

**Einzelokus- und Multilokus-Methylierungsstörungen
beim Silver-Russell-Syndrom:
Häufigkeiten und funktionelle Relevanz**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Matthias Begemann

aus Duisburg

Berichter: Professor Dr. rer. nat. Thomas Eggermann
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Imprinting - genomische Prägung	5
1.2 Imprinting Erkrankungen	6
1.2.1 Silver-Russell- und Beckwith-Wiedeman-Syndrom	6
1.2.1.1 Die Region 11p15	9
1.2.1.2 Chromosom 7	11
1.2.2 Transienter Neonataler Diabetes Mellitus - Chromosom 6	14
1.2.3 upd(14)-Syndrome - Chromosom 14	14
1.2.3.1 Temple- / upd(14)mat-Syndrom	14
1.2.3.2 Wang-Syndrom / upd(14)pat-Syndrom	15
1.2.4 Prader-Willi- / Angelmann-Syndrom - Chromosom 15	15
1.2.5 Pseudohypoparathyroidismus 1b - Chromosom 20	16
1.3 Multi-Locus-Methylierungsdefekte	16
1.4 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien	24
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.1.1 Anlegen von primären Zellkulturen	28
2.2.1.2 Splitten von Zellkulturen	28
2.2.1.3 Cryo-Konservierung von Zellen	28
2.2.1.4 Auftauen von cryo-konservierten Zellen	29

2.2.2	Isolation und Synthese von Nukleinsäuren	29
2.2.2.1	DNA-Isolation	29
2.2.2.2	RNA-Isolation	29
2.2.2.3	cDNA-Synthese	29
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.3	Genomische Untersuchungs-Verfahren	31
2.2.3.1	Array-Analytik	31
2.2.3.2	Sequenzierung	34
2.2.3.3	Mikrosatelliten Typisierung	37
2.2.3.4	MLPA - Multiplex Ligation Dependend Probe Amplifi- kation	37
2.2.4	Methylierungsspezifische Verfahren	38
2.2.4.1	MS-MLPA - Methylierungs-Spezifische MLPA	38
2.2.4.2	Bisulfit-Behandlung genomischer DNA	38
2.2.4.3	MS-PCR	39
2.2.4.4	MS-SNuPE Screening	41
2.2.4.5	SeQMA – Sequence based Quantitative Methylation Analysis	43
2.2.5	Quantitative Real-Time PCR	43
2.3	Patienten-Kollektive	45
3	Ergebnisse	47
3.1	MS-SNuPE Screening idiopathischer SRS-Patienten	47
3.1.1	SeQMA	49
3.1.2	Sequenzierung der Primerbindestellen von <i>IGF2P0</i>	50
3.1.3	Sequenzierung der Primerbindestellen von <i>IGF2R</i>	51
3.1.4	MS-SNuPE Screening - Ergebnisse nach Validierung	51
3.2	Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten	52
3.2.1	MS-PCR für Chromosom 7-Loci	52
3.2.2	MS-PCR für Chromosom 14	53
3.2.3	Mikrosatelliten-Typisierung bei upd(7)mat-Patienten	54
3.2.4	MS-SNuPE-Ergebnisse bei den upd(7)mat-Patienten	56
3.2.5	Molekulare Karyotypisierung	57
3.2.6	Expressions-Analysen bei upd(7)mat-Patienten	59
3.2.6.1	Chromosom 7 kodierte Gene	60

3.2.6.2	Chromosom 11 kodierte Gene	61
3.2.6.3	Chromosom 6 und Chromosom 14 kodierte Gene	62
3.2.6.4	Zusammenfassung der Expressionsdaten	63
3.3	Molekulare Charakterisierung von MLMD-Patienten	64
3.3.1	MS-MLPA-Ergebnisse bei MLMD-Patienten	64
3.3.2	MS-SNuPE Ergebnisse bei MLMD-Patienten	65
3.3.3	MS-PCR-Ergebnisse bei MLMD-Patienten	68
3.3.4	Mikrosatelliten-Typisierung bei MLMD-Patienten	69
3.3.5	Sequenzierung der Gene <i>DNMT3L</i> , <i>MBD3</i> und <i>NLRP2</i>	69
3.3.5.1	Identifizierte Varianten in <i>DNMT3L</i> und <i>MBD3</i>	70
3.3.5.2	Varianten in <i>NLRP2</i>	70
3.3.6	Expressionsanalysen bei MLMD-Patienten	71
3.3.6.1	Chromosom 7 kodierte Gene	71
3.3.6.2	Chromosom 11 kodierte Gene	72
3.3.6.3	Chromosom 6 und Chromosom 14 kodierte Gene	74
3.3.6.4	Zusammenfassung der Expressionsdaten	74
3.4	Klinische Konsequenzen von strukturellen Varianten der Region 11p15	75
4	Diskussion	82
4.1	Bedeutung von Multilocus-Methylierungsveränderungen bei SRS-Patienten	82
4.1.1	MS-SNuPE-Screening idiopathischer SRS-Patienten	82
4.1.1.1	<i>IGF2R</i>	83
4.1.1.2	<i>IGF2P0</i>	84
4.1.1.3	<i>MEG3</i>	84
4.1.1.4	MS-SNuPE-Screening idiopathischer SRS-Patienten	85
4.1.2	MLMD-Patienten	86
4.1.2.1	Geprägte Loci auf 11p15.5 bei MLMD-Patienten	86
4.1.2.2	<i>GRB10</i> und <i>MEST</i>	87
4.1.2.3	<i>IGF2R</i> und <i>MEG3</i>	88
4.1.2.4	Bewertung der Befunde zu MLMD-Patienten	88
4.1.3	Sequenzierung der MLMD-Kandidatengene <i>DNMT3L</i> , <i>MBD3</i> und <i>NLRP2</i>	89
4.1.4	Zusammenfassung zu MLMD	91

4.2	Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten	92
4.2.1	(Epi)genetische Untersuchungen an upd(7)mat-Patienten	92
4.2.1.1	MS-PCR für Chromosom 7	92
4.2.1.2	Mikrosatelliten-Analysen für Chromosom 7	92
4.2.1.3	MS-SNuPE-Untersuchungen bei upd(7)mat-Patienten	93
4.2.1.4	Molekulare Karyotypisierung bei LW4925	93
4.3	Expressionsanalysen bei upd(7)mat und MLMD-Patienten	94
4.3.1	Expressionsanalysen an upd(7)mat-Fibroblasten	94
4.3.1.1	Expressionsstudien zu Chromosom 7-kodierten Gene	94
4.3.1.2	Expressionsstudien zu Chromosom 11p15-kodierten Ge- nen	96
4.3.1.3	Expressionsstudien zu Chromosom 6- und 14-kodierten Gene	97
4.3.2	Expressionsanalysen an MLMD-Fibroblasten	98
4.3.2.1	Expressionsstudien zu Chromosom 7-kodierten Gene	98
4.3.2.2	Expressionsstudien zu Chromosom 11p15-kodierten Ge- nen	99
4.3.2.3	Expressionsstudien zu Chromosom 6- und 14-kodierten Gene	100
4.4	Bedeutung von strukturellen Varianten der Region 11p15	101
4.5	Ausblick	105
5	Anhang	108
5.1	PCR-Programme	108
5.2	Primer-Sequenzen	110
5.3	TaqMan Probes	116
5.4	Verwendete Datenbanken und online Quellen	117
5.5	Verwendete Software	117
6	Literaturverzeichnis	118
6.1	Eigene Publikationen	132

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
aCGH	s. CGH
AHO	Albright's Hereditary Osteodystrophie
array-CGH	s. CGH
AS	Angelman-Syndrom
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CDKN1C	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C (p57, Kip2)
cDNA	Complementary DNA
CF	Cystic Fibrosis - Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGH	Comperative Genome Hybridisation
Chr.	Chromosom
CNV	Copy Number Variation
Ct	Cycle Threshold
CTCF	CCCTC-binding factor
ddNTP	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMR	Diffentiell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FKS	Fetales Kälbeserum
G	Guanin
g	Gramm
GOI	Gain Of Imprinting (s. GOM)
GOM	Gain Of Methylation (s. GOI)
GRB10	Growth Factor Receptor-Bound Protein 10
HdF	Human dermal Fibroblast
ICR	Imprinting Control Region
IE	Imprinting Erkrankung
IG-DMR	Intragenisch Differentiell Methylierte Region
IGF2	Insulin-like Groth Factor II
kb	Kilobasen - 1000 bp
KCNQ1	Potassium Channel, Voltage-Gated, KQT-like Subfamiliy, Member 1
KCNQ1OT1	KCNQ1 Overlapping Transcript 1
KI	Konfidenzintervall
lncRNA	long non coding RNA
LOH	Loss Of Heterozygosity
LOI	Loss Of limprinting (s. LOM)
LOM	Loss Of Methylation (s. LOI)
MBD3	Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3
MEG1	Maternally Expressed Gene 1
MEST	Mesoderm-specific Transcript, Touse, Homolog of; MEST/ Paternally Expressed Gene 1; PEG1
MI	Methylierungsindex
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	Multiplex Ligation Depended Probe Amplification
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR

MS-SNuPE	Methylation Specific Single Nucleotide Primer Extension
NK	Normalkontrolle
nm	Nanometer
nMI	Normalisierter Methylierungsindex
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHP	Pseudohypoparathyroidismus
PLAGL1	Pleiomorphic Adenoma Gene-Like 1
PV	Primer-Verlängerungsreaktion
PWS	Prader-Willi-Syndrom
qPCR	Quantitative PCR (s. qRT-PCR)
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR (s. qPCR)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ	Relative Quantity - Relative Häufigkeit
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRS	Silver-Russell-Syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNDM	Transienter Neonataler Diabetes Mellitus
UPD	Uniparentale Disomie
upd(6)mat	Maternale uniparentale Disomie Chromosom 6
upd(6)pat	Paternale uniparentale Disomie Chromosom 6
upd(7)mat	Maternale uniparentale Disomie Chromosom 7
upd(7)pat	Paternale uniparentale Disomie Chromosom 7
UPHD	Uniparentale Heterodisomie
UPID	Uniparentale Isodisomie
upd(14)mat	Maternale uniparentale Disomie Chromosom 14
upd(14)pat	Paternale uniparentale Disomie Chromosom 14

Zusammenfassung

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS; OMIM #180860) ist ein kongenitales Kleinwuchersyndrom aus der Gruppe der Imprinting-Erkrankungen (IE). Der Phänotyp des SRS wird dominiert durch einen prä- und postnatalen primordialen Kleinwuchs. Weitere typische Merkmale sind ein dreieckiges Gesicht, Asymmetrie des Körpers oder der Extremitäten, eine Klinodaktylie V sowie eine relative Makrozephalie. Bei etwa 50 % der Patienten lässt sich eine Hypomethylierung im *imprinting control center 1* (ICR1) auf Chromosom 11p15 nachweisen. Weitere molekulare Defekte stellen mit ca. 7 % eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 7 (upd(7)mat) und mit ca. 20 % strukturelle chromosomale Aberrationen dar. Gegenwärtig rückt eine weitere Untergruppe von Patienten mit IE in den Focus der Forschung, die neben einer Methylierungsveränderung am erkrankungsspezifischen Locus (ICR1) noch zusätzliche Methylierungsveränderungen trägt. Diese als MLMD (*multilocus methylation defects*) bezeichnete Beobachtung wurde mittlerweile bei mehreren IE beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Häufigkeit und funktionelle Relevanz des MLMD bei SRS-Patienten untersucht werden. In einer Gruppe aus 93 Probanden mit der Verdachtsdiagnose SRS, bei denen im Vorfeld die klassischen Ursachen ausgeschlossen worden waren, wurden mittels MS-SNuPE-Assay (Methylation Specific - Single Nucleotide Primer Extension) die Loci von vier IEs auf Methylierungsveränderungen hin untersucht. Dabei konnte bei einem Probanden eine leichte Hypomethylierung am *MEG3*-Locus identifiziert werden, vereinbar mit einem Mosaik für eine Temple-Syndrom Deletion, einem isolierten Imprinting-Defekt oder einer Mosaik-Trisomie 14 maternalen Herkunft. Bei drei weiteren Probanden fand sich eine Hypermethylierung in *IGF2R* unklarer Bedeutung.

Durch die Analyse der Genexpression an upd(7)mat-Zelllinien konnte ein Einblick in die komplexe Regulation und die Auswirkungen einer Genommutation auf die Expression geprägter Gene gewonnen werden. Hierbei war insbesondere der Vergleich zwischen Patienten mit upd(7)mat und segmentaler upd(7q)mat mit zusätzlicher Hypomethylierung der *MEG3*-DMR von Interesse. Es konnte eine Hochregulation der Expression von *COPG2* und *GRB10* beobachtet werden. Der upd(7q)mat-Patient zeigte weiterhin Effekte auf die Gene *CDKN1C* und *PLAGL1*.

Die Charakterisierung von MLMD-Patienten zeigte eine hohe Variabilität in den Methylierungsmustern. Gemeinsam war den untersuchten Probanden eine Beteiligung der ICR1 und ICR2 auf Chromosom 11p15 sowie ihr SRS-Phänotyp. In den Expressionsstudien zeigte sich, dass die epigenetische Variabilität sich auch in der Regulation geprägter Gene niederschlägt. Ein gemeinsamer Effekt ließ sich nur in der reduzierten Expression von *CDKN1C* nachweisen.

Die Untersuchungen der Region 11p15 in Bezug auf strukturelle Veränderungen haben gezeigt, dass solche Umbauten einen tiefgreifenden Einfluss auf die Regulation wachstumsrelevanter Gene haben. Die Effekte sind dabei nicht nur im Zugewinn oder Verlust von kodierendem genetischem Material begründet, sondern auch die Beteiligung *cis*-wirksamer Elemente hat einen Einfluss auf die Genexpression und auf den Methylierungsstatus geprägter Regionen. Die Auswirkungen von strukturellen Veränderungen hängen dabei ab von der elterlichen Herkunft, den Bruchpunkten, den enthaltenen Genen sowie von der Größe der betroffenen Region.

Summary

Silver-Russell syndrome (SRS; OMIM #180860) is a congenital imprinting disorder (ID) characterized by severe pre- and postnatal growth retardation. The main features of SRS include a typical triangular shaped facial gestalt, a relative macrocephaly and clinodactyly of the fifth digits. Additional findings are asymmetry of the body and/or the limbs and a failure to thrive during the first month. Currently, (epi)genetic alterations can be found in 65-70% of patients suggestive for SRS. These findings comprise a hypomethylation of the *H19* imprinting control region (ICR1) in up to 40%, maternal uniparental disomy of chromosome 7 (upd(7)mat) in 7% and chromosomal aberrations in 20% of cases. Recently the focus of interest has shifted to a particular subgroup of patients with IDs, which exhibit additional epigenetic changes at other loci than the disease specific one. This finding has been called multilocus methylation defect (MLMD) and has meanwhile been identified in several IDs.

Aim of this study was to identify the frequency and functional relevance of MLMD in SRS patients. In a group of 93 patients suggestive for SRS a MS-SNuPE-Assay (Methylation Specific - Single Nucleotide Primer Extension) was performed to identify changes in the methylation patterns of eight imprinted genes. The aforementioned SRS specific (epi)mutations have been previously excluded in these patients. In the current screening one patient could be identified to carry a slight reduction of methylation at the *MEG3* locus consistent with mosaicism for a Temple-syndrome deletion, an isolated imprinting defect or mosaic trisomy of chromosome 14 of maternal origin. In three further patients a hypermethylation of *IGF2R* with unknown significance could be detected.

To study the functional impact of a genome mutation, gene expression analysis was performed on upd(7)mat fibroblast cell lines. These experiments enlightened the knowledge about the complex regulation and expression of imprinted genes involved in growth and development. Particularly the comparison between the functional outcome of a patient with segmental upd(7q)mat and an hypomethylation of the *MEG3*-DMR on chromosome 14 with the upd(7)mat carriers was remarkable. An upregulation of *COPG2* and *GRB10* was observed. Furthermore, the patient with segmental upd(7q)mat showed interesting effects on *CDKN1C* and *PLAGL1*.

The (epi)genetic characterization of MLMD patients revealed a high variability in their methylation patterns of imprinted genes. All of these patients showed SRS phenotype and a common loss of methylation at the ICR1 and ICR2 in 11p15. The gene expression studies demonstrated that the high variability found in the methylation patterns in MLMD patients result in a comparable variability in the expression of imprinted genes. A common effect was only observed in the reduced expression of *CDKN1C*.

The investigations concerning structural variations of the chromosomal region 11p15 revealed the importance of rearrangements in that region for the regulation of genes related to growth and development. The resulting effect on the clinical outcome does not only depend on the gain or loss of coding material, but also affected *cis*-acting elements may have an influence on the expression and the methylation patterns of imprinted genes. For the evaluation of structural chromosomal alterations the size, breakpoints, included genes and parental origin of the affected region have to be considered.

1 Einleitung

1.1 Imprinting - genomische Prägung

Unter genomischer Prägung oder *genomic Imprinting* versteht man die monoallelische Expression eines Gens oder eines Gen-Clusters von nur einem elterlichen Allel. Dabei wird in Abhängigkeit von epigenetischen Modifikationen wie CpG-Methylierungen oder Histonmodifikationen entweder das paternale oder maternale Allel exprimiert bzw. reprimiert (zur Übersicht Horsthemke, 2010). Diese Imprinting-Signale werden bereits in den elterlichen Keimzellen gesetzt und bleiben im späteren Organismus erhalten. Gegenwärtig sind etwa 60 menschliche Gene bekannt, die einem Imprinting unterliegen. Geprägte Gene folgen dabei keiner zufälligen Verteilung im Genom, sondern treten in Clustern auf, was auf einen übergeordneten Regulationsprozess hindeutet, der nicht auf Einzelgenebene reguliert. Die Steuerung der Regulation erfolgt in solchen Gen-Clustern über ICRs (*Imprinting Control Region*), die als *cis*-regulatorische Elemente nach Bindung spezifischer Faktoren wie CTCF die Chromatin-Struktur ihrer chromosomalen Region verändern und so z. B. Enhancer in räumliche Nähe zu einem Promoter bringen (Hark et al., 2000).

Die Konflikt-Hypothese gemäß Haig and Graham (1991) beschreibt einen Selektionsvorteil von paternalen Allelen, wenn diese wachstumsfördernd auf die Nachkommen wirken. Kräftigere Nachkommen haben eine höhere Überlebenschance und steigern somit die Fitness. Im Gegensatz dazu haben mütterlich vererbte Allele einen Selektionsvorteil, wenn sie eher wachstumshemmend wirken und das Risiko für die Mutter unter der Geburt zu versterben senken (Wilkins and Haig, 2003). Im Einklang damit scheint der größte Teil der geprägten Gene eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Entwicklung eines Organismus zu spielen. Diese Beobachtung wird durch die Beteiligung der Imprinting-Cluster auf den Chromosomen 6, 7, 11, 14 und 15 bei angeborenen Imprinting-Erkrankungen untermauert, von denen das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) am bekanntesten sind.

1.2 Imprinting Erkrankungen

Beim Menschen wurden mehrere Erkrankungen beschrieben, die mit einer Veränderung des Imprinting-Status einhergehen. Beteiligt an den bekannten Imprinting-Erkrankungen (IE) des Menschen sind die Chromosomen 6 (Transienter Neonataler Diabetes Mellitus - TNDM), 7 (Silver-Russell-Syndrom - SRS), 11 (Beckwith-Wiedemann-Syndrom - BWS, SRS), 14 (upd(14)mat-/- Temple-Syndrom, upd(14)pat-/- Wang-Syndrom), 15 (Angelman-Syndrom - AS, Prader-Willi-Syndrom - PWS) und 20 (Pseudohypoparathyroidismus Typ 1b - PHP1b). Im Einklang mit der Beobachtung, dass geprägte Gene eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und für das Wachstum eines Organismus spielen, findet sich bei nahezu allen bisher beschriebenen IE eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Beeinflussung des Wachstums und der Körpergröße.

Einer IE können mehrere molekulare Ursachen zu Grunde liegen, die die Expression elterlich geprägter Gene beeinflussen und das Expressionsmuster damit paternalisieren oder maternalisieren. Neben einem veränderten Methylierungsmuster des geprägten Locus kann auch eine Deletion oder Duplikation des chromosomalen Abschnitts oder der *Imprinting Control Region* zum Phänotyp einer Imprinting-Erkrankung führen. Ein weiterer Befund bei Patienten mit Imprinting-Erkrankungen ist das Vorliegen einer uniparentalen Disomie (UPD). Eine uniparentale Disomie beschreibt die Vererbung der beiden homologen Chromosomen von nur einem Elternteil. Liegen beide homologen Chromosomen des Vaters oder der Mutter vor, spricht man von einer uniparentalen Heterodisomie (UPHD), bei einer uniparentalen Isodisomie liegt ein identisches Chromosom von Vater oder Mutter zweimal vor.

1.2.1 Silver-Russell- und Beckwith-Wiedeman-Syndrom

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS; OMIM #180860) ist ein angeborenes Kleinwuchssyndrom mit variabler, phänotypischer Ausprägung und (epi)genetischer Heterogenität, das in den 1950er Jahren unabhängig von Russell (1954) und Silver et al. (1953) beschrieben wurde (Abbildung 1.1). Es ist primär gekennzeichnet durch intrauterinen Kleinwuchs ohne postnatales Aufholwachstum und eine relative Makrozephalie (Tabelle 1.1). Neben dem das Syndrom dominierenden Kleinwuchs weisen die Patienten eine Reihe weiterer Merkmale auf. Typischerweise findet sich ein kleines, eher dreieckiges Gesicht mit prominenter Stirn, herabgezogenen Mundwinkeln sowie eine Klinodaktylie des fünften Fingers.

Tabelle 1.1: Leitsymptome des Silver-Russell-Syndroms (nach Eggermann et al. (2006)).

	Typische Charakteristika	Weitere Merkmale	Einzelbefunde
Wachstum	IUGR, Kleinwuchs	Verzögertes Knochenalter	Verzögerter Fontanellen-Verschluss
Kraniofaziale Auffälligkeiten	Kleines dreieckförmiges Gesicht, Prominente Stirn, Herabhängende Mundwinkel, Relative Makrozephalie	Tiefsitzende Ohren/ Ohranomalien, Zahnfehlstellungen, Hoher Gaumen/Gaumenspalte	Antevertierte Nares, Blaue Skleren, Epikanthus, Congenitale Ptose der Oberlider, Verschmolzene Augenbrauen
Körper und Extremitäten	Klinodaktylie/Brachydaktylie der 5. Finger, Asymmetrie der Extremitäten u. des Körpers, Hemihypertrophie des Stamms/der Extremitäten	Partielle kutane Syndaktylie zwischen 2. und 3. Zehen, Muskuläre Hypotonie/Hypertrophie, Hypospadie, Cryptorchismus	Café-au-lait-Flecken, Kurzer Hals, Vierfingerfurche

Häufig wird von Fütterungsschwierigkeiten in den ersten Lebensmonaten mit zum Teil notwendiger Sondenernährung berichtet. Bei etwa 50 % ist eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Asymmetrie des Körpers zu beobachten (zur Übersicht Wollmann et al. (1995); Eggermann et al. (2008a); Begemann et al. (2010)).

Die genetischen und epigenetischen Ursachen des Silver-Russell-Syndroms sind bis heute nicht vollständig geklärt und sehr heterogen. Bei ca. 7-10 % lässt sich eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 7 (upd(7)mat) nachweisen. Den häufigsten Befund bei SRS-Patienten stellt eine Untermethylierung der ICR1 (*Imprinting Control Region 1*) in 11p15.5 mit einem Anteil von ca. 40% dar. Daneben finden sich bei bis zu 20% der Patienten ohne die o. g. Defekte, chromosomale Veränderungen wie Deletionen oder Duplikationen (Spengler et al., 2012).



Abbildung 1.1: Patient mit Silver-Russell-Syndrom im Alter von 15 Jahren (aus Bege-
mann et al., 2011).

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS; OMIM #130650) stellt phänotypisch und (epi)genetisch das Gegenteil zum Silver-Russell-Syndrom dar. Es handelt sich um ein Großwuchs-Syndrom, das von Beckwith (1969) und Wiedemann (1969) erstmals beschrieben wurde. Die Hauptcharakteristika sind Bauchwand-Defekte (Nabelhernie), Makroglossie und Makrosomie mit Wachstum oberhalb der 97. Perzentile. Eine Asymmetrie des Körpers bedingt durch eine Hemihyperplasie und die Anfälligkeit für embryonale Tumore sind ebenfalls häufige Symptome.

Auf molekulargenetischer Ebene lassen sich unterschiedliche Befunde in der Region 11p15 bei BWS-Patienten erheben. Zu 50 % liegt ein Methylierungsverlust in der ICR2 vor. Eine Hypermethylierung der ICR1 findet sich bei 5 % der Fälle. Bei etwa 20 % der Patienten sind sowohl die ICR1 als auch die ICR2 durch das Vorliegen einer paternalen uniparentalen Disomie des Chromosom 11 betroffen, die die Region 11p15.5 umfasst. Die uniparentalen Disomien der Region 11p15 liegen zumeist als Mosaik vor, was sich durch eine postzygotische Entstehung erklären lässt (zur Übersicht Weksberg et al., 2010). Mutationen im *CDKN1C*-Gen (OMIM *600856) sind bei etwa 5 % der sporadischen Fälle zu finden, treten aber bei bis zu 40 % der familiären Fälle auf.

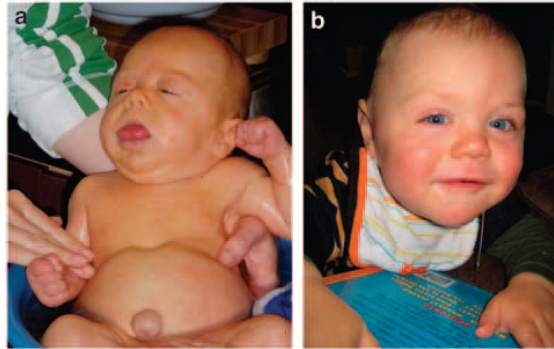


Abbildung 1.2: Patient mit BWS im Alter von einem Monat mit Makroglossie und Nabelhernie (a). Spätere Aufnahme 1 Jahr nach Zungenreduktion (b) (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [EJHG] (Weksberg et al., 2010), copyright (2010)).

1.2.1.1 Die Region 11p15

In der Region 11p15.5 liegt das beim Menschen am besten untersuchte Cluster von geprägten Genen. Es umfasst u. a. die Gene *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT1*. In der Region finden sich zwei differentiell methylierte Regionen (DMR), die als *Imprinting Control Center* fungieren. Die DMR1 (ICR1) reguliert dabei die reziproke Expression der Gene *H19* und *IGF2*, wobei im Normalzustand das Tumorsuppressorgen *H19* vom maternalen Allel und der Wachstumsfaktor *IGF2* vom paternalen Allel exprimiert wird. In der ICR1 finden sich Bindemotive für das Insulatorprotein CTCF, welche durch die Bindung von CTCF eine Konformationsänderung der DNA bewirken und damit stromaufwärts gelegene Enhancer-Elemente in räumliche Nähe zum Promotor von *H19* bringen. Diese Änderung der DNA-Struktur bewirkt die Expression von *H19* vom maternalen Allel. Die Methylierung der ICR1 des paternalen Allels verhindert die Bindung des Faktors CTCF an die DNA, wodurch die Expression von *H19* unterbleibt und stattdessen die Expression von *IGF2* induziert wird (Abbildung 1.3, Bergström et al. 2007). Mikrodeletionen, Duplikation und uniparentale Disomien, die die Region 11p15.5 ganz oder auch nur teilweise beinhalten, können in Abhängigkeit von ihrer Größe und Segregation sowohl für das BWS, als auch für das SRS verantwortlich sein (Schönherr et al., 2007; Begemann et al., 2012b).

Die zentromerisch gelegene ICR2 reguliert die Expression der Gene *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT1*. Im Normalzustand ist hier das maternale Allel methyliert, was in einer Expression der Gene *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* resultiert.

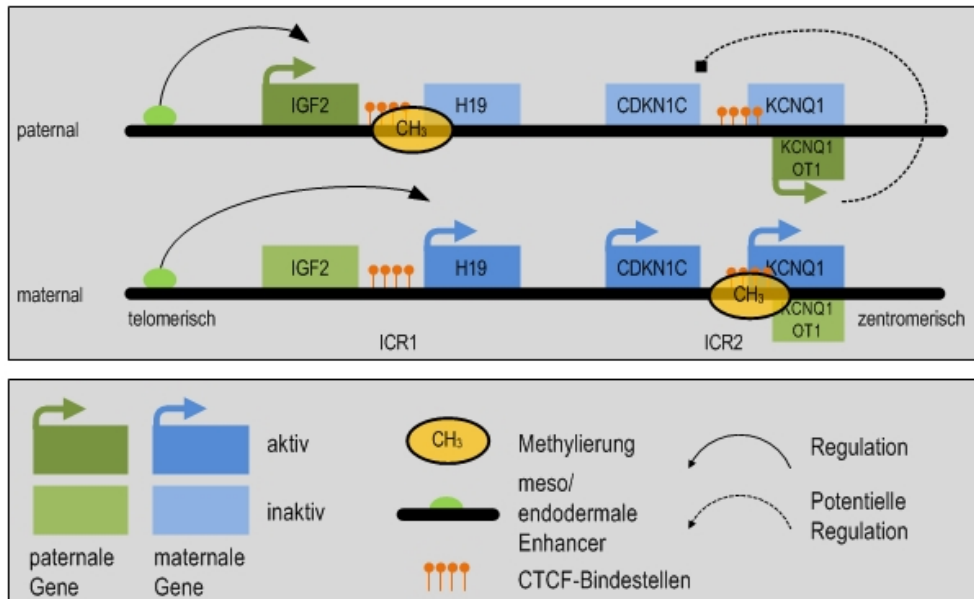


Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über die Region 11p15.5 mit den Imprinting Control Centern 1 (ICR1) und ICR2 bei normaler Methylierung des paternalen und des maternalen Allels (in Anlehnung an Abu-Amero et al., 2008).

IGF2 ist ein Mitglied der Insulin-Familie von Polypeptid-Wachstumsfaktoren. Die Expression erfolgt beim Menschen vom paternalen Allel und führt zu verschiedenen Isoformen. Eine Isoform wird vom *IGF2P0*-Promoter reguliert, anders als bei Mäusen ist diese jedoch nicht auf die plazentare Expression beschränkt. Weitere Isoformen werden vom Insulin-Promoter aus transkribiert und führen zu einem Fusionstranskript *INSIGF* (Monk et al., 2006). *IGF2* spielt eine Rolle bei der Stimulation der Zellproliferation und der Regulation der Insulin-Wirkung.

H19 kodiert für eine ca. 2,3 kb große, nicht translatierte RNA und gehört damit zur Gruppe der *long noncoding RNAs*. *H19* unterliegt einem Imprinting und wird ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert. Die genaue Funktion von *H19* ist bisher noch ungeklärt. Innerhalb des *H19*-Gens sind weitere Transkripte kodiert, darunter die Mikro-RNA miR-675. Keniry et al. (2012) beschreiben *H19* als Reservoir für die Mikro-RNA miR-675. Bei Bedarf wird diese aus vorliegenden *H19*-Transkripten prozessiert und erfüllt dann die eigentlichen regulatorischen Aufgaben. Für die miR-675 konnte gezeigt werden, dass diese eine gesteigerte Expression des Zellzyklusregulators *Rb* bewirken kann (Tsang et al., 2010) und den Rezeptor des Wachstumsfaktors *IGF1* herunter reguliert (Keniry et al., 2012). Weitere Effekte wurden auch auf die Expression von *NOMO1*, einem

Antagonisten des Nodal-Signalwegs, gefunden. *NODAL* gehört zur Familie der TGF- β -Wachstumsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle beim Trophoblastenwachstum. Onyango and Feinberg (2011) beschrieben ein Antisense-Transkript in *H19*, welches zu *HOTS* (*H19* opposite tumor suppressor) translatiert wird und auf Proteinebene das Wachstum verschiedener Tumorzellen hemmt.

Das Gen *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)) liegt ebenfalls im Imprinting-Cluster auf Chromosom 11p15.5 und ist paternal methyliert (Hatada et al., 1996). Mutationen in *CDKN1C* sind für bis zu 40% der familiären Fälle des Beckwith-Wiedemann sowie für das IMAGE-Syndrom (OMIM #614732) verantwortlich (Hatada et al., 1997; Arboleda et al., 2012). *CDKN1C* ist ein Zellzyklusinhibitor und negativer Regulator der Zellproliferation und wird für den TGF- β induzierten Zellzyklusarrest benötigt (Scandura et al., 2004). Eine Beteiligung von *CDKN1C* an der Genese verschiedener Tumoren wird ebenfalls berichtet (Kikuchi et al., 2002).

KCNQ1OT1 (*KCNQ1* overlapping transcript 1; *LIT1*, Long-QT internal transcript) ist ein 60 kb großes Antisense-Transkript, das das Exon 10 von *KCNQ1* überspannt. Es wurde bei der Suche nach weiteren geprägten Genen in der Region 11p15 identifiziert und ist ebenfalls geprägt, mit präferentieller Transkription des paternalen Allels. (Mitsuya et al., 1999). Die zu *KCNQ1OT1* gehörende KvDMR (ICR2), welche in Intron 10 des *KCNQ1*-Gens lokalisiert ist, ist im Normalfall maternal methyliert, weist aber bei bis zu 40% der BWS-Patienten ein *loss of imprinting* (LOI) auf. Niemitz et al. (2004) berichten von einer Mikrodeletion, welche das gesamte *KCNQ1OT1*-Gen umfasst und bei maternaler Transmission einen BWS-Phänotyp inklusive reduzierter Expression von *CDKN1C* verursacht. Eine paternale Weitergabe der Deletion verursacht keinen Phänotyp.

1.2.1.2 Chromosom 7

Die Beteiligung von Chromosom 7 bei der Entstehung des Silver-Russell-Syndroms geht zurück auf den Befund einer maternalen uniparentalen Disomie des Chromosom 7 mit gleichzeitiger Demaskierung einer rezessiven Mutation für Cystische Fibrose im *CFTR*-Gen (Spence et al., 1988). Die Patienten wiesen einen stärker ausgeprägten Kleinwuchs auf als für CF-Patienten üblich, was die Autoren veranlasste den Verdacht auf Vorliegen eines SRS zu äußern. Die Beschreibung von CF-Patienten mit maternaler uniparentaler

Disomie 7 durch Spence et al. (1988) und Voss et al. (1989) war gleichzeitig auch die erste Beschreibung einer UPD beim Menschen überhaupt. Kotzot et al. (1995) fanden bei vier von 35 SRS-Patienten eine upd(7)mat und postulierten das Vorhandensein von mindestens einem maternal geprägten Faktor auf Chromosom 7, der ursächlich für die Entstehung eines SRS sein könnte. Ein vergleichbarer Anteil von 7-10 % der SRS-Patienten mit einer upd(7)mat wurde in weiteren Studien bestätigt (zur Übersicht Eggermann et al., 1997). Der genaue Mechanismus der Entstehung eines Silver-Russell-Syndroms durch eine upd(7)mat ist bisher unbekannt. Es werden aber verschiedene Kandidatengene und Regionen auf Chromosom 7 diskutiert (Abbildung 1.4). Die Suche nach einem rezessiven Faktor in einem gemeinsamen, isodisomen Segment bei SRS-Patienten mit upd(7)mat war bisher erfolglos (Preece et al., 1999), so dass angenommen wird, dass die maternalisierte Expression eines geprägten Faktors zur Ausprägung eines SRS führt. Dennoch konnten auf Chromosom 7 zwei Regionen mit geprägten Genen identifiziert werden, die eine Reihe von Kandidatengenen enthalten (Abbildung 1.4). Mutationsscreenings in den im Nachfolgenden beschriebenen Genen konnten bisher keine das SRS verursachenden Varianten nachweisen (Abu-Amero et al., 2008).

Gene in der Region 7p11.2-p13 Eine Region mit Kandidatengenen liegt im Bereich 7p11.2-p13 und enthält einige Gene die für Wachstum und Entwicklung eine Rolle spielen, darunter *IGFBP1*, *IGFBP3*, *EGFR* und *GRB10/MEG1* (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 10 / Maternally Expressed Gene 1*) (Abbildung 1.4).

GRB10 wurde u. a. bei der Suche nach Faktoren des Insulin-Signalweges identifiziert (Liu and Roth, 1995) und stellt einen vielversprechenden Kandidaten dar, da es einer mütterlichen Prägung unterliegt (Miyoshi et al., 1998). Eine Überexpression von *Grb10* in Mäusen verursacht eine Wachstumsretardierung sowie Insulinresistenz und unterstreicht die Rolle als Kandidatengen für das SRS (Shiura et al., 2005). Eine die Region 7p11.2-p13 betreffende Duplikation (Abbildung 1.4) bei einem Patienten mit SRS lässt eine Beteiligung von *GRB10* an der Ätiologie des SRS möglich erscheinen (Monk et al., 2000). Der Nachweis von maternalen UPDs die auf den langen Arm von Chromosom 7 beschränkt sind, lassen aber auch einen maternalen Faktor auf dem q-Arm als Kandidaten vermuten (Eggermann et al., 2008b).

Gene in der Region 7q32 Die Region 7q32 stellt eine weitere Kandidatengenregionen für das SRS auf Chromosom 7 dar, da auch Patienten mit einer auf den q-Arm

Abbildung 1.4

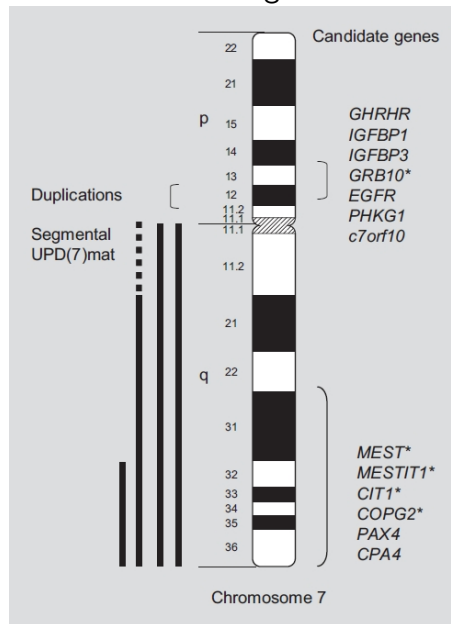


Abbildung 1.4: Kandidatengene für das Silver-Russell-Syndrom auf Chromosom 7 (* Gen unterliegt einem Imprinting). (Aus Eggermann; Cappa M, Maghnie M, Loche S, Bottazzo GF (eds): Endocrine Involvement in Developmental Syndromes. Endocr Dev. Basel, Karger, 2009, vol 14, pp 10–19, mit freundlicher Genehmigung der S. Karger AG/Basel)

beschränkten maternalen UPD mit SRS beschrieben wurden. Sie beinhaltet außerdem drei geprägte Gene (*MEST/PEG1*, *CPA4*, *COPG2*) sowie zwei *long noncoding RNAs* (*MESTIT1*, *CIT1/COPG2IT1*), die eine Rolle bei der Ätiologie des SRS spielen könnten (Abbildung 1.4).

MEST (Mesoderm-specific transcript homolog) wurde zuerst als geprägtes und paternal exprimiertes Gen 1 / *PEG1* bei Mäusen identifiziert (Kaneko-Ishino et al., 1995). Aufgrund seiner maternalen Prägung wird es als Kandidatengen für das SRS diskutiert. Die Suche nach Mutationen in *MEST* bei SRS-Patienten blieb aber ohne Ergebnis (Kobayashi et al., 2001).

CPA4 und COPG2 (*CPA4* - Carboxypeptidase A4, *COPG2* - coatomer protein complex, subunit gamma 2) wurden aufgrund ihrer Nähe zum *MEST*-Locus und ihrer Prägung ebenfalls als Kandidatengene für das SRS in Erwägung gezogen. *COPG2* liegt direkt benachbart, mit dem 3'-Ende angrenzend, an *MEST*. Mutationen bei SRS-Patienten ließen sich aber in beiden Genen bisher nicht nachweisen (Bentley et al., 2003; Kayashima

et al., 2003). Ein von Maclsaac et al. (2012) identifiziertes, langes *MEST*-Transkript, *MestXL* mit einer Größe von mehr als 10 kb scheint über das Gen *COPG2* hinweg transkribiert zu werden und so die Expression von *COPG2* zu regulieren.

1.2.2 Transienter Neonataler Diabetes Mellitus - Chromosom 6

Der transiente neonatale Diabetes Mellitus (TNDM, OMIM #601410) stellt eine IE bei Neugeborenen dar und ist definiert als insulinpflichtige Hyperglykämie. *PLAGL1* (pleiomorphic adenoma gene-like 1) wurde von Kamiya et al. (2000) als potentieller Kandidat für TNDM in einem Screening nach geprägten Genen identifiziert. *PLAGL1* ist paternal exprimiert und maternal geprägt. Weitere unterstützende Hinweise auf *PLAGL1* kamen durch die Beschreibung einer paternalen UPD und einer partiellen Duplikation des langen Arms von Chromosom 6 (Temple et al., 1995, 1996).

1.2.3 upd(14)-Syndrome - Chromosom 14

1.2.3.1 Temple- / upd(14)mat-Syndrom

Das Temple-Syndrom oder upd(14)mat-Syndrom ist gekennzeichnet durch eine intrauterine Wachstumsretardierung, eine angeborene Hypotonie, moderate mentale Retardierung, motorische Entwicklungsverzögerung, vorzeitige Pubertät und eine geringe Körpergröße (Temple et al., 1991). Das Syndrom weist einen definierten Phänotyp auf, besonders in der neugeborenen Phase aber bestehen Ähnlichkeiten zum SRS bzw. zum PWS, welche Differentialdiagnosen darstellen (Hoffmann and Heller, 2011).

