

***Charakterisierung der DNA-Methylierung geprägter Gene im  
Kontext physiologischer und gestörter Entwicklung und  
somatischer Differenzierung***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Julia Kolarova

Kiel, 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Reiner Siebert

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2015

Zum Druck genehmigt: 21.07.2015

Gez. der Dekan Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang J. Duschl

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epigenetik und epigenetische Regulationsmechanismen</b>	<b>1</b>
<b>1.2 DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Imprinting als Teilaspekt der Epigenetik</b>	<b>5</b>
1.3.1 Regulatorische Elemente von Imprintingclustern	6
1.3.2 Beispiel eines Imprintingclusters	7
1.3.3 Bestimmung differenziell methylierter Regionen geprägter Gene	9
1.3.4 Imprinting in der Embryogenese	10
1.3.5 Imprinting in der Phylogenese	12
1.3.6 Imprinting-Netzwerk	13
<b>1.4 Gestörte DNA-Methylierung geprägter Gene</b>	<b>14</b>
1.4.1 Imprintingfehler	15
1.4.2 Klassische Imprintingsyndrome	16
1.4.3 Multi-Locus Methylierungsdefekt	19
1.4.4 Imprinting und Entwicklungsstörungen	21
1.4.5 Multifaktorielle Erkrankungen und der Einfluss der DNA-Methylierung	23
1.4.6 DNA-Methylierung und Tumorentstehung	23
<b>1.5 DNA-Methylierung geprägter Gene in induzierten pluripotenten Stammzellen</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>28</b>
2.1.1 Probenmaterialien für die DNA-Methylierungsanalyse geprägter Gene	28
2.1.2 Kontrollen	44
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	45
2.1.4 Geräte und Zubehör	47
2.1.5 Kits	48
2.1.6 Software	49
2.1.7 Puffer und Lösungen	50
2.1.8 Primersequenzen	51

<b>2.2 Methoden</b>	<b>53</b>
2.2.1 DNA-Extraktion	54
2.2.2 Quantifizierung der DNA mithilfe eines Fluorometers	55
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	56
2.2.4. SNP-Array Analyse	56
2.2.5. Mikrosatellitenanalyse	58
2.2.6. Methylierungs-spezifische multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation	61
2.2.7 Herstellung der gesamtgenom-amplifizierten DNA aus Pool-DNA	65
2.2.8 Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA	67
2.2.9 Regionen-spezifische DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung	70
2.2.10 Bestimmung der DNA-Methylierung mittels BeadChip Technologie	78
2.2.11 Angewandte statistische Verfahren	81
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>92</b>
<b>3.1 Technische Aspekte und Qualitätskontrolle bei den durchgeführten Analysen</b>	<b>92</b>
3.1.1 Übersicht über die verwendeten Gewebe für die einzelnen Teilprojekte	92
3.1.2 Verwendete BeadChip Arrays	95
3.1.3 Qualitätskontrolle der mittels BeadChip generierten DNA-Methylierungsdaten	95
<b>3.2 Abhängigkeit der DNA-Methylierung von der Fixiermethode</b>	<b>98</b>
<b>3.3 DNA-Methylierung geprägter Gene in verschiedenen Normalgeweben</b>	<b>104</b>
3.3.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in pränatal entnommenen Normalgeweben	104
3.3.2 DNA-Methylierung geprägter Gene in postnatal entnommenen Normalgeweben	110
<b>3.4 Erworbene Veränderung der DNA-Methylierung am Beispiel zweier somatischer Erkrankungen</b>	<b>113</b>
3.4.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in verschiedenen Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung	113
3.4.2 DNA-Methylierung geprägter Gene bei kolorektalen Karzinom	122
<b>3.5 Analysen der DNA-Methylierung in Patientenkollektiven mit verschiedenen Entwicklungsstörungen</b>	<b>128</b>
3.5.1 DNA-Methylierung geprägter Gene bei zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht geborenen Kindern	129
3.5.2 DNA-Methylierung geprägter Gene bei Patienten mit Blasenektrophie	143
3.5.3 DNA-Methylierung geprägter Gene bei Patienten mit mentaler Retardierung	150

