развития. Для синдрома Беквита—Видеманна относительный риск рождения больного ребенка выше в 5,2 раза, чем в среднем в популяции. Однако связи между повышенным риском развития болезней импринтинга и применением методов ВРТ не выявлено для синдрома Прадера—Вилли и синдрома Энгельмена. Не обнаружено никаких доказательств наличия причинно-следственной связи между болезнями импринтинга и методами ВРТ. Болезни импринтинга являются следствием ошибок метилирования в сперматозоидах или ооцитах родителя [95].

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования механизмов репрограммирования генома человека в гаметогенезе и эмбриогенезе как для понимания фундаментальных проблем биологии развития, так и для решения актуальных задач медицинской генетики.

#### Список литературы

1. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007; 447: 425-432.
2. Lange UC, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays*. 2010; 32(8): 659-668.
3. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001; 293: 1089-1093.
4. Пендина АА, Гринкевич ВВ, Кузнецова ТВ, Баранов ВС. Метилирование ДНК — универсальный механизм регуляции активности генов. *Экологическая генетика*. 2004; 1(II): 27-37.
5. Пендина АА, Ефимова ОА, Кузнецова ТВ, Баранов ВС. Болезни геномного импринтинга. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2007; LVI(1): 76-83.
6. Ефимова ОА, Пендина АА, Тихонов АВ, и др. Метилирование ДНК — основной механизм репрограммирования и регуляции генома человека. *Медицинская генетика*. 2012; 11(4): 10-18.
7. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*. 2007 Feb 1; 67(3): 946-950.
8. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324: 930-935.
9. Ефимова ОА, Пендина АА, Тихонов АВ, и др. Гидроксильная форма 5-метилцитозина — 5-гидроксиметилцитозин: новый взгляд на биологическую роль в геноме млекопитающих. *Экологическая генетика*. 2014; XII(1): 3-13.
10. Ефимова ОА, Пендина АА, Тихонов АВ, Баранов ВС. Эволюция представлений о биологической роли кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в геноме млекопитающих. *Экологическая генетика*. 2016; XVI(4): 14-25.
11. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011; 146(6): 866-872.
12. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010; 466: 1129-1133.
13. He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011; 333: 1303-1307.
14. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011; 333(6047): 1229-1230.
15. Maiti A, Drohat A. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*. 2011 Oct 14; 286(41): 35334-35338.
16. Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(9): 3642-3647.
17. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*. 2011; 2: 241.
18. Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, et al. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*. 2004; 14(7): R266-7.
19. Shi W, Dirim F, Wolf E, et al. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 2004; 71: 340-347.
20. Hou J, Lei TH, Liu L, et al. DNA methylation patterns in in vitro-fertilized goat zygotes. *Reprod Fert Devel*. 2005; 17: 809-813.
21. Fulka J, Fulka H, Slavik T, et al. DNA methylation pattern in pig in vivo produced embryos. *Histochem Cell Biol*. 2006; 126: 213-217.
22. Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th edition. USA. Mosby. 2009: 541 p.
23. Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, et al. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Molecular Cell*. 2011; 44: 361-372.
24. Walter M, Teissandier A, Perez-Palacios R, Bourc'his D. An epigenetic switch ensures transposon repression upon dynamic loss of DNA methylation in embryonic stem cells. *Elife*. 2016; 5. doi: 10.7554/eLife.11418.
25. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*. 2007; 317: 1760-1764.
26. Rottach A, Frauer C, Pichler G, Bonapace IM, et al. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38: 1796-1804.
27. Fang J, Cheng J, Wang J, et al. Hemi-methylated DNA opens a closed conformation of UHRF1 to facilitate its histone recognition. *Nat Commun*. 2016; 7: 11197.
28. Tang WWC, Dietmann S, Irie N, et al. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell*. 2015; 161: 1453-1467.
29. Guo F, Yan L, Guo H, et al. The Transcriptome and DNA Methylation Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*. 2015; 161: 1437-1452.
30. Gkoutela S, Zhang KX, Shafiq TA, et al. DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. *Cell*. 2015; 161: 1425-1436.
31. von Meyenn F, Berrens RV, Andrews S, et al. Comparative principles of DNA methylation reprogramming during human and mouse in vitro primordial germ cell specification. *Dev Cell*. 2016; 39: 104-115.
32. Zhang W, Xia W, Wang Q, et al. Isoform switch of TET1 regulates DNA demethylation and mouse development. *Mol Cell*. 2016; 64(6): 1062-1073.
33. Gkoutela S, Li Z, Vincent JJ, et al. The ontogeny of cKIT+ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ

line reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 113-122.

34. Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jul 1; 3(7).

35. Macdonald WA, Mann MRW. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev.* 2014; 81: 126-140.

36. Spahn L, Barlow DP. An ICE pattern crystallizes. *Nat Genet* 2003; 35: 11-12.

37. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 2183-2187.

38. Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, et al. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *Embo J.* 2013; 32: 340-353.

39. Wermann H, Stoop H, Gillis AJM, et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol.* 2010; 221: 433-442.

40. Okae H, Chiba H, Hiura H, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004868.

41. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002440.

42. Smallwood SA, Tomizawa S-I, Krueger F, et al. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet.* 2011; 43: 811-814.

43. Guo H, Zhu P, Yan L, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature.* 2014; 511: 606-610.

44. Smith ZD, Chan MM, Humm KC, et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo : Nature : Nature Publishing Group. *Nature.* 2014; 511: 611-615.

45. Marques CJ, Joao Pinho M, Carvalho F, et al. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics.* 2011; 6: 1354-1361.

46. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 2542-2551.

47. Marques CJ, Costa P, Vaz B, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14: 67-74.

48. Sato A, Hiura H, Okae H, et al. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertil Steril.* 2011; 95: 129-34- 134.e1-4.

49. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 73-80.

50. Sato A, Otsu E, Negishi H, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human Reproduction.* 2007; 22: 26-35.

51. Khoueiry R, Khoueiry R, Ibala-Rhondane S, et al. Dynamic CpG methylation of the KCNQ10T1 gene during maturation of human oocytes. *J Med Genet.* 2008; 45: 583-588.

52. Arima T, Wake N. Establishment of the primary imprint of the HYMAI/PLAGL1 imprint control region during oogenesis. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 113: 247-252.

53. Geuns E, Hilven P, Van Steirteghem A, et al. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet.* 2006; 44: 144-147.

54. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, et al. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 352-361.

55. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2873-2879.

56. Anckaert E, De Rycke M, Smitz J. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Human Reproduction Update.* 2013; 19: 52-66.

57. Petrusa L, Van de Velde H, De Rycke M. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20: 861-874.

58. Huntriss J, Hinkins M, Oliver B, et al. Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2004; 67: 323-336.

59. Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20: 1131-1139.

60. Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science.* 2010; 330(6004): 622-627.

61. Ooi SL, Henikoff S. Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19: 257-265.

62. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction.* 2004; 128: 703-708.

63. Fulka H, Barnetova I, Mosko T, Fulka J. Epigenetic analysis of human spermatozoa after their injection into ovulated mouse oocytes. *Hum Reprod.* 2008; 23: 627-634.

64. Pendina AA, Efimova OA, Fedorova ID, et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 132: 1-7.

65. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos. *Reproduction.* 2015; 149: 223-233.

66. Iurlaro M, von Meyenn F, Reik W. DNA methylation homeostasis in human and mouse development. *Curr Opin Genet Dev.* 2017; 43: 101-109.

67. Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: R47-R58.

68. Xu Y, Zhang JJ, Grifo JA, Krey LC. DNA methylation patterns in human tripronucleate zygotes. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11(3): 167-171.

69. Баранов ВС, Пендина АА, Кузнецова ТВ, и др. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития. *Цитология.* 2005; 47(8): 723-730.

70. Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development.* 2012; 139: 15-31.

71. Payer B, Saitou M, Barton SC, et al. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol.* 2003; 13: 2110-2117.

72. Bortvin A, Goodheart M, Liao M, Page DC. Dppa3 / Pgc7 / stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol.* 2004; 4: 1-5.