Neben der upd(14)mat wurde auch ein isolierter Imprinting-Defekt bei Patienten mit Temple-Syndrom beschrieben (Temple et al., 2007). In der Region 14q32 liegt eine differentiell Methylierte Region (IG-DMR - intergenische differentiell methylierte Region) die einer paternalen Methylierung unterliegt (Wylie et al., 2000). Neben der IG-DMR befindet sich in dieser Region die ebenfalls differentiell methylierte *MEG3*-DMR und einige Gene, wie *DLK1* (delta-like 1 homolog (Drosophila)), ein Transmembranprotein und Wachstumsregulator der EGF-like-Familie, *GTL2* (gene trap locus 2) eine *long noncoding RNA*, sowie *RTL1* (*retrotransposon-like 1*) und *RTL1as* (*RTL1 antisense*) (Abbildung 1.5).

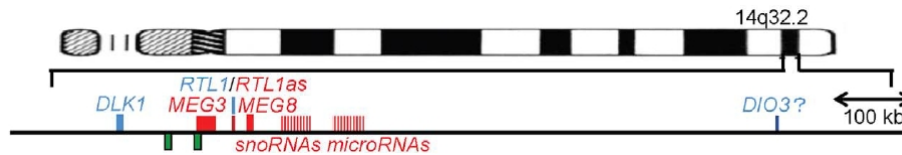


Abbildung 1.5: Übersicht über die Region 14q32 mit den differenziell methylierten Bereichen IG-DMR und MEG3-DMR. (Aus Kagami et al., 2010).

1.2.3.2 Wang-Syndrom / upd(14)pat-Syndrom

Die paternale UPD des Chromosoms 14 (OMIM #608149) zeichnet sich durch einen weit schwereren Phänotyp als die upd(14)mat aus. Der Phänotyp ist gekennzeichnet durch Skelettfehlbildungen, im besonderen durch einen glockenförmigen Thorax, faciale Dysmorphien, mentale Retardierung sowie eine Entwicklungsverzögerung (Cotter et al., 1997). Der Verlauf ist relativ schwer, die Mortalität durch postnatale respiratorische Insuffizienz hoch (zur Übersicht Kagami et al., 2012).

1.2.4 Prader-Willi- / Angelmann-Syndrom - Chromosom 15

Zu den bekanntesten IEs zählen das PWS (OMIM #176270) und das AS (OMIM #105830). Beide Erkrankungen werden durch Mutationen im *UBE3A*-Gen oder Methylierungsveränderungen im *SNRPN*-Locus auf Chromosom 15 verursacht.

Das PWS ist gekennzeichnet durch eine reduzierte fetale Aktivität, muskuläre Hypotonie, Kleinwuchs und im späteren Verlauf von Adipositas. Bei ca. 70 % lässt sich eine Deletion von paternalem Material im Bereich 15q11-q13 nachweisen. Unter den verbleibenden Patienten findet sich bei ca. 29 % eine maternale UPD, ca. 1 % weist isolierte Imprinting-Defekte am *SNURF-SNRPN*-Locus auf.

Beim AS hingegen steht die gestörte neuronale Entwicklung im Vordergrund. Mentale Retardierung, Bewegungs- und Gleichgewichtsstörungen sowie eine schwere Beeinträchtigung der Sprache und Verhaltensauffälligkeiten zeichnen den Phänotyp aus.

Wie beim PWS liegt auch beim AS bei ca. 70 % der Patienten eine Deletion in 15q11-q13 vor, die aber das maternale Chromosom betrifft. In 5-10 % der Fälle lassen sich Punktmutationen im *UBE3A*-Gen nachweisen und 3-5 % haben ein verändertes Methylierungsmuster am *SNRPN*-Locus. Uniparentale Disomien sind die Ursache für ein AS in 1-2 % der Fälle (zur Übersicht Horsthemke and Wagstaff, 2008).

1.2.5 Pseudohypoparathyroidismus 1b - Chromosom 20

Der Pseudohypoparathyroidismus Typ1b (PHP1b, OMIM #103580) ist eine erbliche Erkrankung, die sich durch eine Resistenz gegen Parathyroidhormon (PTH) in der Niere äußert. Aus der Hormonresistenz resultieren Symptome wie ein erhöhter PTH- und Phosphat-Spiegel im Serum sowie eine erniedrigte Calciumkonzentration. Im Gegensatz zum PHP1a dessen Phänotyp typische Skelett-Fehlbildungen, Kleinwuchs und Brachydaktylie beinhaltet und der als erbliche Albright Osteodystrophie (AHO) bezeichnet wird, treten diese Manifestationen beim PHP1b in der Regel nicht auf. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch Mutationen im *Gs-alpha*-Gen (*GNAS* - guanine nucleotide binding protein alpha stimulating activity polypeptide) (Mouallem et al., 2008; Lubell et al., 2009). *GNAS* ist auf Chromosom 20q13.3 lokalisiert und unterliegt einem komplexen gewebespezifischen Imprinting mit unterschiedlichen Isoformen, was zu einer variablen Ausprägung des Phänotyps beiträgt. Unterschiedliche Defekte einschließlich Deletionen, uniparentaler Disomien des Chromosom 20 und Methylierungsdefekte sind für PHP1b und andere PHP-Subtypen beschrieben worden (Bastepe and Jüppner, 2005). Der Subtyp PHP Typ 1b stellt dabei eine definierte IE dar und ist gekennzeichnet durch das Vorliegen einer Hormonresistenz bei fehlendem AHO-Phänotyp. Zugrunde liegt dem PHP1b ein Imprinting-Defekt am *GNAS*-Locus, der die gewebespezifische monoallelische Expression durchbricht (Kelsey, 2010).

1.3 Multi-Locus-Methylierungsdefekte

Beim Menschen wurden bisher die acht o. g. verschiedenen Imprinting-Erkrankungen beschrieben, die sich zwar klar voneinander abgrenzen lassen, bisweilen aber gemeinsame phänotypische Merkmale aufweisen. Weitere Gemeinsamkeiten stellen die molekularen Befunde bei allen IE dar, es lassen sich UPDs, Deletionen, isolierte Methylierungsveränderungen, sowie bei einigen Erkrankungen Duplikationen nachweisen. Dennoch war eine Zuordnung von Veränderungen an einem spezifischen Locus zu einer spezifischen Erkrankung möglich. Dieses Muster wurde mit der Beschreibung von TNDM-Patienten mit Methylierungsveränderungen an weiteren Loci durch Mackay et al. (2006a) in Frage gestellt. Bei einigen der Patienten konnten Mutationen im *ZFP57*-Gen für die veränderte Methylierung verantwortlich gemacht werden. Da die zusätzlichen Veränderungen auf maternal geprägte Loci beschränkt waren, wurde die Beobachtung als Maternales-Hypomethylierungs-Syndrom (MHS) bezeichnet (Mackay et al., 2008).

1.3 Multi-Locus-Methylierungsdefekte

Der Nachweis von weiteren betroffenen Loci bei Patienten mit anderen IEs folgte relativ zeitnah. Azzi et al. (2009) konnten bei ca. 9,5 % der untersuchten SRS-Patienten mit initial nachgewiesener ICR1-Hypomethylierung und bei etwa 23,5 % der BWS Patienten mit bestätigter Hypomethylierung der ICR2, weitere Loci mit Methylierungsveränderungen nachweisen. Am häufigsten fand sich dabei zusätzlich eine Reduktion der Methylierung in *DLK1* bei den SRS Patienten. Bei den BWS Patienten waren *PLAGL1* und *MEST* am häufigsten betroffen (Tabelle 1.2).

Die Beobachtung, dass neben den krankheitsspezifischen Loci von IE noch weitere Methylierungsveränderungen auch an anderen Loci bei Patienten gefunden werden, wird zunehmend unter dem Begriff Multilocus-Methylierungsdefekte (MLMD) geführt, da sowohl maternal als auch paternal geprägte Gene bzw. Imprinting-Cluster involviert sind.

Tabelle 1.2: Häufigkeiten der betroffenen Loci bei SRS- und BWS-Patienten mit MLMD (nach Azzi et al., 2009)

Locus	MLMD SRS (n=7)	MLMD BWS (n=16)
ICR1 11p15	7 (100 %)	1 (6,3 %)
ICR2 11p15	3 (43 %)	16 (100 %)
PLAGL1	2 (29 %)	6 (37,5 %)
SNRPN	1 (14 %)	1 (6,3 %)
MEST	3 (43 %)	6 (37,5 %)
DLK1/GTL2	5 (71 %)	0 (0 %)
Anzahl Patienten mit 2 betroffenen Loci	3 (43 %)	10 (62,5 %)
Anzahl Patienten ≥ 3 betroffenen Loci	4 (57 %)	6 (37,5 %)

Diese Veränderungen wurden zwischenzeitlich bei nahezu allen IEs beobachtet, wobei das Phänomen wohl nur beim BWS, SRS und TNDM häufiger auftritt (zur Übersicht Eggermann et al., 2013). Interessanterweise treten sowohl bei SRS- als auch BWS-Patienten dabei gleichartige Veränderungen auf. Für beide Gruppen sind Patienten beschrieben, die sowohl in der ICR1 als auch in der ICR2 auf 11p15.5 Hypomethylierungen tragen, aber meist einen syndromtypischen Phänotyp aufweisen. Wie es trotz gleichartiger Veränderungen zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen kommt, ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise spielen somatische Mosaik eine Rolle bei der Festlegung des Krankheitsbildes oder die Dominanz einer ICR über die andere, in Abhängigkeit von der Ausprägung des Methylierungsdefekts (Azzi et al., 2009, 2010).

Neben den SRS- und BWS-Patienten mit gleichartigen epigenetischen Veränderungen in 11p15.5 wurden auch eineiige Zwillinge beschrieben, von denen aber nur ein Zwilling einen tatsächlichen Phänotyp aufweist obwohl, beide den gleichen Methylierungsdefekt tragen (Blik et al., 2009a).

Die etwa 60 bekannten Gene beim Menschen, die einem Imprinting unterliegen, lassen einen komplexen Mechanismus vermuten, der die Regulation, Aufrechterhaltung und das Setzen von Methylierungsmuster steuert. Neben *cis*-regulatorischen Elementen wie DMRs im allgemeinen, CTCF-Bindestellen, Enhancern und antisense-RNAs, die einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression eines Locus haben, scheinen auch solche *cis*-wirkenden Faktoren zu existieren, die einen Effekt auf den Methylierungsstatus eines Locus haben. Demars et al. (2010) berichten von BWS-Patienten mit Mutationen und Deletionen in OCT-Bindestellen der ICR1, die vermutlich mit der Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustandes des Locus in Verbindung stehen. Bei Patienten mit AS konnte gezeigt werden, dass Mutationen in OCT-Bindestellen des zugehörigen *Imprinting Center* einen direkten Einfluss auf den Methylierungsstatus haben und zu einem Zugewinn an Methylierung führen (Kaufman et al., 2009).

Während Defekte in *cis*-regulatorischen Elementen einen Locus-spezifischen Effekt vermuten lassen, kann bei *trans*-wirkenden Faktoren ein globaler Effekt auf den Methylierungsstatus postuliert werden. Tatsächlich wurden bereits Patienten mit TNDM und MLMD beschrieben, die Mutationen in *ZFP57* aufweisen (Mackay et al., 2008). Beim BWS scheinen Mutationen in *NLRP2* bei der Mutter, das vermutlich eine Rolle bei der Etablierung von Imprinting-Signalen spielt, bei Nachkommen ein BWS mit LOM der ICR2 zu verursachen und sind damit Ursache einer familiären Imprinting-Erkrankung (Meyer et al., 2009). Bei einem der betroffenen Nachkommen war zusätzlich ein Methylierungsdefekt des *MEST*-Locus im Sinne eines MLMD zu beobachten, was die Rolle von *NLRP2* beim Mechanismus des Imprinting unterstreicht.

Eine Gruppe potentieller Kandidaten, die bei der Genese von IE beteiligt sein könnte, stellen die Enzyme dar, die als Methyltransferasen bezeichnet werden. Bei Mäusen wurde eine Beteiligung von Dnmt1 beim Setzen von Imprinting-Signalen bereits nachgewiesen (Howell et al., 2001). Mit *DNMT3L* wird ein weitere Kandidat diskutiert, bisher konnte aber eine Beteiligung bei der Entstehung von IE nicht nachgewiesen werden (Blik et al., 2009a).

Auf die Existenz weiterer in *trans*-wirkender Faktoren weist auch der Bericht einer upd(7q)mat mit zusätzlicher Hypomethylierung des *DLK1/GTL2*-Locus hin, auch wenn

1.3 Multi-Locus-Methylierungsdefekte

der entsprechen Faktor noch nicht identifiziert werden konnte (Begemann et al., 2012c; Eggermann et al., 2013).

Neben den Hinweisen auf *trans*-wirkende Elemente, die den Methylierungsstatus geprägter Loci beeinflussen, gibt es eine steigende Anzahl von Forschungsergebnissen, die auf eine wechselseitige Beeinflussung geprägter Gene hin deuten. So wurde bereits von Niemitz et al. (2004) gezeigt, dass der Verlust des gesamten *KCNQ1*-Gens einen Einfluss auf die Expression von *CDKN1C* hat. Immer mehr Daten sprechen dafür, dass komplexe Regulationsmechanismen im Sinne eines Netzwerks von geprägten Genen existieren (Abbildung 1.6) (Varrault et al., 2006). Arima et al. (2005) konnten zeigen, dass *Zac* (*PLAGL1*) bei Mäusen in Abhängigkeit der Methylierung an CpG-Inseln bei *KCNQ1OT1* bindet und darüber die Expression von *CDKN1C* reguliert.

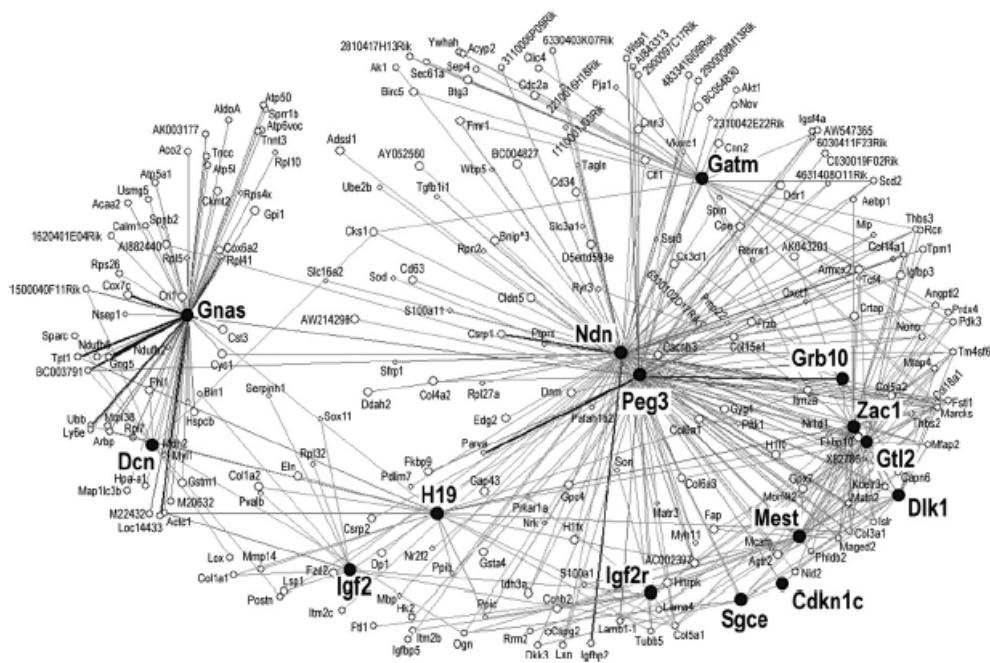


Abbildung 1.6: Netzwerk geprägter Gene. Jede Verbindungslinie gibt die Koregulation in einem Datensatz von >100 Mikroarrays an. Gewählt wurden 246 Gene, die mit mindestens drei geprägten Genen in Verbindung stehen. Die Liniestärke gibt die Häufigkeit der Koregulation an (Varrault et al., 2006).

1.4 Zielsetzung

Bei Patienten mit einem klinisch diagnostizierten Silver-Russell-Syndrom (SRS) lassen sich in ca. 40 % der Fälle Methylierungsveränderungen in der ICR1 auf Chromosom 11p15.5 nachweisen, 7-10 % der Patienten sind Träger einer upd(7)mat und in 20 % lassen sich chromosomale Aberrationen darstellen. Durch die Beschreibung von TNDM-Patienten mit Methylierungsveränderungen an weiteren Loci neben *PLAGL1* ist in den letzten Jahren das Phänomen MLMD (Multilocus-Methylierungsdefekte) in den Fokus der Forschung gerückt (Mackay et al., 2006b,2008). Bei SRS-Patienten sind weitere Methylierungsveränderungen bei einem Anteil von ca. 8-9 % der Patienten mit ICR1-Hypomethylierung nachweisbar (Eggermann et al., 2013). Unter den 20 % der SRS-Patienten mit strukturellen chromosomalen Veränderungen finden sich weiterhin häufig solche, die auch die Region 11p15 betreffen (Spengler et al., 2012).

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die **Ermittlung der Verbreitung und Häufigkeit der MLMD** im Zusammenhang mit dem SRS. Dazu wurden 93 als idiopathisch bezeichnete SRS-Patienten mit unklarer Genese analysiert. Neben der Identifikation eines MLMD mit einer sehr sensitiven Methode sollten auch Veränderungen erfasst werden, die nur schwach ausgeprägt sind und von den klassischerweise verwendeten Methoden nicht detektiert werden können.

Der zweite Schwerpunkt des Dissertationsvorhabens lag in funktionellen **Charakterisierungen spezifischer Patientenzelllinien**: Seit einiger Zeit mehren sich Berichte in der Literatur, die auf eine Interaktion geprägter Gene im Sinne eines Netzwerks hindeuten, die eine wesentliche Rolle für Wachstum und Entwicklung spielen (Arima et al., 2005; Varrault et al., 2006). Hautbiopsien von vier SRS-Patienten mit upd(7)mat sollten mit den verschiedenen Methoden (epi)genetisch charakterisiert und an den gewonnenen Fibroblastenkulturen die Auswirkungen von Genommutationen (z.B. der upd(7)mat) auf die Expression der in einem Netzwerk organisierten geprägten Gene untersucht werden. Von SRS-Patienten mit MLMD und einigen Angehörigen konnten ebenfalls Hautbiopsien gewonnen werden, die im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht werden sollten. In einem ersten Schritt war vorgesehen diese Proben (epi)genetisch zu charakterisieren und nachfolgend Expressionsanalysen durchzuführen, um die Genexpression in Bezug auf die veränderten Methylierungsmuster zu bestimmen. Die Sequenzierung von Kandidatengen für die Entstehung eines MLMD bei SRS-Patienten sollte an diesen Probanden ebenfalls durchgeführt werden.

Da sich bei einem signifikanten Anteil der SRS-Patienten auch chromosomale Verände-

rungen finden, sollte im Rahmen dieser Arbeit an Patienten mit der Verdachtsdiagnose SRS nach Ausschluss der typischen (epi)genetischen Veränderungen eine **molekulare Karyotypisierung** durchgeführt werden. Auf diese Weise wurden mittels SNP-Array-Analyse strukturelle Veränderungen identifiziert, die die Region 11p15 betreffen. Um die Auswirkungen solcher Umbauten zu untersuchen, sollten diese in Bezug auf ihre Position, Größe und elterliche Herkunft sowie mögliche Auswirkungen auf die Methylierungsmuster bei den Patienten überprüft werden. Zur besseren Einordnung der Deletions- und Duplikationsbefunde und ihrer klinischen Relevanz wurden die identifizierten strukturellen Aberrationen in 11p15 mit in der Literatur publizierten Fällen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Autoklav:
 - HV-85 (HD-Tek, Süßen, D)
- Brutschränke:
 - Heraeus HERAcell 150 CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)
 - HeraHybrid 6 100C (Kendro, Langenselbold, D)
- Fluidics-Station
 - GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Geldokumentation:
 - Imaging-System Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München, D)
 - Gelkammern: Gelkammer EasyPhor Maxi (Biozym, Hess. Oldendorf, D)
 - Gelträger 20x20cm (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
 - 22-Zahn-Kämme (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
 - Serva Gelkammer DM100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D)
- Hybridisierungsöfen:
 - GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Heizblock:
 - Dry-Block DB3D (Techne, Wertheim, D)

- UnitekTM HBS-130/E (peqlab, Erlangen, D)
- Magnetrührer:
 - Ikamag RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen, D)
- Netzteile:
 - Electrophoresis Power Supply PS 304 (Gibco BRL, Groningen, NL)
 - Whatman Biometra Model PS304 Power Supply (Biometra, Göppingen, D)
- pH-Meter:
 - Bench Meter PH211 (HANNA Instruments, Kehl am Rhein, D)
- Photometer:
 - Bio Photometer (Eppendorf, Köln, D)
- Pipetten:
 - Pipette P10, P20, P100, P200, P1000, (Gilson, Villiers-le-Bel, F)
 - Discovery Comfort, DV10, DV20, DV100, DV200, DV1000, (Abimed, Langenfeld, D)
 - serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D)
- Realtime PCR Gerät:
 - StepOnePlus (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- Sequenzierer:
 - AB3130 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- Scanner
 - GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Schüttler:
 - Thermomixer 5437 (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Sterilarbeitsbänke:

- HeraSafe KS12 (Thermo Electron, Langenselbold, D)
- HeraSafe HS12 (Kendro Laboratory Products, Hanau, D)
- Thermocycler:
 - Thermo Hybaid Px2 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)
 - Thermocycler PTC 200 DNA Engine, MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf, D)
- Waagen:
 - Sartorius BP615 (Sartorius AG., Göttingen, D)
 - Sartorius BP2100 (Sartorius AG., Göttingen, D)
- Wasserbäder:
 - Lauda Ecoline Refrigerating Circulators RE-200 (LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, D)
 - GFL 1086 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D)
- Zentrifugen:
 - Heraeus Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)
 - Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, D)
 - Heraeus Megafuge 1.0R (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)
 - Heraeus Christ Varifuge K (Heraeus-Christ GmbH, Osterode, D)
 - Eppendorf 5430 Plattenfuge (Eppendorf, Hamburg, D)

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren vom Reinheitsgrad p. a. und wurden von folgenden Herstellern bezogen:

- Applichem, Weiterstadt, D
- Applied Biosystems, Darmstadt, D
- BioRad, Hercules, USA
- Biozym, Oldendorf, D

- Boehringer, Mannheim, D
- Dianova, Hamburg, D
- ICN Biomedicals, Ohio, USA
- Invitrogen, Karlsruhe, D
- Merck, Weiterstadt, D
- Promega, Mannheim, D
- Riedel de Haen, Seelze, D
- Roth, Karlsruhe, D
- Serva, Heidelberg, D
- SigmaAldrich, Dreisenhofen, D
- USB, Cleveland, USA
- Zymo Research, CA, USA

Oligonukleotide

Oligonukleotide und Primer wurden von der Eurofins MWG GmbH Ebersberg synthetisiert. Das Design der Primer erfolgte mit der online verfügbaren Software Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000), die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben. Für das Design der Primer wurden RefSeq Sequenzen genutzt, die über den UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) bzw. die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verfügbar sind. Die entsprechenden Transkripte sind in den Beschreibungen der Methode angegeben. Die für die quantitative Realtime PCR verwendeten Oligonukleotide und Sonden wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, D) als vorgefertigte TaqMan® Assays bezogen. Die entsprechenden Assay-IDs finden sich im Anhang.

Reagenzien und Enzyme

Zellkultur

- DMEM Medium, High Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Quantum 333, Medium für Fibroblasten (PAA Laboratories, Cölbe, D)

- Fetal Bovine Serum (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, D)
- 0.05% Trypsin-EDTA 1X, Phenol Rot (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Collagenase B from *Clostridium histolyticum* (Roche, Mannheim, D)
- MycoZap™ Plus-PR (Lonza, Köln, D)
- Penicillin-Streptomycin, (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, D)

Reaktionskits und Enzyme

- ABI PRISM Multiplex SNaPshot Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- AccuGENE™ Molecular Biology Water (Lonza, Köln, D)
- Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D)
- AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- DNA Marker. 100 bp-Leiter & 50 bp-Leiter, 1 µg/µl (Invitrogen, Karlsruhe, D)
- ExoSAP-IT™ (USB Corporation, Cleveland, USA)
- EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange County, CA, USA)
- GeneScan LIZ120 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- GeneScan LIZ500 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- HiDi-Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- HotStar Taq-DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, D)
- Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas, St.- Leon-Rot, D)
- Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, D)
- Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Power SYBR Green Mastermix, (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D)

- QIAamp RNA Blood Mini Kit, (Qiagen, Hilden, D)
- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt/Main, D)
- FastDigest® Enzymes (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- SALSA MLPA kit ME030 BWS/RSS (MRC-Holland, Amsterdam, NL)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (Affymetrix/USB Corporation, High Wycombe, UK)
- SNaPshot®- Matrix-Standard-Set DS02 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- SNP6.0 Core Reagent Kit (Affymetrix, High Wycombe, UK)
- T4 DNA Ligase, 10x (New England Biolabs, Frankfurt/Main, D)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- TITANIUM DNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA)

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien des täglichen Bedarfs wurden über den Fertigvorrat des Universitätsklinikum der RWTH Aachen bezogen. Des Weiteren wurden folgende Materialien genutzt:

- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 ml (Applied Biosystem, Darmstadt, D)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystem, Darmstadt, D)
- Nunc Cryo Tube Vials (Thermo Fischer, Schwerte, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für bestimmte Analysen ist es notwendig auf natives Material von Patienten zurückgreifen zu können oder einfach zu untersuchende Zelllinien zur Verfügung zu haben. Zu diesem Zweck wurden für die vorliegende Arbeit primäre Fibroblastenkulturen von Patienten angelegt, die aus Hautbiopsien der Probanden angezchtet wurden.

2.2.1.1 Anlegen von primären Zellkulturen

Die erhaltenen Hautbiopsien wurden mittels Skalpell und Pinzette auf einer Zellkulturschale in sehr kleine, etwa 0,5 mm³ große Stücke geschnitten und in einer 60 mm Zellkulturschale antrocknen gelassen. Alternativ wurde vor dem Zerkleinern mittels Skalpell ein Verdau des Biopsats mit Kollagenase B (10 mg/ml) durchgeführt. Das Biopsat wurde mit Zellkulturmedium überschichtet und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um Kontaminationen zu verhindern wurde das Zellkulturmedium mit Antibiotika versetzt. Zum Einsatz kamen Penicillin/Streptomycin gegen bakterielle Kontamination sowie Amphotericin gegen Pilzinfektionen. Das Medium wurde alle paar Tage erneuert. Sobald die Anzuchtschale bewachsen war, wurden die Zellen gesplittet, also auf mehrere größere Zellkulturschalen verteilt. Teilweise wurde auf den fertigen Antibiotika-Cocktail MycoZap PR-Plus (Lonza, Köln, D) zurückgegriffen, der zusätzliche eine Kontamination mit Mycoplasmen verhindern soll.

2.2.1.2 Splitten von Zellkulturen

Um adhärent wachsende Zellen von einer Kulturschale loszulösen, z. B. zur Überführung in ein neues Gefäß, werden diese mit Trypsin/EDTA behandelt. Dabei werden zum einen Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Zellen durch Trypsin verdaut, zum anderen wird durch EDTA das für die durch Cadherin vermittelte Adhäsion notwendige Ca²⁺ komplexiert. Dazu wird das Medium von den Zellen abgesaugt und diese kurz mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, da das im Medium enthaltene Serum die Trypsin-Reaktion hemmt. Die Zellen wurden je nach Größe der Kulturschale mit 0,5-3 ml Trypsin/EDTA versetzt und 10-30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen von der Kulturschale abgelöst waren konnten sie mit einer 1000 µl Pipette noch mechanisch vereinzelt und auf neue Kulturschalen verteilt werden.

2.2.1.3 Cryo-Konservierung von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu lagern und für spätere Versuche zur Verfügung zu haben bedient man sich der Cryo-Konservierung. Die Lagerung erfolgt in einem speziellen Medium aus Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Hierbei werden die Zellen wie beschrieben in einer 100 mm Kulturschale trypsinisiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur und etwa 1000 rpm zentrifugiert um sie

zu pelletieren. Das Zellpellet wird dann in 2-3 ml Konservierungsmedium aufgenommen und je 1 ml in ein Cryo-Röhrchen (Lonza) gefüllt. Diese werden dann erst bei -80°C im Gefrierschrank und zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4 Auftauen von cryo-konservierten Zellen

Das den Zellen für die Lagerung zugesetzte DMSO verhindert bei sehr niedrigen Temperaturen zwar die Bildung von Eiskristallen die die Zellen schädigen, ist aber bei Raumtemperatur toxisch und muss vor der Weiterkultivierung entfernt werden. Die tiefgekühlten Zellen wurden dazu bei RT aufgetaut und möglichst schnell mit 5-10 ml Medium versetzt. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend re-suspendiert und in eine Schale zur Kultivierung überführt.

2.2.2 Isolation und Synthese von Nukleinsäuren

2.2.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation von DNA aus Blut erfolgte durch ein einfaches Aussalzverfahren gemäß dem Protokoll von Miller et al. (1988). Einige DNA-Proben entstammten der Routinediagnostik und standen so bereits zur Verfügung. Alternativ wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) für die DNA-Isolation oder Aufreinigung verwendet.

2.2.2.2 RNA-Isolation

Für die Isolation von RNA wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Für eine spätere Weiterverarbeitung wurden die Zellen in dem im Kit enthaltenen RLT-Puffer bei -80°C gelagert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern wurde auf der Isolationssäule ein DNaseI Verdau ebenfalls gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die RNA bei 65°C für 10 Minuten denaturiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Bei der Synthese von cDNA wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase RNA in ein komplementäres DNA-Molekül umgeschrieben. Das erleichtert weitergehende Ana-

lysen, da RNA nicht sehr stabil und außerordentlich empfindlich gegenüber dem Abbau durch RNasen ist. Die Erststrang-Synthese erfolgte dabei ausgehend von oligo-dT Primern, die sich an den Poly-A-Schwanz von mRNAs anlagern, und einem Gemisch aus sogenannten Random-Hexamer Primern, die sich aufgrund ihrer Zusammensetzung aus sechs zufälligen Basen, statistisch verteilt an jedes vorhandenen RNA-Molekül anlagern können. Für die Synthese von cDNA wurde das Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas, St.-Leon-Rot, D) verwendet. Als Ausgangsmaterial kamen 3-5 µl (1-2 µg) RNA zum Einsatz. Die Synthese Reaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers in einem Thermocycler 10 Minuten für 25°C gefolgt von 30 Minuten bei 50°C sowie einem abschließenden Inaktivierungsschritt von 85°C für 5 Minuten.

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA gezielt für spezifische Analysen anzureichern bedient man sich der Methode der Polymerasekettenreaktion. Die Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes gelingt, indem dieses durch spezifische Oligonukleotide definiert wird, die am 5'-, und 3'-Ende des gewählten Bereichs komplementär an die genomische DNA binden. Ausgehend vom 3'-OH-Ende der Primer wird das flankierte Element klonal amplifiziert, indem komplementär zum Matrizenstrang die vier verschiedenen desoxy-Nukleotide eingebaut werden (dNTPs). Die Reaktion der PCR ist im Wesentlichen in drei Phasen gegliedert mit unterschiedlichen Temperaturen. Zu Beginn steht die Denaturierung der DNA, in der die Doppelstränge aufgeschmolzen werden. Daran schließt sich eine Annealing-Phase an, während der sich die Primer an die DNA anlagern, gefolgt von einer Elongationsphase, in der die DNA von einer thermostabilen Polymerase synthetisiert wird. Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt. Da die bereits synthetisierten DNA-Fragmente in späteren Zyklen ebenfalls als Matrize für die Neusynthese dienen können, wird eine exponentielle Amplifikation erreicht (Saiki et al., 1988). Während die Denaturierung und Elongationsphase meist bei den gleichen Temperaturen ablaufen (95°C bzw. 72°C), lässt sich durch Verändern der Annealingtemperatur der Primer eine höhere oder niedrigere Spezifität der PCR erzielen. Weitere Modifikationen lassen sich durch verschiedene Zusätze im PCR-Mix wie DMSO oder Harnstoff erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden oft sogenannte HotStart Polymerasen verwendet, die eine hohe Spezifität aufweisen da sie durch einen Antikörper blockiert sind, der erst durch eine Inkubation bei 95°C für mehrere Minuten inaktiviert wird. Dadurch lässt sich verhindern, dass bereits beim Ansetzen der PCR unspezifische Produkte erzeugt werden. Um erzeugte PCR-Produkte zu über-

prüfen wurden diese auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die DNA wandert entsprechend ihrer Ladung und Größe im Elektrische Feld. Dem Gel wird beim Gießen Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und fluoresziert bei der Anregung durch UV-Licht (260 nm), wodurch die erzeugten PCR-Produkte im Gel sichtbar werden. Für die Kontrolle von PCR-Produkten wurden in der Regel 1 %ige Agarosegele verwendet. Die Kontrolle der enzymatischen Fragmentierung für die Arrayanalytik erfolgte mit 3 %igen Gelen.

Zur Herstellung der Gele für die EasyPhor® Maxi Träger 20x25 cm (Biozym, Hessisch Oldendorf) wurden 3,5 g Agarose (Appllichem, Weiterstadt, D) in 350 ml 1x TBE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Die Lösung wurde auf einem Rotationsschüttler abkühlen gelassen, mit Ethidiumbromid versetzt und in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Es kamen 10 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung je 100 ml Gel zum Einsatz. Nach dem die Gele auspolymerisiert waren, wurden diese in die Gelkammern eingesetzt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE verwendet. Zur Kontrolle wurden je 5 µl PCR Produkt mit dem gleichen Volumen PCR-Ladepuffer versetzt und auf ein Gel aufgetragen. Zur Größenkontrolle lief ein parallel aufgetragener DNA-Größen Marker (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des PCR-Ladepuffers

Reagenz	Endkonzentration	Volumen [ml]
10 x TBE	1 x	1,0
Ficoll 400	20 %	4,0
Bromphenol-Blau	0,1 %	1,0
Aqua dest.	ad	10,0

2.2.3 Genomische Untersuchungs-Verfahren

2.2.3.1 Array-Analytik

Die Array-Analytik ermöglicht es nahezu genomweit, submikroskopische Imbalancen zu detektieren, also Deletionen und Duplikationen die mittels klassischer Zytogenetik nicht dargestellt werden können. Arrays bestehen in der Regel aus Glasflächen auf denen in definierten Rastern mehrere Millionen Marker aufgebracht sind, wobei Anzahl und Position jedes Markers im Raster bekannt ist. Die Methode beruht darauf, dass eine DNA-Probe mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird und dann gegen einen Array hybridisiert

wird. Die so markierte DNA-Probe lagert sich an die auf dem Array immobilisierten komplementären DNA-Fragmente an und ihre Fluoreszenzintensität kann gemessen werden. Die Intensität der Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Anzahl der gebundenen DNA-Moleküle. Da Anzahl und Position der Marker bekannt sind, lässt sich durch bioinformatische Verrechnung auf die Kopienzahl der durch einzelne Marker analysierte Bereiche in der Probe schließen. Die Auflösung der Arrays ist dabei abhängig von der Beschickung, also Art, Anzahl und Verteilung der verwendeten Marker im Genom. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Arrays handelte es sich um sog Oligo-SNP-Arrays. Oligo-SNP-Arrays basieren auf vielen verschiedenen Oligo-Nukleotiden von 25-85 bp, die über das gesamte Genom verteilt sind. Jedes dieser Oligomere ist gegen die Sequenzinformation eines SNP oder gegen eine Kopienzahl-Variante (CNV) gerichtet. Die Untersuchung von polymorphen SNPs erlaubt es neben der reinen Kopienzahlbestimmung des Genoms noch weitere Informationen zu erhalten. So sind z. B. uniparentale Isodisomien ganzer Chromosomen am Verlust von kopienzahlneutraler Heterozygotie (LOH) erkennbar. Daneben eignen sich SNP-Arrays auch zum Genotypisieren, für Assoziationsstudien und zur Analyse von Haplotypen. Ein Nachteil der Oligo-Arrays ist, dass sich mit der reduzierten Größe der Marker die Wahrscheinlichkeit von Fehlhybridisierungen erhöht. Da im Gegensatz zur Array-CGH hier keine direkte Analyse gegen eine Kontroll-DNA erfolgt, wird bioinformatisch gegen eine gewisse Anzahl hinterlegter Referenzproben gerechnet.

Analyse und Interpretation Veränderungen in der Menge des genetischen Materials werden wertneutral als Copy Number Variation (CNV) bezeichnet. Ihr Vorhandensein lässt nicht *per se* Rückschlüsse auf eine Assoziation mit dem Phänotyp schließen. Die Bewertung von CNVs kann bisweilen recht komplex sein und unter Umständen auch nicht abgeschlossen werden. Gewertet wurden bei der Analyse von CNVs nur solche Veränderungen in der Kopienzahl, die eine Größe von 100 kb überschritten. Die Bewertung der Pathogenität erfolgte nach dem von Spengler (2011) beschriebenen Algorithmus. Dabei erfolgt ein Abgleich mit einer eigenen Sammlung von CNVs, die im Laufe der Zeit erhoben wurde. Sollte eine Variante nicht darin enthalten sein, wird ein Abgleich mit mehreren Datenbanken durchgeführt. DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) ermöglicht einen Abgleich mit bekannten Syndromen und den gefundenen genomischen Veränderungen. Die Database of Genomic Variants / DGV (<http://projects.tcag.ca/variation/>) listet eine große Anzahl von CNVs, die in gesunden Kontrollproben gefunden wurden und kann zum Abgleich identifizierter Varianten genutzt werden. Ein weiteres Kriterium ist der Inhalt an genetischer Information. Je höher die Anzahl der Gene in einem CNV,

desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer ursächlichen Beziehung zum Phänotyp. Davon abweichend kann aber auch bei besserer Kenntnis einer chromosomalen Region die Auflösung höher gewählt werden als 100 kb. So kann unter Umständen, auch der Wegfall regulatorischer Elemente als ursächlich angesehen werden. Für die Array-Analysen wurde der Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Oligo-Array mit ca. 1,8 Millionen Markern, je zur Hälfte etwa polymorphe SNP-Marker und nicht-polymorphe Marker gegen CNVs. Davon sind ca. 200.000 gegen mehr als 5600 bekannte CNVs gerichtet, mehr als 740.000 Sonden sind relativ gleichmäßig über das Genom verteilt. Der mittlere Markerabstand beträgt etwa 700 bp.

Für die Analyse der DNA wurde zunächst eine enzymatische Fragmentierung durchgeführt. Dazu wurde in parallelen Ansätzen je ein *StyI* und ein *NspI* Verdau durchgeführt. Dabei entstehen 4 bp Überhänge, an die ein Adapter ligiert wurde, der eine Bindestelle für einen Universal-Primer enthält. Eine nachfolgende PCR mit diesem Universal-Primer amplifiziert die erzeugten Fragmente wobei Produkte im Bereich von 200-1100 bp erzeugt wurden. Die PCR-Produkte beider Verdau wurden vereinigt und einer Reinigung mit DNA-bindenden Beads unterzogen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mittels eines DNaseI-Verdau fragmentiert und mit einem Biotin-Label versehen. Über dieses Biotin-Label wird später der Streptavidin-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion im Scanner an die Produkte gebunden. Die Probenvorbereitung für die Array-Analysen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Abweichend wurde auf FastDigest® Restriktionsenzyme (Fermentas) zurückgegriffen.

Tabelle 2.2: Restriktionsverdau Array mit FastDigest® Enzymen

Reagenz	Volumen [μ l]
A. dest.	12,5
Fast Digest Buffer (10x)	2
FD NspI/StyI (10 U/ μ l)	0,5
DNA (50 ng/ μ l)	5

Nach dem Verdau wurde der Ansatz bei 65°C für 5 Minuten inaktiviert. Die Hybridisierung der Arrays erfolgte mit einer Affymetrix GeneChip® Fluidics Station 450 und einem Affymetrix GeneChip® Hybridization Oven 640. Gescannt wurden die Arrays mit einem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G.

2.2.3.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen erfolgte nach der Sanger-Methode, eine auch als Kettenabbruch-Methode benannte modifizierte PCR-Reaktion. Hierbei werden in einen Sequenzier-Reaktionsmix neben den vier verschiedenen dNTPs auch noch zu einem gewissen Anteil mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxy-Nukleotide zugegeben. Die fehlende 3'-OH Gruppe an diesen ddNTPs verhindert eine weitere Verlängerung des Moleküls. Stochastisch verteilt wird so nach jedem Nukleotid ein Abbruch erreicht. Damit die Sequenzinformation nur in einer Richtung ausgelesen wird und es nicht zu Überlagerungen kommt, wird in eine Sequenzier-PCR nur ein Primer eingesetzt. Mit einer anschließenden Gelelektrophorese lassen sich so die unterschiedlich großen DNA-Moleküle auftrennen und die Sequenzinformation kann anhand der verschiedenen Farbstoffe ausgelesen werden.

PCR-Produkt-Aufreinigung Für die Sequenzierung von PCR Produkten ist es notwendig überschüssige Nukleotide und PCR-Primer zu entfernen, um eine saubere Sequenz zu erhalten. Die Aufreinigung wurde enzymatisch mittels ExoSAP-IT® (usb, Cleveland, USA) durchgeführt. Dabei werden durch eine Shrimp Alkalische Phosphatase die 5'-Phosphate der Nukleotide entfernt und so inaktiviert. Nicht verbrauchte Primer werden durch eine Exonuklease abgebaut. Es wurden je 1 µl PCR Produkt mit 1 µl ExoSAP-IT® sowie 5 µl Aqua dest. versetzt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, gefolgt von einem 15 Minuten Inaktivierungsschritt bei 80°C. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler.