<b>3.6 Multiple DNA-Methylierungsstörung</b>	<b>158</b>
3.6.1 Verifizierung der Befunde der DNA-Methylierungsanalyse des Patientenkollektivs mit DNA-Methylierungsstörungen an mehreren Genorten	161
<b>3.7 DNA-Methylierung geprägter Gene bei induzierten pluripotenten Stammzellen und deren     Ursprungszellen</b>	<b>163</b>
<b>3.8 Zusammenfassung der vorgestellten Ergebnisse</b>	<b>168</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>170</b>
<b>4.1 Technische Aspekte</b>	<b>170</b>
4.1.1 Gewebefixierung	170
4.1.2 DNA-Extraktion	173
4.1.3 Natriumbisulfit-Konvertierung	174
4.1.4 BeadChip Technologie	175
4.1.5 Verifizierung einzelner Infinium HumanMethylation450 BeadChip Ergebnisse	180
4.1.6 Veränderung der physiologischen DNA-Methylierung somatisch geprägter Gene mit steigendem Alter	181
<b>4.2. Gewebespezifität geprägter Gene</b>	<b>182</b>
4.2.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in humanen Keimzellen	182
4.2.2 Plazenta-spezifisch geprägte DMRs	184
4.2.3 Somatisch geprägte DMRs	186
<b>4.3 Krankheits-spezifische Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene</b>	<b>189</b>
4.3.1 Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene beispielhaft analysiert an zwei somatischen Erkrankungen	189
4.3.2 Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene bei konstitutionellen Erkrankungen	196
<b>4.4 DNA-Methylierung in Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen</b>	<b>211</b>
<b>4.5 Fazit</b>	<b>212</b>
<b>4.6 Ausblick</b>	<b>213</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>214</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>216</b>
<b>7 REFERENZEN</b>	<b>218</b>

<b>8 ANHANG</b>	<b>238</b>
<b>8.1 Korrelationsmatrices</b>	<b>238</b>
<b>8.2 Elektronischer Anhang</b>	<b>248</b>
<b>9 DANKSAGUNG</b>	<b>249</b>
<b>10 LEBENSLAUF</b>	<b>250</b>
<b>11 PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>251</b>
<b>11.1 Originalarbeiten</b>	<b>251</b>
<b>11.2 Veröffentlichte Tagungsbeiträge</b>	<b>252</b>
<b>11.3 Nicht veröffentlichte Tagungsbeiträge</b>	<b>254</b>
<b>12 ERKLÄRUNG</b>	<b>255</b>

Übersichtshalber sind im Inhaltsverzeichnis nur die Hierarchieebenen 1 bis 4 angegeben.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-caC	5-Carboxylcytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
AC	Amniozentese
APS	Adenosinphosphosulfat
ART	assistierte Reproduktion
AS	Angelman Syndrom
ATG-Kit	AmpliTaq Gold Kit
ATP	Adenosintriphosphat
AVG-Beta	average Beta, DNA-Methylierungslevel eines CpG Locus
BARI	bariatrische Operation
BEK	Blasenektrophie-Epispadie-Komplex
<i>BLCAP</i>	bladder cancer associated protein
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	Body-Mass-Index (Körpermassenindex)
bp	Basenpaar
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
<i>CABIN1</i>	calcineurin binding protein 1
<i>CDKN1C</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
cg	Infinium HumanMethylation450 BeadChip Bezeichnung einer Sonde die ein CpG Locus repräsentiert
ch	Infinium HumanMethylation450 BeadChip Bezeichnung einer Sonde die ein nicht-CpG Locus repräsentiert
Chr. 15 imp. Region	Chromosome 15 imprinted Region
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRC	kolorektales Karzinom
CSV-Datei	Dateiformat, Comma-separated values
CTCF	CCCTC-binding factor
CV	chorionic velle (Chorionzotten)
dATPαS	Desoxyadenosin-Alpha-Thiotriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidest
DetPval	detection P-value
dGDP	Desoxyguanosindiphosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>DLK1</i>	delta-like homolog 1
DMR	differenziell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPH-Gestose	edema-proteinuria-hypertension Gestose (Ödeme-Proteinurie-Hypertonie Gestose)
<i>FAM20A</i>	family with sequence similarity 20, member A
<i>FAM50B</i>	family with sequence similarity 50, member B
FBHM	familiäre biparentale hydatiforme Molen
FDR	false discovery rate
Fib	Fibroblasten
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GH	growth hormone (Wachstumshormon)
<i>GLI2</i>	GLI family zinc finger 2
<i>GRB10</i>	growth factor receptor-bound protein 10
GS	GenomeStudio
h	Stunden
<i>H19</i>	H19, imprinted maternally expressed transcript
H3K27	Aminosäure Lysin (K) an Position 27 in der unstrukturierten Domäne des Histonproteins H3
H3K4	Aminosäure Lysin (K) an Position 4 in der unstrukturierten Domäne des Histonproteins H3
H3K9	Aminosäure Lysin (K) an Position 9 in der unstrukturierten Domäne des Histonproteins H3
HM	Heatmap
HT	Hybridisierungstemperatur
IC	imprinting centre
ICR	imprinting control region (Imprintingkontrollregion)
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
ID	Identifikationsnummer
IDAT	intensity data
<i>IGF2</i>	insulin-like growth factor 2
<i>INPP5Fv2</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase F isoform 2
iPSZ	induzierte pluripotente Stammzelle
IVF	In-vitro-Fertilisation
kA	keine Angabe
<i>KCNQ1</i>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
<i>KCNQ1OT1</i>	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1
kg	Kilogramm
<i>KHDC3L</i>	KH domain containing 3-like, subcortical maternal complex member
l	Liter

