

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

MANNING M, LIEBAERS I, LISSENS W, VAN STEIRTEGHEM A, WEIDNER W
ICSI und Imprinting

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2000; 10 (3) (Ausgabe
für Österreich), 26-29*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



ICSI UND IMPRINTING

Summary

The introduction of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has in many ways given rise to concern about its safety in terms of genetic risks. The possible influence of genetic imprinting – a strictly parent of origin depending mechanism of gene regulation by which only one of the parental copies of a gene is expressed – on an ICSI procedure has not yet been investigated. We studied therefore the DNA methylation mediating the imprinting process at a defined region on

chromosome 15q11-q13 of 92 children born after ICSI. A methylation specific polymerase chain reaction was carried out from sodium bisulphite treated genomic DNA of the 92 children. The same analysis was performed in patients suffering from imprinting defects in the target region as well as from healthy persons as control groups. In all 92 children, regular imprints were present at 15 q11-q13 similar to the healthy controls. In conclusion, these data do not indicate a higher risk for imprinting defects in children born after ICSI.

pression, der sich nach dem elterlichen Geschlecht richtet, kommt der Methylierung der Desoxyribonukleinsäure Zytosin in CpG-Dinukleotiden entscheidende Bedeutung zu. In der Regel führt die fehlende Methylierung des Zytosins zur Expression der betreffenden chromosomalen Region, wohingegen das Anfügen einer Methylgruppe an Zytosin die Expression verhindert. Bei Imprinting vom Typ der väterlichen Expression wird hierbei immer das väterliche Allel exprimiert (unmethyliertes Zytosin) und niemals das mütterliche (methyliertes Zytosin). Bei Imprinting mit mütterlicher Expression gilt analog dazu das Gegenteil.

ZUSAMMENFASSUNG

Wechselwirkungen von intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) und genetischem Imprinting, der geschlechtsspezifischen Steuerung der Genexpression durch DNS-Methylierung, werden in jüngster Zeit diskutiert. Ziel unserer Untersuchungen war die Imprinting-Analyse der exprimierten chromosomalen Region 15q11-q13 von ICSI-gezeugten Kindern. Von n = 92 ICSI-gezeugten Kindern wurde direkt nach der Geburt eine Blutprobe gewonnen. Nach standardisierter DNA-Extraktion wurde eine Methylierungs-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (M-PCR) sowohl mit Primern spezifisch für den maternalen wie auch mit Primern spezifisch für den paternalen Methylierungszustand durchgeführt. Kontrollproben von Gesunden und Patienten mit Defekten in der Zielregion wurden kontinuierlich mitgeführt. Sowohl für die M-PCR mit maternalen als

auch mit paternalen Primern zeigte sich bei allen 92 Kindern ein regelrechtes Banding analog der gesunden Kontrollgruppe. Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich kein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für Methylierungsdefekte in 15q11-q13 für ICSI-gezeugte Kinder oder ihre Nachkommen.

EINLEITUNG

Seit der Einführung der ICSI in die Infertilitätstherapie werden mögliche genetische Risiken im Zusammenhang mit dieser Therapieoption diskutiert, obwohl große Langzeitstudien bisher lediglich eine minimale, jedoch statistisch signifikante Erhöhung von geschlechtschromosomalen und strukturellen de novo-Anomalien nachweisen konnten [1]. Mögliche Störungen des genetischen Imprintings durch ICSI werden in jüngster Zeit diskutiert [2]. Genaue Daten fehlen jedoch.

Bei genetischem Imprinting, einem Regulierungsmodus der Gen-Ex-

Ziel unserer Untersuchungen war die Analyse des Imprinting-Status der DNS von Kindern, die mit Hilfe einer ICSI gezeugt wurden.

Exemplarisch wurde die chromosomale Region 15q11-q13 untersucht. Störungen in dieser durch Imprinting regulierten Region führen zu bekannten und klar definierten neurogenetischen Mißbildungssyndromen wie Prader-Willi-Syndrom (PWS) oder Angelman-Syndrom (AS).

MATERIAL UND METHODIK

DNS-Extraktion aus weißen Blutkörperchen

Von 92 ICSI-Kindern wurden direkt nach der Geburt 5–10 ml EDTA-Blut abgenommen und bei –80 Grad kryokonserviert. Nach Auftauen wurde bei diesen Proben eine DNS-Extraktion aus weißen Blutkörperchen unter Anwendung eines kommerziellen Kits durchgeführt. Durch Hinzu-fügen von Proteasen wurde die Zell-Lyse herbeigeführt.