Sequenzier-PCR Für die Sequenzierreaktion wurde je 1 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 0,5 µl Sequenzierprimer versetzt. Dieses Gemisch wurde mit 1,5 µl BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, D) versetzt und in einem Thermocycler eine Sequenzierreaktion gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das verwendete Programm zur Sequenzier-PCR befindet sich im Anhang (Tabelle 5.2). Alternativ erfolgte die Sequenzierung bei einem externen Anbieter (eurofinsdna/MWG, Ebersberg, D).

Fällung Das erhaltene Produkt der Sequenzier-PCR muss für die eigentliche Sequenzierung gereinigt werden. Dazu wurde das Produkt einer Ethanol-Acetat Fällung unterzogen. Das Sequenzierprodukt wurde dazu mit 350 µl Fällungsmix versetzt und für mindestens 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und

das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Für die Sequenzier-Elektrophorese wurde das Pellet in 20 µl HiDi®-Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Fällungs-Mix

Reagenz	Volumen [µl]
Natriumacetat 3M, pH 4,8	10
HPLC-Wasser	80
Ethanol 100 %	250

Kapillar-Gelelektrophorese Das Prinzip der Kapillar-Gelelektrophorese ist im Wesentlichen das Gleiche, wie es bei den Agarosegelen zum Einsatz kommt (Abschnitt 2.2.2.4). Sie findet z. B. bei der MLPA-Analytik, Sanger-Sequenzierung, bei der Mikrosatelliten-Typisierung, MS-PCR und MS-SNuPE-Methode Verwendung. Als Gel wird hier eine mit Polyacrylamid gefüllte Kapillare genutzt. Es handelt sich um eine denaturierende Elektrophorese, wodurch Sekundärstrukturen wie zum Beispiel Rückfaltungen von Nukleinsäuren verhindert werden. Da keine interkalierenden Farbstoffe genutzt werden können, müssen die Produkte mit einem Fluoreszenzmarker versehen werden. Dies geschieht über fluoreszenzmarkierte Primer. Diese Farbstoffe werden über einen Laser mit spezifischen Wellenlängen angeregt und die Fluoreszenzsignale über eine Kamera erfasst. Für die Fragmentgrößen-Bestimmung wird ein Größenstandard eingesetzt, der mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Neben der Größenbestimmung erfolgt auch eine quantitative Bestimmung der Fragmente. Bei der MS-PCR, MS-SNuPE und für die Mikrosatelliten-Typisierung wurde die PCR-Produkte auf einem 1 %igen Agarose-Gel überprüft. Das Produkt wurde zwischen 1:20-1:100 verdünnt und anschließend 0,5 µl der Verdünnung mit 9,4 µl HiDi®-Formamid und 0,1 µl LIZ120® Size Standard bei MS-SNuPE-Analysen bzw. 8,5 µl HiDi® 0,5 µl LIZ500® sowie 1 µl der Verdünnung für MS-PCR, MLPA und Mikrosatelliten-Analyse versetzt. Die Analyse erfolgte auf einem AB3130 Kapillarsequenzierer, die anschließende Auswertung mittels der GeneMapper Software 4.0 (Applied Biosystems).

Sequenzierung der Gene *DNMT3L* und *MBD3* Zum Nachweis von Mutationen im Zusammenhang mit Multilocus-Methylierungsdefekten (MLMD) wurden bei drei Patienten (EB6247, RW6091, und DL6467) mit MLMD die Gene *DNMT3L* (Exons 2-12 des

Transkripts NM_013369) und *MBD3* (NM_003926) wie beschrieben sequenziert. Die bioinformatische Analyse der Sequenzen erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool/NCBI) und dem Programm SeqPilot (JSI medical systems, Kippenheim, D). Die exakten Bedingungen der PCR-Reaktionen und Primer-Sequenzen finden sich im Anhang .

Sequenzierung der Primer-Bindestellen von *IGF2P0* Um die Ergebnisse von auffälligen Patienten aus der MS-SNuPE (*Methylation Specific Single Nucleotide Primer Extension*)-Analyse zu bestätigen bzw. zu überprüfen, wurde in einigen Fällen auf die Sequenzierung der Primer-Bindestellen der PCR und PV-Reaktionen (Primer-Verlängerung) zurückgegriffen. Die entsprechenden Sequenzierprimer wurden daher außerhalb der PCR-Primer gelegt. Indiziert war die Analyse des *IGF2P0*-Locus besonders dann, wenn die Veränderung in der Methylierung auf diesen Locus beschränkt war und nicht mit einer veränderten Methylierung in der *H19*-DMR einherging. Die *IGF2P0*-PCR erfolgte bei einer Annealingtemperatur (ΔT) von 56°C, die Primer-Sequenzen sind im Anhang zu finden.

Sequenzierung der Primer-Bindestellen von *IGF2R* Da für den *IGF2R*-Locus keine weitere methylierungssensitive Methode zur Verfügung stand, wurde auch dieser Locus sequenziert, wenn auffällige Ergebnisse in der SNuPE-Analyse auftraten und bestätigt werden sollten. Primer-Sequenzen sind im Anhang zu finden. Die *IGF2R*-PCR wurde mit dem PCR-Programm Standard (Tabelle 5.1) bei einer Annealingtemperatur (ΔT) von 56°C durchgeführt.

Tabelle 2.4: PCR Ansatz zur Sequenzierung der Primerbindestellen für das MS-SNuPE-Screening

Reagenz	Volumen [μ l]
Q-Solution	5
PCR Puffer Qiagen 10X	2,5
dNTP	4
Primer F	1
Primer R	1
Taq Invitrogen	1,25
DNA (20ng/ μ l)	4
H2O	ad 25

2.2.3.3 Mikrosatelliten Typisierung

Mikrosatelliten oder „short tandem repeats“ (STR) sind sich häufig wiederholende, meist nicht kodierende Abschnitte der DNA der Art $n(CA)$. Diese Abschnitte sind hoch polymorph und unterscheiden sich von Individuum zu Individuum in der Anzahl der Wiederholungen. Diese Eigenschaft kann man sich u. a. für Abstammungsnachweise zu Nutze machen. Eingesetzt wurde die Methodik der Mikrosatellitentypisierung für die Analyse von uniparentalen Disomien (upd), Duplikationen und Deletionen sowie für Kopplungsanalysen. Für die Mikrosatelliten-PCR wird einer der verwendeten Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um die erzeugten Produkte sichtbar zu machen. Alternativ kommt eine Kombination aus drei verschiedenen Primern zum Einsatz. Ein spezifisches Primerpaar, das die Repeats flankiert sowie ein fluoreszenzmarkierter Primer, der als Common-F (oder Common-R) bezeichnet wird. Einer der spezifischen Primer ist mit einem Sequence-Tag versehen an den der Common-F Primer binden kann (Lagier-Tourenne et al., 2003). Somit werden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte erzeugt, die sich in ihrer Größe in Abhängigkeit von der Anzahl der Repeats unterscheiden. Diese können dann mittels Kapillar-Gelelektrophorese analysiert werden (Abschnitt 2.2.3.2).

2.2.3.4 MLPA - Multiplex Ligation Dependend Probe Amplifikation

Die Methode der MLPA ermöglicht es simultan und in einer Reaktion für bis zu 50 verschiedene Bereiche eine Kopienzahlbestimmung vorzunehmen. Dabei werden je Locus zwei Sonden so gewählt, dass sie direkt nebeneinander an die DNA einer Probe hybridisieren. Durch die räumliche Nähe können die beiden Sonden aneinander ligiert werden. Die Sonden enthalten neben Abschnitten für die Längendiskriminierung jeweils eine Sequenz, an die ein allgemeiner F-Primer bzw. R-Primer binden kann. Es kommt also nur nach erfolgreicher Ligation zur Ausbildung eines PCR-Produktes. Diese allgemeinen Primer sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wodurch sie mit dem Kapillarsequenzierer analysiert werden können. Durch die Verrechnung der Peakhöhen der Sonden ist dann eine quantitative Aussage über die Anzahl der vorliegenden Genkopien in der Probe möglich. Die Verrechnung erfolgt innerhalb einer Probe gegen eine Reihe von Kontrollsonden. Des Weiteren ist es nötig mindestens drei Kontrollen im Ansatz mitzuführen, gegen die die Proben gerechnet werden (Schouten et al., 2002).

2.2.4 Methylierungsspezifische Verfahren

2.2.4.1 MS-MLPA - Methylierungs-Spezifische MLPA

Eine besondere Form der MLPA (Abschnitt 2.2.3.4) stellt die methylierungs-spezifische oder MS-MLPA dar. Sie erlaubt neben der Bestimmung der Kopienzahl auch die Identifizierung des Methylierungsstatus für bestimmte Loci. Die Hybridisierungs sonden sind so gelegt, dass sie auf einer Schnittstelle des Restriktionsenzym *HhaI* liegen. *HhaI* schneidet dabei nur das unmethylierte Allel. Dadurch lässt sich der Methylierungsstatus eines Locus quantifizieren. Bei Vorliegen einer Hypomethylierung z.B. können sich weniger Sonden anlagern, da mehr Bindestellen durch den methylierungsspezifischen Verdau zerschnitten werden. Für die Analyse der Patientenproben wurde das MLPA-Kit ME030 von MRC-Holland (MRC-Holland, Amsterdam, NL) verwendet. Es enthält Sonden für die Silver-Russell- und Beckwith-Wiedemann-Syndrom relevante Region auf Chromosom 11p15.5 und untersucht diese hinsichtlich Veränderungen der Kopienzahl und des Methylierungsstatus. Durch die kombinierte Analyse lassen sich sowohl Deletionen und Duplikationen, isolierte Veränderungen des Methylierungsstatus als auch uniparentale Disomien dieser Region nachweisen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Fragmente wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben, analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Coffalyser Analyse Software (MRC-Holland).

2.2.4.2 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA

Zur Analyse des Methylierungsstatus eines Locus kann man sich die Eigenschaft methylierter DNA zu Nutze machen gegen eine C-T-Konversion durch Bisulfit geschützt zu sein. Bei der Bisulfit-Behandlung von DNA erfolgt in einem ersten Schritt eine Sulforierung von Cytosin als auch von 5'-Methyl-Cytosin. Eine anschließende Deaminierung kann allerdings nur am Cytosin erfolgen, wodurch dieses in Uracil überführt wird, da 5'-Methylcytosine vor der Deaminierung geschützt ist. Wird an so modifizierter DNA eine PCR durchgeführt, paart Uracil mit Adenin wodurch in Bezug auf die Vorlage eine C-T-Konversion stattfindet (Frommer et al., 1992). Die methylierten Cytosine können dadurch von unmethylierten durch einen Vergleich der Sequenzen unterschieden werden. Die Bisulfit-Behandlung erfolgte mittels EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Orange County, CA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 200-500 ng DNA für die Konversion verwendet. Eluiert wurde die Bisulfit-DNA in 15-20 µl Aqua dest..

2.2.4.3 MS-PCR

Die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) dient dem Nachweis von Methylierungsänderungen, uniparentalen Disomien sowie Deletionen und Duplikationen an geprägten Loci. An Bisulfit-behandelter DNA wird eine PCR durchgeführt, die Produkte unterschiedlicher Größe für das maternale und paternale Allel erzeugt. Neben den spezifischen Primern für das maternale bzw. paternale Allel wird ein gemeinsamer Primer für beide Produkte verwendet, der eine Fluoreszenzmarkierung trägt. Über diesen gemeinsamen Primer ist eine Analyse mittels Kapillar-Gelelektrophorese möglich. Je nach Methylierungsstatus wird dann ein Allel nicht oder reduziert amplifiziert.

MS-PCR für den *PLAGL1*-Locus – 6q24.2 Um Patienten mit auffälliger Methylierung in *PLAGL1* validieren zu können und zum Nachweis einer uniparentalen Disomie des Chromosom 6 (upd(6)mat / upd(6)pat) wurde eine MS-PCR für den entsprechenden Locus auf Chromosom 6 durchgeführt.

Tabelle 2.5: Ansatz MS-PCR *PLAGL1*

Reagenz	Volumen [μ l]
HotStart Taq Mix	12,5
Primer MS-PCR6-F (10 μ M)	1,0
Primer MS-PCR6-RM (10 μ M)	1,0
Primer MS-PCR6-RU (10 μ M)	1,0
Aqua dest.	6,5
DNA	3

Die MS-PCR für Chromosom 6 resultiert für das maternal methylierte Allel in einem Produkt von 176 bp. Das paternal unmethylierte Allel lässt sich durch ein Produkt von 188 bp nachweisen. Primer Sequenzen und das verwendete PCR-Programm (Tabelle 5.4) finden sich im Anhang. Die Amplifikation erfolgte bei einer Annealingtemperatur von 60°C.

MS-PCR für den *MEST*-Locus – 7q32 Basierend auf einem Protokoll von Moore et al. (2003) wurde eine MS-PCR zum Nachweis von uniparentalen Disomien am *MEST*-Locus auf Chromosom 7q32 durchgeführt. Beim *MEST*-Locus liegt eine Methylierung des maternalen Allels vor. Das korrespondierende PCR-Produkt hat eine Länge von 187 bp. Das paternale, unmethylierte Allel resultiert in einem kürzeren Produkt von 104 bp. Der in Tabelle 2.6 beschriebene Ansatz wurde unter Verwendung des Hotstart

PCR-Programms (Tabelle 5.3) mit einer Annealingtemperatur von 60°C amplifiziert. Primer Sequenzen befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.6: Ansatz MS-PCR *MEST*

Reagenz	Volumen [μ l]
A. dest.	9,5
AmpliTaq Gold Master Mix	12,5
Primer-PUF (10 μ M)	1,0
Primer-MMF (10 μ M)	1,0
Primer-R (10 μ M)	1,0
DNA (bisulf.)	1,0

MS-PCR für den *GRB10*-Locus – 7p13 Ebenfalls zum Nachweis von uniparentalen Disomien des Chromosom 7 und zur Unterscheidung einer segmentalen upd(7q)mat von einer vollständigen upd(7)mat, wurde eine MS-PCR für den geprägten Locus *GRB10* auf Chromosom 7p13, basierend auf einem Protokoll von Mackay et al. (2008) und Spengler (2011) durchgeführt. Die MS-PCR für *GRB10* resultiert in einem Peak von 185 bp für das maternal methylierte Allel und einem 190 bp großen Produkt für das paternal unmethylierten Allel. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des PCR-Programms Hotstart (Tabelle 5.3) bei 58°C Annealingtemperatur.

Tabelle 2.7: Ansatz MS-PCR *GRB10*

Reagenz	Volumen [μ l]
A.dest	10,5
AmpliTaq Gold Master Mix (10 μ M)	12,5
Primer GRB10_1_met (10 μ M)	0,5
Primer GRB10_1_unmet (10 μ M)	0,5
Primer GRB10_1_fam	1,0
DNA (bisulf.)	je 1,0

MS-PCR für den *MEG3*-Locus – 14q32.2 Methylierungsveränderungen am *MEG3*-Locus bzw. uniparentale Disomien des Chromosoms 14 lassen sich mit einer MS-PCR nachweisen, die auf einem Protokoll von Temple et al. (2007) beruht. Das paternale Allel trägt die Methylierung und führt zu einem PCR-Produkt von 193 bp. Das maternale nicht methylierte Allel erzeugt ein Fragment von 221 bp. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Ansatz in Tabelle 2.8 mit dem Hotstart PCR-Programm (Tabelle 5.3) bei einer Annealingtemperatur von 58°C. Primer-Sequenzen finden sich im Anhang.

Tabelle 2.8: Ansatz MS-PCR *MEG3*

Reagenz	Volumen [μ l]
A.dest	6,75
Qiagen PCR Enhancer	2,5
AmpliTaq Gold Master Mix	12,5
Primer GTL2b-fam (10 μ M)	0,75
Primer GTL2b-unmeth (10 μ M))	0,75
Primer GTL2b-meth (10 μ M)	0,75
DNA (bisulf.)	1,0

2.2.4.4 MS-SNuPE Screening

Die MS-SNuPE-Untersuchung von DNA erlaubt die simultane Quantifizierung des Methylierungsstatus von neun oder mehr Loci an Bisulfit behandelte DNA (Abschnitt 2.2.4.2). Es wird dabei auf eine modifizierte Sequenzierreaktion nach Sanger (Abschnitt 2.2.3.2) zurückgegriffen. Anders als bei der Sanger-Sequenzierung kommen ausschließlich ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate) zum Einsatz, welche zusätzlich durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Dadurch kann jeder eingesetzte Primer immer nur um eine Base verlängert werden. Die sog. PV (Primer-Verlängerungsreaktions)-Primer wurden so gewählt, dass sie direkt benachbart zum Cytosin eines CpG-Dinukleotids in der DNA enden. Durch die vorherige Bisulfit-Behandlung weisen die zu untersuchenden CpGs, entsprechend ihres Methylierungsstatus, am Cytosin einen Sequenzunterschied im Sinne einer Heterozygotie auf. In Abhängigkeit der Methylierung werden also zwei verschiedene, unterschiedlich markierte ddNTPs eingebaut. Mittels Kapillargelelektrophorese werden dann die verlängerten Primer als Fragment analysiert und quantifiziert. Die Fluoreszenzfarbstoffe vermitteln den verlängerten Primern zusätzlich Unterschiede in ihrer Laufeigenschaft in der Kapillargelelektrophorese, was eine spätere Analyse erleichtert (Begemann et al., 2012a).

Ausgehend von ca. 100 ng Bisulfit behandelte DNA wurden drei Multiplex-PCRs mittels Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt (Tabelle 5.5). Von jeder PCR wurden 2-3 μ l vereinigt und mit ExoSAP-IT® enzymatisch gereinigt. Etwa 3 μ l des gereinigten PCR-Pools wurden mit dem ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems) in zwei verschiedenen PV-Reaktionen analysiert. Die Primerverlängerung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers bei 50°C. Die verbliebenen Nukleotide wurden mit 1 Unit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (usb/Affymetrix) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch die Dephosphorylierung der Nukleotide wird eine unspezifische

Elongation der Primer verhindert. Für die Fragmentanalyse wurden 0,5 µl einer 1:5 Verdünnung des dephosphorylierten Produkts mit je 0,1 µl GeneScan LIZ120 sowie 9,4 µl HiDi Formamid (Applied Biosystems) versetzt. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 95°C denaturiert, direkt auf Eis gestellt und im Anschluss mit einem modifizierten Protokoll auf einem AB3130 Sequenzierer aufgetrennt. Das Set-Up des Sequenzierers für die SNaPshot-Analyse erfolgte mit dem SNaPshot®-Matrix-Standard-Set DS02 (Applied Biosystems). Die Quantifizierung erfolgte durch die Berechnung des Methylierungsindex MI der einzelnen Proben und einer Normalisierung (nMI) gegen Kontrollen bzw. gegen den Median eines Versuchsansatzes. Die Berechnung des MI erfolgte nach folgender Formel unter Verwendung der Werte der Peakflächen (Gleichung 2.1).

$$MI = \frac{A_m}{A_m + A_{um}} \quad (2.1)$$

Dabei ist A_m die Fläche des methylierten Allels, A_{um} die Fläche des unmethylierten Allels.

$$nMI = \frac{1}{2} \frac{MI_P}{MI_C} \quad (2.2)$$

Der normalisierte Methylierungsindex (nMI) berechnet sich als Anteil des Methylierungsindex des Patienten (MI_P) am Methylierungsindex der Kontrollen (MI_C), wobei MI_C je nach experimentellem Ansatz der Mittelwert der Kontrollen oder der Median eines Versuchsansatzes war (Gleichung 2.2). Die Verrechnung gegen 0,5 diente der Veranschaulichung der Daten. Die Wertung als auffällig bzw. unauffällig erfolgte ab einem Wert von ± 2 SD vom Median des Ansatzes. Gewertet wurden Proben mit einer Auffälligkeit in beiden PV-Reaktionen von ± 2 SD. Die Analyse erfolgte nach Abschluss der Datenerhebung über den gesamten Datensatz der untersuchten idiopathischen SRS-Patienten.

Für einige Analysen wurde eine modifizierter MS-SNuPE-Ansatz verwendet, der momentan auch für die diagnostische Aufklärung genutzt wird. Dieser MS-SNuPE-Assay wurde um zwei zusätzliche Loci erweitert und beinhaltet mit *SNRPN* einen Locus auf Chromosom 15, der eine Rolle beim PWS und AS spielt, sowie mit der *IG-DMR*, einen weiteren Chromosom 14-Locus (Kagami et al., 2008). Das Protokoll wurde optimiert, so dass nur noch eine einzelne Multiplex-PCR durchgeführt werden musste.

2.2.4.5 SeQMA – Sequence based Quantitative Methylation Analysis

Bei der SeQMA werden verschiedene Methoden kombiniert, indem eine PCR an Bisulfit-behandelter DNA durchgeführt und anschließend sequenziert wird (Kanber et al., 2009). Durch die Bisulfit-Behandlung erhält man eine Sequenz, die an den CpG-Dinukleotiden je nach Konversion und Methylierungsstatus eine heterozygote Stelle aufweist. Für die PCR wurden die MS-SNuPE Primer für den MEG3-Locus verwendet und die PCR entsprechend durchgeführt (Abschnitt 2.2.4.4). Anschließend wurde das PCR Produkt gereinigt und sequenziert (Abschnitt 2.2.3.2). Mit dem Programm Sequencing Analysis (Applied Biosystems) wurde jeweils im Elektropherogramm der Sequenzen die Peakhöhe der Basen Thymin und Cytosin an den differentiell methylierten Stellen bestimmt. Aus den Peakhöhen wurde der Methylierungsindex des jeweiligen CpGs berechnet (Abschnitt 2.2.4.4). Im Ansatz wurden drei Verrechnungskontrollen sowie eine gesunde Normalkontrolle zum Vergleich mitgeführt.

2.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) oder auch qPCR ist eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren. Sie eignet sich neben der Bestimmung der Zahl von Genkopien, z.B. zur Bestätigung von Arraybefunden, auch dazu die Expression von Genen zu untersuchen. Quantifiziert wird immer ein Zielgen in Bezug auf ein Referenzgen oder Haushaltsgen, von dem entweder eine definierte Anzahl Kopien vorliegt oder das ein stabiles Expressionsniveau im untersuchten Zellsystem aufweist. Zur Quantifizierung wird eine PCR in einem Real-Time Thermocycler durchgeführt, der während der Zyklen Fluoreszenzsignale detektiert. Zur Real-Time-Detektion kommen entweder sog. TaqMan®-Probes oder „molecular beacons“ zum Einsatz oder ein interkalierender Farbstoff wie SYBR-Green®. Bei der Verwendung von SYBR-Green® wird eine PCR für den Locus durchgeführt, der analysiert werden soll. In der Elongationsphase der PCR wird dann die Intensität des Lichtsignals durch die Interkalation des SYBR-Greens® in die dann doppelsträngigen PCR-Produkte gemessen. Mit zunehmender Zyklenzahl wird dabei das gemessene Lichtsignal immer stärker, bis eine Sättigung erreicht ist. Bei der Verwendung von TaqMan®-Probes wird ein modifiziertes Prinzip verwendet. Zwischen die beiden Primer, die einen zu untersuchenden Locus eingrenzen, wird eine Sonde gelegt, die an ihrem 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich ein sogenannte Quencher, der das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Bei der Amplifikation des PCR-Produkts wird dann dieser Quencher durch die 5'-3'-Exonuklease-

Aktivität der eingesetzten Polymerase abgebaut, wodurch das Fluoreszenzsignal am 3-Ende nicht länger unterdrückt wird. Das freiwerdende Lichtsignal wird gemessen und verrechnet. Die Verwendung von Sonden bietet gegenüber dem Ansatz mit interkalierenden Farbstoffen den Vorteil, dass die Reaktion sehr spezifisch ist und die Amplifikation unspezifischer Produkte nicht gemessen wird. Für die Analyse der Daten wird der sogenannte Ct-Wert verwendet. Der Ct-Wert (cycle threshold) ist definiert als Zeitpunkt des Übergangs des gemessenen Lichtsignals vom Hintergrund-Signal in die Phase des exponentiellen Anstiegs. Die Berechnung der relativen Konzentration erfolgt zwischen den Proben auf Basis eines ubiquitär exprimierten Haushaltsgens (Referenzgen). Bei den Referenzgenen geht man davon aus, dass diese in jeder Zelle ungefähr das gleiche Expressionslevel aufweisen. Verwendet wurde für die Quantifizierung der Genexpression die delta-delta-Ct-Methode. Dabei verrechnet man zuerst das Zielgen mit dem Haushaltsgen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Verrechnung mit einer Normal-Kontrolle, z.B. einem Wildtyp. Für die Berechnung gelten die folgenden Formeln, wobei die Ratio (RQ - *Relative Quantity*) den relativen Unterschied im Expressionslevel eines Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen zwischen Probe und Kontrolle darstellt.

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \quad (2.3)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Patient} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} \quad (2.4)$$

$$\text{Ratio } RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (2.5)$$

Die Analyse der qPCR-Ansätze erfolgte mit der StepOne Software 2.2. (Applied Biosystems). Als Referenzgen wurde das TATA-Box Binding Protein (TBP) verwendet. Für die Expressionsanalysen wurde der Platinum qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) oder der TaqMan® GeneExpression Master Mix (Applied Biosystems) genutzt. Es wurden 10 µl Reaktionsansatz pro Well gemessen.

Tabelle 2.9: Reaktionsmix qPCR Ansatz mit TaqMan®-Probes

Reagenz	Konzentration	Volumen [μ l]
Master-Mix	2 x	50
Sonde	20 x	0,5
cDNA		1,0
Aqua dest.		3,5

Pro Gen wurde ein Mastermix pipettiert und je 18 μ l bzw. 27 μ l in ein weiteres Reaktionsgefäß vorgelegt. In dieses wurden dann 2-3 μ l cDNA gegeben. Der Ansatz wurde gevortext und abzentrifugiert, bevor je 9 μ l in je ein Well einer Reaktionsplatte gegeben wurden. Von jeder Probe wurden mindestens zwei biologische Replikate gemessen, d.h. es wurden zwei separat isolierte Proben untersucht (A und B Probe). Die Verrechnung erfolgte gegen einen Pool von Normal-Kontrollen. Um eine genauere Quantifizierung zu ermöglichen, wurde anhand eines Gesamt-Pools aller gemessenen Proben die Effizienz der PCR-Reaktionen für jedes untersuchte Gen ermittelt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem im Anhang aufgeführten qPCR-Programm für TaqMan® Ansätze (Tabelle 5.6). Um die natürliche Streubreite einzuschätzen wurde für alle Loci die Expression in den Kontrollen gemessen, die für den Wildtyp-Pool verwendet wurden.

2.3 Patienten-Kollektive

Idiopathische Silver-Russell-Syndrom Patienten:

93 Patienten mit der klinischen Diagnose oder Verdachtsdiagnose eines Silver-Russell-Syndroms, bei denen die typischerweise auftretenden Störungen wie eine upd(7)mat und ein Methylierungsdefekt der Region 11p15 im Vorfeld ausgeschlossen worden waren.

Upd(7)mat Patienten:

Die Patienten NB6165, MD8282, JW11296 und LW4925, die ein Silver-Russell-Syndrom aufgrund einer upd(7)mat aufweisen und von denen im Rahmen eines BMBF-Projektes Hautstanzen für Fibroblastenkulturen gewonnen werden konnten.

Probanden mit Multilocus-Methylierungsdefekt - MLMD-Probanden:

Die SRS-Patienten EB6247, RW6091, DL6467, FL12530 und JS9687, die neben der typischen Epimutation in *H19* noch Methylierungsveränderungen an weiteren Loci auf-

wiesen, sowie ihre Angehörigen MB7231, die eineiige Zwillingschwester von EB6247, und AL7588, die Mutter von DL6467.

Probanden mit strukturellen Veränderungen der Region 11p15:

Die Probanden JP11221, RD6443 und MZ10456 sowie ihre Angehörigen, die strukturelle Veränderungen in der Region 11p15 trugen und zum Teil eine Wachstumsstörung aufwiesen.

Ethik

Der Probenentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken und den Untersuchungen im Rahmen dieses Projekts wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums der RWTH Aachen zugestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 MS-SNuPE Screening idiopathischer SRS-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ermittlung der Verbreitung und Häufigkeit von Multilocus-Methylierungsveränderungen (MLMD – Multilocus Methylation Defects) im Zusammenhang mit dem Silver-Russell-Syndrom 93 als „idiopathische SRS-Patienten“ bezeichnete Probanden untersucht. Bei allen Patienten war im Vorfeld eine upd(7)mat oder Methylierungsveränderungen in 11p15.5 mittels MS-MLPA und MS-PCR als Ursache für das SRS ausgeschlossen worden. Die Proben der Patienten wurden mittels der MS-SNuPE-Methode auf Methylierungsveränderungen in je zwei CpGs der Loci *PLAGL1* (6q24.2), *IGF2R* (6q25.3), *MEST* (7q32.2), *GRB10* (7p12.2), *H19*, *IGF2P0*, *KCNQ1OT1* (11p15.5), *MEG3* (14q32.2) hin analysiert. Ziel war, es neben der Identifikation eines MLMD, mit einer sehr sensitiven Methode auch Veränderungen zu erfassen, die nur schwach ausgeprägt sind und von den klassischerweise verwendeten Methoden nicht detektiert werden können. Da in dem Screening keine Kontrollen mit analysiert wurden, erfolgte die Berechnung über den Mittelwert der Proben. Die finale Auswertung wurde an dem gesamten Datensatz von 93 Proben vorgenommen, wobei die Ergebnisse einiger Proben zweifach vorlagen, da sie aufgrund von Auffälligkeiten wiederholt analysiert wurden. Als auffällig wurden solche Proben gewertet, die mindestens bei beiden PV-Reaktionen einen Wert größer oder kleiner des Mittelwertes ± 2 Standardabweichungen aufwiesen (Abbildung 3.1a). Solche Proben mit einem Zugewinn an Methylierung sind in grün markiert, eine rote Markierung weist auf einen Verlust an Methylierung im entsprechenden Locus hin. Bei Patient SRS-09 ließ sich eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Locus beobachten. Die gleiche Veränderung zeigte sich auch bei den Proben SRS-81 und SRS-65. Isolierte Hypomethylierungen im *IGF2P0*-Locus zeigten sich in den DNA-Proben von SRS-10 und SRS-93. Der mit den upd(14)-Syndromen assoziierte Locus wies in einer Probe ebenfalls eine veränderte Methylierung auf. SRS-20 zeigte hier eine leichte Hypomethylierung. Damit ließen sich in einem Vertrauensintervall von 95 % bei ~6,5 % der Proben Methylierungsveränderungen bei ± 2 Standardabweichungen nachweisen.

3.1 MS-SNuPE Screening idiopathischer SRS-Patienten

Tabelle 3.1: Patienten mit Auffälligkeiten im MS-SNuPE-Screening (Vertrauensintervall (a) \pm 2 SD und (b) \pm 3 SD). Der Zugewinn an Methylierung ist in grün dargestellt, der Verlust von Methylierung ist rot markiert. Angegeben ist der normalisierte Methylierungsindex von beiden Primerverlängerungsreaktionen PV-1 und PV-2.

(a) Patienten mit Auffälligkeiten im MS-SNuPE-Screening (Vertrauensintervall \pm 2 SD).

Patient	Chromosom 6				Chromosom 7			
	PLAGL1		IGF2R		MEST		GRB10	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,511	0,521	0,840	0,780	0,525	0,497	0,513	0,521
SRS-10	0,492	0,476	0,487	0,457	0,497	0,482	0,493	0,476
SRS-20	0,511	0,512	0,362	0,414	0,487	0,497	0,484	0,502
SRS-65	0,477	0,490	0,784	0,734	0,498	0,502	0,494	0,502
SRS-81	0,498	0,537	0,805	0,760	0,509	0,503	0,526	0,516
SRS-93	0,504	0,489	0,493	0,500	0,501	0,491	0,509	0,510

Patient	Chromosom 11						Chromosom 14	
	H19		IGF2P0		KCNQ1OT1		MEG3	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,607	0,542	0,509	0,471	0,497	0,493	0,488	0,495
SRS-10	0,534	0,502	0,314	0,338	0,521	0,516	0,508	0,477
SRS-20	0,559	0,527	0,524	0,486	0,526	0,518	0,444	0,451
SRS-65	0,556	0,494	0,519	0,526	0,504	0,505	0,505	0,502
SRS-81	0,631	0,548	0,522	0,507	0,493	0,495	0,512	0,525
SRS-93	0,522	0,532	0,214	0,242	0,513	0,504	0,490	0,497

(b) Patienten mit Auffälligkeiten im MS-SNuPE-Screening (Vertrauensintervall \pm 3 SD).

Patient	Chromosom 6				Chromosom 7			
	PLAGL1		IGF2R		MEST		GRB10	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,511	0,521	0,840	0,780	0,525	0,497	0,513	0,521
SRS-10	0,492	0,476	0,487	0,457	0,497	0,482	0,493	0,476
SRS-65	0,477	0,490	0,784	0,734	0,498	0,502	0,494	0,502
SRS-81	0,498	0,537	0,805	0,760	0,509	0,503	0,526	0,516
SRS-93	0,504	0,489	0,493	0,500	0,501	0,491	0,509	0,510

Patient	Chromosom 11						Chromosom 14	
	H19		IGF2P0		KCNQ1OT1		MEG3	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,607	0,542	0,509	0,471	0,497	0,493	0,488	0,495
SRS-10	0,534	0,502	0,314	0,338	0,521	0,516	0,508	0,477
SRS-65	0,556	0,494	0,519	0,526	0,504	0,505	0,505	0,502
SRS-81	0,631	0,548	0,522	0,507	0,493	0,495	0,512	0,525
SRS-93	0,522	0,532	0,214	0,242	0,513	0,504	0,490	0,497

Erhöht man das Vertrauensintervall auf ± 3 Standardabweichungen vom Mittelwert reduziert sich die Zahl der auffälligen Proben auf fünf Patienten (Abbildung 3.1b). Der Patient SRS-20 mit Veränderungen der Methylierung in *MEG3* wies auf einem Signifikanzniveau von 99% keine Abweichungen mehr auf. Der Anteil der Patienten mit veränderter Methylierung reduzierte sich damit auf ca. 5,4%.

3.1.1 SeQMA

Da bei Patient SRS-20 bei einer Streubreite von ± 2 Standardabweichungen am *MEG3*-Locus eine leichte Hypomethylierung aufgefallen war, die sich in einer MS-PCR für diesen Locus nicht nachweisen ließ, sollte die Probe mit einer weiteren Methode analysiert werden. Es wurde mit den Primern, die auch für die MS-SNuPE-PCR verwendet wurden, unter gleichen Bedingungen eine PCR mit anschließender direkter Sequenzierung nach Sanger durchgeführt. Da die Sequenzierung an bisulfitbehandelter DNA durchgeführt wird, werden differentiell methylierte Cytosine durch die anteilige Konversion in Thymin, als heterozygot in der Sequenzierung dargestellt. Zur Quantifizierung wurden die Peakhöhen im Programm Sequencing Analysis (Applied Biosystems) gemessen und gegen drei Kontrollen verrechnet. Die Berechnung erfolgte wie bei der MS-SNuPE-Methode. In dem amplifizierten Bereich sind elf CpG-Inseln lokalisiert, mit der SeQMA-Methode konnten zehn davon untersucht werden. Die vom MS-SNuPE erfassten methylierten Cytosine in diesem Abschnitt sind in der CpG 1 bzw. CpG 4 lokalisiert. Die CpG 1 konnte mit der SeQMA nicht untersucht werden, da sie zu dicht am Primer lag. Neben drei Verrechnungskontrollen wurde auch eine Normalkontrolle analysiert.

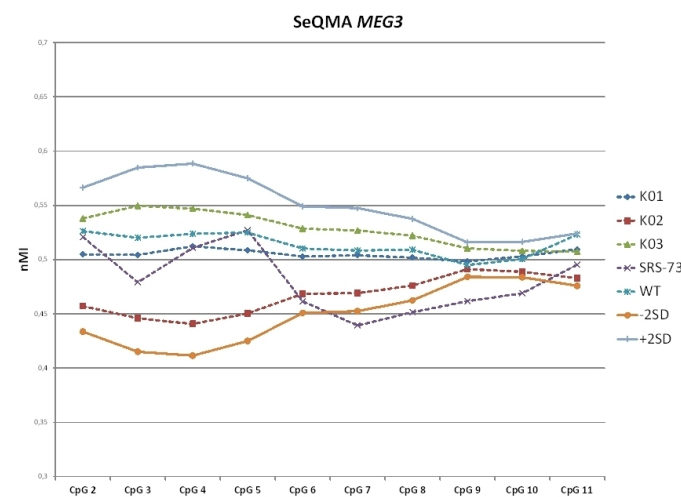


Abbildung 3.1: Ergebnis der SeQMA-Analyse für SRS-20 und als Kurvendiagramm. Dargestellt ist der normalisierte Methylierungsindex (nMI) je untersuchtes CpG für die *MEG3*-DMR. Durchgezogene Linien repräsentieren den Mittelwert der Kontrollen +/-2SD.

Die Analyse der SeQMA-Daten ergab eine leichte Reduktion des Methylierungsindex für die CpGs 7-10. Diese liegen auf einem Signifikanzniveau von 95% außerhalb der normalen Streubreite der drei verwendeten Kontrollen. Damit ließ sich auch in der SeQMA eine reduzierte Methylierung für einige CpGs beim Patienten SRS-20 nachweisen (Abbildung 3.1).

3.1.2 Sequenzierung der Primerbindestellen von *IGF2P0*

Aufgrund der im Sinne einer isolierten Hypomethylierung interpretierbaren Reduktion des normalisierten Methylierungsindex in *IGF2P0* bei den Proben SRS-10 und SRS-93 wurden die Bindestellen der Primer dieses Locus auf SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) hin untersucht. Bei der Sequenzierung der Probe SRS-93 wurden mehrere SNPs in den Primerbindestellen gefunden. Detektiert wurden die beiden SNPs rs4930041 und rs3741210, die im R-Primer der PCR bzw. im *IGF2P0*-PV2-Primer liegen. Zusätzlich ließ sich die Variante NC_000011.9.g:92165350A>G im heterozygoten Zustand nachweisen, die im F-Primer der PCR für den *IGF2P0*-Locus liegt. Diese Variante war, wie der SNP rs3741210, ebenfalls in der Probe SRS-10 nachweisbar.

3.1.3 Sequenzierung der Primerbindestellen von *IGF2R*

Aufgrund der nachgewiesenen Hypermethylierung in *IGF2R* bei den Proben SRS-09, SRS-65 und SRS-81, wurden diese sequenziert um Varianten in den Primerbindestellen auszuschließen. Bei allen drei Proben war keine Variante nachweisbar. Damit wiesen die Proben SRS-09, SRS-65 und SRS-81 eine tatsächliche Hypermethylierung auf, die nicht auf Polymorphismen in den Bindestellen der Primer für die PCR oder Primerverlängerungsreaktion zurückzuführen war.

3.1.4 MS-SNuPE Screening - Ergebnisse nach Validierung

Nach Ausschluss der o. g. falsch-positiven Ergebnisse mittels Sequenzierung der Primerbindestellen von *IGF2R* und *IGF2P0* bzw. Bestätigung der Befunde durch eine zweite Methode verblieben vier Patienten mit veränderten Methylierungsmustern: Dabei wiesen drei Patienten (3,2%), eine Hypermethylierung von *IGF2R* auf. Bei einem Patienten konnte sowohl in der MS-SNuPE-Analyse, als auch in der SeQMA eine leicht reduzierte Methylierung in *MEG3* gezeigt werden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Patienten mit Auffälligkeiten im MS-SNuPE-Screening nach Kontrolle auf falsch-positive Ergebnisse durch Polymorphismen, bzw. Validierung durch eine zweite Methode. (Vertrauensintervall +/- 2SD). Der Zugewinn an Methylierung ist in grün dargestellt, der Verlust von Methylierung ist rot markiert. Angegeben ist der normalisierte Methylierungsindex von beiden Primerverlängerungsreaktionen PV-1 und PV-2.

Patient	Chromosom 6				Chromosom 7			
	<i>PLAGL1</i>		<i>IGF2R</i>		<i>MEST</i>		<i>GRB10</i>	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,511	0,521	0,840	0,780	0,525	0,497	0,513	0,521
SRS-20	0,511	0,512	0,362	0,414	0,487	0,497	0,484	0,502
SRS-65	0,477	0,490	0,784	0,734	0,498	0,502	0,494	0,502
SRS-81	0,498	0,537	0,805	0,760	0,509	0,503	0,526	0,516

Patient	Chromosom 11				Chromosom 14			
	<i>H19</i>		<i>IGF2P0</i>		<i>KCNQ1OT1</i>		<i>MEG3</i>	
	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2	PV-1	PV-2
SRS-09	0,607	0,542	0,509	0,471	0,497	0,493	0,488	0,495
SRS-20	0,559	0,527	0,524	0,486	0,526	0,518	0,444	0,451
SRS-65	0,556	0,494	0,519	0,526	0,504	0,505	0,505	0,502
SRS-81	0,631	0,548	0,522	0,507	0,493	0,495	0,512	0,525

3.2 Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten

Im Rahmen der Routinediagnostik für das Silver-Russell-Syndrom konnten, unter den eingesandten Proben, Patienten mit einer maternalen uniparentalen Disomie des Chromosoms 7 identifiziert werden. Einige dieser Patienten konnten für weitere Forschungsvorhaben gewonnen werden, in deren Rahmen sie Hautbiopsien zum Anlegen von Zellkulturen und Expressionsanalysen zur Verfügung stellten. Von den Patienten NB6135, MD8282, JW11296 und LW4925 konnten Fibroblasten-Kulturen aus den Hautbiopsien angelegt und etabliert werden. Bei allen beschriebenen upd(7)mat Patienten wurde mittels MS-MLPA und/oder MS-SNuPE eine Veränderung in der Region 11p15 im Vorfeld ausgeschlossen.