## Abkürzungsverzeichnis

---

LDR	loci detection rate (Loci-Detektions-Rate)
<i>LIN28B</i>	lin-28 homolog B
lncRNA	long non coding RNA (nicht-kodierende RNA größer 200 Nukleotide)
LOI	loss of imprinting (gestörte Expression geprägter Gene)
M	molar
m	männlich
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mat	maternale
Mb	Megabasen (1.000.000 Basenpaare)
MBD	methyl-CpG bindende Domäne
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1
Median(R)	Median über alle Korrelationskoeffizienten einer Probe in der Gesamtkorrelationsanalyse
<i>MEG3</i>	maternally expressed 3
<i>MEG8</i>	maternally expressed 8
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	micro ribonucleic acid (Mikro-Ribonukleinsäure)
MK	methylierte Kontrolle
ml	Milliliter
MLMD	Multi-Locus Methylierungsdefekt
MLPA	multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation
mM	millimolar
MR	mentale Retardierung
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS-MLPA	Methylierungs-spezifische multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation
MW	Mittelwert
MWT	Mittelwert der Kontrollen
N	Normalgewebe
n	Anzahl
NA	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung)
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	non-alcoholic steatohepatitis (nicht-alkoholische Fettleberhepatitis)
ncRNA	non coding ribonucleic acid (nicht kodierende-Ribonukleinsäure)
ng	Nanogramm
<i>NLRP2</i>	NLR family, pyrin domain containing 2
<i>NLRP7</i>	NLR family, pyrin domain containing 7
NMB	normaler DNA-Methylierungsbereich
OP	Operation
p	Signifikanzwert
pat	paternale
pB	peripheres Blut
pb	Basenpaar

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCA	principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKZ	primordiale Keimzelle
<i>PLAGL1</i>	pleiomorphic adenoma gene-like 1
PM	perfect match
PM-Kit	PyroMark PCR Kit
pmol	picomolar
PPi	Pyrophosphat
Proben Nr.	Probennummer
PWS	Prader-Willi Syndrom
q	FDR (false discovery rate) Level
R	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RE	Restriktionsenzym
<i>RGMA</i>	repulsive guidance molecule family member a
RNA	Ribonukleinsäure
rs Loci	Infinium HumanMethylation450 BeadChip Bezeichnung für eine Sonde, die einen SNP repräsentiert
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Substrat
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionen
SD	Standardabweichung
SGA	small for gestational age (zu klein und/oder zu leicht für das Geburtsalter und Geschlecht geboren)
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering ribonucleic acid (kleine interferierende Ribonukleinsäure)
SLMD	Single-Locus Methylierungsdefekt
SNP	single nucleotid polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SRS	Silver-Russell Syndrom
SZ	Stammzelle
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNM-Klassifikation	Codesystem aus Buchstaben und Zahlen das den Tumor (T), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt
TP	Teilprojekt
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TS	Temple Syndrom
<i>TSIX</i>	TSIX Transcript, XIST antisense RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
Tu	Tumorgewebe
U	Uracil
u.a.	unter anderem
<i>UBE3A</i>	ubiquitin protein ligase E3A