Natriumbisulfit-Behandlung

Da Unterschiede in der DNS-Methylierung methodisch nicht mit Polymerasekettenreaktion (PCR) zu erfassen sind, ist eine spezielle Vorbehandlung der DNS unumgänglich. Hierdurch wird der Unterschied in der DNS-Methylierung in einen Unterschied in der Nukleinsäuresequenz übersetzt. Durch Behandlung der DNS mit Natriumbisulfit wird die Nukleinsäure Zytosin, wenn sie in freier unmethylierter Form vorliegt, in Uracil transferiert. Liegt Zytosin in methylierter Form vor, ist die Überführung in Uracil nicht möglich und Zytosin bleibt unverändert [3–5].

Die DNS-Proben werden zunächst in 10mM Tris-EDTA-Lösung verdünnt. Die Denaturierung wird danach mittels Hinzufügen von 3M NaOH und Inkubation bei 37°C für 15 Minuten und bei 95°C für 3 Minuten durchgeführt. Im Anschluß wird die denaturierte DNS mit der Natriumbisulfit-Lösung vermischt und für 16 Stunden bei 55°C im Dunkeln inkubiert. Es folgt die Reinigung der DNS von der Natriumbisulfit-Lösung unter Verwendung des kommerziellen Reinigungssystems und -Kits „Wizard Clean Up“.

Methylierungs-spezifische Polymerasekettenreaktion (M-PCR)

Im Anschluß an die Natriumbisulfit-Vorbehandlung können die eigentlichen PCRs mit den folgenden Primer-Paaren [6] als parallele, jedoch separate Reaktionen durchgeführt werden (35 Zyklen):

Primer-Paar spezifisch für Methylierungszustand auf mütterlichem Allel:

primer SNRPN-Mfor: 5'-TAA-ATA-AGT-ACG-TTT-GCG-CGG-TC3'

primer SNRPN-Mrev: 5'-AAC-CTT-ACC-CGC-TCC-ATC-GCG-3'

Primer-Paar spezifisch für Methylierungszustand auf väterlichem Allel:

primer SNRPN-Pfor: 5'-GTA-GGT-TGG-TGT-GTA-TGT-TTA-GGT-3'

primer SNRPN-Prev: 5'-ACA-TCA-AAC-ATC-TCC-AAC-AAC-CA-3'

Die PCR-Produkte werden auf einem 2%igem Agarose-Gel separiert, mit Ethidiumbromid angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Kontroll-DNS von gesunden Personen, von Prader-Willi- und Angelman-Syndrom-

Patienten sowie eine DNS-freie Probe wurden kontinuierlich mitgeführt.

ERGEBNISSE

Patientengut

Von den insgesamt 92 ICSI-geborenen Kindern, deren Blut- und DNS-Proben gewonnen werden konnten, war die überwiegende Mehrzahl von 90,2% (n = 83) in einer ICSI mit ejakulierten Spermatozoen gezeugt worden. Bei den restlichen 9,8% der Kinder war eine ICSI mit testikulären Spermatozoen (6,5%, n = 6) oder epididymalen Spermatozoen (3,3%, n = 3) durchgeführt worden (Abbildung 1).

Unter den 92 untersuchten Kindern befanden sich 20 Zwillingspaare (40 Zwillingenkinder). Es bestand ein ausgeglichenes Verhältnis von Jungen und Mädchen (n = 47 oder 51% Jungen und n = 43 oder 49% Mädchen) (Abbildung 2).

Bei allen Paaren wurde die ICSI wegen einer Fertilitätsstörung mit männlicher Komponente durchgeführt. Wegen eines Klinefelter-

Abbildung 1: Verteilung der ICSI-geborenen Kinder hinsichtlich der Herkunft der Spermatozoen bzw. Spermatozoen

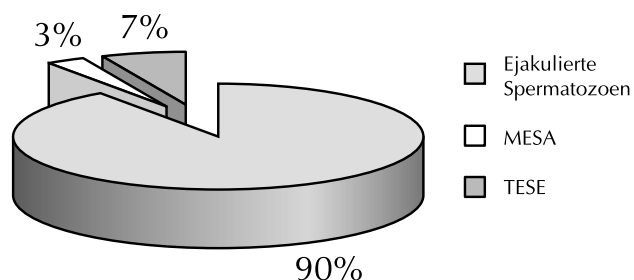
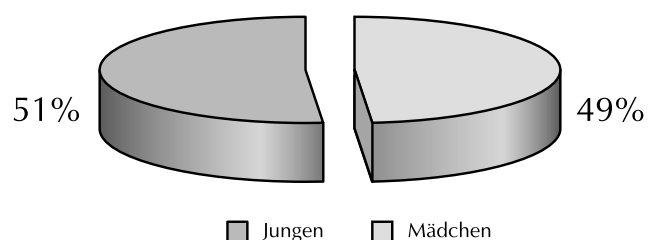


Abbildung 2: Verteilung von Jungen und Mädchen unter den ICSI-geborenen Kindern



Syndroms des Mannes, bei dem keine Spermatozoen gewonnen werden konnten, wurden in zwei Fällen Spermatozoen von Samen Spendern injiziert.