73. Li X, Ito M, Zhou F, et al. A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell.* 2008; 15: 547-557.

74. Li W, Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids.* 2011; 2011: 870726.

75. Wright FA, Lemon WJ, Zhao WD, et al. A draft annotation and overview of the human genome. *Genome Biol.* 2001; 2: 1-18.



76. Musio A, Mariani T, Vezzoni P, Frattini A. Heterogeneous gene distribution reflects human genome complexity as detected at the cytogenetic level. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; 134(2): 168-171.
77. Straussman R, Neiman D, Roberts D, et al. Developmental programming of CpG islands methylation profiles in the human genome. *Net Struct Mol Biol.* 2009; 16: 571-594.
78. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 6538-6547.
79. Пендина АА, Ефимова ОА, Каминская АН, и др. Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека. *Цитология.* 2005; 47(8): 731-737.
80. Ефимова ОА, Пендина АА, Тихонов АВ, и др. Сравнительный иммуноцитохимический анализ профилей метилирования ДНК метафазных хромосом из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов человека. *Молекулярная медицина.* 2015; 3: 17-21.
81. Santos F, Hyslop L, Stojkovic P, et al. Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2010; 25(9): 2387-2395.
82. Robinson WP, Price EM. The human placental methylome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015. doi: 10.1101/cshperspect.a023044.
83. Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science.* 2011; 334: 194.
84. Goto T, Jones GM, Lolatgis N, et al. Identification and characterization of known and novel transcripts expressed during the final stages of human oocyte maturation. *Mol Reprod Dev.* 2002; 62: 13-28.
85. Anvar Z, Cammisa M, Riso V, et al. ZFP57 recognizes multiple and closely spaced sequence motif variants to maintain repressive epigenetic marks in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2015.
86. Court F, Tayama C, Romanelli V, et al. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res.* 2014; 24: 554-569.
87. Takikawa S, Wang X, Ray C, et al. Human and mouse ZFP57 proteins are functionally interchangeable in maintaining genomic imprinting at multiple imprinted regions in mouse ES cells. *Epigenetics.* 2013; 8: 1268-1279.
88. Tian X, Pascal G, Monget P. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol.* 2009; 9: 202.
89. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet.* 2006; 38: 300-302.
90. Nguyen NM, Slim R. Genetics and epigenetics of recurrent hydatidiform moles: Basic science and genetic counselling. *Curr Obstet Gynecol Rep.* 2014; 3: 55-64.
91. Mahadevan S, Wen S, Wan YW, et al. NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Hum Mol Genet.* 2013; 23(3): 706-716.
92. Soellner L, Begemann M, Mackay DJ, et al. Recent Advances in Imprinting Disorders. *Clin Genet.* 2017; 91(1): 3-13.
93. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, et al. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1338-1341.
94. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet.* 2003; 40: 62-64.
95. Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, et al. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Human Reproduction.* 2006; 21: 1009-1011.
96. Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, Vermeiden JPW, Hennekam RCM. Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Human Reproduction.* 2007; 22: 2476-2480.
97. Vermeiden JPW, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril.* 2013; 99: 642-651.
98. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, et al. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet.* 2005; 42: 289-291.
99. Chiba H, Hiura H, Okae H, et al. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Pediatr Int.* 2013; 55: 542-549.
100. Blik J, Terhal P, van den Bogaard M-J, et al. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006; 78: 604-614.
101. Chopra M, Amor DJ, Sutton L, et al. Russell-Silver syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20: 843-847.
102. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod.* 2012; 27: 2541-2548.
103. Cocchi G, Marsico C, Cosentino A, et al. Silver-Russell syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a twin girl born after in vitro fertilization. *Am J Med Genet A.* 2013; 161A: 2652-2655.
104. Talaulikar VS, Arulkumaran S. Reproductive outcomes after assisted conception. *Obstet Gynecol Surv.* 2012; 67: 566-583.
105. Okun N, Sierra S. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *J Obstet Gynaecol Can* 2014; 36: 64-83.