3.2.1 MS-PCR für Chromosom 7-Loci

Im Rahmen der Diagnostik wurde für die Patienten MD8282 und JW11296 eine MS-PCR für den *MEST*- (7q32) sowie den *GRB10*- (7p32) Locus auf Chromosom 7 durchgeführt. In der MS-PCR für *MEST* zeigten alle drei Patienten nur das maternale methylierte Allel bei 187 bp. In der Vergleichskontrolle war neben dem maternalen Allel auch das paternal unmethylierte Allel bei 104 bp zu erkennen (Abbildung 3.2a).

Die MS-PCR für *GRB10* zeigte bei den Proben in der Vergleichskontrolle zwei Peaks, einen für das maternal methylierte Allel (185 bp) und einen für das paternal unmethylierte Allel (190 bp). Bei den Proben MD8282 und JW11296 war nur der Peak für das maternale Allel sichtbar. LW4925 wies wie die Kontrolle zwei Peaks auf (Abbildung 3.2b).

Für MD8282 und JW11296 kann also von einer maternalen upd(7) des gesamten Chromosoms 7 ausgegangen werden, da je ein Locus auf dem q-Arm (*MEST*) und ein Locus auf dem p-Arm (*GRB10*) des Chromosom 7 ein Muster im Sinne einer upd(7)mat zeigte. Bei Patient LW4925 ließ sich in der Kombination der Methylierungsmuster auf dem p-Arm und q-Arm auf eine segmentale maternale uniparentale Disomie des langen Arms von Chromosom 7 (upd(7q)mat) schließen (Begemann et al., 2012c).

3.2 Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten

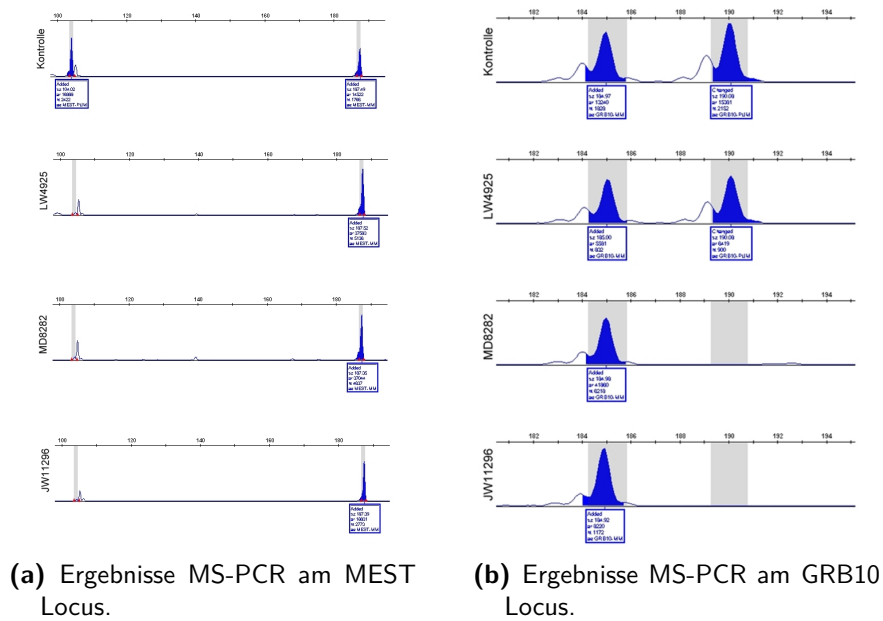


Abbildung 3.2: Ergebnisse der MS-PCR für die Loci *MEST* (a) und *GRB10* (b) auf Chromosom 7 bei LW4925, MD8282, JW11296 sowie einer Kontrolle. (PUM, paternal unmethyliert; MM, maternal methyliert).

3.2.2 MS-PCR für Chromosom 14

Für Patient LW4925 wurde aufgrund überlappender Phänotypen des Silver-Russell-Syndroms mit dem upd(14)-Syndrom auch eine MS-PCR für den *MEG3/GTL2*-Locus auf Chromosom 14 durchgeführt. Hier war beim Patienten lediglich das maternal unmethylierte Allel bei 221 bp erkennbar (Abbildung 3.3), was im Sinne einer isolierten Methylierungsveränderung oder einer upd(14)mat interpretiert werden kann.

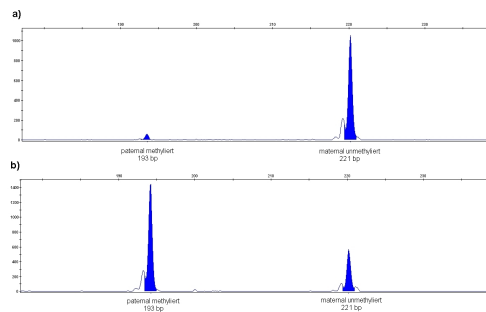


Abbildung 3.3: MS-PCR für Patient LW4925 (a) und einer Kontrolle (b) am *MEG3/GTL2*-Locus (modifiziert nach Begemann et al., 2012c).

3.2.3 Mikrosatelliten-Typisierung bei upd(7)mat-Patienten

Da die methylierungssensitiven Methoden mit Ausnahme der MS-MLPA nicht zwischen einem isolierten Methylierungsdefekt, einer UPD oder einer Deletion unterscheiden können, ist die Verwendung eines weiteren Verfahrens zur eindeutigen Bestimmung notwendig. Mikrosatellitenanalysen (STR-Analysen) ermöglichen die Segregationsanalyse mütterlicher und väterlicher Chromosomen in einer Probe (Abschnitt 2.2.3.3). Durch die Untersuchung mehrerer Marker, die über ein Chromosom verteilt liegen, lässt sich so eine Aussage über das Vorliegen einer Heterodisomie / Isodisomie dieses Chromosoms bzw. einer Deletion/Duplikation treffen.

Tabelle 3.3: Ergebnis der routinediagnostischen Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 7 bei Patient MD8282.

Locus	Marker	Mutter	MD8282	Ergebnis
7p15.3	D7S493	1-2	1-2	upd(7)mat
7p14.3	D7S460	1-2	1-2	upd(7)mat
7p14.2	D7S2251	1-2	1-2	upd(7)mat
7q22.2	D7S2446	1-2	1-2	upd(7)mat
7q33	D7S2452	1-2	1-2	upd(7)mat
7q36.1	D7S483	1-2	1-1	ein maternales Allel
7q36.1	D7S636	1-1	1-1	ein maternales Allel

Tabelle 3.4: Ergebnis der routinediagnostischen Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 7 bei Patient JW11296.

Locus	Marker	Vater	Mutter	JW11296	Ergebnis
7p15.3	D7S493	2-3	1-2	1-2	ein maternales Allel
7p14.3	D7S460	1-3	2-3	2-3	ein maternales Allel
7p14.2	D7S2251	1-3	2-4	2-4	upd(7)mat
7q22.2	D7S2446	1-3	2-2	2-2	upd(7)mat
7q33	D7S2452	1-2	1-3	1-3	ein maternales Allel
7q36.1	D7S636	1-3	2-4	2-4	upd(7)mat
7q36.1	D7S483	1-2	1-3	1-3	ein maternales Allel

Tabelle 3.5: Ergebnis der routinediagnostischen Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 7 bei Patient NB6135.

Locus	Marker	Vater	Mutter	NB6135	Ergebnis
7p15.3	D7S493	1-4	2-3	2-3	upd(7)mat
7p14.3	D7S460	1-2	2-3	2-3	nicht informativ
7p14.2	D7S2251	2-3	1-3	3-3	nicht informativ
7q22.2	D7S2446	1-2	3-4	3-4	upd(7)mat
7q33	D7S2452	1-1	1-2	1-2	nicht informativ
7q36.1	D7S636	3-4	1-2	1-2	upd(7)mat
7q36.1	D7S483	2-4	1-3	1-3	upd(7)mat

Tabelle 3.6: Ergebnis der Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 7 bei Patient LW4925.

Locus	Marker	Vater	Mutter	LW4925	Ergebnis
7p15.3	D7S493	1-2	3-4	1-3	biparental
7p14.2	D7S2251	1-2	1-1	1-2	ein paternales Allel
7p14.3	D7S460	2-4	1-3	2-3	biparental
7q22.2	D7S2446	2-4	1-3	2-3	biparental
7q33	D7S2452	2-3	1-1	1-1	upd(7)mat
7q36.1	D7S636	1-3	1-2	2-2	upd(7)mat

Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analysen ließen sich die im Vorfeld gestellten Diagnosen der upd(7)mat bei den Patienten MD8282, JW11296, NB6135 und LW4925 bestätigen. Für Patient MD8282 stand keine väterliche Probe zur Verfügung, die Mikrosatelliten zeigten aber ausschließlich maternale Allele (Tabelle 3.3). Bei JW11296 zeigten drei Marker ausschließlich maternale Allele (D7S2446, D7S636 und D7S2251, Tabelle 3.4). Zwei davon sind auf dem q-Arm und ein Marker auf dem kurzen p-Arm von Chromosom 7 lokalisiert. Bei NB6135 zeigten vier Marker eine uniparentale maternale Vererbung (Tabelle 3.5). Bei Patient LW4925 konnte in der Mikrosatelliten-Analyse wie auch schon in den Ergebnissen der MS-PCR eine upd(7)mat nur für den langen Arm des Chromosoms 7 nachgewiesen werden (Tabelle 3.6). Da in der MS-PCR bei Patient LW4925 eine Hypomethylierung in *MEG3/GTL2* aufgefallen war, wurde für Chromosom 14 ebenfalls eine Mikrosatelliten-Typisierung durchgeführt um eine maternale UPD von Chromosom 14 auszuschließen.

Tabelle 3.7: Ergebnis der Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 14 bei Patient LW4925.

Locus	STR	Vater	Mutter	LW4925	Ergebnis
14q32.2	D14S267	3-3	1-2	1-3	biparental
14q31.3	D14S68	1-2	2-3	1-3	biparental
14q24.2	D14S277	2-3	1-2	2-3	ein paternales Allel
14q11.2	D14S72	2-3	1-3	2-3	biparental
14q11.2	D14S283	1-2	3-4	1-4	biparental
14q12	D14S80	3-4	1-2	1-4	biparental

Die Mikrosatelliten für Chromosom 14 bei LW4924 zeigten für fünf von sechs Markern Allele von beiden Eltern. Bei einem Marker lag mindestens ein paternales Allel vor (Tabelle 3.7). Eine upd(14)mat war somit für den untersuchten Bereich bei LW4925 ausgeschlossen .

3.2.4 MS-SNuPE-Ergebnisse bei den upd(7)mat-Patienten

Um die Diagnose eines Silver-Russell-Syndroms aufgrund einer upd(7)mat zu bestätigen bzw. weitere Loci auf Methylierungsveränderungen hin zu untersuchen wurde eine MS-SNuPE-Analyse an DNA-Proben der Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Bei Patient JW11296 war neben der Hypermethylierung von *GRB10* und *MEST* weiterhin eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Locus zu beobachten. Bei den Proben MD8282 und NB6135 war nur die Hypermethylierung von *MEST* und *GRB10* im Sinne einer upd(7)mat zu erkennen. Weitere Loci waren hier nicht betroffen. LW4925 wies neben der Hypermethylierung von *MEST* noch eine Hypomethylierung des *MEG3*-Locus auf, die bereits in der MS-PCR für diesen Locus dargestellt wurde. Bei LW4925 unterstützten die MS-SNuPE-Analysen ebenfalls den Befund einer upd(7)mat, die sich auf den langen Arm des Chromosoms 7 beschränkt, was sowohl in der MS-PCR als auch durch die Mikrosatelliten-Typisierung bestätigt wurde.

3.2 Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten

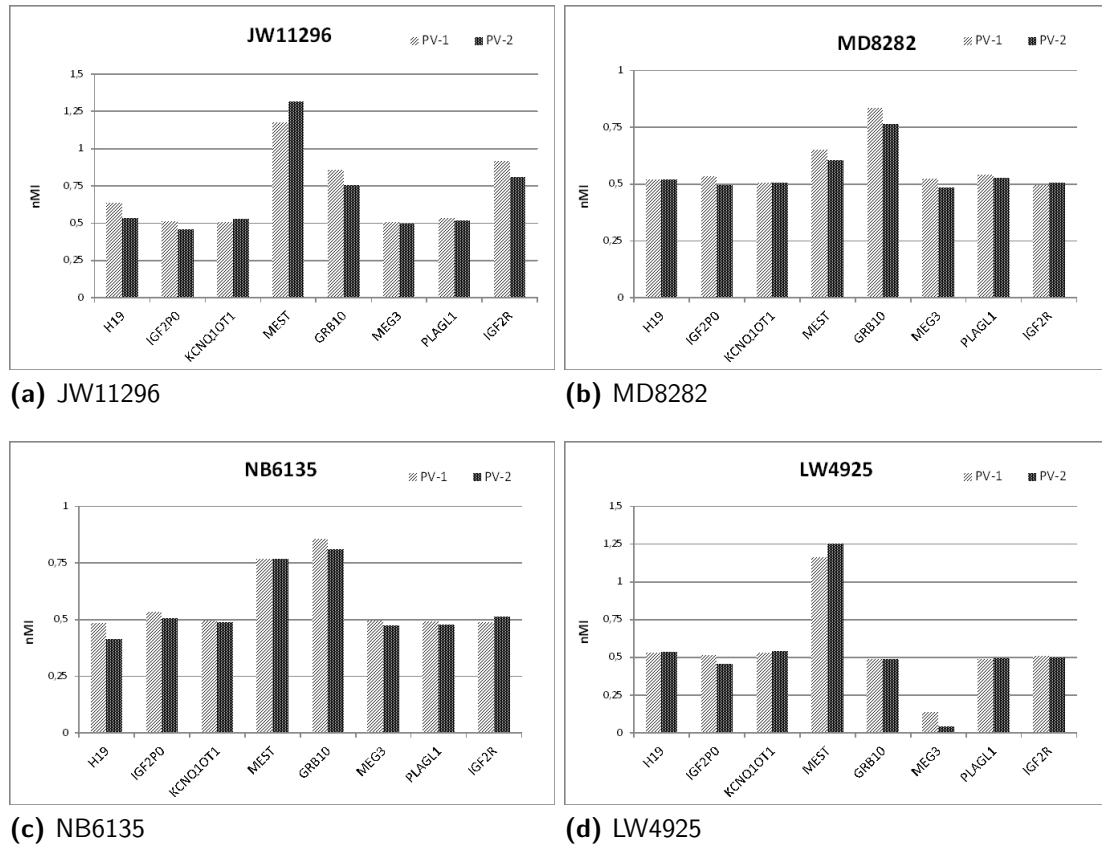
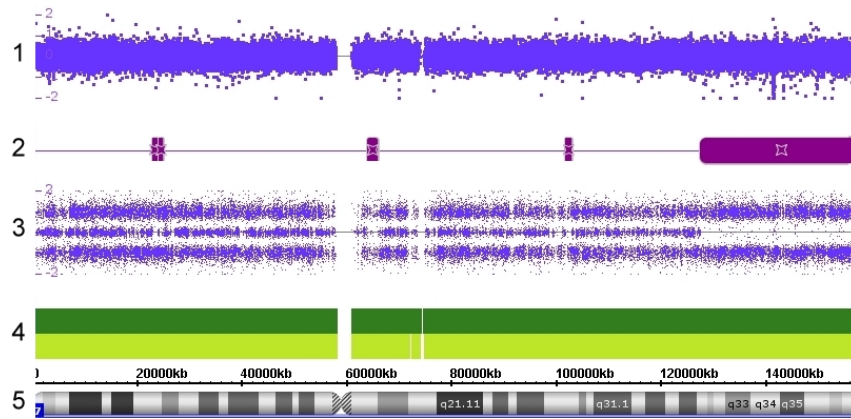


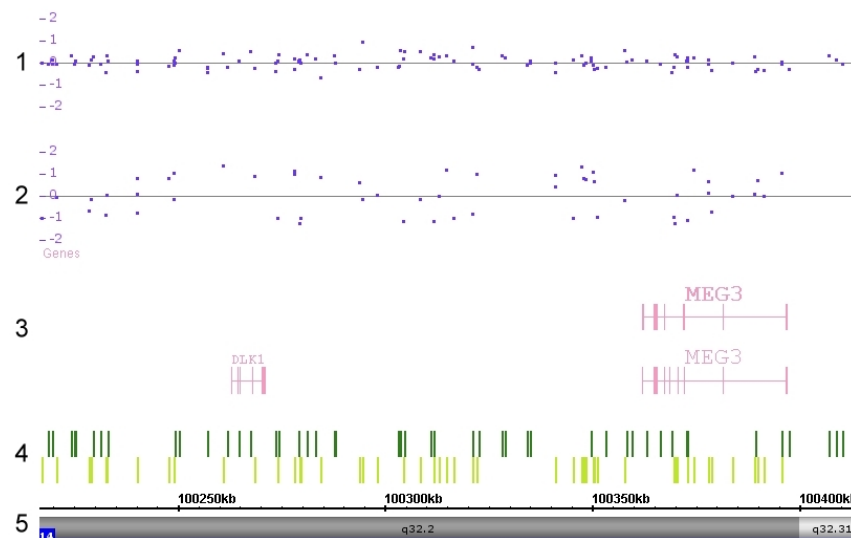
Abbildung 3.4: MS-SNuPE Ergebnisse der Patienten mit upd(7)mat. (nMI, normalisierter Methylierungsindex; PV, Primerverlängerungsreaktion)

3.2.5 Molekulare Karyotypisierung

Um die bei Patient LW4925 gefundene Methylierungsveränderung am *MEG3*-Locus von einer möglichen Deletion des paternalen Allels unterscheiden zu können und eventuelle in *cis*- oder *trans*-wirkenden Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf die komplexen genetischen und epigenetischen Veränderungen dieses Patienten haben, wurde eine SNP-Array-Typisierung vorgenommen (Abschnitt 2.2.3.1).



(a) Log₂-Ratio für Chr. 7; 2, Bereiche fehlender Heterozygotie für Chr. 7q32 bis qter; Allelunterschiede 7q32 bis qter; 4, Markerabdeckung des verwendeten Arraysystems; 5, physikalische Position auf Chromosom 7. Abbildung



(b) Darstellung der Log₂-Ratio für 14q32; 2, Allelunterschiede; 3, Gene in der Region 14q32; Markerabdeckung; 5, physikalische Position und chromosomale Bande.

Abbildung 3.5: Ergebnis der molekularen Karyotypisierung bei Patient LW4925 mit upd(7q)mat und Hypomethylierung der *MEG3*-Region in 14q32 (entnommen aus Begemann et al. (2012c)).

Die SNP-Array Analyse bei LW4925 wies keine pathogenen Kopienzahlabweichungen > 100 kb auf. In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse der Array-Analytik für Chromosom 7 sowie die Region 14q32.2 dargestellt. Bei Betrachtung des langen Arms von Chromosom 7 wurde auch in der Array-Analyse die bekannte upd(7q)mat sichtbar (Abbildung 3.5a). Hier zeigte sich ein isodisomes uniparentales Segment von 7q32 bis qter. Dieses war sowohl in den Bereichen mit fehlender Heterozygotie, als auch in der Darstellung der Al-

Unterschiede sichtbar. In Abbildung 3.5b ist die Region 14q32.2 mit den enthaltenen Genen *MEG3/GTL2* und *DLK1* dargestellt. Die Analyse zeigte, dass in der gesamten Region 14q32.2 keine Deletionen nachweisbar waren. Nach Analyse der Array-Daten war für Patient LW4925 sowohl eine uniparentale Isodisomie des Abschnitts 7q32 bis qter, als auch im Abgleich mit den Daten von MS-SNuPE, MS-PCR und Mikrosatelliten-Analyse, eine isolierte Methylierungsveränderung der Region *MEG3* bestätigt (Bege- mann et al., 2012c). Deletionen oder Duplikationen, die einen Hinweis auf *cis*- oder *trans*-interagierende Faktoren geben, konnten nicht identifiziert werden.

3.2.6 Expressions-Analysen bei upd(7)mat-Patienten

Bei einer maternalen uniparentalen Disomie des Chromosom 7 stammen beide Kopien dieses Chromosoms von der Mutter mit den entsprechenden Methylierungsmustern und vollständig mütterlicher Prägung. Da eine upd(7)mat als Genommutation die einzige bekannte Ursache eines Silver-Russell-Syndroms darstellt, eignen sich ihre Träger sehr gut um einen Einfluss der veränderten Prägung des gesamten Chromosom 7 auf die Expression anderer geprägter Gene zu erfassen.

Um Interaktionen zwischen Faktoren zu untersuchen, die auf den Chromosomen 6, 7, 11 und 14 kodiert sind und eine Rolle bei den bisher beschriebenen angeborenen Imprinting-Erkrankungen spielen, wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression der Gene *PLAGL1* (6q24.2), *MEST*, *COPG2* (7q32.2), *GRB10* (7p12.2), *H19*, *IGF2*, *CDKN1C* (11p15.5) und *MEG3* (14q32.2) untersucht.

Zur Normierung wurde als Referenzgen das TATA-Box-binding Protein (*TBP*, 6q27) gewählt. Die Messung jeder Probe erfolgte an mindestens zwei biologischen Replikaten, mit je drei technischen Replikaten. Die einzelnen biologischen Replikate wurden für die Auswertung in biologischen Gruppen zusammengefasst. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit dem Studienmodul der StepOne® Software (Applied Biosystems). Als Kontrollgruppe wurden sieben verschiedene Fibroblastenkulturen genutzt, die unter gleichen Bedingungen wie die Proben kultiviert und isoliert wurden.

3.2.6.1 Chromosom 7 kodierte Gene

Gene in 7q

Im Vergleich zu einer Gruppe von Kontrollen ließ sich erkennen (Abbildung 3.6a), dass bei Patienten mit nachgewiesener upd(7)mat bzw. upd(7q)mat die Expression des paternal exprimierten und maternal methylierten Gens *MEST* nahezu unterbleibt.

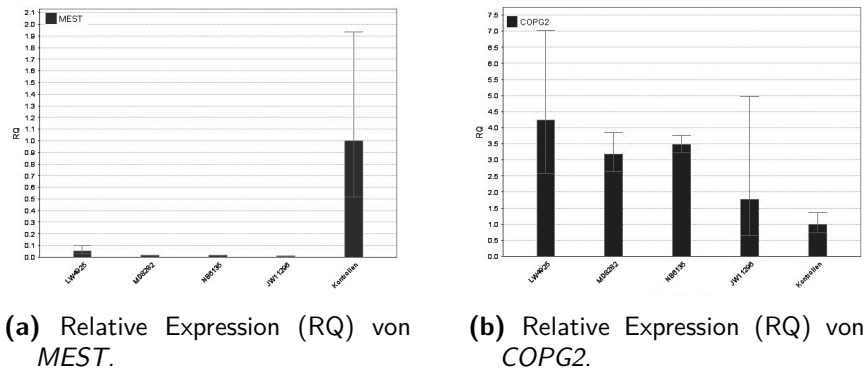


Abbildung 3.6: Relative Expression (RQ) der Gene *MEST* (a) und *COPG2* (b) auf Chromosom 7q in upd(7)mat Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. (Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%).

Das Gen *COPG2* liegt direkt angrenzend an *MEST* in 7q32 und wurde von Blagitko et al. (1999) als geprägt identifiziert. Die Expression von *COPG2* in Fibroblastenkulturen von upd(7)mat und upd(7q)mat Patienten war hier im Vergleich zur Kontrollgruppe bei drei von vier Patienten (LW4925, MD8282, NB6135) signifikant bis zu vierfach erhöht. Bei JW11296 wies die Messung von *COPG2* eine hohe Streuung auf (Abbildung 3.6b).

Gene in 7p

Für das auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 lokalisierte Gen *GRB10* konnte in allen Proben eine Überexpression gemessen werden (Abbildung 3.7). Die Expression von *GRB10* bei MD8282 und NB6135 war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. JW11296 wies eine relativ hohe Streuung auf, so dass die Verdopplung der Expression hier nicht signifikant war. Bei Patient LW4925 lag keine upd(7)mat des p-Arms vor, die Expression von *GRB10* war aber vergleichbar zu der bei Patienten mit vollständiger upd(7)mat. Aufgrund der erhöhten Streuung bei LW4925 war die Steigerung nicht signifikant.

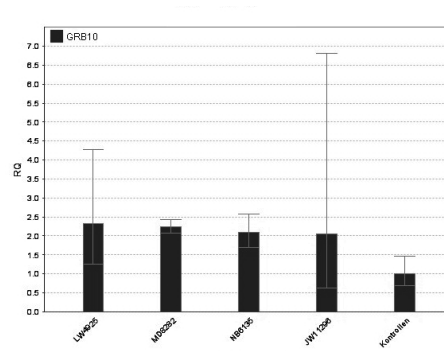


Abbildung 3.7: Relative Expression (RQ) von *GRB10* bei upd(7)mat Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. (Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%).

3.2.6.2 Chromosom 11 kodierte Gene

CDKN1C

Um eine mögliche Interaktion zwischen Faktoren zu untersuchen, die auf den Chromosomen 7 und 11 kodiert sind, wurde die Expression von *CDKN1C*, *H19* und *IGF2* untersucht.

Bei den upd(7)mat Patienten MD8282 und NB6135 wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe für *CDKN1C* ein normales Expressionsmuster gemessen. Bei Patient JW11296 war die Expression leicht, aber signifikant erniedrigt. Der Patient LW4925 zeigte eine mehr als verdoppelte Expression (Abbildung 3.8).

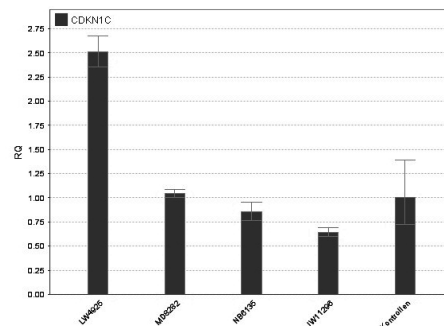


Abbildung 3.8: Relative Expression (RQ) von *CDKN1C* bei upd(7)mat Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. (Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%).

H19 und IGF2

Bei der Messung der Expression von *H19* und *IGF2* in der Kontrollgruppe zeigte sich, dass für diese Gene eine Aussage über die Expression in upd(7)-Patienten aufgrund der enormen Streuung der Kontrollen nicht möglich war (Abbildung 3.9c-d).

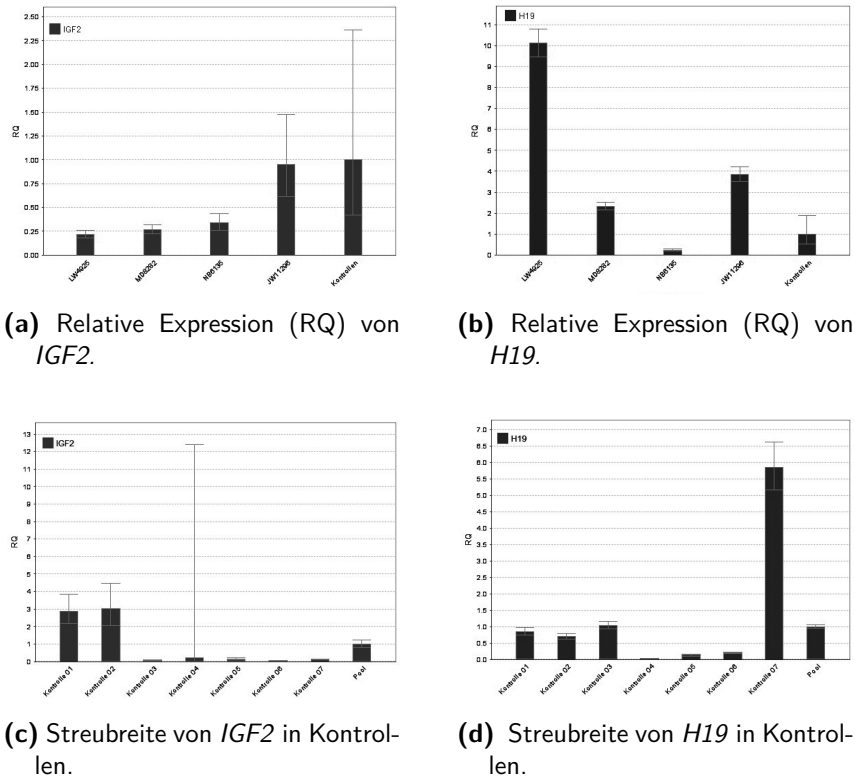


Abbildung 3.9: Relative Expression (RQ) von *IGF2* (a) und *H19* (b) bei upd(7)mat Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (a,b) und Streubreite der Expression von *IGF2* (c) und *H19* (d) in den verwendeten Kontrollen. (Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%).

3.2.6.3 Chromosom 6 und Chromosom 14 kodierte Gene

Um einen Einfluss der upd(7)mat auf weitere geprägte Gene zu untersuchen, wurde die Expression der Gene *PLAGL1* auf Chromosom 6 sowie von *MEG3* auf Chromosom 14 untersucht. Bei den Patienten LW4925 und JW11296 war die Expression von *PLAGL1* in etwa halbiert, während MD8282 und NB6135 eine geringere Reduktion auf das 0,6-0,7 -fache, am Übergang zur Streubreite der Kontrollen zeigten (Abbildung 3.10a).

Die Expression von *MEG3* bei den Trägern einer vollständigen upd(7)mat war signifikant

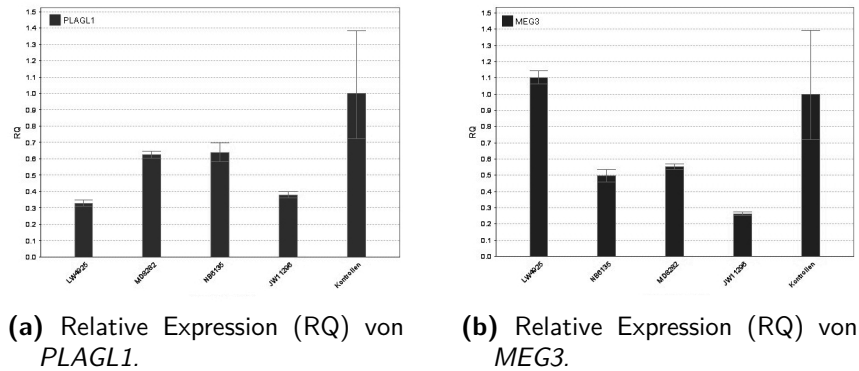


Abbildung 3.10: Relative Expression (RQ) von *PLAGL1* (a) und *MEG3* (b) bei upd(7)mat-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. (Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%).

erniedrigt. Bei LW4925, bei dem die upd(7)mat auf den langen Arm von Chromosom 7 beschränkt ist und eine Hypomethylierung der *MEG3*-DMR auf Chromosom 14 vorliegt (Abbildung 3.4), zeigte *MEG3* eine normale Expression im Bereich der Kontroll-Gruppe.

3.2.6.4 Zusammenfassung der Expressionsdaten

Bei drei Patienten mit nachgewiesener upd(7)mat und einem Patienten mit einer uniparentalen Disomie des langen Arms von Chromosom 7 (upd(7q)mat) wurde die Expression der Gene *MEST*, *GRB10*, *COPG2*, *PLAGL1*, *MEG3*, *CDKN1C* sowie *H19* und *IGF2* gemessen. Die Expression von *MEST* war bei allen vier Patienten nahezu vollständig herunter reguliert, die von *GRB10* in etwa verdoppelt. Diese Befunde stehen bei den drei upd(7)mat-Patienten im Einklang mit der molekularen Diagnose. Für *COPG2* wurde ebenfalls bei allen Patienten eine gesteigerte Expression nachgewiesen. Eine erniedrigte Expression von *MEG3* wurde nur bei den drei Patienten mit vollständiger upd(7)mat nachgewiesen. LW4925, der Patient mit segmentaler auf den q-Arm beschränkter upd(7q)mat und Hypomethylierung in der *MEG3*-DMR auf Chromosom 14, wies keine erniedrigte Expression von *MEG3* auf. Umgekehrt zeigte nur LW4925 eine gesteigerte Expression von *CDKN1C*. Bei JW11296 schien die *CDKN1C*-Expression etwas erniedrigt (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Übersicht über die Expression (RQ) bei upd(7)mat-Patienten für die Gene *MEST*, *GRB10*, *COPG2*, *PLAGL1*, *MEG3* und *CDKN1C*. Hochregulierte Gene sind grün, eine erniedrigte Expression in rot dargestellt. Die Streubreite der Kontrollen ist für ein Konfidenzintervall von 95% angegeben.

Locus	upd(7q)mat	upd(7)mat			Kontrollen
	LW4925	MD8282	NB6135	JW11296	Kontrollrange
<i>MEST</i>	0	0	0	0	0,5-1,8
<i>GRB10</i>	2,3	2,2	2,1	2,1	0,7-1,5
<i>COPG2</i>	4,2	3,2	3,5	1,8	0,7-1,7
<i>PLAGL1</i>	0,3	0,6	0,6	0,4	0,7-1,4
<i>MEG3</i>	1,1	0,6	0,5	0,3	0,7-1,4
<i>CDKN1C</i>	2,5	1	0,9	0,6	0,7-1,4

3.3 Molekulare Charakterisierung von Patienten mit Multilocus-Methylierungsdefekten (MLMD)

Im Nachfolgenden werden Patienten beschrieben, bei denen die Diagnose eines Silver-Russell-Syndrom aufgrund einer Hypomethylierung der ICR1 in 11p15.5 gesichert werden konnte und die zusätzlich weitere Auffälligkeiten in ihrem Methylierungsmuster im Sinne eines MLMD aufweisen. Teilweise konnte von den Patienten eine Fibroblastenkultur aus Hautzellen gewonnen werden, die dann für Expressions-Analysen verwendet wurden.

3.3.1 MS-MLPA-Ergebnisse bei MLMD-Patienten

Aufgrund der Verdachtsdiagnose eines Silver-Russell-Syndrom, wurde bei den Patienten im routinediagnostischen Vorgehen eine MS-MLPA für die Region 11p15 durchgeführt. Bei den Patienten EB6247, MB7231, DL6467 und RW6091 wurde dabei, neben der beim Silver-Russell-Syndrom auftretenden Hypomethylierung der ICR1, zusätzlich eine typischerweise beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom auftretenden Hypomethylierung der ICR2 beobachtet (Abbildung 3.11).

3.3 Molekulare Charakterisierung von MLMD-Patienten

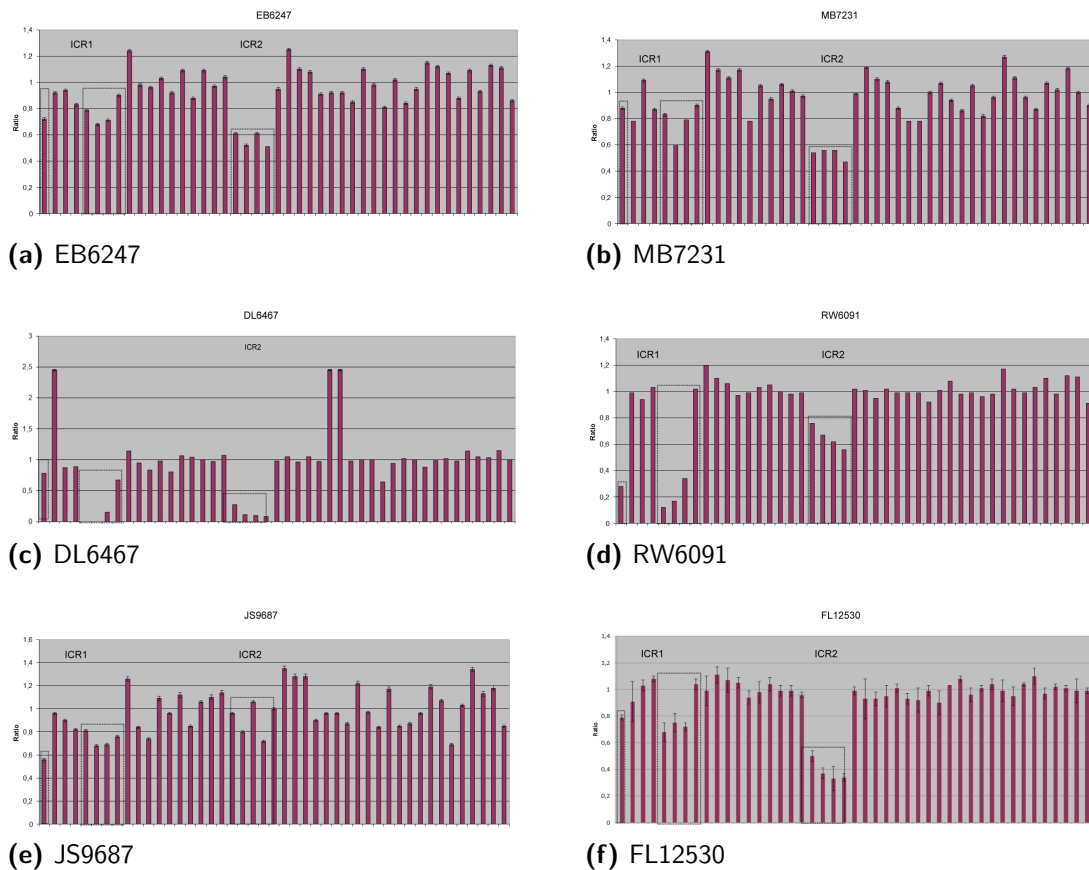
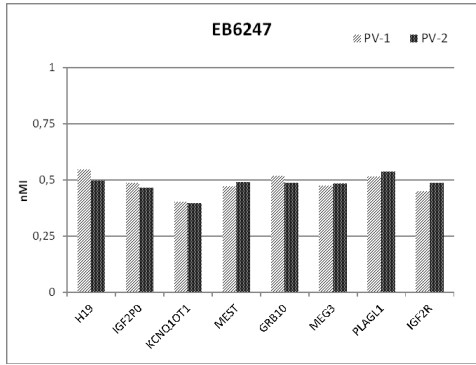


Abbildung 3.11: Ergebnis der Methylierungsanalyse der MS-MLPA für die Patienten EB6247 (a), MB7231 (b), DL6467 (c), RW6091 (d), JS9687 (e) und FL12530 (f). Erkennbar ist eine Hypomethylierung der ICR1 (Imprinting Control Region 1) sowie eine Hypomethylierung der ICR2. Die methylierungssensitiven Sonden sind umrandet.

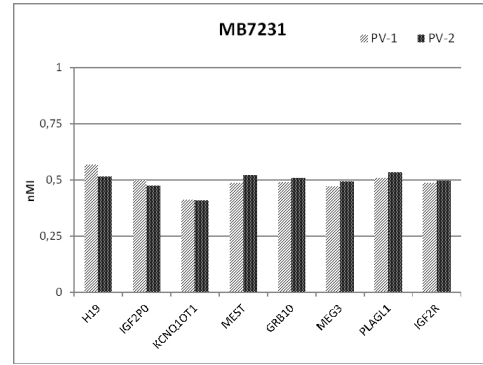
3.3.2 MS-SNuPE Ergebnisse bei MLMD-Patienten

Um bei Patienten, die sowohl in der ICR1 als auch in der ICR2 auf Chromosom 11p15 ein auffälliges Methylierungsmuster zeigten, weitere Loci zu überprüfen und die Auffälligkeiten in der ICR1 und ICR2 zu bestätigen, wurde eine MS-SNuPE-Analyse an den Patientenproben durchgeführt.

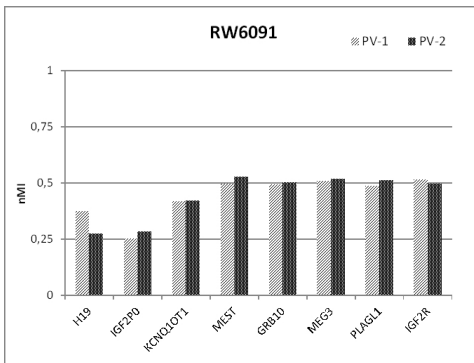
3.3 Molekulare Charakterisierung von MLMD-Patienten



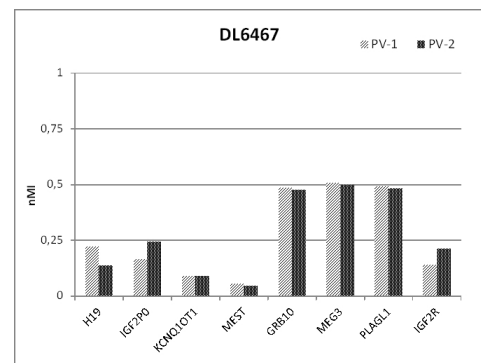
(a) nMI für Proband EB6247



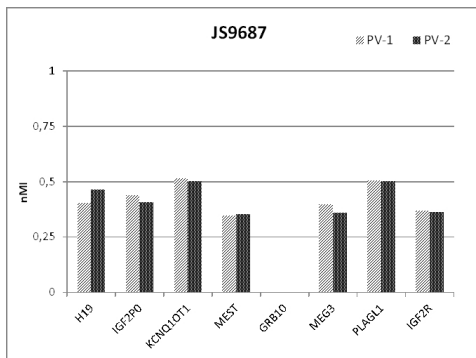
(b) nMI für Proband MB7231



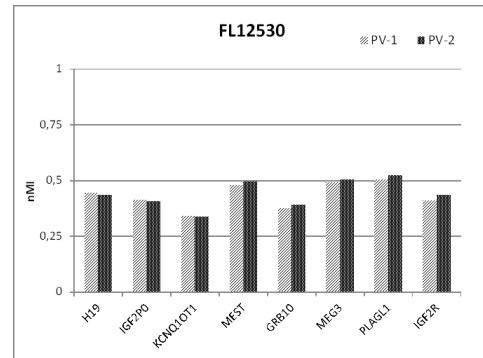
(c) nMI für Proband RW6091



(d) nMI für Proband DL6467



(e) nMI für Proband JS9687



(f) nMI für Proband FL12530

Abbildung 3.12: MS-SNuPE-Ergebnisse bei MLMD-Probanden. Normalisierter Methylierungsindex (nMI) für die Loci *H19*, *IGF2P0*, *KCNQ1OT1* (11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12.1), *MEG3* (14q32.2), *IGF2R* (6q25.3), *PLAGL1* (6q24.2).