Keines der untersuchten 92 Kinder zeigte Symptome, die auf ein Prader-Willi- oder Angelman-Syndrom hinweisen könnten.

Methylierungs-Status

Von der DNS gesunder Kontrollpersonen ergab die M-PCR ein 174bp-Produkt in der Reaktion spezifisch für das mütterliche Allel sowie ein 100bp-Produkt in der Reaktion spezifisch für das väterliche Allel. Exakt das gleiche Ergebnis fand sich bei allen DNS-Proben der untersuchten 92 Kinder, geboren nach ICSI, einschließlich der insgesamt 9 Kinder, die einer ICSI mit testikulären bzw. epididymalen Spermien entstammten. Dieses Ergebnis stand in klarem Gegensatz zu den Resultaten der Kontrollpersonen mit Imprintingdefekten. So fehlte nach M-PCR der DNS-Probe des Prader-Willi-Syndrom-Patienten das 100bp-Produkt aus der Reaktion spezifisch für das väterliche Allel und bei den Angelman-Syndrom-Patienten das 174bp-Produkt aus der Reaktion spezifisch für den mütterlichen Methylierungszustand. Die DNS-freie Probe ergab erwartungsgemäß in keiner der beiden Reaktionen ein PCR-Produkt.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Imprinting und ICSI: Hypothesen zu denkbaren Wechselwirkungen

Für die Etablierung des entsprechenden Imprinting- bzw. DNS-

Methylierungs-Status sind sowohl die Gametogenese als auch die Embryogenese entscheidende Phasen. Zumindest für die Spermio- und Spermatogenese muß festgestellt werden, daß die ICSI eine Manipulation im Bereich eben dieser Zeiträume darstellt. Obwohl die eigentliche Methylierung der chromosomalen Imprinting-Regionen gemäß dem Geschlecht der Keimzelle, das sogenannte „Resetting“, nach derzeitigem Wissen zu einem früheren Zeitpunkt in der Spermienausreifung stattfindet als die ICSI, wird eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ungeordneter de novo-Methylierung nach Etablierung des neuen Imprinting-Status postuliert [7]. Inwieweit diese sensible Phase zum Zeitpunkt der ICSI weiterbesteht, besonders mit testikulären Spermatozoen oder Spermatiden, ist noch ungesichert.

Obwohl keines der untersuchten Kinder Symptome zeigte, die auf Imprintingdefekte in der untersuchten Region hindeuten, kann eine stumme Weitergabe von Imprintingdefekten über die Generationen nicht komplett ausgeschlossen werden. Ein neu entstandener Methylierungsdefekt könnte im nicht exprimierten Allel liegen und deshalb nicht sofort ausgeprägt werden; erst bei einem Geschlechtswechsel in der weiteren Vererbungskette kämen die Symptome zur Ausprägung. Jedoch ist dieser Hypothese zu entgegnen, daß es keinen logischen Grund dafür gibt, daß Defekte nur dann vermehrt auftreten, wenn sie das nicht ausgeprägte Allel betreffen. In anderen Fällen müßten Defekte auch im ausgeprägten Allel vermehrt vorkommen und somit in der Nachsorge

der ICSI-Kinder Symptome aufgefallen sein. Darüberhinaus wäre die Art des neu aufgetretenen Defekts ja weniger die Mutation in der chromosomalen Region mit Imprinting oder gar im Imprinting-Zentrum, sondern vielmehr lediglich die Veränderung der DNS-Methylierung.

Käme also eine fehlerhafte Demethylierung in einem Allel vor, das eigentlich in methylierter Form vorliegen und folglich nicht ausgeprägt hätte sein sollen, würde die Situation der doppelten Ausprägung dieser Region entstehen. Dies muß nicht unbedingt direkte Symptome nach sich ziehen, wie wir aus Untersuchungen über uniparentale Disomien wissen. Möglicherweise würde ein solcher Fehler sogar beim nächsten Resetting vor Weitergabe an die nächste Generation wieder „eingerenkt“ werden. Mit direkten Symptomen ist jedoch im umgekehrten Fall der fehlerhaften Methylierung einer Region und somit der fehlenden Ausprägung zu rechnen. Da das zweite Allel dann vermutlich ebenfalls methyliert (hier jedoch ordnungsgemäß) vorläge, entspräche dies im Grunde der Deletion.