## Abkürzungsverzeichnis

---

UPD	uniparentale Disomie
V	Volt
vergl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i> (gegen)
w	weiblich
WDR27	WD repeat domain 27
WGA	whole genome amplification (gesamtgenom-amplifiziert)
xg	-faches der Erdbeschleunigung
XIST	X inactive specific transcript
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
ZFP57	ZFP57 zinc finger protein
ZNF331	zinc finger protein 331
ZNF597	zinc finger protein 597

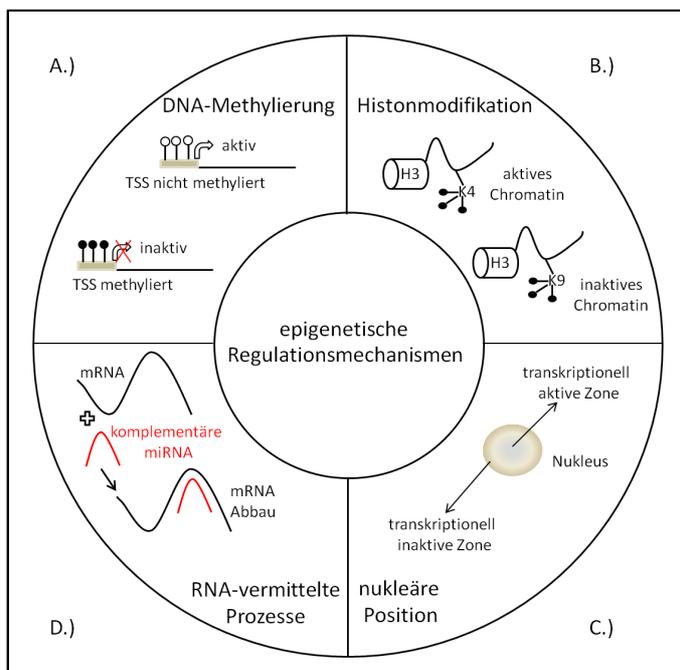
Anmerkung: Die Gennamen wurden nicht in die deutsche Sprache übersetzt sondern sind nur in Englischer Sprache angegeben und stammen von der Internetseite GeneCards (<http://www.genecards.org/>, Stand April 2015).

# 1 Einleitung

## 1.1 Epigenetik und epigenetische Regulationsmechanismen

Der Begriff "Epigenetik" wurde von Conrad Hall Waddington (1905-1975) geprägt [1]. Er beschrieb mit diesem Ausdruck die Interaktion von Genen und Genproduktion, die gemeinsam für einen Phänotyp verantwortlich sind [1]. Heute werden unter dem Begriff "Epigenetik" zelluläre Mechanismen zusammengefasst, die einen Einfluss auf die Genexpression haben, nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz hervorgerufen werden, modifizierbar sind und sowohl mitotisch als auch meiotisch vererbbar sein können [2].

Zu den epigenetischen Mechanismen zählen die Modifikation von DNA und Histonproteinen, die Expressionskontrolle durch RNA-vermittelte Prozesse und die nukleäre Position von Genen [3] (siehe Abbildung 1). Auf diese Mechanismen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.



**Abbildung 1:** Die epigenetischen Regulationsmechanismen. A.) Die DNA-Methylierung (ausgefüllte Kreisstrukturen) an Transkriptionsstartstellen (TSS) führt zur Stilllegung der nachgeschalteten Gene. B.) Die Trimethylierung von Lysin an Position 4 der N-terminalen Domäne des Histons H3 deutet auf aktives Chromatin, die Trimethylierung von Lysin an Position 9 deutet auf inaktives Chromatin hin. C.) Der Nukleus ist unterteilt in transkriptionell aktive Bereiche und transkriptionell inaktive Bereiche. D.) Mithilfe komplementärer miRNA Moleküle kann der gezielte Abbau von mRNA reguliert werden.