Die MS-SNuPE Analyse konnte bei allen untersuchten MLMD-Patienten die Hypomethylierung des *KCNQ1OT1*-Locus bestätigen. Bei der Patientin EB6247 und ihrem ein-eiigen Zwilling MB7231 zeigte sich im *IGF2P0*-Locus ebenfalls eine leichte Reduktion des

3.3 Molekulare Charakterisierung von MLMD-Patienten

Methylierungsindex in mindestens einer Primerverlängerungsreaktion. Bei EB6247 und MB7231 war die Verringerung des Methylierungsindex für *H19* im Gegensatz zur MS-MLPA-Analyse nicht zu erkennen (Abbildung 3.11, Begemann et al. 2011). An der Probe von RW6091 ließ sich zusätzlich zur Reduktion des Methylierungsindex in *KCNQ1OT1* eine deutliche Reduktion des Methylierungsindex für *H19* und *IGF2P0* nachweisen. DL6467 wies das auffälligste Methylierungsmuster auf. Die Methylierungsindices für *H19*, *IGF2P0* und *KCNQ1OT1* waren hier am stärksten reduziert. Dazu zeigte sich im Sinne einer ausgeprägten Hypomethylierung eine Reduktion der Methylierungsindices für *MEST* und *IGF2R*. Bei AL7588, der Mutter von DL6467, ließ sich im MS-SNuPE keine veränderte Methylierung nachweisen (Daten nicht abgebildet). Bei JS9687 war eine Reduktion des Methylierungsindex im Sinne einer Hypomethylierung in sechs Loci zu erkennen (*H19*, *IGF2P0*, *MEST*, *GRB10*, *MEG3* und *IGF2R*), nur *KCNQ1OT1* und *PLAGL1* wiesen einen Methylierungsindex im Bereich einer normalen Methylierung auf. FL12530 wurde wie auch JS9687 über die Routinediagnostik erfasst. Der Methylierungsindex war hier für *H19*, *IGF2P0*, *KCNQ1OT1*, *GRB10* und *IGF2R* reduziert.

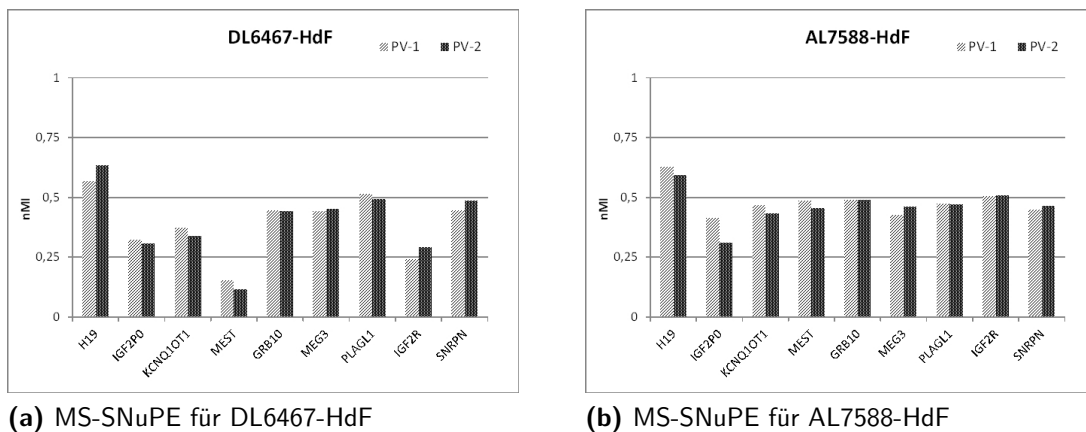


Abbildung 3.13: MS-SNuPE Ergebnisse für humane Hautfibroblasten-Kulturen (HdF) von DL6467 und seiner Mutter AL7588.

Um die Methylierung von MLMD-Patienten in humanen Hautfibroblasten zu untersuchen wurde aus den Kulturen von DL6467 und AL7588 DNA isoliert und mittels MS-SNuPE analysiert. Bei DL6467 zeigte sich, dass die Loci *KCNQ1OT1*, *MEST* und *IGF2R* das gleiche Methylierungsmuster aufwiesen, wie es in DNA aus Lymphozyten nachgewiesen wurde. In *H19* und *IGF2P0* war bei beiden Probanden eine Hypermethylierung von *H19* und eine Hypomethylierung für *IGF2P0* nachweisbar. Die verbleibenden Loci bei AL7588 waren unauffällig.

3.3.3 MS-PCR-Ergebnisse bei MLMD-Patienten

Um die Befunde der Loci bei MLMD-Patienten zu bestätigen, die nicht in der Routinediagnostik abgedeckt wurden, wurden u. a. MS-PCR-Analysen durchgeführt.

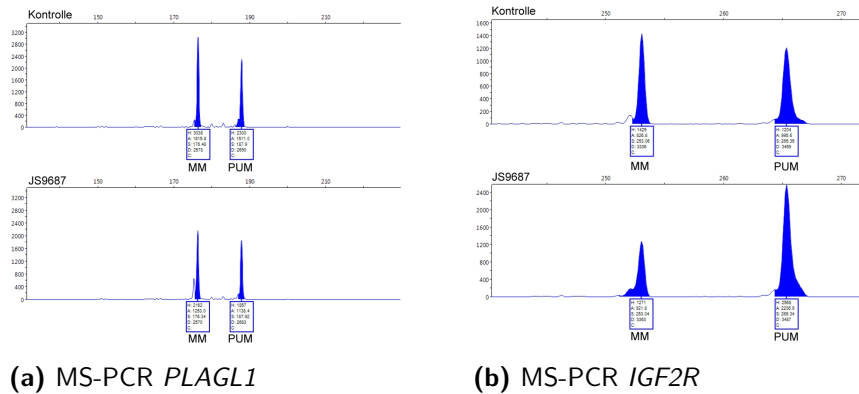


Abbildung 3.14: MS-PCR-Ergebnisse für JS9687 an Chromosom 6

Bei JS9687 konnte mittels MS-PCR für die Loci auf Chromosom 6 das Vorliegen einer reduzierten Methylierung für *IGF2R* bestätigt werden. Die MS-PCR für *PLAGL1* sprach gegen das Vorliegen einer upd(6)mat.

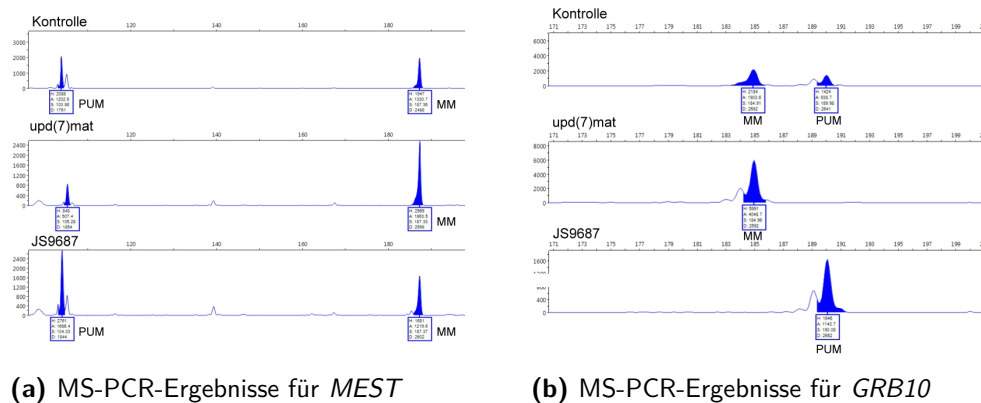


Abbildung 3.15: MS-PCR-Ergebnisse von *MEST* (a) und *GRB10* (b) auf Chromosom 7 für JS9687. Dargestellt ist eine Normalkontrolle, eine upd(7)mat-Probe sowie JS9687.

Für *MEST* zeigte sich bei JS9687 eine Reduktion des maternal methylierten Allels im Vergleich zum paternal unmethylierten Allel. Dieser Befund ist vereinbar mit einer Hypomethylierung des maternalen Allels (Abbildung 3.15a). Die MS-PCR für *GRB10* (Abbildung 3.15b) zeigte ein Fehlen des maternal methylierten Allels bei JS9687 und

bestätigte den Befund der MS-SNuPE-Analyse (Abbildung 3.12e). Die MS-PCR am *MEG3*-Locus für JS9687 zeigte im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhtes Signal für das maternal unmethylierte Allel im Sinne einer Hypomethylierung, was den MS-SNuPE-Befund bestätigte.

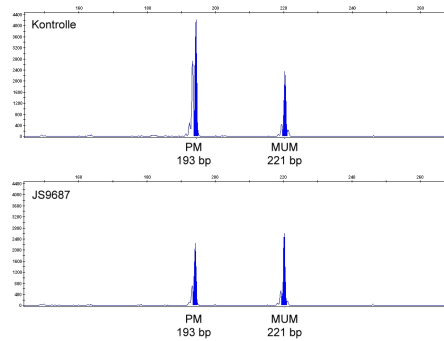


Abbildung 3.16: MS-PCR für den *MEG3*-Locus für JS9687 und eine Kontrolle

3.3.4 Mikrosatelliten-Typisierung bei MLMD-Patienten

Um eine upd(7)mat bei JS9687 auszuschließen, wurde eine Mikrosatelliten-Typisierung für Chromosom 7 durchgeführt, fünf Mikrosatelliten zeigten dabei eine biparentale Vererbung.

Tabelle 3.9: Ergebnis der Mikrosatelliten-Typisierung für JS9687 für Chromosom 7

Locus	Marker	Vater	Mutter	JS9687	Ergebnis
7p15.3	D7S493	1-3	2-3	1-2	biparental
7p14.3	D7S460	1-1	2-2	1-2	biparental
7q22.2	D7S2446	1-1	2-3	1-3	biparental
7q33	D7S2452	1-2	2-3	1-2	ein paternales Allel
7q36.1	D7S483	1-1	2-3	1-3	biparental
7q36.1	D7S636	1-4	2-3	2-4	biparental

3.3.5 Sequenzierung der Gene *DNMT3L*, *MBD3* und *NLRP2*

Um mögliche Varianten zu identifizieren, die für die gestörte Methylierung an multiplen Loci verantwortlich sein könnten, wurden die Gene *DNMT3L* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 – like) und *MBD3* (in Zusammenarbeit mit Frau Magdalena Gogiel)

sequenziert. Bei beiden Genen wird eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung bzw. der Etablierung von Methylierungssignalen postuliert (Reese et al., 2007; Chédin, 2011). Die Sequenzierung von *NLRP2* erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Universität Schleswig-Holstein in Kiel.

3.3.5.1 Identifizierte Varianten in *DNMT3L* und *MBD3*

Untersucht wurden die MLMD-Patienten JW6091, EB6247 und DL6467. In der Sequenz von *MBD3* (RefSeq NM_003926.5) ließ sich bei keinem der Patienten eine relevante Mutation im kodierenden Bereich sowie den Intron-Exon-Übergängen nachweisen. Bei Patient JW6091 waren in Exon 6 zwei SNPs nachweisbar. Beide Varianten, rs1053151 und rs9585, kommen mit einer Häufigkeit von > 1% in der Bevölkerung vor und liegen in der 3'-UTR von *MBD3*. Bei der Sequenzierung von *DNMT3L* (NM_013369) wurden ebenfalls keine relevanten Veränderungen gefunden. Bei Patient DL6467 war ein nicht synonyme Basenaustausch in Exon 9 (rs7354779) nachweisbar. Diese Variante führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz von Arginin (AGG) zu Glycin (GGG) und kommt mit einer Häufigkeit von > 1% vor. Bei allen drei Patienten ließ sich im Intron 1 die Variante IVS1-4 A>G nachweisen. Dabei handelt es sich um den Polymorphismus rs2070565, der in allen vier bekannten Basen vorkommen kann. Seine Häufigkeit liegt bei > 1%. Bei Patient EB6247 lag der Austausch heterozygot vor, bei DL6467 und RW6091 in homozygoter Form. Die Angaben der durchschnittlichen Heterozygotenfrequenz entstammen der NCBI SNP Datenbank (dbSNP135, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Tabelle 3.10: Gefundene Varianten in *DNMT3L* und *MBD3* (bezogen auf dbSNP135).

Variante	Patient	Lokalisation	Austausch	Durchschnittliche Heterozygotenfrequenz*
rs1053151	RW6091	MBD3, Exon 6, 3'UTR	C/T	0,499 +/- 0,020
rs9585	RW6091	MBD3, Exon 6, 3'UTR	A/G	0,364 +/- 0,222
rs7354779	DL6467	DNMT3L, Exon 9	C/T	0,348 +/- 0,230
rs2070565	Alle	DNMT3L, IVS1-4	A/G	0,326 +/- 0,238

3.3.5.2 Varianten in *NLRP2*

Im Rahmen eines BMBF-Projektes wurde in den Proben DL6467 und AL7588, der Mutter von DL6467 in Kooperation mit der Humangenetik der Universität Schleswig Holstein in

Kiel die Variante NM_017852.3:c. 2237delA in heterozygotem Zustand gefunden, die zu einem verkürzten Protein führt: NP_060322.1:p.(Asn746Thrfs*4). Eine Resequenzierung konnte die Variante in DL6467 und AL7588 bestätigen. Die gesunden Geschwister von DL6467 sind nicht Träger der Variante in *NLRP2*.

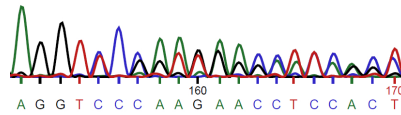


Abbildung 3.17: Heterozygote Variante c.2237delA in DL6467 und AL7588. Reverse Sequenzierung des Exons 7 von *NLRP2* (NM_017852.3).

3.3.6 Expressionsanalysen bei MLMD-Patienten

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Methylierungsveränderungen bei MLMD-Patienten auf die Genexpression verschiedener Gene zu untersuchen, wurde eine quantitative Realtime-PCR für die Gene *PLAGL1* (6q24.2), *MEST*, *COPG2*, (7q32.2), *GRB10* (7p12.2), *H19*, *IGF2*, *CDKN1C* (11p15.5), und *MEG3* (14q32.2) durchgeführt. Bestimmt wurde die relative Expression (RQ) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus Fibroblasten (Abschnitt 2.2.5).

3.3.6.1 Chromosom 7 kodierte Gene

Gene in 7q

Die Messung zeigte eine erhöhte Expression von *MEST* im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den MLMD-Patienten DL6467, EB6247 und MB7231 (Zwilling von EB6247). In der Probe von AL7588 (mütterliche Probe zu DL6467) war eine Expression vergleichbar der in Kontrollen nachzuweisen (Abbildung 3.18a).

In direkter Nachbarschaft zu *MEST* auf Chromosom 7 liegt das ebenfalls geprägte Gen *COPG2*. In den vorliegenden Proben von MLMD-Patienten ließ sich bei MB7231 und DL6467 eine leicht reduzierte Expression von *COPG2* nachweisen. Bei beiden Proben lag die Messung der Expression an der Grenze zur Streubreite der Kontrollen (Abbildung 3.18b).

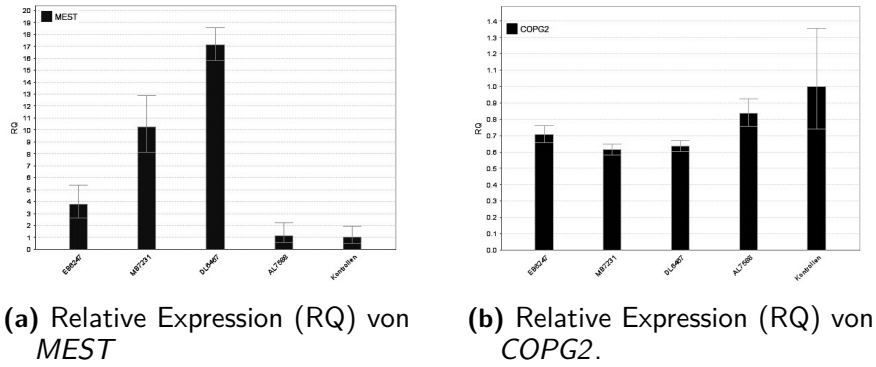


Abbildung 3.18: Relative Expression der Gene *MEST* (a) und *COPG2* (b) in 7q bei MLMD-Patienten. (das Konfidenzintervall ist mit 95 % angegeben).

Gene in 7p

Die Expression in 7p lokalisierten Gens *GRB10* lag bei allen gemessenen Proben im Bereich der normalen Schwankungen innerhalb der Kontrollen. Eine veränderte Genexpression für *GRB10* ließ sich nicht nachweisen (Abbildung 3.19).

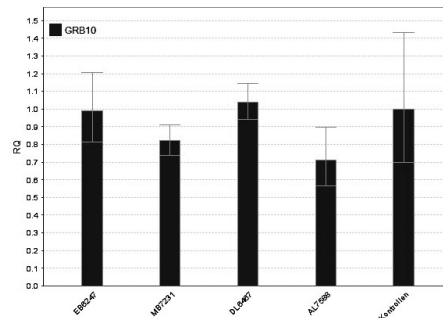


Abbildung 3.19: Relative Expression (RQ) von *GRB10* bei MLMD-Patienten (das Konfidenzintervall ist mit 95 % angegeben).

3.3.6.2 Chromosom 11 kodierte Gene

Wie auch schon für die upd(7)mat-Patienten (Abschnitt 3.2.6.2) wurde bei der Gruppe der MLMD-Patienten die Expression der Gene des Imprinting-Clusters auf Chromosom 11p15.5 gemessen.

CDKN1C

Bei allen gemessenen Proben ließ sich eine Reduktion der *CDKN1C*-Expression nachweisen. Die Reduktion der Expression bei MB7231 war dabei schwächer ausgeprägt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag sie am Übergang zum Normbereich.

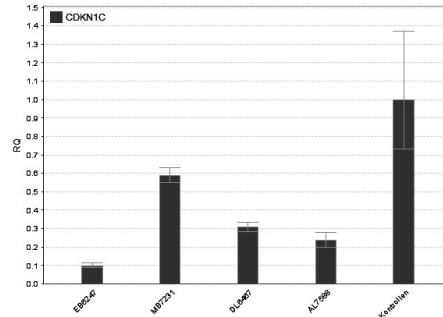
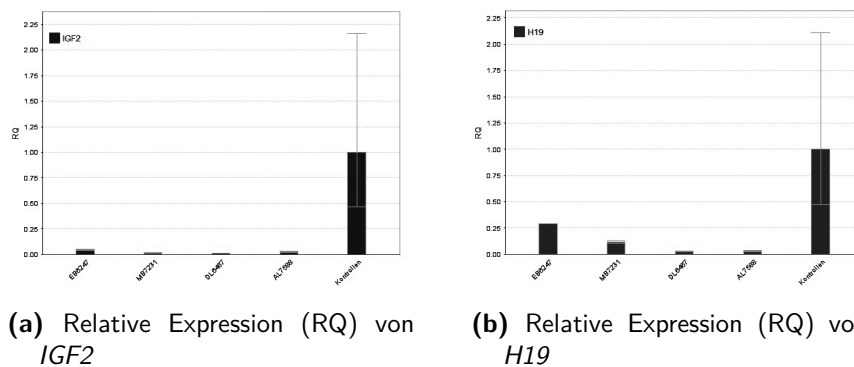


Abbildung 3.20: Relative Expression (RQ) von *CDKN1C* bei MLMD-Patienten (das Konfidenzintervall ist mit 95 % angegeben).

H19 und IGF2

Für die Messung der Expression von *IGF2* (Abbildung 3.21a) und *H19* (Abbildung 3.21b) wurden die gleichen Kontrollproben verwendet wie für die Messung dieser Gene bei upd(7)mat-Patienten. Die Streubreite in der Kontrollgruppe erwies sich damit auch für die Auswertung der Expression von *H19* und *IGF2* in der MLMD-Gruppe als zu breit.



(a) Relative Expression (RQ) von *IGF2*

(b) Relative Expression (RQ) von *H19*

Abbildung 3.21: Relative Expression (RQ) von *IGF2* und *H19* bei MLMD-Patienten (das Konfidenzintervall ist mit 95 % angegeben).

Die Expression von *IGF2* ist bei allen Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe stark

reduziert. Die Expression von *H19* aller gemessenen Proben lag unterhalb der gemessenen Expression in Kontrollen.

3.3.6.3 Chromosom 6 und Chromosom 14 kodierte Gene

Die Messung von *PLAGL1* in MLMD-Patienten zeigte eine deutliche Reduktion der Expression für die Probe von AL7588. Bei EB6247 und DL6467 lag eine Reduktion der Expression an der Grenze zur Streubreite von Kontrollen vor. MB7231 zeigte eine Expression innerhalb des Normalbereichs (Abbildung 3.22a).

Die Expression von *MEG3* von EB6247, MB7231 und DL6467 lag im Bereich der Normal-Kontrollen. Bei AL7588 lies sich eine signifikante Reduktion der *MEG3*-Expression messen (Abbildung 3.22b). Die Expression von *MEG3* bei EB6247 schien erhöht, lag aber im Bereich der Normal-Kontrollen und war nicht signifikant.

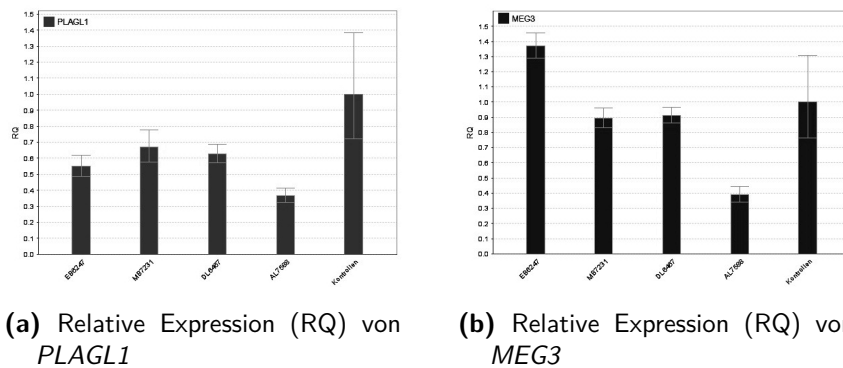


Abbildung 3.22: Relative Expression (RQ) von *PLAGL1* (a) und *MEG3* (b) bei MLMD-Patienten (die Fehlerbalken geben den Vertrauensintervall für 95 % an).

3.3.6.4 Zusammenfassung der Expressionsdaten

Untersucht wurde des Expressionsmuster der Gene *MEST*, *GRB10*, *COPG2*, *PLAGL1*, *MEG3* und *CDKN1C* bei MLMD-Patienten und ihren Familienmitgliedern. Für *MEST* konnte eine Hochregulation bei zwei MLMD-Patienten und dem gesunden eineiigen Zwilling von EB6247 nachgewiesen werden. Bei dem ebenfalls auf Chromosom 7 kodierten Gen *GRB10* zeigte sich keine veränderte Expression. *COPG2*, in direkter Nachbarschaft zu *MEST* lokalisiert, wies nur bei dem eineiigen Zwilling MB7231 und bei DL6467 eine signifikante Reduktion an der Grenze zur normalen Streubreite von Kontrollen auf. Eine reduzierte Expression von *PLAGL1* auf Chromosom 6 ließ sich bei allen Proben bis

auf MB7231 nachweisen. Der auf Chromosom 14 lokalisierte Faktor *MEG3* war nur in AL7588, der Mutter des Patienten DL6467, erniedrigt. Reduziert war die Expression von *CDKN1C* bei allen gemessenen Proben, wobei sich MB7231 nur knapp unterhalb der normalen Streubreite der Kontrollen befand.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Expression (RQ) bei MLMD-Patienten für die Gene *MEST*, *GRB10*, *COPG2*, *PLAGL1*, *MEG3* und *CDKN1C*, sowie *IGF2* und *H19*. Hochregulierte Gene sind in grün dargestellt, eine erniedrigte Expression in rot. Die Streubreite der Kontrollen ist für ein Konfidenzintervall von 95% angegeben.

Indikation	MLMD	Zwilling	MLMD	Mutter	Kontrollen
Locus	EB6247	MB7231	DL6467	AL7588	Streubreite
<i>MEST</i>	3,7	10,2	17,1	1,1	0,5-1,8
<i>GRB10</i>	1,0	0,8	1,0	0,7	0,7-1,5
<i>COPG2</i>	0,7	0,6	0,6	0,8	0,7-1,7
<i>PLAGL1</i>	0,6	0,7	0,6	0,4	0,7-1,4
<i>MEG3</i>	1,4	0,9	0,9	0,4	0,7-1,4
<i>CDKN1C</i>	0,1	0,6	0,3	0,2	0,7-1,4

3.4 Klinische Konsequenzen von strukturellen Varianten der Region 11p15

Im Rahmen der Routinediagnostik für das Silver-Russell-Syndrom und gemäß den allgemeinen Empfehlungen für Patienten mit einem Kleinwuchs-Phänotyp umfasst der diagnostische Algorithmus auch eine molekulare Karyotypisierung, da auch strukturelle Varianten in der Region 11p15 für das Silver-Russell-Syndrom verantwortlich sein können. Mit diesem Angang ließ sich bei zwei Patienten ein struktureller Umbau in der Region 11p15 identifizieren. Ein weiterer Patient wurde aufgrund einer mentalen Retardierung extern molekular karyotypisiert, wobei eine Duplikation in der Region 11p15.5 nachgewiesen wurde.

JP11221 ist das dritte Kind gesunder, nicht verwandter deutscher Eltern. Die Größe der Eltern beträgt beim Vater 180 cm (0,28 SD) und liegt bei der Mutter mit 160 cm (-0,78 SD) am unteren Rand des Normalbereichs. Der Bruder der Mutter (180 cm / 0,28 SD) und der mütterliche Großvater (173 cm / -0,73 SD) wiesen eine normale Größe auf. Die mütterliche Großmutter war mit 157 cm (-1,29 SD) eher klein. Die beiden älteren Schwestern der Patienten hatten geringe Geburtsmaße und verblieben am

unteren Ende der Wachstumskurve (8 Jahre alte Schwester 123 cm (1,03 SD), 3,5 jährige Schwester 94 cm (2,42 SD)). Während der Schwangerschaft wurde von reduzierten Bewegungen des Fetus berichtet. Weitere Merkmale waren nicht zu beobachten. Die Geburt erfolgte in der 34. SSW *per sectio* aufgrund eines Fruchtwassermangels, schwerer intrauteriner Wachstumsverzögerung und einer Herzproblematik. Die Geburtsmaße betragen 39 cm (-2,28 SD) und 1030 g (-2,89 SD) bei einem Kopfumfang von 28 cm (-2,18 SD), (APGAR 9-10-10).

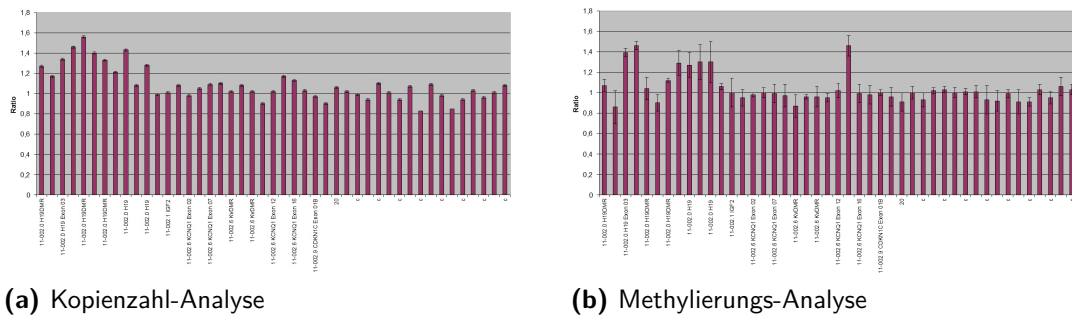


Abbildung 3.23: Patientin JP11296 im Alter von 7,5 Monaten (aus Begemann et al., 2012b).

Es wurde von einem kleinen Mittelgesicht mit prominenter Stirn berichtet (Abbildung 3.23), das Plazentagewicht war deutlich reduziert und entsprach etwa der 20-25 SSW. Mit 7,5 Monaten lag eine ausgeprägte Wachstumsretardierung vor (59 cm, -3,47 SD; Gewicht 4,5 kg, -7,0 SD), der Kopfumfang war normal (42 cm, 0,68 SD) was einer relativen Makrozephalie entspricht. Neben einer Nabelhernie wurde von Schluckproblemen, einer muskulären Hypotonie und einer leicht verzögerten motorischen Entwicklung berichtet. Das Gesicht wies eine milde Asymmetrie auf.

Bei JP11221 zeigte die initiale MS-MLPA für die Region 11p15 erhöhte Signale für die *H19* spezifischen Sonden im Dosis-Lauf und eine korrespondierende, veränderte Methylierung (Abbildung 3.24).

3.4 Klinische Konsequenzen von strukturellen Varianten der Region 11p15



(a) Kopienzahl-Analyse

(b) Methylierungs-Analyse

Abbildung 3.24: MS-MLPA Ergebnisse bei Patientin JP11221

Die MLPA zeigte ausschließlich verstärkte Signale für die ICR1; Sonden, die gegen die ICR2 und *IGF2* gerichtet sind, zeigten keine Auffälligkeiten. Die Duplikation der Region 11p15.5 konnte dann mittels Array-Analyse bestätigt und eingegrenzt werden.

Die molekulare Karyotypisierung zeigte eine 596 kb große Duplikation in der Region 11p15.5 (NCBI36/hg18: chr11:1.501.757-2.098.162), die zwar das Gen *H19*, nicht aber *IGF2* betrifft (SRS2, Abbildung 3.26). Die Duplikation wurde von der Mutter ererbt und war bei den beiden Schwestern ebenfalls nachweisbar. Der mütterliche Onkel der Patientin ist nicht Träger der familiären Duplikation.

Eine MS-SNuPE-Analyse bestätigte die Duplikation bei JP11221 und zeigte zusätzlich eine Hypermethylierung für die geprägten Chromosom 6 Loci *PLAGL1* und *IGF2R*. Die Methylierungsmuster bei den Schwestern der Patientin waren normal. Mittels Mikrosatelliten-Analyse ließ sich das Vorliegen einer vollständigen maternalen uniparentalen Heterodisomie für das Chromosom 6 (uphd(6)mat) bei JP11221 bestätigen, die im Array nicht sichtbar war.

Tabelle 3.12: Mikrosatellitentypisierung an JP11221 für Chromosom 6

Locus	Marker	Vater	Mutter	JP11221	Ergebnis
6q24.3	D6S1649	1-1	2-3	2-3	maternale upd
6p23	D6S1593	1-1	2-3	2-3	maternale upd
6p12.3	D6S272	1-2	2-2	2-2	nicht informativ
6p12.2	5'AR	2-2	1-3	1-3	maternale upd
6p12.2	M182	2-3	1-3	1-3	ein maternales Allel
6p12.1	D6S1960	1-2	3-3	3-3	maternale upd

Die MS-SNuPE Analysen der Schwestern zeigten ebenfalls die Veränderung in 11p15.5. Bei allen vier Proben war eine Reduktion des Signals für *H19* in mindestens einer PV-

3.4 Klinische Konsequenzen von strukturellen Varianten der Region 11p15

Reaktion sichtbar. Bei IP11535 war zusätzlich eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Locus zu detektieren. Eine Sequenzierung der Primerbindestellen von *IGF2R* bei der Familie zeigte keine Varianten, die eine Erhöhung des Signals im Sinne einer Hypermethylierung verursachen würden.

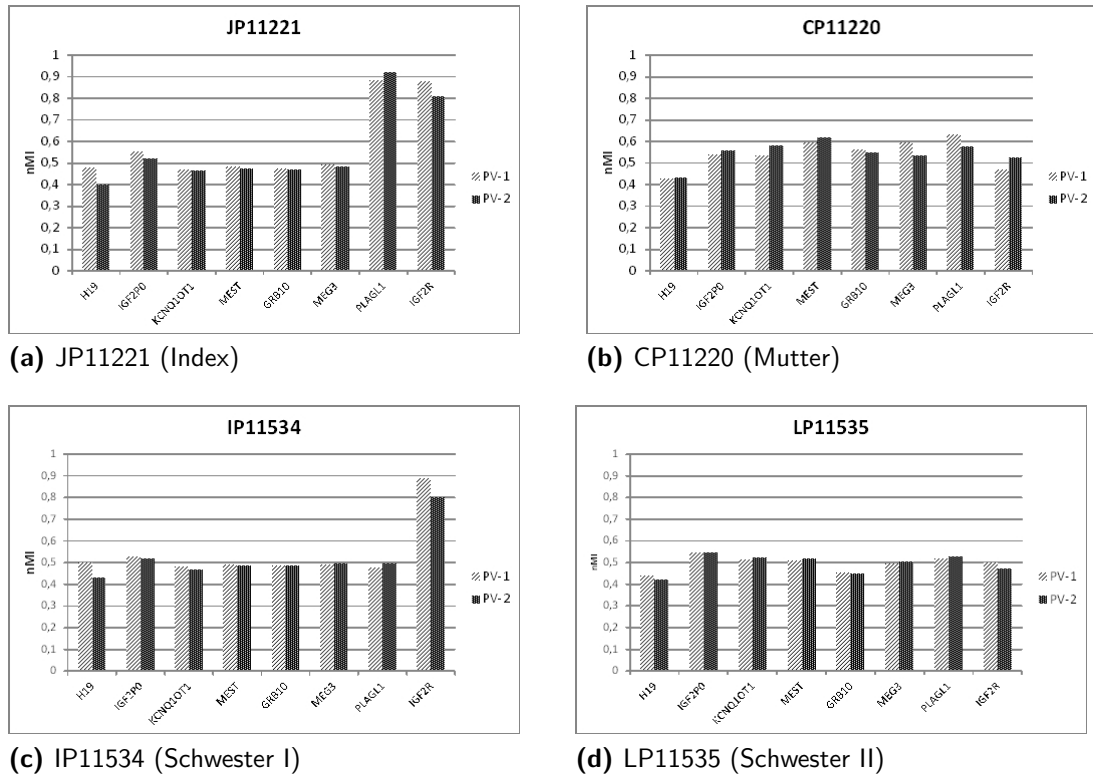


Abbildung 3.25: MS-SNuPE Ergebnisse für JP11221 sowie Mutter und Schwestern

RD6443 ist das zweite Kind gesunder deutscher Eltern (Vater: 28 Jahre, 180 cm, 0,28 SD; Mutter 24 Jahre, 163 cm, -0,27 SD). Eine ältere Schwester zeigte normales Wachstum. Die Schwangerschaft verlief ohne Auffälligkeiten und wurde in der 38. SSW aufgrund der vorliegenden IUGR des Patienten *per sectio* beendet. Die Geburtsmaße betragen 1390 g (-4,4 SD) und 40 cm (-4,83 SD). Der Kopfumfang lag bei 32 cm (-2,07 SD). Schwere Fütterungsprobleme im Alter von drei Monaten machten eine fünfwöchige Sondenernährung notwendig. Im Alter von 13 Monaten betrug die Größe des Patienten 65,5 cm (-4,42 SD) und das Gewicht 5,3 kg (BMI 12,35). Als weitere SRS-typische Merkmale wies der Patient ein dreieckiges Gesicht mit betonter Stirn, eine Mikrognathie sowie eine Klinodaktylie des fünften Fingers auf. Des Weiteren wurde von einer Gaumenspalte berichtet.

Für Patient RD6443 blieb die routinediagnostische Aufarbeitung des Silver-Russell-Syndroms ohne Befund. Eine extern durchgeführte konventionelle zytogenetische Begutachtung nach der Geburt zeigte einen normalen Karyotyp. Die molekulare Karyotypisierung zeigte eine 346 kb große Deletion in 11p15.5 (NCBI36/hg18: chr11:1.554.705-1.900.779). Die Deletion wurde vom gesunden Vater geerbt. Großelterliche Proben waren nicht verfügbar um eine weitere Segregation zu untersuchen. Die Deletion bei RD6443 betrifft den mesodermalen Enhancer von *IGF2* (SRS5, Abbildung 3.26), aber nicht die H19-DMR oder andere mittels MS-MLPA erfasste Bereiche. In der MS-SNuPE-Analyse war eine Hypomethylierung der *IGF2P0*-DMR sichtbar. Eine Sequenzierung der entsprechenden Primerbindestellen zeigte keine Veränderungen.

MZ10567 ist das erste Kind gesunder, nicht verwandter deutscher Eltern (Vater 24 Jahre alt, 183 cm, Mutter 20 Jahre alt, 158 cm). Die Familiengeschichte und Schwangerschaft waren unauffällig. Die Geburt erfolgte spontan in der 40. SSW (40+3). Das Geburtsgewicht wurde mit 2770 g (-1,67 SD), Länge und Kopfumfang mit 53 cm (0,59 SD) bzw. 36 cm (0,85 SD) angegeben. Die motorische Entwicklung war verzögert, freies Laufen mit zwei Jahren. Die Sprachentwicklung verlief normal. Mit sieben Jahren besuchte sie bedingt durch ihre mentale und motorische Entwicklungsverzögerung eine Sonderschule. Zusätzlich bestand eine Hypotonie ohne spezielle neurologische Einschränkungen. In den ersten Jahren waren Größe und Gewicht knapp unterhalb der dritten Perzentile. Mit 7 5/12 Jahren zeigte die Patientin ein Aufholwachstum (20,7 kg (P10), 113,8 cm (0,5 cm < P3) BMI 16,0 (P50), Kopfumfang 50,9 cm, Kopfumfang 50,9 cm (P25)). Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit betrug zwischen dem vierten und siebten Lebensjahr 6,2 cm / Jahr. Die Patientin wies diskrete Merkmale, wie ein länglich schmales Gesicht, nach oben gerichtete Lidspalten, einen schmalen Mund, relativ große Ohren und eine transversale Grube am Kinn auf. Dazu wurden eine Vierfingerfurche, eine symmetrische Klinodaktylie V und eine beidseitige Syndaktylie der Zehen II / III beschrieben.

3.4 Klinische Konsequenzen von strukturellen Varianten der Region 11p15

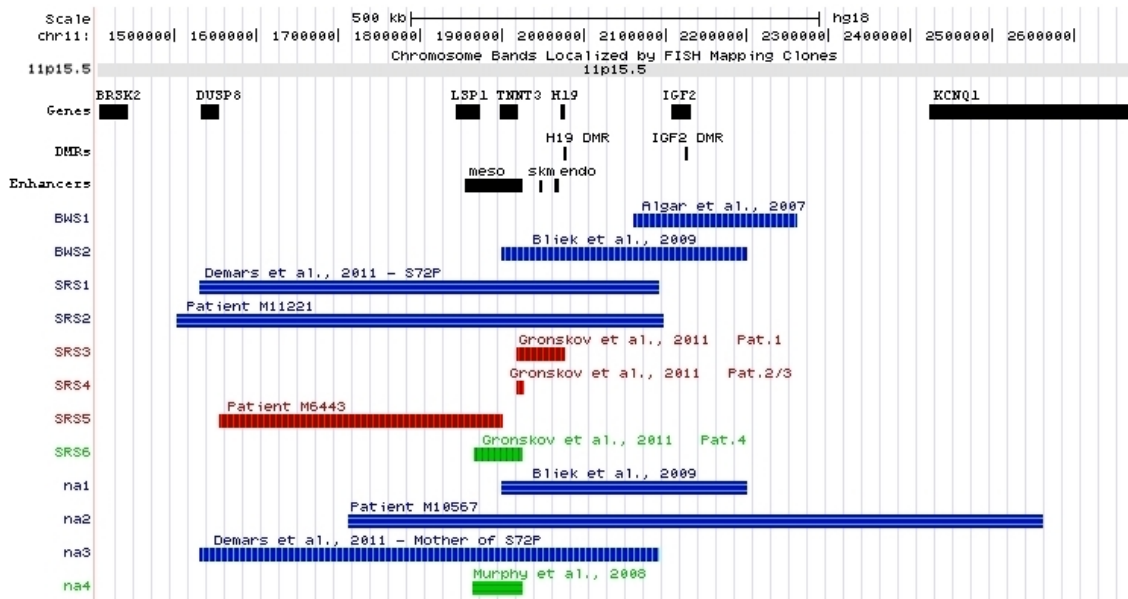


Abbildung 3.26: UCSC Genome Browser Custom Tracks für die Region 11p15. Eigene Fälle und Fälle aus der Literatur. Blau: Duplikation, rot: Deletion, grün: Translokation; horizontal gestreift: maternales Allel; vertikal gestreift: paternales Allel; BWS - Beckwith-Wiedemann-Syndrom; SRS - Silver-Russell-Syndrom; na, nicht betroffener Träger; meso, mesodermal; endo, endodermal; skm, Skelett-Muskel Enhancer. Entnommen aus Begemann et al. (2012b).