Imprinting und Geburtsgewicht

Follow up-Studien an Kindern, die nach ICSI geboren wurden, ergeben in der Regel ein geringeres durchschnittliches Geburtsgewicht. Nicht selten wird auch während einer ICSI-Schwangerschaft die Tendenz zum eher kleineren Fetus festgestellt. Bis zu einem gewissen Grad ist dies durch die erhöhte Zahl von Mehrlingsschwangerschaften und -geburten zu erklären. Weitere Faktoren könnten darüberhinaus eine Rolle spielen. Aus Tier-

experimenten wissen wir, daß auch uniparentale Disomien mit fetalen Wachstumsstörungen vergesellschaftet sein können. Gene, die vom väterlichen Genom exprimiert werden, sollen das Wachstum beschleunigen, wohingegen die des mütterlichen Genoms das Wachstum unterdrücken. Folglich kann die parentale Disomie eine mögliche Erklärung für das Auftreten fetaler Wachstumsdefekte sein [8].

Risikoeinschätzung

Da sich in der M-PCR aller untersuchter Kinder, die nach einer ICSI geboren wurden, ein regelrechter DNS-Methylierungsstatus in der Zielregion 15q11-q13 darstellen ließ, ergibt sich hieraus keinerlei Hinweis auf ein erhöhtes Risiko von Imprinting-Defekten nach ICSI. Die Anzahl von 92 Kindern erscheint klein im Vergleich zur Prävalenz der Prader-Willi- und Angelman-Syndrome von 1 zu 15000 Neugeborenen, dennoch sollte sich bei relevant erhöhtem Risiko bereits ein Hinweis ergeben haben. Die regelrechten Ergebnisse bei den 9 untersuchten Kindern, die in einer ICSI mit nicht-ejakulierten Spermatozoen gezeugt wurden, ist in besonderem Maß beruhigend, da gerade hier die Gefahr zu sehen ist, daß der Vorgang des Resettings noch inkomplett bzw. die neu geschaffene väterliche DNS-Methylierung testikulärer Spermatozoen oder gar elongierter Spermatischen noch sehr vulnerabel für Störungen ist. Dennoch sollte in der vorliegenden Studie mehr ein Beginn der Beschäftigung mit der Thematik zu sehen sein, als der ultimative Beweis für die Unbedenklichkeit der ICSI hinsichtlich Imprintingdefekten.



Dr. med. Martina Manning

Geboren 1966 in Heidelberg, D. Von 1986 bis 1992 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Von 1992 bis 1993 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Mannheim. 1993 Staatsexamen. Von 07/93 bis 12/93 Ärztin im Praktikum an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim (Prof. Dr. P. Alken); von 01/94 bis 12/94 Ärztin im Praktikum an der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Mannheim (Prof. Dr. M. Trede). Dezember 1993 Promotion magna cum laude, Thema: Klinische Einführung eines neuen Lithotriptor-Konzeptes zur Behandlung der Urolithiasis. Jänner 1995 Approbation. Von 1995 bis 1998 Assistenzärztin an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim (Prof. Dr. P. Alken). Von 1998 bis 1999 Forschungsstipendium der EAU: Academisch Ziekenhuis, Universiteit Brussels (AZ-VUB), Centres of Reproductive Medicine (Prof. Dr. A. van Steirteghem) und Medical Genetics (Prof. Dr. I. Liebaers). Seit Jänner 1999 Fachärztin für Urologie. Seit November 1999 Weiterbildung in operativer Urologie, Urologische Universitätsklinik Giessen (Prof. Dr. Weidner).

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Martina Manning
Urologische Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen
D-35392 Gießen, Klinikstraße 29

Literatur:

1. Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 781–2.
2. Tesatik J, Sousa M, Greco E, Mendoza C. Spermatis as gametes. indications and limitations. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl 3): 89–107; discussion 108–11.
3. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. Nature Genetics 1997; 16: 16–7.
4. Zeschnigk M, Lich C, Nuiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet 1997; 5: 94–8.
5. Saitoh S, Buiting K, Cassidy B. Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome

- patients with an imprinting mutation. Am J Med Genet 1997; 68: 195–206.
6. Sutcliffe J, Nakao S, Christian S, Orstavik K, Tommerup N, Ledbetter D, Beaudet A. Deletions of a differentially methylated CpG island at the Snrpn gene define a putative imprinting control region. Nature Genet 1994; 8: 52–8.
 7. Bestor TH, Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. Nat Genet 1996; 12: 363–7.
 8. Hall JG. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. Am J Hum Genet 1990; 46: 857–73.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des European Urological Scholarship Programme (EUSP) der European Association of Urology (EAU) unterstützt (Nr. SJ3).

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)