- nukleäre Position:

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Zellkern in transkriptionell aktive und inaktive Kompartimente aufgeteilt werden kann. Dabei liegen in der Peripherie eher inaktive Gene und in der Zellkernmitte eher aktiv transkribierte Gene [4].

- RNA-vermittelte Prozesse:

Die Expressionskontrolle durch RNA-vermittelte Prozesse kann auf verschiedene Art und Weise die Aktivität eines Gens regulieren. Bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms kommen z.B. zwei

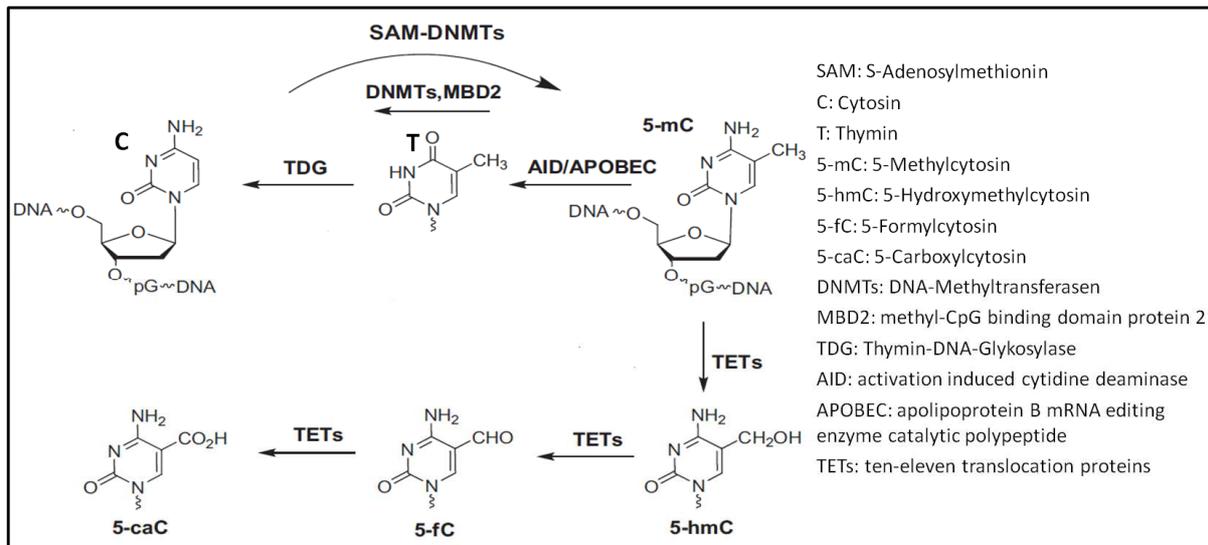
verschiedene RNA-vermittelte Mechanismen zum Tragen. Auf dem zu inaktivierenden X-Chromosom wird die nicht-kodierende RNA (non coding RNA, ncRNA) *XIST* exprimiert, welche an bestimmte Regionen des X-Chromosoms bindet und damit die Inaktivierung unterstützt. Auf dem aktiven X-Chromosom wird dagegen die antisense-RNA *TSIX* exprimiert, die auf diesem Chromosom die Expression von *XIST* verhindert [5]. Ein weiteres Beispiel RNA-vermittelter Expressionskontrolle ist der Mechanismus der RNA-Interferenz. Über diesen Mechanismus können kleine nicht-kodierende RNAs (micro RNA, miRNAs) den Abbau bestimmter mRNAs fördern [6]. Weitere RNA-Moleküle, die kleinen interferierenden RNAs (small interfering RNA, siRNAs), scheinen bei den Prozessen der DNA- und Histonmodifikation eine Rolle zu spielen und beeinflussen die Genexpression so indirekt [6].