MZ10567 und ihre gesunde Mutter sind Träger einer 849 kb großen Duplikation in 11p15.5 (NCBI36/hg18:chr11:1.712.385-2.562.224), die sowohl *H19* als auch *IGF2* betrifft (Abbildung 3.26). Die Duplikation war *de novo* in der Mutter entstanden und betrifft das großmütterliche Chromosom (Tabelle 3.13). In Abbildung 3.27 ist zu erkennen, dass die Duplikation sowohl die Sonden für *H19*, als auch Sonden für *IGF2* und einen Teil von *KCNQ1OT1* umfasst.

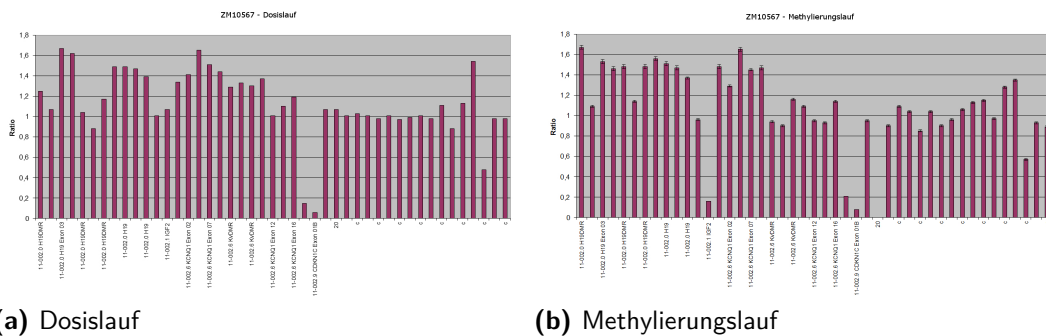


Abbildung 3.27: MS-MLPA Ergebnis für MZ10567 für die Region 11p15 - 849 kb Duplikation einschließlich *H19* und *IGF2*

Tabelle 3.13: Ergebnis der Mikrosatellitentypisierung für Chromosom 11 zur Segregation der Duplikation bei ZM10567 und ZS10566

Probe	BM11136	BI11130	SZ10566	MZ10567
Marker	Großvater	Großmutter	Mutter	Index
D11S875	1-2	3-3	1-3-3	2-3-3
D11S1785	1-3	3-4	3-4-4	2-4-4

In Tabelle 3.13 ist die Segregation des von der Duplikation betroffenen Chromosoms für zwei informative Marker dargestellt. Für D11S875 fand sich Allel 3 sowohl bei Großmutter, Mutter und Index-Patientin. D11S1785 zeigte ebenfalls ein gemeinsames Allel für Großmutter, Mutter und die Indexpatientin ZM10567. Damit folgt das betroffene Chromosom der mütterlichen Linie. Ein *UCSC-Genome-Browser Customtrack* für die 849 kb große Duplikation zur Einordnung in die Region 11p15.5 ist in Abbildung 3.26 dargestellt (na2, Patient M10567).

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von Multilocus-Methylierungsveränderungen bei SRS-Patienten

Der Nachweis von Methylierungsveränderungen an weiteren geprägten Loci bei Patienten mit 6q24-assoziiertem TNDM und in nachfolgenden Studien an Patienten mit anderen IE hat die Untersuchung von mehr als einem Locus bei Patienten mit IE in den Fokus gerückt (Mackay et al., 2006a; Bliiek et al., 2009c; Azzi et al., 2010). Mit der Etablierung des MS-SNuPE-Verfahrens (Spengler, 2011; Begemann et al., 2012a) steht eine sehr sensitive Multiplex-PCR basierte Methode zur Verfügung, die Loci von fünf wichtigen IE auf Veränderungen hin untersucht. Mittels MS-SNuPE-Methode ist es möglich in einem parallelen Ansatz auch geringgradige Veränderungen nachzuweisen. Wie andere methylierungsspezifische Verfahren kann aber auch der MS-SNuPE-Test nicht zwischen isolierten Methylierungsveränderungen und Deletionen, Duplikationen oder UPDs unterscheiden. Es ist daher i. d. R. notwendig andere Methoden zur Abgrenzung und Validierung heranzuziehen. In der vorliegenden Arbeit wurden 93 idiopathische SRS-Patienten und fünf mit einem nachgewiesenen MLMD mittels MS-SNuPE-Verfahren auf weitergehende Methylierungsveränderungen hin untersucht.

4.1.1 MS-SNuPE-Screening idiopathischer SRS-Patienten

Mittels der MS-SNuPE-Methode sollte ein Kollektiv aus idiopathischen SRS-Patienten, d. h. Patienten mit der Verdachtsdiagnose SRS, auf Methylierungsveränderungen in geprägten Genen analysiert werden. Ziel war es durch die parallele Analyse von acht Loci, die an fünf IE beteiligt sind, auch in den Loci für Differentialdiagnosen des SRS geringgradige Methylierungsveränderungen und Mosaik zu erfassen, die mit den Standardmethoden nicht detektiert werden konnten. Ein weiteres Ziel des Screenings war es, das Vorkommen von isolierten Hypomethylierungen des *IGF2P0*-Locus, die von Bartholdi et al. (2009) und Grønsvov et al. (2011) erstmals beschrieben wurden, nachzuweisen,

da dieser Locus durch das kommerziell zu erwerbende MS-MLPA Kit (ME030, MRC-Holland) nicht abgedeckt wird. Unter Anwendung anderer methylierungssensitiver Verfahren waren Veränderungen in den klassischen SRS-Loci bei den untersuchten Patienten im Vorfeld ausgeschlossen worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 93 Patienten mit der Verdachtsdiagnose SRS mittels MS-SNuPE-Verfahren auf veränderte Methylierungsmuster in den DMRs für die Loci *H19/IGF2*, *IGF2P0*, *KCNQ1OT1* (Chromosom 11), *MEST* und *GRB10* (Chromosom 7), *PLAGL1* und *IGF2R* (Chromosom 6) und *MEG3* (Chromosom 14) untersucht. Dabei konnten in einer ersten Analyse der Daten bei sechs von 93 Patienten (6,4%), bei einer Grenze von ± 2 SD, Veränderungen nachgewiesen werden.

4.1.1.1 *IGF2R*

Bei drei Patienten (3,2%) war eine Hypermethylierung von *IGF2R* zu beobachten die auch nach Anlegen engerer Grenzen (± 3 SD) Bestand hatte (Tabelle 3.1b). Die Sequenzierung der Bindestellen der MS-SNuPE-Primer zeigte keine Varianten, so dass die beobachtete Hypermethylierung nicht von einer verschobenen PCR-Amplifikation durch *allelic drop out* hervorgerufen wurde. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch in der Literatur beschrieben. Poole et al. (2010) fanden in einer Kohorte aus 90 Patienten mit negativem Ergebnis nach molekularzytogenetischer Analyse und ausgeschlossenen Methylierungsdefekten bei vier Patienten Veränderungen in *IGF2R*. Drei dieser Patienten trugen einen vollständigen GOM (*gain of methylation*), ein Proband einen LOM (*loss of methylation*). Eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Locus war die am häufigsten beobachtete Veränderung und trat in vergleichbarer Anzahl, wie in den untersuchten Patienten der vorliegenden Studie, auf.

Das *IGF2R*-Gen enthält im Intron 2 einen Promotor für eine antisense-RNA, die ein Homolog zur Maus *long non-coding RNA Airn* darstellt (Yotova et al., 2008). Stromabwärts von *Igf2r* wird ein weiteres Kontrollelement vermutet, das die Transkription der lncRNA *Airn* reguliert und für die Aufrechterhaltung des paternal unmethylierten Zustands notwendig ist (Koerner et al., 2012). In Mäusen ist *Igf2r* an Wachstum und Entwicklung beteiligt. Mutanten zeigen einen Großwuchsphänotyp, der auf eine Rolle als Wachstumsinhibitor hindeutet (Wang et al., 1994). Die Beteiligung von *IGF2R*-Methylierungsveränderungen an Wachstum und Entwicklung wird derzeit diskutiert. In einer Studie an 70 Patienten mit der Verdachtsdiagnose SRS konnten Turner et al. (2010) bei sieben Patienten Hypermethylierungen in *IGF2R* nachweisen, die im Vergleich mit

einer Kontrollgruppe signifikant häufiger auftraten. Unklar bleibt, inwieweit die Veränderungen am *IGF2R*-Locus beim Menschen ursächlich für einen Kleinwuchs sind. Dagegen spricht, dass die Hypermethylierung auch bei gesunden Kontrollen mit einem Anteil von ca. 3% zu beobachten ist (Poole et al., 2010; Turner et al., 2010). Auffällig ist dennoch, dass ein aberrantes Imprinting am *IGF2R*-Locus besonders häufig bei Patienten aufzutreten scheint, die weitere Veränderungen in geprägten Loci aufweisen. So tragen in der Studie von Turner et al. (2010) zwei der sieben Patienten ebenfalls eine Hypomethylierung in *H19*. Dieser Befund wurde ebenfalls bei SRS-Patienten erhoben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (Abschnitt 4.1.2.3). Das Methylierungsmuster am *IGF2R*-Locus beim Menschen könnte im Sinne eine Methylierungspolymorphismus interpretiert werden. Der Locus scheint aber anfällig gegenüber Störungen zu sein, so dass hier häufig eine Veränderung auftritt, wenn weitere Loci ebenfalls betroffen sind.

4.1.1.2 *IGF2P0*

Bei zwei der untersuchten Patienten konnte eine Reduktion des normalisierten Methylierungsindex für *IGF2P0* im Sinne einer Hypomethylierung beobachtet werden (Tabelle 3.1a). Der *IGF2P0*-Promoter steuert die Expression von *IGF2* und ist i. d. R. analog zur ICR1 methyliert. Die Validierung des MS-SNuPE-Ergebnis durch eine Sequenzierung der Primer-Bindestellen des MS-SNuPE-Assays zeigte bei beiden Patienten das Vorliegen der Variante g:92165350A>G. Dieser Basenaustausch betrifft die vorletzten Base am 3'-Ende des Primers und verhindert vermutlich eine Amplifikation des methylierten Allels. In dem Kollektiv aus 93 Patienten war damit bei keiner Probe eine isolierte Hypomethylierung in *IGF2P0* nachzuweisen, wie sie in der Literatur berichtet werden (Bartholdi et al., 2009; Grønskov et al., 2011).

4.1.1.3 *MEG3*

Ein weiterer Befund wurde im MS-SNuPE-Screening bei einem Patienten für den *MEG3*-Locus auf Chromosom 14 erhoben. Der Patient SRS-20 wies eine leichte Hypomethylierung in der *MEG3*-DMR auf. Ein Nachweis der Veränderung durch eine MS-PCR war nicht möglich, so dass ein weiteres Verfahren angewendet wurde. In der SeQMA-Analyse konnte bei vier von zehn untersuchten CpG-Dinukleotiden dieses Bereichs ebenfalls eine reduzierte Methylierung unterhalb von -2 SD nachgewiesen werden. Diese leichte Reduktion lässt sich am ehesten im Sinne eines schwachen Mosaiks für eine upd(14)mat, eine

paternale Deletion oder ein Mosaik für eine Trisomie 14 unter Beteiligung des maternalen Chromosoms interpretieren. In einer modifizierten Version des MS-SNuPE-Assays, der für die Routinediagnostik verwendet wird, zeigte sich ebenfalls eine leichte Hypomethylierung der IG-DMR, ein weiterer geprägter Locus auf Chromosom 14. Damit ergab sich ein zusätzlicher Hinweis, der ebenfalls für einen pathologischen Befund dieses Locus spricht. In Kooperation mit dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Essen, konnte in einem Next-Generation-Bisulfit-Sequencing Assay die leichte Hypomethylierung bestätigt werden.

4.1.1.4 Bedeutung des MS-SNuPE-Screenings an idiopathischen SRS-Patienten

Der Nachweis von weiteren MLMD-Patienten ist durch das durchgeführte Screening an idiopathischen SRS-Patienten nicht gelungen. Es konnte aber gezeigt werden, dass - wie von anderen Arbeitsgruppen auch berichtet - die Methylierung des *IGF2R*-Locus einer Variabilität unterliegt, dessen funktionelle Relevanz für die IE des Menschen noch unklar ist. Anders als in der Literatur beschrieben waren die isolierten Veränderungen des *IGF2P0*-Promoters, die im hier untersuchten Kollektiv zu beobachten waren, auf eine Sequenzveränderung im Bereich der Primerbindestelle des Assays zurückzuführen und nicht auf Deletionen im Enhancer-Element. Inwieweit die gefundene Variante selbst für einen Phänotyp verantwortlich sein könnte, bleibt offen. Eingetragene Polymorphismen für diese Position sind in einschlägigen Datenbanken nicht zu finden (dbSNP137). Mit der Detektion einer schwachen Veränderung am *MEG3*-Locus konnte bei einem Patienten die Diagnose eines Temple-Syndrom-Mosaiks gestellt werden.

Die Anwendung des MS-SNuPE-Verfahrens für die Routinediagnostik und für das Screening weiterer Kollektive stellt dennoch eine gute Möglichkeit dar, einen Einblick in Verteilung und Häufigkeit von Methylierungsveränderungen bei Patienten mit IE und Wachstumsstörungen zu gewinnen, insbesondere im Hinblick auf das Vorhandensein eines MLMD und anderer globaler Methylierungsveränderungen. So konnte z.B. durch diese Methode eine genomweite paternale UPD bei einer Patientin detektiert werden (Gogiel et al., 2012). Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang aber auch die Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs. Die hier analysierten Patienten stellten eine relativ inhomogene Gruppe dar. Sie setzte sich zusammen aus Patienten mit der Verdachtsdiagnose SRS, zu denen i. d. R. keine weiteren klinischen Daten vorlagen, so dass sich die Plausibilität des Verdachts nicht überprüfen ließ. Aufgrund der ausgeprägten

phänotypischen Heterogenität beim SRS und der Seltenheit der Erkrankung kann die klinische Diagnosestellung zuweilen schwierig sein. Das dennoch der Nachweis einer Erkrankung mit überlappendem klinischen Bild erfolgt ist, unterstreicht die Bedeutung der Multi-Locus-Testung bei Patienten mit Wachstumsstörungen und Patienten mit dem Verdacht auf Imprinting-Erkrankungen.

4.1.2 MLMD-Patienten

Im Rahmen der SRS-Studien wurden fünf Patienten erfasst, die neben einem SRS zusätzlich ein MLMD aufwiesen und die für die Beteiligung an Forschungsvorhaben gewonnen werden konnten (EB6247, DL6467, RW6091, JS9687, FL12530). Alle diese Patienten wurden als MLMD-Patienten erfasst, da sie in der MS-MLPA-Analyse neben einer ICR1-Hypomethylierung zusätzlich eine Hypomethylierung der ICR2 trugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methylierungsdefekte dieser Patienten mittels MS-SNuPE-Verfahren näher charakterisiert und weitere Loci auf Veränderungen überprüft. Des Weiteren wurden bei einigen dieser Patienten Kandidatengene für das SRS bzw. für MLMD sequenziert.

4.1.2.1 Geprägte Loci auf 11p15.5 bei MLMD-Patienten

Bei der Patientin EB6467 und ihrer gesunden eineiigen Zwillingschwester zeigten die MS-MLPA-Ergebnisse für die ICR1 eine schwach ausgeprägte Hypomethylierung, die in der MS-SNuPE-Analyse ebenfalls nur schwach ausgeprägt bis nicht nachweisbar war. Hier konnte teilweise nur in einer PV-Reaktion des *IGF2P0*-Locus ein LOM nachgewiesen werden. Der Methylierungsverlust an der ICR2 war bei beiden Probanden sowohl in der MS-MLPA, als auch in der MS-SNuPE-Analyse wesentlich stärker ausgeprägt. Dass die in der MS-MLPA sichtbare Hypomethylierung der ICR1 im MS-SNuPE-Assay nur bedingt nachweisbar war, könnte auf die Methode zurückzuführen sein. Bedingt durch den Multiplex-Vorgang werden beim MS-SNuPE jeweils nur zwei CpGs pro Locus abgefragt, während die MS-MLPA in Bezug auf die ICR1 mehrere und auch andere CTCF-Bindestellen analysiert.

Der Nachweis von Epimutationen in DNA aus peripheren Lymphozyten in einer gesunden Person erscheint widersprüchlich. Weitergehende Untersuchungen an Wangenschleimhaut zeigten aber keine Epimutationen im nicht-betroffenen Zwilling (Begemann et al.,

2011). Die Epimutation in peripheren Lymphozyten bei beiden diskordanten Zwillingen kann durch einen gemeinsamen Blutkreislauf während der fetalen Entwicklung und gemeinsamen hämatopoetischen Stammzellen erklärt werden (Hall, 2003) und bietet außerdem eine weitere Erklärung für die nur schwach ausgeprägten Methylierungsveränderungen der ICR1 im betroffenen Zwilling. Bei einem gemeinsamen fetalen Blutkreislauf ist anzunehmen, dass auch die nicht betroffenen Zellen des gesunden Zwillings ebenfalls in der betroffenen Schwester nachzuweisen sind. Eine schon schwach ausgeprägte Veränderung könnte so maskiert werden. Gestützt wird diese Annahme auch durch den Befund, dass die Epimutation bei der Patientin EB6467 in DNA aus Wangenschleimhaut stärker ausgeprägt war. In DNA aus Fibroblasten zeigte MB7231 ebenfalls ein normales MS-MLPA-Hybridisierungsmuster (Begemann et al., 2011). Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Zwillingsgeschwistern beobachtet, die diskordant für ein BWS waren (Blik et al., 2009a).

Um die Stabilität der Methylierungsmuster in Fibroblasten einzuschätzen, wurde für DL6467 und AL7588 eine MS-SNuPE-Analyse an DNA aus Fibroblasten durchgeführt. Die Loci *H19* und *IGF2P0* erwiesen sich hier als nicht stabil. *H19* wies eine Hypermethylierung auf, während *IGF2P0* hypomethyliert war. Die Ursache dieser im Vergleich zu Blutlymphozyten abweichenden Befunde, bleibt unklar.

Patientin RW6091 zeigte ein ähnliches Methylierungsmuster für die ICR1 und ICR2 wie die beiden Zwillingsschwestern. An weiteren Patienten waren komplexere Methylierungsmuster zu beobachten.

4.1.2.2 *GRB10* und *MEST*

Bei den Patienten JS9687 und FL12530 konnte eine Hypomethylierung in *GRB10* nachgewiesen werden, die bei JS9687 sogar vollständig war. Bei DL6467 war ein fast kompletter LOM für *MEST* auffällig. Der LOM von *GRB10* bei JS9687 konnte mittels MS-PCR bestätigt und eine upd(7)pat ausgeschlossen werden. Die Beteiligung der Loci *MEST* und *GRB10* auf Chromosom 7 an der Ätiologie des SRS wird durch den Befund einer upd(7)mat in 7-10 % der SRS-Patienten schon länger diskutiert. Da beide Loci maternal geprägt sind, kann eine Hypomethylierung funktionell mit einer upd(7)pat verglichen werden. In der Literatur sind bisher nur wenige Fälle mit einer upd(7)pat beschrieben, diese weisen aber meist ein normales Wachstum auf (Le Caignec et al., 2007). Da insbesondere *GRB10* eher einen Wachstumsinhibitor darstellt, der maternal exprimiert wird, erscheint ein ursächlicher Einfluss bei MLMD-Patienten auf den Phänotyp unwahrscheinlich. Der

Bericht über den Träger einer paternalen Duplikation von 7p12.2-Material einschließlich *GRB10*, der einen Großwuchsphänotyp aufweist, liefert ebenfalls keinen Hinweis auf *GRB10* (Eggermann et al., 2012).

Eine Hypomethylierung von *MEST* wurde bei DL6467 und JS9687 nachgewiesen. Wie auch für *GRB10* konnte die Hypomethylierung in *MEST* bei JS9687 mittels MS-PCR bestätigt werden. Bei DL6467 war der LOM in *MEST*, ebenso wie der LOM der anderen veränderten Loci bei diesem Patienten, relativ stark ausgeprägt. Von funktioneller Seite entspricht ein LOM in *MEST* einer upd(7)pat, was in einer gesteigerten Expression von *MEST* resultieren sollte. Da die genaue Funktion von *MEST* nicht bekannt ist, kann die Relevanz der Veränderung derzeit nicht beurteilt werden.

Vor dem Hintergrund, dass bei SRS-Patienten eher eine Maternalisierung von Chromosom 7 auftritt und Patienten mit upd(7)pat keine Beeinflussung des Wachstums zeigen, ist ein Beitrag eines LOM von *MEST* und *GRB10* unwahrscheinlich aber nicht auszuschließen.

4.1.2.3 *IGF2R* und *MEG3*

Neben Hypomethylierungen, die die Loci in 11p15.5 betreffen, ist vor allem die Hypomethylierung in *IGF2R* bei drei Patienten (JS9687, DL6464, FL12530) auffällig, deren Relevanz weitestgehend unklar ist, da beim Menschen keine IEs mit ursächlichen Veränderungen dieses Locus beschrieben sind (Abschnitt 4.1.1.1). Mit *MEG3* auf Chromosom 14 ist bei JS9687 ein weiterer beim MLMD häufig veränderter Locus betroffen, was mittels MS-PCR bestätigt werden konnte. Dieser Befund wurde bei zwei von drei Patienten mit MLMD erhoben (Azzi et al., 2010).

4.1.2.4 Bewertung der Befunde zu MLMD-Patienten

Zu beachten ist, dass bei allen hier untersuchten Patienten der Focus der Analyse auf DNA aus peripheren Lymphozyten lag und damit mögliche gewebespezifische Mosaik der Epimutationen nicht erfasst werden konnten. Ausgehend von der Annahme, dass der am stärksten betroffene Locus den Phänotyp dominiert, ist eine Mosaikkonstellation verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen Epimutationsmustern anzunehmen. Eine gesteigerte Detektionsrate ließe sich u. U. durch die Testung unterschiedlicher Gewebe erzielen.

Allen untersuchten Patienten gemeinsam war die Hypomethylierung der 11p15-Loci. Aufgrund des SRS-Phänotyps kann bei den untersuchten Patienten eine funktionelle Dominanz der ICR1 angenommen werden. Inwieweit die Methylierungsveränderungen an weiteren Loci den Phänotyp beeinflussen, bleibt unklar. Allerdings sind bei der Mehrheit der hier beschriebenen Patienten keine SRS-untypischen Merkmale bekannt. Da Patienten mit MLMD im Vergleich zu Patienten mit Einzel-Locus-Veränderungen keine auffälligen Unterschiede im Phänotyp aufweisen, kann der Methylierungsverlust multipler Loci u. U. eher selbst als Symptom einer übergeordneten Störung interpretiert werden. Eine entsprechende Genotyp-Phänotyp-Zuordnung ist aber aufgrund der geringen Fallzahlen und der vorliegenden phänotypischen Variabilität des SRS und von IEs allgemein schwierig.

Bei Patientin FL12530 liegt eine für SRS-Patienten ungewöhnliche Adipositas vor, die vermutlich auf ein Craniopharyngeom, einen gutartigen Tumor aus embryonalem Gewebe in der Nähe der Hypophyse, zurückzuführen ist. Bei Patienten mit Craniopharyngeom ist Adipositas ein häufigeres Symptom, bedingt durch hormonelle Fehlregulationen, die sich aus dem Druck eines solchen Tumors auf die Hypophyse ergeben können (Garnett et al., 2007).

Auffällig ist, dass bei allen fünf hier beschriebenen MLMD-Probanden immer nur ein LOM der untersuchten Loci nachgewiesen wurde, wobei sowohl paternal als auch maternal geprägte Gene betroffen sind, während ein GOM nicht zu beobachten war. Turner et al. (2010) beschreiben zwar Patienten mit MLMD und einem GOM, der aber exklusiv am *IGF2R*-Locus auftritt und die einzige zusätzliche Methylierungsveränderung darstellt. Von funktioneller Seite kann über einen Defekt in einem Faktor spekuliert werden, der Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung oder das adäquate Setzen von Imprinting-Signalen hat. Ausgehend von einem Erhaltungsfehler der DNA-Methylierung und einer semi-konservativen DNA-Replikation mit zufälliger Verteilung der Chromosomen in der Mitose sollte ein gewebespezifisches Methylierungsmuster vergleichbar dem bei MLMD-Patienten entstehen (Azzi et al., 2010).

4.1.3 Sequenzierung der MLMD-Kandidatengene DNMT3L, MBD3 und NLRP2

Für *Dnmt1o*-defiziente Mäuse konnte bereits demonstriert werden, dass Defekte in einzelnen Genen Methylierungsmuster verursachen können, die einem MLMD gleichen (Cirio et al., 2008). Mit dem Nachweis von *ZFP57*-Mutationen bei TNDM-Patienten mit

MLMD wurde die Beteiligung von *trans*-wirkenden Faktoren an der Genese von komplexen Methylierungsstörungen auch beim Menschen bestätigt (Mackay et al., 2008). Weitere potentielle Kandidaten die bei der Entstehung von MLMD eine Rolle spielen könnten, sind die Gene *DNMT3L*, *MBD3* und *NLRP2*. Diese wurden in dieser Arbeit durch eine direkte Sequenzierung untersucht.

Dnmt3l spielt eine wichtige Rolle beim Setzen von maternalen Imprintingsignalen. Das Protein selber weist keine katalytische Aktivität mehr auf, ist aber für die Rekrutierung und Stimulierung der Methyltransferase Dnmt3a notwendig (Chedin et al., 2002; Hata et al., 2002).

Bei *MBD3* handelt es sich um einen Bestandteil des Mi-2/NuRD Nukleosomen-Komplex mit Histone-Deacetylase-Aktivität (Zhang et al., 1998). Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass es ebenfalls benötigt wird um die Repression und den Methylierungsstatus von *H19* auf dem paternalen Allel aufrecht zu erhalten (Reese et al., 2007). Diese Funktion macht *MBD3* zu einem guten Kandidatengen für das SRS, Mutationsanalysen konnten aber bisher keine pathogenen Varianten bei SRS-Patienten aufzeigen (Bachmann et al., 2010).

NLRP2 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 2*) ist ein Protein der *NALP*-Familie, deren Mitglieder eine Funktion bei Entzündungsprozessen erfüllen (Tschopp et al., 2003). Mutationen in dem verwandten Gen *NLRP7* stehen in Verbindung mit der familiären Form der Blasenmole (Wang et al., 2009), die auch auf eine vollständige Androgenisierung des Chromosomensatzes zurück gehen kann. Meyer et al. (2009) beschreiben eine familiäre Form des BWS, bei der Mutationen in *NLRP2* gefunden werden konnten.

Um mögliche Defekte der Gene und eine mögliche Beteiligung an der Entstehung von MLMD nachzuweisen wurden die kodierenden Exons mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Analyse der Gene *DNMT3L* und *MBD3* zeigte dabei keine pathogenen Varianten. Alle gefundenen Varianten wiesen laut Datenbank (dbSNP137) eine relativ hohe durchschnittliche Heterozygotenfrequenz von $> 1\%$ auf. Aufgrund dessen erscheint ein ursächlicher Beitrag dieser Veränderungen zur Entstehung von MLMD sehr unwahrscheinlich.

Das Gen *NLRP2* wurde im Rahmen des „Netzwerks Imprinting Erkrankungen“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung in Kooperation mit der Humangenetik Kiel sequenziert. Die dabei identifizierte heterozygote Variante NM_017852.3:c.2237delA führt vermutlich zu einem frühzeitigen Translationsstopp oder *nonsense mediated de-*

cay der entsprechenden mRNA. In einer durchgeführten Resequenzierung konnte die Mutation in Patient DL6467 und seiner Mutter AL7588 bestätigt werden, während die gesunden Geschwister des Patienten nicht Träger der Variante waren. Im Gegensatz zu der von Meyer et al. (2009) beschriebenen Veränderung in *NLRP2* liegt die hier identifizierte Mutation nur heterozygot vor. Da *NLRP2* ebenfalls einem Imprinting unterliegt und vom maternalen Allel exprimiert wird, kann eine Relevanz der Variante für das vorliegende SRS mit MLMD bei DL6467 nicht ausgeschlossen werden (Bjornsson et al., 2008). Interessanterweise liegt bei einem der von Meyer et al. (2009) beschriebenen BWS-Patienten ebenfalls eine Methylierungsveränderung in *MEST* vor, wie sie auch bei DL6467 beobachtet wurde. Bedingt durch fehlendes großelterliches Material der Familie war die Segregation der Mutation bisher nicht nachverfolgbar. Eine Transmission vom Großvater des Patienten zu AL7588 würde aufgrund der Prägung den Verdacht erhärten, dass die Frameshiftmutation in *NLRP2* zur Genese des MLMD bei DL6467 beigetragen haben könnte.

4.1.4 Zusammenfassung zu MLMD

Durch die Charakterisierung der SRS-Patienten mit MLMD mittels MS-SNuPE-Verfahren konnte gezeigt werden, dass trotz eines ähnlichen Phänotyps die nachweisbaren epigenetischen Veränderungen in dieser Subgruppe stark variieren können. Dennoch konnten aus den Beobachtungen Erkenntnisse abgeleitet werden, die sich auch mit Forschungsergebnissen anderer Gruppen decken. So scheint bei allen bisher beschriebenen MLMD-Fällen eine Beteiligung der ICR1 oder ICR2 vorzuliegen und das Phänomen hauptsächlich bei BWS- und SRS-Patienten aufzutreten. Trotz der Beteiligung unterschiedlicher Loci ist allen Patienten gemeinsam, dass vor allem ein LOM aufzutreten scheint.

Weiterhin auffällig war das Auftreten von Methylierungsveränderungen am *IGF2R*-Locus. Hier konnte unter den MLMD-Fällen bei drei von fünf Patienten ein LOM detektiert werden, während im MS-SNuPE-Screening idiopathischer SRS-Patienten bei zwei Probanden ein GOM von *IGF2R* nachweisbar war. Ein LOM der *IGF2R*-DMR scheint insbesondere dann aufzutreten, wenn eine generelle Hypomethylierung geprägter Loci vorliegt. Diese Befunde stehen im Einklang mit Berichten aus der Literatur, die ebenfalls häufig Veränderungen dieses Locus beschreiben, was zusammengenommen für eine Anfälligkeit der *IGF2R*-DMR für Methylierungsstörungen spricht, auch wenn eine klinische Bedeutung im Unklaren bleibt.

Die Sequenzierung ausgesuchter Kandidatengene erbrachte keinen Hinweis auf die Be-

teilung von *DNMT3L* und *MBD3* bei der Entstehung der MLMD bei SRS-Patienten. Bei einem Patienten und seiner Mutter konnte eine Mutation in *NLRP2* nachgewiesen werden, deren Bedeutung weiterhin unklar ist. Dabei sollte aber erwähnt werden, dass es sich um wenige untersuchte Einzelfälle handelt und die Aussagekraft der durchgeführten Mutationsanalysen dadurch reduziert wird. Da das Phänomen MLMD allerdings die Subpopulation einer seltenen Erkrankungsform betrifft, ist die Verfügbarkeit großer Kohorten aber nicht gegeben. Funktionelle Untersuchungen an *NLRP2* und der entsprechenden Variante könnten helfen hier einen tieferen Einblick zu erhalten. Solche funktionellen Untersuchungen müssten auch die mögliche Wirkung von *NLRP2* als maternaler Faktor, wie von Meyer et al. (2009) beschrieben, mit einschließen.

4.2 Molekulare Charakterisierung von upd(7)mat-Patienten

4.2.1 (Epi)genetische Untersuchungen an upd(7)mat-Patienten

4.2.1.1 MS-PCR für Chromosom 7

Im Rahmen der Routinediagnostik konnte bei einem Teil der Patienten mit klinisch diagnostiziertem SRS eine upd(7)mat als Ursache identifiziert werden. In der MS-PCR für Chromosom 7 konnten bei LW4925, MD8282 und JW11296 nur maternal methylierte Allele für *MEST* (7q) nachgewiesen werden, in der MS-PCR für *GRB10* (7p) zeigten sich ausschließlich maternale Allele nur bei MD8282 und JW11296. Die Ergebnisse der MS-PCR für Chromosom 7 wurden im Sinne einer upd(7)mat für die Patienten MD8282 und JW11296 interpretiert. Für LW4925 ließen die Ergebnisse den Schluss auf eine segmentale upd(7q)mat zu.

4.2.1.2 Mikrosatelliten-Analysen für Chromosom 7

Diese Befunde der MS-PCR Analysen konnten bei allen drei Patienten mittels Mikrosatellitentypisierung bestätigt werden. Die Diagnose einer upd(7)mat bei einem weiteren Patienten, NB6135, erfolgte routinediagnostisch mittels Mikrosatelliten, da zu diesem Zeitpunkt noch keine MS-PCR zur Verfügung stand.

4.2.1.3 MS-SNuPE-Untersuchungen bei upd(7)mat-Patienten

Um die mittels MS-PCR und Mikrosatelliten-Analyse gestellten Diagnosen mit einem weiteren Verfahren zu bestätigen und einen Einfluss der upd(7)mat auf die Methylierung weiterer Loci im Sinne eines MLMD zu untersuchen, wurde bei den Patienten eine MS-SNuPE-Analyse durchgeführt. Bei MD8282 und NB6135 konnte die upd(7)mat bestätigt werden. JW11296 wies neben dem GOM für die Gene *MEST* und *GRB10* einen GOM am *IGF2R*-Locus auf, der nicht weiter untersucht wurde. Über die Relevanz eines GOM am *IGF2R*-Locus wurde an anderer Stelle bereits diskutiert (Abschnitt 4.1.1.1).

Bei Patient LW4925 konnte die Diagnose der upd(7q)mat ebenfalls mittels MS-SNuPE bestätigt werden. Neben dem GOM am *MEST*-Locus konnte ein LOM für *MEG3* (Chromosom 14) beobachtet werden. Die Diagnose bei LW4925 stellt eine Sonderform dar. LW4925 ist der erste berichtete Patient mit einer upd(7q)mat und einer *MEG*-Hypomethylierung, wie sie bei Patienten mit Temple-Syndrom auftritt (Begemann et al., 2012c). Eine MS-PCR für *MEG3* konnte diesen Befund bestätigen. Mittels Mikrosatelliten-Analyse konnte eine upd(14)mat für diesen Bereich ausgeschlossen werden, so dass bei LW4925 eine upd(7q)mat und eine isolierte Methylierungsstörung *MEG3*-Region vorliegt. Auch klinisch waren bei dem Patienten neben den Symptomen der upd(7q)mat, Zeichen des Temple-Syndroms erkennbar

Damit stellt LW4925 eine Übergangsform zwischen upd(7)mat und MLMD-Patient dar.

4.2.1.4 Molekulare Karyotypisierung bei LW4925

Da die Veränderung des Methylierungsindex in *MEG3* auch durch eine Deletion des maternalen Allels verursacht sein könnte (Kagami et al., 2010), wurde eine molekulare Karyotypisierung durchgeführt. Die Analyse der Daten zeigte keinen Verlust von genetischem Material für die Region 14q32.2 oder an anderen Stellen des Genoms. Es konnten somit auch keine möglichen in *trans*-wirkenden Faktoren identifiziert werden, deren Deletion oder Duplikation für die reduzierte Methylierung des *MEG3*-Locus hätten verantwortlich sein können. Der verwendete Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) erlaubt durch die Analyse der SNP-Marker auch die Detektion einer uniparentalen Isodisomie. Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, dass die upd(7q)mat isodisom vorliegt, was auch schon in der Mikrosatelliten-Analyse erkennbar war. Bei einer Isodisomie liegt eine identische Kopie eines Chromosoms oder chromosomalen Abschnitts vor. Ein solcher kopienzahlneutraler *LOH* kann z. B. eine rezessive Mutation demaskie-

ren, was auch zur Entdeckung der UPD als Genommutation geführt hat (Spence et al., 1988; Voss et al., 1989). Durch die Identifizierung des gesamten q-Arms als isodisomes Segment, kommt neben einem geprägten, *trans*-wirkenden Faktor auch eine Homozygotie für eine Mutation in einem Gen auf Chromosom 7q in Frage, das die Methylierung der *MEG3*-Region auf 14q32.2 beeinflusst.

4.3 Expressionsanalysen bei upd(7)mat und MLMD-Patienten

4.3.1 Expressionsanalysen an upd(7)mat-Fibroblasten

Um einen Einblick in die Auswirkungen zu erhalten, die eine upd(7)mat auf ein mögliches Netzwerk geprägter Gene hat, wurden an Fibroblasten von drei upd(7)mat-Patienten (MD8282, NB6135, JW11296) und einem upd(7q)mat-Patienten (LW4925) Expressionsstudien durchgeführt. Bestimmt wurde die Expression der Gene *MEST*, *COPG2* (Chr. 7q), *GRB10* (Chr. 7p), *CDKN1C*, *IGF2*, *H19* (Chr. 11p15.5), *PLAGL1* (Chr. 6) und *MEG3* (Chr. 14).

4.3.1.1 Expressionsstudien zu Chromosom 7-kodierten Genen

Gene in 7q

In 7q32.2 liegen direkt aneinander angrenzend die Gene *MEST* und *COPG2*. Im Vergleich mit den NK zeigt sich, dass die Expression von *MEST* in upd(7)mat-Zelllinien nahezu unterbleibt. *MEST* ist maternal methyliert und die Expression erfolgt vom paternalen nicht methylierten Allel. Da bedingt durch die upd(7)mat zwei mütterliche Allele vorliegen, entspricht ein Ausbleiben der Expression von *MEST* den Erwartungen.

COPG2 liegt direkt benachbart zu *MEST* und scheint mit diesem einer Koregulation zu unterliegen. Die Expression von *COPG2* bei LW4925, MD8282 und JW11296 war im Vergleich zu Normalkontrollen (NK) signifikant um das Vierfache erhöht. Bei JW11296 lag eine hohe Standardabweichung vor, die mit dem Kontrollbereich überlappt. Die Messwerte von JW11296 unterlagen bei mehreren Genen erhöhten Schwankungen, was u. U. auf ein Problem mit der RNA oder cDNA in einem Replikat hindeutet. Der Imprintingstatus von *COPG2/Copg2* wird diskutiert, so findet sich in Blutlymphozyten und embryonalem Gewebe eine biallelische Expression (Blagitko et al., 1999; Yamasaki et al., 2000). Gewebe in Mausembryonen, die *MestXL* exprimieren (eine längere Isoform von *Mest*),

scheinen *Copg2* präferentiell monoallelisch maternal zu exprimieren. *MestXL* wird einige kb in die kodierende Sequenz von *Copg2* transkribiert und scheint so die Expression des auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang lokalisierten *Copg2* zu inhibieren (Maclsaac et al., 2012). Ein Wegfallen jeglicher *MEST*-Expression und damit auch eines inhibierenden *MESTXL*-Transkripts kann auch beim Menschen erklären, warum eine upd(7)mat in einer gesteigerten Expression von *COPG2* resultiert. Der erst kürzlich erbrachte Hinweis auf diesen Regulationsmechanismus in neuronalem Gewebe von Mausembryonen konnte aber bisher nicht in humanem Gewebe untersucht werden. Ein wichtiger Schritt wäre der Nachweis des *MESTXL*-Transkripts in humanen Kontrollfibroblasten sowie der Wegfall in den untersuchten upd(7)mat-Fibroblastenkulturen.

Eine reine maternale Expression von *COPG2* unabhängig von *MEST* würde bei einer vorliegenden upd(7)mat in einer gesteigerten Expression resultieren. Vor dem Hintergrund der beiden vorliegenden maternalen Kopien würde man in etwa eine Verdopplung der Expression erwarten. Die gemessene Expression war etwa um das Vierfache gesteigert und relativ stabil zwischen den einzelnen upd(7)mat Probanden, was auf den Wegfall eines negativen Regulators der *COPG2*-Expression hindeutet. Eine Steigerung über eine Verdopplung hinaus kann ebenfalls auf eine positive Rückkopplung hinweisen, die die Expression von *COPG2* weiter erhöht. Die erhobenen Daten könnten also auf einen Mechanismus der Transkriptions-Interferenz hindeuten, wie er von Maclsaac et al. (2012) bei *Mest/Copg2* in Mäusen beschrieben wurde.

Gene in 7p

In 7p12.1 liegt das Gen *GRB10*, das bei der Suche nach Faktoren des Insulinsignalwegs identifiziert wurde. Seine Rolle als Kandidatengen des SRS geht auf Untersuchungen an Mäusen zurück, die nach Überexpression des Gens einen Kleinwuchs zeigten (Shiura et al., 2009). Entsprechende chromosomale Umbauten beim Menschen wurden ebenfalls beschrieben (zur Übersicht Eggermann et al., 2012). *GRB10* ist maternal geprägt (Blagitko et al., 2000) und unterliegt einem stark gewebespezifischen Expressionsmuster. Seine Rolle als Kandidatengen für das SRS wird aber in Frage gestellt, da auch Patienten mit upd(7q)mat einen SRS-Phänotyp aufweisen (Eggermann et al., 2012).

Die Expression von *GRB10* in Fibroblasten der drei upd(7)mat-Patienten sowie des upd(7q)mat-Patienten war in etwa verdoppelt. Für zwei Proben (MD8282, NB6135) war die Erhöhung der Expression signifikant. JW11296 zeigte, wie auch schon in den Messungen für andere Gene, eine erhöhte Streuung, die mit der Expression in NK überlappt. Der Patient mit der upd(7q)mat (LW4925) zeigte ebenfalls eine etwa zweifache Erhöhung

der Expression, die aber nicht signifikant war, da die Streuung in dieser Probe mit dem Normalbereich der Kontrollen überlappt. Bei angenommener Expression des maternalen Allels, ist eine in etwa verdoppelte Expression von *GRB10* bei den drei upd(7)mat-Patienten mit dem genetischen Befund einer upd(7)mat vereinbar. Die Erhöhung der *GRB10*-Expression bei LW4925 als real vorausgesetzt, ist mit diesem Mechanismus aber nicht kompatibel. Eine Erklärung für die Steigerung wäre ein *trans*-wirkender Faktor in 7q, der die erhöhte Expression von *GRB10* bewirkt. Der Vorteil eines solchen Modells ist, dass er die Erklärung für die Beobachtung bei upd(7)mat mit Beteiligung des gesamten Chromosoms mit einschließt. Im Widerspruch dazu stehen die Duplikationsbefunde, die die Region 7p12 beinhalten, und die Beobachtungen bei Mäusen. Zumindest bei den Deletions-/ Duplikationsbefunden muss bedacht werden, dass die betroffenen Abschnitte auch weitere Gene beinhalten, die zum Phänotyp beitragen können.

Des Weiteren wäre denkbar, dass im Gegensatz zur direkten Steigerung der Expression von *GRB10* durch eine vollständige upd(7)mat, die erhöhte *GRB10*-Expression bei LW4925, dem Patienten mit segmentaler upd(7q)mat, mit der Hypomethylierung von *MEG3* auf Chromosom 14, im Sinne eines Netzwerks geprägter Gene in Zusammenhang steht.

4.3.1.2 Expressionsstudien zu Chromosom 11p15-kodierten Genen

Die Bedeutung der Region 11p15.5 mit den Genen *IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1OT1* und *KCNQ1* für die Ätiologie des SRS und BWS ist seit längerem bekannt und macht diese Region zum Ziel vieler Forschungsansätze. In dieser Arbeit sollte nun die Auswirkung einer upd(7)mat auf die Expression von *IGF2*, *H19* und *CDKN1C* untersucht werden.

Für *CDKN1C* ließ sich eine normale Expression bei MD8282 und NB6135 nachweisen. JW11296 zeigte eine leichte aber signifikante Reduktion am Übergang zum Normbereich der Kontrollen, die eventuell auf die o. g. Qualität des Probenmaterials zurückzuführen ist. In den Proben von LW4925 konnte eine starke Expressionssteigerung für *CDKN1C* gemessen werden. Eine mögliche Ursache für die gesteigerte *CDKN1C*-Expression in dieser Probe kann ein Effekt der zusätzlichen Hypomethylierung des *MEG3*-Locus sein, die bei LW4925 vorliegt. Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass sowohl *MEG3*, als auch *CDKN1C* Mitglieder eines Netzwerks aus geprägten Genen sind und einer Koregulation unterliegen (Arima et al., 2005; Varrault et al., 2006).

Die Messungen der Expression von *IGF2* zeigte für die upd(7)mat bzw. upd(7q)mat-Patienten Werte zwischen 0,25-1 mit starken Schwankungen. Es zeigte sich ebenfalls eine breite Streuung in den Kontrollproben. Die Messwerte für *H19* lagen bei den Patientenproben noch weiter auseinander als für *IGF2*. Im Vergleich zu NK ergaben sich Werte zwischen ca. 0,25-8-facher Expression. Die Streuung unter den Kontrollen lag ebenfalls in dieser Größenordnung. Aufgrund der hohen Variabilität der Expression von *H19* und *IGF2* konnten die in Patientenproben gemessenen Daten nicht ausgewertet werden. Da es sich bei *IGF2* und *H19* um Schlüsselfaktoren von Wachstum und Entwicklung handelt, sind starke Schwankungen u. U. auf Effekte der Zellkultivierung zurückzuführen. So wird den Zellen als Nährstoff 5 % fetales Kälberserum zugesetzt, so dass schon leichte Schwankungen z. B. in der Konzentration von Wachstumsfaktoren wie Insulin sich in einer differentiellen Genexpression von wachstumsrelevanten Genen äußern könnte. Weitere Ursachen könnten interindividuell genetische Unterschiede in Alter und Geschlecht des Spenders der Kontrollfibroblasten lokalisiert sein. Die schlechte Verfügbarkeit von alters- und geschlechtsangepassten Kontrollproben für Erkrankungen des Kleinkind- und Jugendalter erschweren die Analyse insbesondere von Genen, die eine direkte Reaktion auf extrinsische Faktoren wie Insulin zeigen.

4.3.1.3 Expressionsstudien zu Chromosom 6- und 14-kodierten Gene

Um Effekte auf weitere geprägte Gene zu untersuchen die an IE beteiligt sind, wurde die Genexpression von *PLAGL1* und *MEG3* auf Chr. 6 bzw. Chr. 14 bestimmt. Bei *PLAGL1* war die Expression in den allen Probanden erniedrigt, wobei die stärkste Ausprägung bei LW4925 zu erkennen war. Zwei upd(7)mat-Proben zeigten zwar eine verringerte Expression, diese lag aber am Übergang zum Normbereich der Kontrollen. JW11296 ließ ebenfalls eine stärkere Reduktion in der *PLAGL1*-Konzentration erkennen. Wie aber für diese Probe bereits diskutiert, lag hier in nahezu allen untersuchten Gene eine erhöhte Streuung vor bzw. es wurde eine niedrige Expression gemessen. Für *PLAGL1* kann somit eine erniedrigte Genexpression nur für LW4925 sicher angenommen werden, für die upd(7)mat-Patienten wurde ebenfalls eine Reduktion gemessen, deren Aussagekraft aber vermutlich begrenzt ist. Dennoch wäre eine Auswirkung sowohl der upd(7)mat als auch der upd(7q)mat auf die Regulation und Expression von *PLAGL1* denkbar und plausibel. Unter den Mitgliedern des Netzwerks geprägter Gene scheint *PLAGL1* (Zac1) eine Schlüsselrolle zuzukommen, was sich u. a. auch in der Interaktion von *PLAGL1* mit Chromosom 7 kodierten Genen niederschlägt, auch wenn Varianten zumindest in SRS-

Patienten in diesem Gen bisher nicht nachweisbar waren (Arima et al., 2005; Varrault et al., 2006; Gabory et al., 2009; Jäger et al., 2009).

Bei der Analyse von *MEG3* zeigte sich eine normale Expression in der Probe von LW4925, während die Patienten mit der durchgängigen upd(7)mat eine erniedrigte Expression aufwiesen. Ausgehend von der Annahme, dass die reduzierte Expression von der upd(7)mat verursacht wird, bleiben bei den vorliegenden (epi)genetischen Befunden der untersuchten Proben verschiedene Interpretationsmöglichkeiten.

1. Postuliert man einen maternalen Faktor in 7p, der inhibierend auf die Expression von *MEG3* wirkt, so lässt sich der Unterschied zwischen den upd(7)mat und upd(7q)mat-Patienten damit erklären. Ein solcher Ansatz vernachlässigt allerdings die *MEG3*-Hypomethylierung bei LW4925.
2. Ein anderer Erklärungsansatz ist ein inhibierender Faktor in 7q, der die *MEG3*-Expression beeinflusst, dessen Wirkung aber entweder von der *MEG3*-Hypomethylierung aufgehoben wird oder dessen Wirkmechanismus eine korrekte Methylierung der *MEG3*-DMR erfordert.

4.3.2 Expressionsanalysen an MLMD-Fibroblasten

Um die Auswirkungen der komplexen Methylierungsmuster bei MLMD-Patienten und ihren Angehörigen auf die Expression verschiedener geprägter Gene zu untersuchen, wurde eine quantitative Real-Time-PCR für die Gene *PLAGL1* (6q24.2), *MEST*, *COPG2* (7q32.2), *GRB10* (7p12.2), *H19*, *IGF2*, *CDKN1C* (11p15.5), und *MEG3* (14q32.2) durchgeführt. Ermittelt wurde die relative Expression (RQ) der Gene in den Probanden im Vergleich zu einer Gruppe aus Kontrollfibroblasten.

4.3.2.1 Expressionsstudien zu Chromosom 7-kodierten Genen

Gene in 7q

Die Expression von *MEST* bei EB6247, MB7231 und DL6467 war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Für AL7588 konnte keine erhöhte Expression gemessen werden. Der Methylierungsstatus für *MEST* bei EB6247 und MB7231 an Fibroblasten wurde nicht mittels MS-SNuPE bestimmt. In DNA aus Lymphozyten zeigten sich aber in der initialen diagnostischen Aufklärung keine Auffälligkeiten. Ein direkter Einfluss einer veränderten Methylierung ist hier also mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die Ursache für

die erhöhte Expression von *MEST*. Der Grund für die gesteigerte Expression in dem nicht betroffenen eineiigen Zwilling (MB7231), bleibt unklar. Geht man von einem ursächlichen Zusammenhang aus, könnte ein nicht detektiertes gewebespezifisches Mosaik in den Fibroblasten vorliegen. Eine andere Erklärung könnte ein *trans*-wirkender Faktor sein, der eine gesteigerte Expression von *MEST* bewirkt und auf einem gemeinsamen molekularen Defekt, bei den eineiigen Zwillingen beruht.

Bei DL6467 zeigte sich im MS-SNuPE an DNA aus Fibroblasten eine Hypomethylierung wie im Blut, wohingegen die Mutter (AL7588) keine Veränderungen aufwies. Korrespondierend dazu wurde die stärkste Steigerung der *MEST*-Expression bei DL6467 gemessen und keine Veränderung bei AL7588.

Ausgehend von einem Netzwerk geprägter Gene in dem *MEST* eine wichtige Funktion erfüllt, könnten bei den hier untersuchten MLMD-Patienten unterschiedliche Ursachen vorliegen, die über die Interaktionen in einem solchen Netzwerk, in einer gesteigerten Expression von *MEST* resultieren

Für *COPG2* war nur bei MB7231 und DL6467 eine leicht reduzierte Expression am Übergang zum Kontrollbereich darstellbar. EB6247 und AL7588 lagen im Normbereich. Da die Reduktion nur sehr schwach ausgeprägt war und die Zusammensetzung der Kontrollen wie bereits diskutiert nicht optimal war, erscheint es wahrscheinlich, dass die Expression von *COPG2* bei den untersuchten MLMD-Patienten im Gegensatz zu den upd(7)mat-Patienten, nicht verändert war, insbesondere da auch der nicht-betroffene Zwilling von EB6247 eine Reduktion aufwies.

Gene in 7p

Die Untersuchungen der Expression von *GRB10* bei MLMD-Patienten zeigten keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz, das gegen eine essentielle Beteiligung von *GRB10* an der Ätiologie des SRS und Imprinting Erkrankungen spricht.

4.3.2.2 Expressionsstudien zu Chromosom 11p15-kodierten Genen

Die auf Chromosom 11 kodierten Gene *CDKN1C*, *H19* und *IGF2* wurden aufgrund ihrer Beteiligung beim SRS und BWS auf ihre Expression bei MLMD-Patienten hin untersucht. Für *CDKN1C* konnte bei allen gemessenen Proben eine Reduktion der Expression festgestellt werden. Am stärksten ausgeprägt war die Reduktion bei EB6247, am geringsten

bei ihrer Schwester MB7231. Hier lag eine Verringerung auf das 0,6-Fache vor. Inwieweit die verringerte *CDKN1C*-Expression auf Methylierungsdefekte zurückzuführen ist, bleibt unklar. Bei DL6467 und EB6247 steht diese Beobachtung im Einklang mit der nachgewiesenen Hypomethylierung in *KCNQ1OT1*, die entsprechend in einer gesteigerten Expression desselben resultieren sollte. Bei *KCNQ1OT1* wurde bereits ein inhibierender Effekt auf die Expression von *CDKN1C* nachgewiesen (Niemitz et al., 2004). Eine Reduktion der *CDKN1C*-Expression bei AL7588 und EB7231 wird durch einen solchen Mechanismus allerdings nicht erklärt.

Für die Gene *H19* und *IGF2* war die Expression bei allen gemessenen Proben im Vergleich zum Kontrollkollektiv nahezu unterbunden. Für die MLMD-Patienten mit nachgewiesener *H19*-Hypomethylierung (EB6247, DL6467) wäre allerdings gemäß dem Enhancer-Blocking-Modell (Hark et al., 2000) eine Steigerung der Expression von *H19* zu erwarten gewesen, bei gleichzeitiger Reduktion der *IGF2*-Expression. Warum insbesondere eine Reduktion auch bei MB7231 und der Mutter von DL6467 (AM7588) auftrat, bleibt unklar. Da die Kontrollen, wie bereits für die Expression bei upd(7)mat-Patienten diskutiert, eine hohe Streuung aufwiesen, wurde auf eine weitere Auswertung dieser Daten verzichtet. Generell gilt bei dem hier untersuchten Probandenkollektiv zu beachten, dass es nur aus zwei Patienten und zwei Angehörigen besteht, wobei die Patienten (EB6247, DL6467) von unterschiedlichem Geschlecht sind und die beiden Angehörigen sich in ihrem Alter deutlich unterscheiden, was durchaus einen zu erwartenden Einfluss auf die Expression und Regulation von wachstums- und entwicklungsrelevanten Genen erwarten lässt. Für AL7588 lässt sich aufgrund der reduzierten Expression in nahezu allen untersuchten Genen ein starker Einfluss des Alters bei Probenentnahme vermuten, was zu einer veränderten Expression von geprägten Genen führt. Die Reduktion in nahezu allen gemessenen Genen lässt aber auch ein Problem der Probenqualität vermuten.

4.3.2.3 Expressionsstudien zu Chromosom 6- und 14-kodierten Genen

Für *PLAGL1* konnte eine verminderte Expression bei allen untersuchten Proben beobachtet werden. Da *PLAGL1* im postulierten Netzwerk geprägter Gene wie bereits diskutiert eine Schlüsselrolle zukommt (Arima et al., 2005; Varrault et al., 2006), wäre eine Beeinflussung der *PLAGL1*-Expression auch bei MLMD-Patienten erklärbar. Da *PLAGL1* aber vermutlich antiproliferativ auf das Wachstum von Zellen wirkt, erscheint eine reduzierte Expression widersprüchlich (Spengler et al., 1997). *PLAGL1* scheint vielfältige Funktionen auszuüben und im Rahmen eines Netzwerks geprägter Gene eine Schlüssel-

rolle einzunehmen, so dass eine regelgerechte Expression sicher ein essentieller Faktor für eine normale Entwicklung ist. Inwieweit sich eine Reduktion der *PLAGL1*-Expression, wie bei den MLMD-Fibroblasten beobachtet, auswirkt bleibt unklar.

Für *MEG3* konnte in den Proben von MB7231 und DL6467 keine Veränderung gemessen werden. Die Probe von AL7588 wies auch hier eine deutliche Reduktion der Expression auf. Bei EB6247 zeigte sich eine deutliche Steigerung der *MEG3*-Expression im Vergleich zu den anderen Proben und den Kontrollen, die aber nicht signifikant war. Der *MEG3/DLK1*-Lokus auf Chromosom 14 ist ähnlich aufgebaut wie das Imprinting-Cluster auf 11p15 (Wylie et al., 2000). *MEG3* kodiert für eine *long non-coding RNA*, vergleichbar mit *H19*. Für *MEG3* konnte gezeigt werden, dass es über die Aktivierung von *p53* zumindest in Tumorzellen als Wachstumsinhibitor wirkt (Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2007). Die beobachtete normale *MEG3*-Expression steht in Einklang mit dem Befund einer normalen Methylierung dieses Locus bei den MLMD-Patienten. Aufgrund seiner Beteiligung am Temple-Syndrom (*upd(14)mat*), das sich ebenfalls durch einen Kleinwuchs auszeichnet, ist ein Beitrag einer *MEG3*-Überexpression zum Wachstumsphänotyp auch bei MLMD-Patienten mit SRS denkbar. Bei einem solchen Mechanismus wäre eine gestörte Methylierung ein Resultat einer übergeordneten molekularen Veränderung, die dann über Methylierungsdefekte zu einem Phänotyp führt. Inwieweit unterschiedliche Methylierungsstörungen auf unterschiedliche molekulare Defekte zurückgehen oder die Methylierung zufällig bzw. stochastisch wird, bleibt unklar.

4.4 Bedeutung von strukturellen Varianten der Region 11p15

Für die diagnostische Aufklärung von Patienten mit Kleinwuchs wird empfohlen eine molekulare Karyotypisierung durchzuführen, da z. B. auch strukturelle Varianten in 11p15 für einen SRS-Phänotyp verantwortlich sein können. Aufgrund der klinischen Überlappung einiger Merkmale können auch Patienten mit anderen Mikrodeletions-Syndromen identifiziert werden (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2012). Des Weiteren wird eine molekulare Karyotypisierung auch durchgeführt um Duplikationen und Deletionen, die die Region 11p15 betreffen und die mittels MS-MLPA bzw. MS-SNuPE-Analyse erfasst wurden, einzugrenzen und zu bestätigen.

Duplikationen in 11p15, die beide ICRs umfassen, führen in Abhängigkeit ihrer elterlichen Herkunft zu den spezifischen Phänotypen. Die Duplikation von maternalem Material resultierten in einer Wachstumsretardierung im Zusammenhang mit SRS, während

die Duplikation von paternalem Material zu einem BWS-Phänotyp führt. Duplikationen, die nur Teile der ICR1 bzw. ICR2 betreffen durchbrechen diese strikte Zuordnung (Abbildung 4.1).

Bei JP11221 konnte mittels MS-MLPA eine Duplikation detektiert werden, die die Region 11p15 betrifft. Sonden gegen *H19* und die ICR1 zeigten verstärkte Signale, während die ICR2 und *IGF2* unauffällig waren. Die Methylierungsanalyse zeigte korrespondierend dazu eine leichte Reduktion der Signale für die ICR1. Eine Array-Analyse ergab, dass bei der Patientin eine Duplikation von 596 kb vorliegt (NCBI36/hg18: chr11:1.501.757-2.098.162), die zwar die ICR1 und *H19*, aber nicht *IGF2* und die ICR2 betrifft und maternal ererbt wurde. Die beiden Schwestern der Patientin, ebenfalls Trägerinnen der Duplikation, hatten ein geringes Geburtsgewicht mit Wachstum am unteren Ende des Normbereichs. Um die Duplikation weiter zu analysieren und eine mögliche Auswirkung auf die Methylierung anderer Loci zu untersuchen, wurde eine MS-SNuPE-Analyse an den Proben der Familie durchgeführt. Dabei zeigte sich bei der Mutter und ihren drei Töchtern erwartungsgemäß eine Reduktion des Methylierungsindex für *H19*, die mit der maternalen Duplikation in Einklang steht. Damit konnte bei JP11221, sowie bei ihren Schwestern und ihrer Mutter eine strukturelle Veränderung in 11p15 nachgewiesen werden, die sich bei allen Trägerinnen zumindest hemmend auf das Wachstum auswirkt. Neben dem in der MS-SNuPE-Analyse erwarteten Befund für *H19* konnte bei JP11221 eine Hypermethylierung für *IGF2R* und *PLAGL1* detektiert werden. Eine der Schwestern zeigte eine Hypermethylierung die auf *IGF2R* beschränkt war. Die Sequenzierung der Primerbindestellen von *IGF2R* zeigte keine Varianten. Mittels Mikrosatelliten-Typisierung konnte bei JP11221 die Hypermethylierung der Loci *PLAGL1* und *IGF2R* auf eine upd(6)mat zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur upd(6)pat, die ein häufiger Befund bei Patienten mit TNDM ist, wurden maternale UPDs von Chromosom 6 meist nur im Zusammenhang mit rezessiven Mutationen anderer Erkrankungen berichtet. Ein spezifischer upd(6)mat Phänotyp ist bisher nicht beschrieben, wobei eine IUGR bei fast allen upd(6)mat-Patienten berichtet wird (Salahshourifar et al., 2010). Inwieweit die upd(6)mat bei JP11221 zum erweiterten Phänotyp beiträgt ist unklar, aber eine Beteiligung ist plausibel. Die Mikrosatelliten-Analyse konnte die upd(6)mat als heterodisom identifizieren, was die Wahrscheinlichkeit von demaskierten rezessiven Mutationen reduziert. Auch in der SNP-Array-Analyse konnten keine isodisomen Blöcke identifiziert werden. Die *IGF2R*-Hypermethylierung bei der Schwester kann, wie bereits im Vorfeld diskutiert, vermutlich als Methylierungspolymorphismus betrachtet werden.

Bei RD6443 konnten keine SRS-typischen Veränderungen auf Chromosom 11 und 7

4.4 Bedeutung von strukturellen Varianten der Region 11p15

nachgewiesen werden. Die anschließende molekulare Karyotypisierung zeigte aber eine 346 kb große Deletion in 11p15 (NCBI36/hg18: chr11:1.554.705-1.900.779), die teilweise den mesodermalen *IGF2*-Enhancer betrifft. Der Vater des Patienten ist ebenfalls Träger der Deletion und gesund. Eine weitergehende Segregation war nicht möglich, da großelterliche Proben nicht zur Verfügung standen. Ein weiterer Befund war eine isolierte *IGF2P0*-Hypomethylierung bei dem Patienten. Die Sequenzierung der Primer-Bindestellen zeigte keine Varianten. Grønskov et al. (2011) beschreiben einen Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp und überlappender Deletion, der ebenfalls eine Hypomethylierung der *IGF2P0*-DMR aufweist. Damit konnte gezeigt werden, dass eine definierte chromosomale Struktur von Nöten ist um eine korrekte Methylierung der Region zu gewährleisten.

Eine weitere Patientin (MZ10567) wurde wegen einer diagnostizierten mentalen Retardierung extern molekular karyotypisiert, wobei eine 849 kb großen Duplikation in 11p15.5 (NCBI36/hg18:chr11:1.712.385-2.562.224) nachgewiesen wurde, die das mütterliche Chromosom betrifft und sowohl *IGF2* als auch *H19* umfasst. Mittels Mikrosatelliten-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Duplikation in der Mutter *de novo* entstanden ist und das großmütterliche Chromosom betrifft.

Phänotyp	Herkunft	Imbalanz	ICR1				ICR2			Präzedenzfall
			IGF2 enh. (1,855,000-1,970,000)*	H19 (1,972,982-1,975,641)	H19 DMR (1,975,008-1,978,367)*	IGF2 (2,106,923-2,118,917)	CDKN1C enh. (2,546,981-2,755,900)*	KCNQ1OT1-DMR (2,676,499-2,678,897)*	CDKN1C (2,861,024-2,863,571)	
BWS	pat	dup								general Blik et al., 2009 Algar et al., 2007
		del								Demars et al., 2011; patient L65P Chiesa et al., 2011 Niemitz et al., 2004; Algar et al., 2011
	mat	dup								RD6443; Grønskov et al., 2011; patients 2+3 Grønskov et al., 2011; patient 1
SRS	mat	del								general Schönherr et al., 2007; Bonaldi et al., 2011 Demars et al., 2011; patient 72P; JP11221
		dup								Schönherr et al., 2007; Bonaldi et al., 2011 Demars et al., 2011; patient 72P; JP11221
not affected	pat	dup								Schönherr et al., 2007; Bonaldi et al., 2011 Demars et al., 2011; patient 572P mother
		del								Algar et al., 2011
	mat	dup								ZM10567; Blik et al. 2009

Abbildung 4.1: Klinische Relevanz von 11p15 Imbalanzen wie sie aus einigen Präzedenzfällen abgeleitet werden können. (Rot, Deletion; blau, Duplikation; vertikal gestreift, Region teilweise betroffen. Die Koordinaten des *CDKN1C*-Enhancers beziehen sich auf Algar et al. (2011), die exakte Position des *CDKN1C*-Enhancers, der *H19*- und *KCNQ1OT1*-DMR sind zur Zeit unklar (nach Begemann et al., 2012b)).

Wie die Daten aus der Literatur und die Untersuchungen am eigenen Kollektiv zeigen, führen Duplikationen der paternalen ICR1 die *H19* und *IGF2* einschließen, zu einem Groß-

wuchs und BWS, während eine maternale Duplikation derselben Region folgenlos bleibt (MZ10567, Blik et al. (2009b)). Eine Beschränkung der maternalen Duplikation auf *H19* (JP11221, Demars et al. (2011)) resultiert bei Trägern in einem SRS-Phänotyp, eine paternale Weitergabe derselben Duplikation bleibt ohne klinische Manifestation. Liegt dagegen ein Stückverlust vor, der die maternale *H19*-Kopie betrifft, kann ein BWS die klinische Konsequenz sein. Auch bei dieser Art der Deletion ist die Beteiligung von paternalem Material ohne phänotypische Relevanz (Prawitt et al., 2005; Sparago et al., 2007; Demars et al., 2010, 2011). Diese Aussage verliert ihre Gültigkeit, sobald die Deletion den weiter telomerisch gelegenen Enhancer von *IGF2* betrifft. Der Verlust schon von Teilen des *IGF2*-Enhancers auf dem paternalen Allel verursacht ein SRS. Eine Deletion im Bereich des *IGF2*-Enhancers stellt den Verlust eines *cis*-wirkenden Elements dar, was auch einen Einfluss auf die Methylierung des *IGF2P0*-Promoters hat. Patienten mit einer solchen Deletion weisen dort eine Hypomethylierung auf (RD6443, Grønskov et al. (2011)).

In Bezug auf die ICR2 liegen vergleichbare Beobachtungen vor. Eine vollständige Duplikation der maternalen Kopie der ICR2 führt zu einem SRS-Phänotyp, die paternale Duplikation bleibt ohne klinischen Effekt. Sind kleinere Bereiche dupliziert, die die maternale Kopie von *KCNQ1OT1* oder des *CDKN1C*-Enhancer betreffen, ist ein BWS die klinische Folge. Interessanterweise resultieren Deletionen des *CDKN1C*-Enhancer und der *KCNQ1OT1*-DMR auf dem maternalen Allel ebenfalls in einem BWS, wohingegen eine entsprechende paternale Deletion dahingehend folgenlos bleibt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem Wachstumsphänotyp (wie SRS- und BWS-Patienten), komplexe Umbauten der Region 11p15 ursächlich sein können. Diese Fälle geben einen Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen von Wachstum und Entwicklung beim Menschen. Dabei zeigt sich, dass der Pathomechanismus nicht bloß durch eine veränderte Genexpression zum tragen kommt, die auf dem Verlust oder Zugewinn an kodierendem genetischem Material basiert. Auch Deletionen bzw. Duplikationen die, *cis*-wirksame Faktoren betreffen und die einen Einfluss auf die Methylierung und damit auf die Regulation von geprägten Genen haben, können ursächlich für einem Phänotyp sein.

Zusammenfassend hängen die klinischen Effekte einer strukturellen chromosomalen Veränderung in 11p15 ab von der Größe der betroffenen Region, den Bruchpunkten so wie der elterlichen Herkunft. Aufgrund der komplexen Strukturen der Region 11p15 bedarf die Interpretation von Veränderungen daher sorgfältiger Untersuchungen (nach Bege-

mann et al., 2012b).

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Multilocus-Testung zur diagnostischen Aufklärung von Patienten mit Verdacht auf eine Imprinting-Erkrankung oder bei Vorliegen eines Wachstumsphänotyps sinnvoll ist. Zum einen werden dadurch mögliche Differentialdiagnosen aus der Gruppe der Imprinting-Erkrankungen parallel untersucht, zum anderen ist die gleichzeitige Detektion von MLMD bei diesen Patienten möglich. Mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Multilocus-Tests wie MS-MLPA und MS-SNuPE können bis zu zehn Loci auf fünf Chromosomen untersucht werden. In einem Screening an 93 Patienten mit der Verdachtsdiagnose Silver-Russell-Syndrom konnte in dieser Studie bei einem Patienten eine Hypomethylierung der *MEG3*-DMR und bei drei Patienten eine Hypermethylierung von *IGF2R* nachgewiesen werden. Der verwendete MS-SNuPE-Assay umfasst gegenwärtig nur Loci, die bereits als krankheitsrelevant beschrieben wurden bzw. wissenschaftlich von Interesse sind. Die Charakterisierung der Methylierungsdefekte bei MLMD-Patienten hat gezeigt, dass diese bezogen auf die Methylierungsmuster eine sehr heterogene Gruppe darstellen. Dennoch war allen untersuchten Patienten eine Hypomethylierung der ICR1 und ICR2 gemein. Des Weiteren zeigte sich, dass bei MLMD-Patienten als gemeinsames Merkmal der *IGF2R*-Locus häufig von einer Hypomethylierung betroffen ist, wohingegen bei Normalkontrollen und idiopathischen SRS-Patienten eher eine Hypermethylierung zu beobachten war.

Zukünftig werden für die weitere Erforschung des Phänomens MLMD Methoden von Interesse sein, die eine globale Analyse der Methylierungsmuster bei MLMD-Patienten und Patienten anderer Imprinting-Erkrankungen erlauben, wie z. B. Methylierungs-Arrays. Auch eine genomweite Bisulfit-Sequenzierung basierend auf Hochdurchsatz Next-Generation-Sequencing Technologien wird einen erheblichen Beitrag zur Aufklärung und Erforschung von genomweiten Methylierungsveränderungen beitragen. Auch die Detektion ursächlicher Mutation in Faktoren eines Netzwerks geprägter Gene durch *whole exome* und *whole genome* Sequenzierungen wird durch diese Technologien ermöglicht werden.

Durch die Analyse der Genexpression bei MLMD-Patienten konnte gezeigt werden, dass sich die komplexen Methylierungsmuster auch in einer komplex veränderten Expression geprägter Gene niederschlägt. Es wurde außerdem deutlich, dass die Zusammensetzung des Patientenkollektivs von großer Bedeutung ist. Für die Analysen der vorliegenden

Arbeit standen nur die Kulturen von zwei MLMD-Patienten sowie zweier Angehöriger zur Verfügung. Zukünftige Untersuchungen sollten an größeren Kollektiven durchgeführt werden. Teilweise konnten bereits weitere Hautbiopsien von weiteren MLMD-Patienten gewonnen werden, die im Rahmen dieser Arbeit keine Berücksichtigung finden konnten. Die Analyse weiterer Proben und Gene kann in Zukunft einen tieferen Einblick in die komplexe Regulation der Expression innerhalb eines Netzwerks geprägter Gene liefern.

Die Expressionsdaten von drei Patienten mit upd(7)mat und einem Patienten mit upd(7q)mat mit zusätzlicher *MEG3*-Hypomethylierung haben bestätigt, dass diese Klasse von (Epi)mutationen einen Einfluss auf die Genexpression von geprägten Genen im Sinne eines *imprinted gene network* hat. Es konnte gezeigt werden, dass die grundsätzliche Annahme eines solchen Netzwerks auch für den Menschen richtig ist und ihm eine entscheidende Rolle für den Pathomechanismus des SRS durch eine upd(7)mat-Genommutation zukommt. Von besonderem Interesse sind dabei die Wirkmechanismen, die die Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen upd(7)mat und upd(7q)mat-Patienten bewirken, da sie tiefere Einblicke in die Funktion eines solchen Netzwerks erlauben. Insbesondere der Einfluss weiterer Epimutationen ist in diesem Zusammenhang von Interesse. Die Analyse von upd(7)mat-Patienten als Modell für die Pathogenese von Imprinting-Erkrankungen bietet mehrere Vorteile. Als Genommutation liegt mit der upd(7)mat eine molekulargenetisch definierte Veränderung vor, so dass sich ein Patientenkollektiv mit einer gleichartigen Veränderung für die Untersuchungen nutzen ließ. Auf Genexpressionsebene ließ sich erkennen, dass sich daraus bei den Patienten auch gleichartige Veränderungen in der Expression geprägter Gene ergeben. Zusätzlich stand eine Probe mit segmentaler upd(7q)mat und *MEG3*-Hypomethylierung zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass diese zusätzliche epigenetische Veränderung sich auch auf die Genexpression auswirkt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse von segmentalen upd(7q)mat-Probanden ohne weitere Hypomethylierungen, um die Veränderungen in der Expression im Vergleich zu reinen upd(7)mat-Patienten und dem Probanden mit der zusätzlichen Methylierungsveränderung einzuordnen.

Bereits geplante zukünftige Analysen an upd(7)mat- und MLMD-Patienten sollen die Expression geprägter und nicht geprägter Gene in einem größeren Kontext erforschen. Dazu sollen Expressions-Arrays durchgeführt werden, die nahezu das gesamte Transkriptom inklusive nicht-kodierender RNAs abdecken.

Ein wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist die Zusammensetzung des Kontrollkollektivs. Wünschenswert wären hier Proben, die in etwa von Spendern des gleichen

Alters und Geschlecht stammen. Dieser Aspekt trifft auch auf die Patientenkollektive zu. Bei den upd(7)mat-Patienten konnten Proben gewonnen werden, die alle von weiblichen Probanden im Alter zwischen 6-10 Jahren stammen. Bei den MLMD-Patienten ist eine solche Homogenität nicht möglich gewesen. Hinzu kommt hier die Problematik, dass einem MLMD vermutlich unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können.

Die Untersuchungen zu strukturellen Veränderungen der Region 11p15 mittels Mikroarray-Analytik hat gezeigt, dass Einblicke in die Struktur und Organisation von Imprinting-Cluster einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulationsmechanismen von Wachstum und Entwicklung beitragen können. Nach Ausschluss von Methylierungsveränderungen bei Patienten mit einem Verdacht auf Imprinting-Erkrankungen ist eine molekulare Karyotypisierung angeraten, da z. B. auch Deletionen oder Duplikationen in der Region 11p15 ursächlich für einen Phänotyp sein können. Es konnte gezeigt werden, dass neben der reinen Sequenzinformation im menschlichen Genom eine Reihe struktureller Informationen benötigt werden, um eine korrekte Genexpression und auch richtig gesetzte Methylierungsmuster zu gewährleisten. Die Auswirkungen solcher strukturellen Umbauten sind dabei abhängig von Größe, Position und elterlicher Herkunft. Die tatsächlichen Auswirkungen auf die Regulation und Wirkweise von Genen, die eine Rolle für Wachstum und Entwicklung spielen, müssen im Rahmen von funktionellen Untersuchungen erforscht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist eine Sequenzierung von ganzen Imprinting-Zentren, wie die Region 11p15 bei Patienten mit nachgewiesener Hypomethylierung z. B. von *H19* und *KCNQ1OT1*, sowie von klinisch sicher diagnostizierten Patienten ohne Methylierungsveränderungen oder UPDs. Dadurch ließen sich auch kleinste Deletionen und Duplikationen in *cis*-wirksamen Elementen nachweisen und ihre Funktion bei der Erhaltung und Etablierung des Imprintings beleuchten. Der Vergleich von funktionellen, epigenetischen und genomischen Daten wird zukünftig dazu beitragen, das Zusammenspiel von Genregulation, Genomstruktur und genomischer Prägung und die Beteiligung an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beim Menschen zu verstehen.

5 Anhang

5.1 PCR-Programme

Tabelle 5.1: PCR-Programm Standard

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
94	05:00 min	
94	00:45 min	
56 (ΔT)	00:30 min	30
72	01:30 min	
72	10:00 min	
15	halten	

Tabelle 5.2: PCR-Programm Sequenzier-PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
96	1 Minute	1
96	10 Sekunden	
50	5 Sekunden	24
60	4 Minuten	
4	halten	

Tabelle 5.3: PCR-Programm Hotstart

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
95	15:00 Min	
95	00:45 Min	
58 (ΔT)	00:45 Min	35
72	01:00 Min	
72	10:00 Min	
15	halten	

Tabelle 5.4: PCR-Programm MS-PCR *PLAGL1*

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
95	15 Min	
95	30 Sek	
60 (ΔT)	1 Min	30
72	1 Min	
72	5 Min	
15	halten	

Tabelle 5.5: PCR-Programm SNUPE Multiplex-PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
95	15 Min	
94	30 Sek	
56,5	1:30 Min	35
72	1:30 Min	
72	10 Min	
15	halten	

Tabelle 5.6: qPCR-Programm für TaqMan® Ansätze

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen	Messpunkt
50	2 Min	1	
95	10 Min	40	
95	15 Sek		
60	1 Min		ja

5.2 Primer-Sequenzen

Tabelle 5.7: Primer-Sequenzen MBD3

Primer	Sequenz	Sequenz
	Forward-Primer	Reverse-Primer
MBD3-E01F	GCAGAGACAGGGCACAGTAA	AAAGCCATGCGGCCCAACAA
MBD3-E02F	AGATCTAGGGGCCAGTTGTG	TCGCCTGCAGCTCACGTTCAT
MBD3-E03F	ATGACGTGAGCTGCAGGCGA	ACTCCTGCGCTCACTACGTC
MBD3-E04F	TACAAACGTCCACTGGATCC	GGTCTCCAAGGTCAAGAATG
MBD3-E05F	GTAGTAACACAAGCGGGAGA	GTTCATACTGCTCCGACGAT
MBD3-E06.1F	TCATCCTGTGTCCATGTCCT	TGGCTGCTCTCCAGTCTCAA
MBD3-E06.2F	ACGCTCGTCCTCTACAGAGT	AAGGAGCAGATCCCTCAGAC
MBD3-E06.3F	CCTTCTGTTTAGTGGCGACA	TGCTTTGACTCTGACAGGGA
MBD3-E06.4F	GTCTGAGGGATCTGCTCCTT	CAGCCTTTCATCACCCAACC

Tabelle 5.8: Primer-Sequenzen DNMT3L

Exon	Sequenz	Sequenz
	Forward-Primer	Reverse-Primer
DNMT3L-E01*	GCTGACGGCTTTCTCACATCT	TCACTTAGGATGCTGATCCCA
DNMT3L-E02	TTTGAAAACGAATTGTGATGC	ATACTGGCCCACACCAGACAA
DNMT3L-E03-04	TTTGACAGCACTGGGAAAACA	CCATCCTTTCAGCTACTCATTCC
DNMT3L-E05	CCAAAACAAGGCTCAATCAGG	AGCAGCAGGCCCTGACTTAC
DNMT3L-E06	GGCACAATGTCCTGTTTTGGT	TGTCCCAAAGACACACATGGA
DNMT3L-E07	ACAATCCACGCTCACCCCTCT	TACCGCCGTGAACTCTCAGAC
DNMT3L-E08	ACTGCTGCTGCCTCTCAGTG	TTCAGTTCTGGCAGCCTGTC
DNMT3L-E09	CTCTCAAGCCCCAGTTTCCTT	GCTTTTCTGGTGGAGCTCAGT
DNMT3L-E10	TTACCGTCCAGGTCCCCTGA	G TTCAGGGTCAAGGGGAACAT
DNMT3L-E11	CTGCGCTTGCTCACAACTT	CAAAGGCAACTTTCCTCACGT

Tabelle 5.9: Primer-Sequenzen für NLRP2 Exon 7

Primer	Sequenz
NLRP2-E07F	ACACTAAAGATTTCACTTTCGTTCTC
NLRP2-E07R	GGTAGCTTATGTTTGTATGATGAAGG

Tabelle 5.10: Primer MS-PCR für GRB10

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'
GRB10_1_met	CGGTAGGCGGGTAGGGGTCGCGC
GRB10_1_unmet	GTGAGTTTGTGGTAGGTGGGTAGGGGTTGTGTG
GRB10_1_fam	CCYCCCCTCTCCAATACTCAAATAAACTCC

Tabelle 5.11: Primer MS-PCR für MEST

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'
UPD7_PUF	tggttggtgggttttggtggtttggt
UPD7_MMF	ggttgtagttggtcgcgcg
UPD7_R_comF	ttcccaccrcacactcacct

Tabelle 5.12: Primer MS-PCR MEG3

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'
GTL2b-met	CGGTTTTGGTTTCGTTGGTTTTGGCGCG
GTL2b-unmet	GTGTAGATGGTGGAGAGTAGAGAGGGAGTGTG
GTL2b-fam	CTCCAACAACAAAACCCAAAATCAAACAACTCTC

Tabelle 5.13: Primer MS-PCR für PLAGL1

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'
MS-PCR6-RM	TTCGGGAAGCGTTTCGCGGTTAAGTT
MS-PCR6-RU	GGTTATGATGGTGAATTTGGGAAGTGTGTTT
MS-PCR6-F	CACRACATCTACCATTATCATCAACC

Tabelle 5.14: Verwendete Mikrosatelliten für Chromosom 6 und Chromosom 7**(a)** Mikrosatelliten für Chromosom 6

Marker	Bande	Start	Stop	F-Primer	R-Primer	Größe bp
D6S1593	6p23	13589713	13590070	TAGGTGCTGTGGGAGCCACT	AGCGTCTTGACGGTCAGGA	176-210
D6S1960	6p12.1	53504500	53504803	GCCTCTCCTTCTTCACTTCC	CTCAACAACAACAAATGTAGCA	271-291
D6S1649	6q24.3	146754549	146754775	AGGTCTAAGATTCACAAAACCTCTC	TCCTCCATCAGTTGGGAGTT	126-136
D6S272	6p12.3	50846349	50846656	AGCTCTGAAAATGCAAAGCA	ACTGTGAGCGTTTGTGCTG	180-196
5'AR	6p12.2	52019874	52020081	TTGTCAGCTTCCGTAAGTAC	GCACCAACCTAATAGTCTCTTC	198-214
M182	6p12.2	52278749	52278859	ATGCCCTCTACCCTCTAAA	ACCTACCAACTTTGAATAAATAT	110-160

(b) Mikrosatelliten für Chromosom 7

Marker	Bande	Start	Ende	F-Primer	R-Primer	Größe bp
D7S2446	7q22.2	104001084	104001362	TTTGAGTCTTCACAGCAGTTG	GGGAGGTTGATTTCCACAGT	185-210
D7S2452	7q33	133423774	133424116	TCCAGCATGAGTTGAGAAG	GGCATTGAAGTTTATCGTGA	187-203
D7S636	7q36.1	150699237	150699599	GGAGTGACTGGCCAGGAA	AGCTTGTGTGGGGTTTCA	130-168
D7S483	7q36.1	152198118	152198442	AGTGGTCATTAGCCTTGGCAAAATC	AACCAGAGTTGTAAGCCATGAAAGT	166-188
D7S493	7p15.3	21805090	21805333	GGAAGTCCCAGCCATAGTT	GAAAGCACTTACCCTACTGAGGATTT	194-224
D7S460	7p14.3	34293143	34293352	AATACCCCAAGGGTGGTAA	CATTGATGAACAGTTCAAGCA	180-188
D7S2251	7p14.2	36288503	36288728	CGGAAAGTGGGCATTT	GTAGTGAGAGCCCTCTGA	152-170

Tabelle 5.15: Verwendete Mikrosatelliten für Chromosom 11 und Chromosom 14**(a)** Mikrosatelliten für Chromosom 11

Marker	Bande	Start	Ende	F-Primer:	R-Primer:	Größe bp
D11S1984	11p15p5	1566686	1963635	GGGTGACAGAGCAAAATTCT	ACACCTGGATCTTGGACTCA	170-202
D11S4046	11p15p5	1961106	1963832	ACTCCAGCCTGGGAAAC	TGATAGACACACCCATTGC	183-203
11-2427	11p15p5	2463415	2463678	CAGCCCCCTTCTCAAACCTTG	ACTCAACCAAAAGGATCCCAAA	260-270
11-2820	11p15.4	2856579	2856729	CACAGAAACCCAGCATGTC	ACCAGAGGCCAGAAAATGTC	140-151
D11S1758	11p15.4	4735881	4736218	GTC AAGGTAGCCCAGGAAAT	CCAGTGTCTCACAAAAGTACTGAGTA	241-251
D11S875	11p15.3	11034076	11034206	ACAGAGCTGAGTTTGTAGCT	ACTGTCCTCTCATCCTACTG	103-125

(b) Mikrosatelliten für Chromosom 14

Marker	Bande	Start	Ende	F-Primer:	R-Primer:	Größe bp
D14S277	14q24.2	73027305	73027662	TTGCTTTCACTCCCCATT	TGCACTTGAAGATTCAGATAAGG	140-158
D14S68	14q31.3	88627635	88627975	GAGAGGTGGTTTTTCAGTGGT	TCAGGGATAGTTGGTGGGTA	148-172
D14S267	14q32.2	99224085	99224421	TTAATGCCCACTGAATGCT	AAGGCAGCCCTGGTTT	193-225
D14S72	14q11.2	21370988	21371351	TGTAAAGTTTTGTACATGGTGAAT	TCCTAACATTTCTGCTACCCA	257-271
D14S283	14q11.2	22687415	22687784	GGGACTATATCTCCAGGC	TGTTTTCTAGTAAACCGCA	125-153
D14S80	14q12	27724420	27724760	CATCTACCTGCCGCAA	TAGCCAATTTATGGATAACAATT	132-156

Tabelle 5.16: PCR-Primer-Mix MS-SNuPE (Kleinbuchstaben geben Primer-Tags an)

Primer [100 µM]	Sequenz	µl
MEST_SNuPE_F	gatcTYGTTGTTGGTTAGTTTTGTAYGGTTG	2,5
MEST_SNuPE_R	CAGAAACAGCTATGACCAACACACACCCCTCRTTCCCACC	2,5
MEG3_SNuPE_Fn1	GYGGGATTTATTGGAGGATT	5
MEG3_SNuPE_Rn1	CCRAAAACCAAAAACCACTA	5
IGF2P0_Snupe_F	TGAGGATGGGTTTTTGTGGTAT	1,8
IGF2P0_Snupe_R	TCCTCRATCCACCAAAAATAATAT	1,8
GRB10_Snupe_F	CTTGCTTCCTGGCACGAGYGYGTTAGGYGAAAGYGTAGTAYG	2,5
GRB10_Snupe_R	CAGAAACAGCTATGACTAATCCTAAAATTCTATTACTCCAAAAC	2,5
PLAGL1_Snupe_Fn	CTTGCTTCCTGGCACGAGGATAAATGGTAGATGYGTGGG	0,7
PLAGL1_Snupe_Rn	CAGAAACAGCTATGACCAAAACCRACCTCRAATCTACCTA	0,7
SNRPN_SNuPE_F2	GTGGTGYGYGATAGGTTTT	2,5
SNRPN_SNuPE_R2	CTCCTCRCCTGRATCACTAC	2,5
IGF2R_SNuPE_Fn1	ATGYGTAGTTGGAGGYGTAT	2,5
IGF2R_SNuPE_Rn1	TACCTCCCRACACCTTTTAC	2,5
H19_Snupe_Fn2	GGGAGTYGTTTTGTTGGAG	2,5
H19_Snupe_Rn2	CAAAACAAAACCCCACTTT	2,5
IG-DMR_SNuPE_Fn1	TYGTTTATTGGGTTGGGTTT	2,5
IG-DMR_SNuPE_Rn1	TCCATTATAACCAATTACAATACCACA	2,5
Primer-Mix	Aqua dest.	ad 100
LIT1_SNuPE_F	AATTAGTAGGTGGGGG	1 µl / PCR-Reaktion
LIT1_SNuPE_R	CTAAAAAACTCCCTAAAAATC	

5.3 TaqMan Probes

Tabelle 5.18: TaqMan Probes

Gen	Untersuchte Transkripte	Assay ID
CDKN1C	NM_000076.2	
	NM_001122630.1	Hs0017938_m1
	NM_001122631.1	
COPG2	NM_012133.4	Hs00273295_m1
DLK1	NM_003836.5	Hs00171584_m1
GRB10	NM_001001549.2	
	NM_001001550.2	
	NM_001001555.2	Hs00959286_m1
	NM_005311.4	
H19	NR_002196.1	Hs00262142_g1
H19 IDT	NR_002196	Hs.PT.51.15123502.gs
IGF2	NM_000612.4	Hs00171254_m1
MEG3	NR_002766.2	
	NR_003530.2	
	NR_033358.1	Hs00292028_m1
	NR_033359.1	
	NR_033360.1	
MEST I	NM_177525.1	Hs00602654_m1
MEST II	NM_001253900.1	
	NM_001253901.1	
	NM_001253902.1	
	NM_002402.3	Hs00853380_g1
	NM_177524.2	
	NM_177525.2	
PLAGL1	NM_001080951.1	
	NM_001080952.1	
	NM_001080953.1	Hs00414677_m1
	NM_001080954.1	
	NM_006718.3	

5.4 Verwendete Datenbanken und online Quellen

dbSNP Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: {135-137}).

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

OMIM Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {Dezember 2012}.

World Wide Web URL: <http://omim.org/>

DECIPHER Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Wellcome Trust Sanger Institute Genome Research Limited. (Hinxton Cambridge CB10 1SA UK),

Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk>

DGV Database of Genomic Variants. The Center of Applied Genomics, Department of Genetics and Genomic Biology, (MaRS Centre - East Tower, 101 College Street, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada).

Available from: <http://projects.tcag.ca/variation/>

NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA)

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

5.5 Verwendete Software

- SeqPilot (JSI medical systems, Kippenheim, D)
- GeneMapper Software 4.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- Coffalyser Analyse Software (MRC-Holland, Amsterdam, NL)
- Chromosome Analysis Suite (ChAS) v. 1.1 Software (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- AB DNA Sequencing Analysis Software 5.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- StepOne Software (Applied Biosystems, Darmstadt, D)

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Amero, S., Monk, D., Frost, J., Preece, M., Stanier, P., Moore, G.E. The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, 2008; **45**(4):193–9.
- Algar, E., Dagar, V., Sebah, M., Pachter, N. An 11p15 imprinting centre region 2 deletion in a family with Beckwith Wiedemann syndrome provides insights into imprinting control at CDKN1C. *PLoS one*, 2011; **6**(12):e29034–e29034.
- Arboleda, V.A., Lee, H., Parnaik, R., Fleming, A., Banerjee, A., Ferraz-de Souza, B., Délot, E.C., Rodriguez-Fernandez, I.A., Braslavsky, D., Bergadá, I., Dell’Angelica, E.C., Nelson, S.F., Martinez-Agosto, J.A., Achermann, J.C., Vilain, E. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet*, 2012; **44**(7):788–792.
- Arima, T., Kamikihara, T., Hayashida, T., Kato, K., Inoue, T., Shirayoshi, Y., Oshimura, M., Soejima, H., Mukai, T., Wake, N. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res*, 2005; **33**(8):2650–2660.
- Azzi, S., Rossignol, S., Le Bouc, Y., Netchine, I. Lessons from imprinted multilocus loss of methylation in human syndromes: A step toward understanding the mechanisms underlying these complex diseases. *Epigenetics*, 2010; **5**(5):373–377.
- Azzi, S., Rossignol, S., Steunou, V., Sas, T., Thibaud, N., Danton, F., Le Jule, M., Heinrichs, C., Cabrol, S., Gicquel, C., Le Bouc, Y., Netchine, I. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Human molecular genetics*, 2009; **18**(24):4724–33.
- Bachmann, N., Spengler, S., Binder, G., Eggermann, T. MBD3 mutations are not responsible for ICR1 hypomethylation in Silver-Russell syndrome. *Eur J Med Genet*, 2010; **53**(1):23–24.
- Bartholdi, D., Krajewska-Walasek, M., Ounap, K., Gaspar, H., Chrzanowska, K.H., Ilyana, H., Kayserili, H., Lurie, I.W., Schinzel, a., Baumer, a. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from

- a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *Journal of medical genetics*, 2009; **46**(3):192–7.
- Bastepe, M., Jüppner, H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res*, 2005; **63**(2):65–74.
- Beckwith, J.B. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects Orig Art Ser*, 1969; **V**(2):188–196.
- Begemann, M., Leisten, I., Soellner, L., Zerres, K., Eggermann, T., Spengler, S. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics*, 2012a; **7**(5).
- Begemann, M., Spengler, S., Gogiel, M., Grasshoff, U., Bonin, M., Betz, R.C., Dufke, A., Spier, I., Eggermann, T. Clinical significance of copy number variations in the 11p15.5 imprinting control regions: new cases and review of the literature. *J Med Genet*, 2012b; **49**(9):547–553.
- Begemann, M., Spengler, S., Kanber, D., Haake, A., Baudis, M., Leisten, I., Binder, G., Markus, S., Rupprecht, T., Segerer, H., Fricke-Otto, S., Mühlenberg, R., Siebert, R., Buiting, K., Eggermann, T. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet*, 2011; **80**(1):83–88.
- Begemann, M., Spengler, S., Kordass, U., Schröder, C., Eggermann, T. Segmental maternal uniparental disomy 7q associated with DLK1/GTL2 (14q32) hypomethylation. *Am J Med Genet A*, 2012c; **158A**(2):423–428.
- Begemann, M., Spengler, S., Schröder, C., Kordaß, U., Binder, G., Eggermann, T. Genetic and epigenetic findings in Silver-Russell syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2010; **8**(2):86–93.
- Bentley, L., Nakabayashi, K., Monk, D., Beechey, C., Peters, J., Birjandi, Z., Khayat, F.E., Patel, M., Preece, M.a., Stanier, P., Scherer, S.W., Moore, G.E. The imprinted region on human chromosome 7q32 extends to the carboxypeptidase A gene cluster: an imprinted candidate for Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics*, 2003; **40**(4):249–56.
- Bergström, R., Whitehead, J., Kurukuti, S., Ohlsson, R. CTCF regulates asynchronous replication of the imprinted H19/Igf2 domain. *Cell Cycle*, 2007; **6**(4):450–454.
- Bjornsson, H.T., Albert, T.J., Ladd-Acosta, C.M., Green, R.D., Rongione, M.A., Middle, C.M., Irizarry, R.A., Broman, K.W., Feinberg, A.P. SNP-specific array-based allele-specific expression analysis. *Genome Res*, 2008; **18**(5):771–779.

- Blagitko, N., Mergenthaler, S., Schulz, U., Wollmann, H.A., Craigen, W., Eggermann, T., Ropers, H.H., Kalscheuer, V.M. Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. *Hum Mol Genet*, 2000; **9**(11):1587–1595.
- Blagitko, N., Schulz, U., Schinzel, A.A., Ropers, H.H., Kalscheuer, V.M. gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet*, 1999; **8**(13):2387–2396.
- Bliek, J., Alders, M., Maas, S.M., Oostra, R.J., Mackay, D.M., van der Lip, K., Callaway, J.L., Brooks, A., van 't Padje, S., Westerveld, A., Leschot, N.J., Mannens, M.M.a.M. Lessons from BWS twins: complex maternal and paternal hypomethylation and a common source of haematopoietic stem cells. *European journal of human genetics : EJHG*, 2009a; **17**(12):1625–34.
- Bliek, J., Snijder, S., Maas, S.M., Polstra, a., van der Lip, K., Alders, M., Knegt, a.C., Mannens, M.M.a.M. Phenotypic discordance upon paternal or maternal transmission of duplications of the 11p15 imprinted regions. *European journal of medical genetics*, 2009b; **52**(6):404–8.
- Bliek, J., Verde, G., Callaway, J., Maas, S.M., De Crescenzo, A., Sparago, A., Cerrato, F., Russo, S., Ferraiuolo, S., Rinaldi, M.M., Fischetto, R., Lalatta, F., Giordano, L., Ferrari, P., Cubellis, M.V., Larizza, L., Temple, I.K., Mannens, M.M.a.M., Mackay, D.J.G., Riccio, A. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 2009c; **17**(5):611–9.
- Bruce, S., Hannula-Jouppi, K., Puoskari, M., Fransson, I., Simola, K.O.J., Lipsanen-Nyman, M., Kere, J. Submicroscopic genomic alterations in Silver-Russell syndrome and Silver-Russell-like patients. *Journal of medical genetics*, 2010; **47**(12):816–22.
- Chédin, F. The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011; **101**:255–285.
- Chedin, F., Lieber, M.R., Hsieh, C.L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; **99**(26):16916–16921.
- Cirio, M.C., Martel, J., Mann, M., Toppings, M., Bartolomei, M., Trasler, J., Chaillet, J.R. DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Dev Biol*, 2008; **324**(1):139–150.

- Cotter, P.D., Kaffe, S., McCurdy, L.D., Jhaveri, M., Willner, J.P., Hirschhorn, K. Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet*, 1997; **70**(1):74–79.
- Demars, J., Rossignol, S., Netchine, I., Lee, K.S., Shmela, M., Faivre, L., Weill, J., Odent, S., Azzi, S., Callier, P., Lucas, J., Dubourg, C., Andrieux, J., Le Bouc, Y., El-Osta, A., Gicquel, C. New insights into the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Human mutation*, 2011; **32**(10):1171–82.
- Demars, J., Shmela, M.E., Rossignol, S., Okabe, J., Netchine, I., Azzi, S., Cabrol, S., Le Caignec, C., David, A., Le Bouc, Y., El-Osta, A., Gicquel, C. Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet*, 2010; **19**(5):803–814.
- Eggermann, T. *Endocrine Involvement in Developmental Syndromes*, volume 14. Endocr Dev. Basel, Karger, 2009, 10 - 19 pp.
- Eggermann, T., Begemann, M., Gogiel, M., Palomares, M., Vallespín, E., Fernández, L., Cazorla, R., Spengler, S., García-Miñaur, S. Heterogeneous growth patterns in carriers of chromosome 7p12.2 imbalances affecting GRB10. *Am J Med Genet A*, 2012; **158A**(11):2815–2819.
- Eggermann, T., Begemann, M., Soellner, L., Elbracht, M., Buiting, K., Horsthemke, B., Spengler, S. Molekulargenetische Diagnostik von Imprintingkrankungen. *medizinische genetik*, 2013; pp. 1–9. ISSN 0936-5931.
- Eggermann, T., Eggermann, K., Schönherr, N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet*, 2008a; **24**(4):195–204.
- Eggermann, T., Prager, S., Binder, G., Ranke, M., Wollmann, H. Silver-Russell-Syndrom und Beckwith-Wiedemann-Syndrom: Zwei klinisch gegensätzliche Syndrome der gleichen genetischen Region. *medgen*, 2006; **18**:254–59.
- Eggermann, T., Schönherr, N., Jäger, S., Spaich, C., Ranke, M.B., Wollmann, H.A., Binder, G. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet*, 2008b; **74**(5):486–489.
- Eggermann, T., Wollmann, H.A., Kuner, R., Eggermann, K., Enders, H., Kaiser, P.,

- Ranke, M.B. Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet*, 1997; **100**(3-4):415–419.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992; **89**(5):1827–1831.
- Gabory, A., Ripoche, M.A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyat, A., Fornace, T., James, H., Ainscough, J.F.X., Surani, M.A., Journot, L., Dandolo, L. H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development (Cambridge, England)*, 2009; **136**(20):3413–21.
- Garnett, M.R., Puget, S., Grill, J., Sainte-Rose, C. Craniopharyngioma. *Orphanet J Rare Dis*, 2007; **2**:18.
- Gogiel, M., Begemann, M., Spengler, S., Soellner, L., Göretzlehner, U., Eggermann, T., Strobl-Wildemann, G. Genome-wide paternal uniparental disomy mosaicism in a woman with Beckwith-Wiedemann syndrome and ovarian steroid cell tumour. *Eur J Hum Genet*, 2012; .
- Grønskov, K., Poole, R.L., Hahnemann, J.M.D., Thomson, J., Tümer, Z., Brøndum-Nielsen, K., Murphy, R., Ravn, K., Melchior, L., Dedic, A., Dolmer, B., Temple, I.K., Boonen, S.E., Mackay, D.J.G. Deletions and rearrangements of the H19/IGF2 enhancer region in patients with Silver-Russell syndrome and growth retardation. *J Med Genet*, 2011; **48**(5):308–311.
- Haig, D., Graham, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell*, 1991; **64**(6):1045–1046.
- Hall, J.G. Twinning. *Lancet*, 2003; **362**(9385):735–743.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., Tilghman, S.M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, 2000; **405**(6785):486–489.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., Li, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002; **129**(8):1983–1993.
- Hatada, I., Nabetani, A., Morisaki, H., Xin, Z., Ohishi, S., Tonoki, H., Niikawa, N., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Steichen, E., Ohashi, H., Fukushima, Y., Nakayama, M.,

- Mukai, T. New p57KIP2 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet*, 1997; **100**(5-6):681–683.
- Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., Kaneko, Y., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Ohishi, S., Nabetani, A., Morisaki, H., Nakayama, M., Niikawa, N., Mukai, T. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*, 1996; **14**(2):171–173.
- Hoffmann, K., Heller, R. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011; **25**(1):77–100.
- Horsthemke, B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010; **154C**(3):321–328.
- Horsthemke, B., Wagstaff, J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A*, 2008; **146A**(16):2041–2052.
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M., Chaillet, J.R. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 2001; **104**(6):829–38.
- Jäger, S., Schönherr, N., Spengler, S., Ranke, M.B., Wollmann, H.A., Binder, G., Eggermann, T. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) as member of an imprinted gene network does not harbor Silver-Russell specific variants. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2009; **22**(6):555–559.
- Kagami, M., Matsuoka, K., Nagai, T., Yamanaka, M., Kurosawa, K., Suzumori, N., Sekita, Y., Miyado, M., Matsubara, K., Fuke, T., Kato, F., Fukami, M., Ogata, T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics*, 2012; **7**(10):1142–1150.
- Kagami, M., O’Sullivan, M.J., Green, A.J., Watabe, Y., Arisaka, O., Masawa, N., Matsuoka, K., Fukami, M., Matsubara, K., Kato, F., Ferguson-Smith, A.C., Ogata, T. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS genetics*, 2010; **6**(6):e1000992–e1000992.
- Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., Yamamori, S., Kishimoto, H., Nakayama, M., Tanaka, Y., Matsuoka, K., Takahashi, T., Noguchi, M., Tanaka, Y., Masumoto, K., Utsunomiya, T., Kouzan, H., Komatsu, Y., Ohashi, H., Kurosawa, K., Kosaki, K., Ferguson-Smith, A.C., Ishino, F., Ogata, T. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with

- paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nature genetics*, 2008; **40**(2):237–42.
- Kamiya, M., Judson, H., Okazaki, Y., Kusakabe, M., Muramatsu, M., Takada, S., Takagi, N., Arima, T., Wake, N., Kamimura, K., Satomura, K., Hermann, R., Bonthron, D.T., Hayashizaki, Y. The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted—a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*, 2000; **9**(3):453–460.
- Kanber, D., Buiting, K., Zeschneigk, M., Ludwig, M., Horsthemke, B. Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *European journal of human genetics : EJHG*, 2009; **17**(1):22–9.
- Kaneko-Ishino, T., Kuroiwa, Y., Miyoshi, N., Kohda, T., Suzuki, R., Yokoyama, M., Viville, S., Barton, S.C., Ishino, F., Surani, M.A. Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nat Genet*, 1995; **11**(1):52–59.
- Kaufman, Y., Heled, M., Perk, J., Razin, A., Shemer, R. Protein-binding elements establish in the oocyte the primary imprint of the Prader-Willi/Angelman syndromes domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; **106**(25):10242–10247.
- Kayashima, T., Yamasaki, K., Yamada, T., Sakai, H., Miwa, N., Ohta, T., Yoshiura, K.i., Matsumoto, N., Nakane, Y., Kanetake, H., Ishino, F., Niikawa, N., Kishino, T. The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene (CPA4) in the 7q32 imprinting domain. *Hum Genet*, 2003; **112**(3):220–226.
- Kelsey, G. Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the GNAS locus. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010; **154C**(3):377–386.
- Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., Reik, W. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol*, 2012; **14**(7):659–65.
- Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa, J.P.J., Tokino, T., Imai, K. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene*, 2002; **21**(17):2741–2749.
- Kobayashi, S., Uemura, H., Kohda, T., Nagai, T., Chinen, Y., Naritomi, K., Kinoshita, E.I., Ohashi, H., Imaizumi, K., Tsukahara, M., Sugio, Y., Tonoki, H., Kishino, T., Tanaka, T., Yamada, M., Tsutsumi, O., Niikawa, N., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. No

- evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am J Med Genet*, 2001; **104**(3):225–231.
- Koerner, M.V., Pauler, F.M., Hudson, Q.J., Santoro, F., Sawicka, A., Guenzl, P.M., Stricker, S.H., Schichl, Y.M., Latos, P.A., Klement, R.M., Warczok, K.E., Wojciechowski, J., Seiser, C., Kralovics, R., Barlow, D.P. A downstream CpG island controls transcript initiation and elongation and the methylation state of the imprinted Airn macro ncRNA promoter. *PLoS Genet*, 2012; **8**(3):e1002540.
- Kotzot, D., Schmitt, S., Bernasconi, F., Robinson, W.P., Lurie, I.W., Ilyina, H., Méhes, K., Hamel, B.C., Otten, B.J., Hergersberg, M. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet*, 1995; **4**(4):583–587.
- Lagier-Tourenne, C., Tranebaerg, L., Chaigne, D., Gribaa, M., Dollfus, H., Silvestri, G., Bétard, C., Warter, J.M., Koenig, M. Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet*, 2003; **11**(10):770–778.
- Le Caignec, C., Isidor, B., de Pontbriand, U., David, V., Audrezet, M.P., Ferec, C., David, A. Third case of paternal isodisomy for chromosome 7 with cystic fibrosis: a new patient presenting with normal growth. *Am J Med Genet A*, 2007; **143A**(22):2696–2699.
- Liu, F., Roth, R.A. Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; **92**(22):10287–10291.
- Lubell, T., Garzon, M., Anyane Yeboa, K., Shah, B. A novel mutation causing pseudo-hypoparathyroidism 1A with congenital hypothyroidism and osteoma cutis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2009; **1**(5):244–247.
- Maclsaac, J.L., Bogutz, A.B., Morrissy, A.S., Lefebvre, L. Tissue-specific alternative polyadenylation at the imprinted gene Mest regulates allelic usage at Copg2. *Nucleic Acids Res*, 2012; **40**(4):1523–1535.
- Mackay, D.J.G., Boonen, S.E., Clayton-Smith, J., Goodship, J., Hahnemann, J.M.D., Kant, S.G., Njølstad, P.R., Robin, N.H., Robinson, D.O., Siebert, R., Shield, J.P.H., White, H.E., Temple, I.K. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet*, 2006a; **120**(2):262–269.
- Mackay, D.J.G., Callaway, J.L.a., Marks, S.M., White, H.E., Acerini, C.L., Boonen, S.E., Dayanikli, P., Firth, H.V., Goodship, J.a., Haemers, A.P., Hahnemann, J.M.D., Kordonouri, O., Masoud, A.F., Oestergaard, E., Storr, J., Ellard, S., Hattersley, A.T.,

- Robinson, D.O., Temple, I.K. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nature genetics*, 2008; **40**(8):949–51.
- Mackay, D.J.G., Hahnemann, J.M.D., Boonen, S.E., Poerksen, S., Bunyan, D.J., White, H.E., Durston, V.J., Thomas, N.S., Robinson, D.O., Shield, J.P.H., Clayton-Smith, J., Temple, I.K. Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith-Wiedemann syndrome centromeric locus in individuals with transient neonatal diabetes mellitus. *Human genetics*, 2006b; **119**(1-2):179–84.
- Meyer, E., Lim, D., Pasha, S., Tee, L.J., Rahman, F., Yates, J.R.W., Woods, C.G., Reik, W., Maher, E.R. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet*, 2009; **5**(3):e1000423.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; **16**(3):1215.
- Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P., Oshimura, M. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum Mol Genet*, 1999; **8**(7):1209–1217.
- Miyoshi, N., Kuroiwa, Y., Kohda, T., Shitara, H., Yonekawa, H., Kawabe, T., Hasegawa, H., Barton, S.C., Surani, M.A., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. Identification of the Meg1/Grb10 imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; **95**(3):1102–1107.
- Monk, D., Sanches, R., Arnaud, P., Apostolidou, S., Hills, F.A., Abu-Amero, S., Murrell, A., Friess, H., Reik, W., Stanier, P., Constância, M., Moore, G.E. Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet*, 2006; **15**(8):1259–1269.
- Monk, D., Wakeling, E.L., Proud, V., Hitchins, M., Abu-Amero, S.N., Stanier, P., Preece, M.A., Moore, G.E. Duplication of 7p11.2-p13, including GRB10, in Silver-Russell syndrome. *Am J Hum Genet*, 2000; **66**(1):36–46.
- Moore, M.W., Dietz, L.G., Tirtorahardjo, B., Cotter, P.D. A multiplex methylation PCR assay for identification of uniparental disomy of chromosome 7. *Hum Mutat*, 2003; **21**(6):645–648.
- Mouallem, M., Shaharabany, M., Weintrob, N., Shalitin, S., Nagelberg, N., Shapira, H., Zadik, Z., Farfel, Z. Cognitive impairment is prevalent in pseudohypoparathyroidism

- type Ia, but not in pseudopseudohypoparathyroidism: possible cerebral imprinting of G α . *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008; **68**(2):233–239.
- Niemitz, E.L., DeBaun, M.R., Fallon, J., Murakami, K., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A.P. Microdeletion of LIT1 in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *American journal of human genetics*, 2004; **75**(5):844–9.
- Onyango, P., Feinberg, A.P. A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; **108**(40):16759–64.
- Poole, R.L., Baple, E., Crolla, J.a., Temple, I.K., Mackay, D.J.G. Investigation of 90 patients referred for molecular cytogenetic analysis using aCGH uncovers previously unsuspected anomalies of imprinting. *American journal of medical genetics Part A*, 2010; **152A**(8):1990–3.
- Prawitt, D., Enklaar, T., G€rtner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Lausch, E., Schmidtke, P., Reutzel, D., Fees, S., Lucito, R., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D.E., Pelletier, J., Zabel, B. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; **102**(11):4085–90.
- Preece, M.A., Abu-Amero, S.N., Ali, Z., Abu-Amero, K.K., Wakeling, E.L., Stanier, P., Moore, G.E. An analysis of the distribution of hetero- and isodisomic regions of chromosome 7 in five mUPD7 Silver-Russell syndrome probands. *J Med Genet*, 1999; **36**(6):457–460.
- Reese, K.J., Lin, S., Verona, R.I., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3. *PLoS Genet*, 2007; **3**(8):e137.
- Rozen, S., Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 2000; **132**:365–386.
- Russell, A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc R Soc Med*, 1954; **47**(12):1040–1044.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B.,

- Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; **239**(4839):487–491.
- Salahshourifar, I., Halim, A.S., Sulaiman, W.A.W., Zilfalil, B.A. Maternal uniparental heterodisomy of chromosome 6 in a boy with an isolated cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*, 2010; **152A**(7):1818–1821.
- Scandura, J.M., Bocconi, P., Massagué, J., Nimer, S.D. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; **101**(42):15231–15236.
- Schönherr, N., Meyer, E., Roos, A., Schmidt, A., Wollmann, H.A., Eggermann, T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, 2007; **44**(1):59–63.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002; **30**(12):e57.
- Shiura, H., Miyoshi, N., Konishi, A., Wakisaka-Saito, N., Suzuki, R., Muguruma, K., Kohda, T., Wakana, S., Yokoyama, M., Ishino, F., Kaneko-Ishino, T. Meg1/Grb10 overexpression causes postnatal growth retardation and insulin resistance via negative modulation of the IGF1R and IR cascades. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; **329**(3):909–916.
- Shiura, H., Nakamura, K., Hikichi, T., Hino, T., Oda, K., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. *Hum Mol Genet*, 2009; **18**(8):1424–1438.
- Silver, H.K., Kiyasu, W., George, J., Deamer, W.C. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics*, 1953; **12**(4):368–376.
- Sparago, A., Russo, S., Cerrato, F., Ferraiuolo, S., Castorina, P., Selicorni, A., Schwienbacher, C., Negrini, M., Ferrero, G.B., Silengo, M.C., Anichini, C., Larizza, L., Riccio, A. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet*, 2007; **16**(3):254–264.
- Spence, J.E., Perciaccante, R.G., Greig, G.M., Willard, H.F., Ledbetter, D.H., Hejt-

- mancik, J.F., Pollack, M.S., O'Brien, W.E., Beaudet, A.L. Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet*, 1988; **42**(2):217–226.
- Spengler, D., Villalba, M., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Houssami, S., Bockaert, J., Journot, L. Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J*, 1997; **16**(10):2814–2825.
- Spengler, S. *Implementierung hochauflösender molekulargenetischer Methoden zur Klärung der Pathophysiologie des Silver-Russell-Syndroms*. Ph.D. thesis, Aachen, 2011.
- Spengler, S., Begemann, M., Ortiz Bröchle, N., Baudis, M., Denecke, B., Kroisel, P.M., Oehl-Jaschkowitz, B., Schulze, B., Raabe-Meyer, G., Spaich, C., Blümel, P., Jauch, A., Moog, U., Zerres, K., Eggermann, T. Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with silver-russell features. *J Pediatr*, 2012; **161**(5):933–942.e1.
- Temple, I.K., Cockwell, A., Hassold, T., Pettay, D., Jacobs, P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*, 1991; **28**(8):511–514.
- Temple, I.K., Gardner, R.J., Robinson, D.O., Kibirige, M.S., Ferguson, A.W., Baum, J.D., Barber, J.C., James, R.S., Shield, J.P. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. *Hum Mol Genet*, 1996; **5**(8):1117–1121.
- Temple, I.K., James, R.S., Crolla, J.A., Sitch, F.L., Jacobs, P.A., Howell, W.M., Betts, P., Baum, J.D., Shield, J.P. An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet*, 1995; **9**(2):110–112.
- Temple, I.K., Shrubbs, V., Lever, M., Bullman, H., Mackay, D.J.G. Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet*, 2007; **44**(10):637–640.
- Tsang, W.P., Ng, E.K.O., Ng, S.S.M., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J.Y., Kwok, T.T. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2010; **31**(3):350–8.
- Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; **4**(2):95–104.
- Turner, C.L.S., Mackay, D.M., Callaway, J.L.a., Docherty, L.E., Poole, R.L., Bullman, H., Lever, M., Castle, B.M., Kivuva, E.C., Turnpenny, P.D., Mehta, S.G., Mansour,

- S., Wakeling, E.L., Mathew, V., Madden, J., Davies, J.H., Temple, I.K. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *European Journal of Human Genetics*, 2010; **18**(6):648–655.
- Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Aknin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., Pavlidis, P., Journot, L. Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell*, 2006; **11**(5):711–722.
- Voss, R., Ben-Simon, E., Avital, A., Godfrey, S., Zlotogora, J., Dagan, J., Tikochinski, Y., Hillel, J. Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans? *Am J Hum Genet*, 1989; **45**(3):373–380.
- Wang, C.M., Dixon, P.H., Decordova, S., Hodges, M.D., Sebire, N.J., Ozalp, S., Fallahian, M., Sensi, A., Ashrafi, F., Repiska, V., Zhao, J., Xiang, Y., Savage, P.M., Seckl, M.J., Fisher, R.A. Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. *J Med Genet*, 2009; **46**(8):569–575.
- Wang, Z.Q., Fung, M.R., Barlow, D.P., Wagner, E.F. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. *Nature*, 1994; **372**(6505):464–467.
- Weksberg, R., Shuman, C., Beckwith, J.B. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2010; **18**(1):8–14.
- Wiedemann, H.R. The EMG-syndrome: exomphalos, macroglossia, gigantism and disturbed carbohydrate metabolism. *Z Kinderheilkd*, 1969; **106**(3):171–185.
- Wilkins, J.F., Haig, D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet*, 2003; **4**(5):359–368.
- Wollmann, H.A., Kirchner, T., Enders, H., Preece, M.A., Ranke, M.B. Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients. *Eur J Pediatr*, 1995; **154**(12):958–968.
- Wylie, A.A., Murphy, S.K., Orton, T.C., Jirtle, R.L. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res*, 2000; **10**(11):1711–1718.
- Yamasaki, K., Hayashida, S., Miura, K., Masuzaki, H., Ishimaru, T., Niikawa, N., Kishino, T. The novel gene, gamma2-COP (COPG2), in the 7q32 imprinted domain escapes genomic imprinting. *Genomics*, 2000; **68**(3):330–335.

- Yotova, I.Y., Vlatkovic, I.M., Pauler, F.M., Warczok, K.E., Ambros, P.F., Oshimura, M., Theussl, H.C., Gessler, M., Wagner, E.F., Barlow, D.P. Identification of the human homolog of the imprinted mouse Air non-coding RNA. *Genomics*, 2008; **92**(6):464–473.
- Zhang, X., Zhou, Y., Mehta, K.R., Danila, D.C., Scolavino, S., Johnson, S.R., Klibanski, A. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; **88**(11):5119–5126.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S., Reinberg, D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 1998; **95**(2):279–289.
- Zhou, Y., Zhong, Y., Wang, Y., Zhang, X., Batista, D.L., Gejman, R., Ansell, P.J., Zhao, J., Weng, C., Klibanski, A. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*, 2007; **282**(34):24731–24742.

Eigene Publikationen

- Begemann, M., Leisten, I., Soellner, L., Zerres, K., Eggermann, T., Spengler, S. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics*, 2012a; **7**(5).
- Begemann, M., Spengler, S., Gogiel, M., Grasshoff, U., Bonin, M., Betz, R.C., Dufke, A., Spier, I., Eggermann, T. Clinical significance of copy number variations in the 11p15.5 imprinting control regions: new cases and review of the literature. *J Med Genet*, 2012b; **49**(9):547–553.
- Begemann, M., Spengler, S., Kanber, D., Haake, A., Baudis, M., Leisten, I., Binder, G., Markus, S., Rupprecht, T., Segerer, H., Fricke-Otto, S., Mühlenberg, R., Siebert, R., Buiting, K., Eggermann, T. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet*, 2011; **80**(1):83–88.
- Begemann, M., Spengler, S., Kordass, U., Schröder, C., Eggermann, T. Segmental maternal uniparental disomy 7q associated with DLK1/GTL2 (14q32) hypomethylation. *Am J Med Genet A*, 2012c; **158A**(2):423–428.
- Begemann, M., Spengler, S., Schröder, C., Kordaß, U., Binder, G., Eggermann, T. Genetic and epigenetic findings in Silver-Russell syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2010; **8**(2):86–93.
- Binder, G., Begemann, M., Eggermann, T., Kannenberg, K. Silver-Russell syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011; **25**(1):153–160.
- Eggermann, T., Begemann, M., Binder, G., Spengler, S. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis*, 2010; **5**:19.
- Eggermann, T., Begemann, M., Gogiel, M., Palomares, M., Vallespín, E., Fernández, L., Cazorla, R., Spengler, S., García-Miñaur, S. Heterogeneous growth patterns in carriers of chromosome 7p12.2 imbalances affecting GRB10. *Am J Med Genet A*, 2012a; **158A**(11):2815–2819.
- Eggermann, T., Begemann, M., Soellner, L., Elbracht, M., Buiting, K., Horsthemke, B.,

- Spengler, S. Molekulargenetische Diagnostik von Imprintingkrankungen. *medizinische genetik*, 2013; pp. 1–9. ISSN 0936-5931.
- Eggermann, T., Leisten, I., Binder, G., Begemann, M., Spengler, S. Disturbed methylation at multiple imprinted loci: an increasing observation in imprinting disorders. *Epigenomics*, 2011a; **3**(5):625–637.
- Eggermann, T., Spengler, S., Begemann, M., Binder, G. Silver-Russell-Kleinwuchs. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2011b; **159**:576–582. ISSN 0026-9298.
- Eggermann, T., Spengler, S., Begemann, M., Binder, G., Buiting, K., Albrecht, B., Spranger, S. Deletion of the paternal allele of the imprinted MEST/PEG1 region in a patient with Silver-Russell syndrome features. *Clin Genet*, 2012b; **81**(3):298–300.
- Eggermann, T., Spengler, S., Gogiel, M., Begemann, M., Elbracht, M. Epigenetic and genetic diagnosis of Silver-Russell syndrome. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012c; **12**(5):459–471.
- Gogiel, M., Begemann, M., Spengler, S., Soellner, L., Göretzlehner, U., Eggermann, T., Strobl-Wildemann, G. Genome-wide paternal uniparental disomy mosaicism in a woman with Beckwith-Wiedemann syndrome and ovarian steroid cell tumour. *Eur J Hum Genet*, 2012; .
- Spengler, S., Begemann, M., Binder, G., Eggermann, T. Genetik und Epigenetik des Silver-Russell-Syndroms. *medizinische genetik*, 2010; pp. 405–410.
- Spengler, S., Begemann, M., Binder, G., Eggermann, T. Testing of buccal swab DNA does not increase the detection rate for imprinting control region 1 hypomethylation in Silver-Russell syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011; **15**(10):725–726.
- Spengler, S., Begemann, M., Ortiz Bröchle, N., Baudis, M., Denecke, B., Kroisel, P.M., Oehl-Jaschkowitz, B., Schulze, B., Raabe-Meyer, G., Spaich, C., Blümel, P., Jauch, A., Moog, U., Zerres, K., Eggermann, T. Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with silver-russell features. *J Pediatr*, 2012; **161**(5):933–942.e1.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Begemann
Vorname	Matthias
Geburtstag	26.01.1982
Geburtsort	Duisburg

Ausbildung

Juni 2001	Allgemeine Hochschulreife an der FWS Niederrhein in Dinslaken
April 2002	Studium der Chemie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Oktober 2002	Grundstudium Diplom-Biologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
August 2004	Vordiplom Biologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
ab August 2004	Hauptstudium Diplom-Biologie an der RWTH Aachen
Mai 2008-2009	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum der RWTH Aachen Thema der Abschlussarbeit: Generierung stabiler Zelllinien für verschiedene Zystennierenproteine zur näheren Charakterisierung ihrer subzellulären Lokalisation und Funktion (Betreuer: PD Dr. med. Carsten Bergmann) Abschluss: Diplom-Biologe
ab Juni 2009	Promotionsstudent am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum der RWTH Aachen Dissertation zum Thema: Einzellokus- und Multilokus-Methylierungsstörungen beim Silver-Russell-Syndrom: Häufigkeiten und funktionelle Relevanz (Betreuer: Prof. Dr. T. Eggermann)

Berufstätigkeit

seit Juni 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion
----------------	---

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Eggermann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, andauernde und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie die wertvollen Ideen und Anregungen.

...Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann vom Institut für Biologie II der RWTH Aachen für seine freundliche Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

...Herrn Prof. Dr. med. K. Zerres für die Möglichkeit diese Dissertation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchzuführen.

...Den Patienten und ihren Familien für die freundliche Erlaubnis an den zur Verfügung gestellten Proben Untersuchungen vorzunehmen und die Daten für meine Dissertation zu verwenden.

...den auswärtigen Einsendern für die Bereitstellung des Probenmaterials, die Entnahme der Hautbiopsien und die Erhebung klinischer Daten.

...Den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die wertvolle Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

...Frau Dr. rer. nat. Sabrina Spengler für hervorragende Zusammenarbeit sowie die anregenden Diskussionen und Unterstützung, insbesondere bei der Analyse der SNP-Array Daten und den Methylierungsassays.

...Frau TÄ Nadina Ortiz Brühle für die wertvolle Unterstützung bei der Gestaltung und Auswertung der Genexpressionsanalysen und die angenehme Zusammenarbeit.

...Meinen Kollegen, Andreas Venghaus und Jennifer von Bothmer für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung.

...Magdalena Gogiel und Lukas Soellner für die Hilfe bei der Durchführung der Analysen.

...Den Mitarbeiter des Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen für ihre Mitarbeit und die durchgeführten Untersuchungen.

...Den Mitarbeitern des Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel für die Sequenzierung des *NLRP2*-Gens.

...Meinen Eltern und meiner Familie für den immerwährenden Rückhalt.

...Jessica und Leonard, für ihren bedingungslosen und liebevollen Beistand und ihre Geduld.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Netzwerk „Imprintingkrankungen“, 01GM0884).

This study makes use of data generated by the DECIPHER Consortium. A full list of centres who contributed to the generation of the data is available from <http://decipher.sanger.ac.uk> and via email from decipher@sanger.ac.uk. Funding for the project was provided by the Wellcome Trust.