- Histonmodifikationen:

Die DNA bildet u.a. zusammen mit den Histonproteinen das Chromatin [7]. Acht Histonproteine, jeweils zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4, vereinigen sich zum sogenannten Histonoktamer [8]. Dabei ist jedes Histonprotein aus einer globulären C-terminalen Domäne und einer unstrukturierten N-terminalen Domäne aufgebaut [9]. An die Aminosäurereste der N-terminalen Domäne können, durch enzymatische Prozesse reguliert, Modifikationen angebracht werden, die u.a. Einfluss auf die Bindestärke zwischen DNA-Strang und Histonoktamer haben. Diese Modifikationen, z.B. Phosphorylierung, Azetylierung und Methylierung der Aminosäurereste, werden auch als "Histoncode" bezeichnet [10]. Bisher sind nicht alle Auswirkungen dieses Histoncodes auf die Transkriptionsaktivität des betroffenen DNA-Abschnitts entschlüsselt. Für einige der Modifikationen ist jedoch die Wirkung auf die Transkriptionsaktivität bekannt. So findet sich in transkriptionell aktiven DNA-Bereichen häufig eine Trimethylierung von Histon H3 an der Aminosäure Lysin an Position 4 des unstrukturierten N-Terminus (auch als H3K4 bezeichnet) [11]. Dagegen ist in Heterochromatin, einem transkriptionell inaktiven Bereich, die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin an der Position 9 (H3K9) sowie an der Position 27 (H3K27) charakteristisch [12].

- Modifikationen der DNA:

DNA-Methylierung und Histonmodifikation sind epigenetische Mechanismen die stark miteinander interagieren [13]. Die DNA-Methylierung erfolgt beim Menschen primär an einem Cytosin (5-mC) in einem Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG). Dieses methylierte Cytosin wird häufig auch als "fünfte Base" der DNA bezeichnet [14]. Heutzutage wird eine weitere direkte Cytosinmodifikation, die Hydroxymethylierung von Cytosin (5-hmC), als "sechste Base" der DNA diskutiert [15]. Diese "sechste Base" scheint durch enzymatisch gesteuerte oxidative Reaktionen aus 5-mC hervorzugehen (siehe Abbildung 2). Dabei entstehen weitere Produkte, 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxylcytosin (5-caC), deren Funktionen noch zu klären bleiben [16].

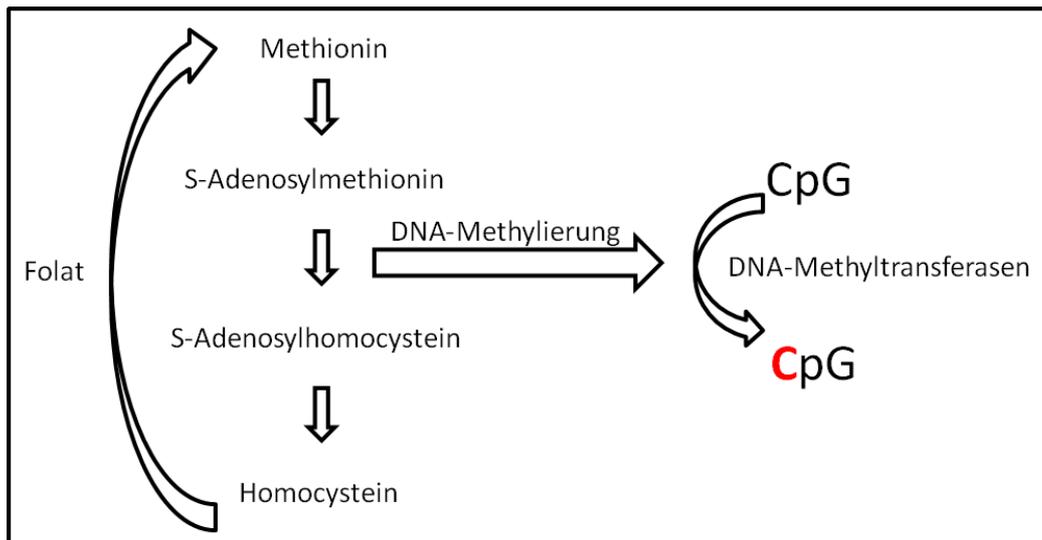


**Abbildung 2: Entstehung von Cytosin-Modifikationen der DNA.** Für die Methylierung von Cytosin (C) zu 5-Methylcytosin (5-mC) wird S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor benötigt. Dieser Prozess wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Die Umwandlung von 5-mC über Thymin (T) zu Cytosin erfolgt mithilfe der folgenden Faktoren: AID (activation induced cytidine deaminase), APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide), MBD2 (methyl-CpG binding domain protein 2), DNMTs und TDG (Thymin-DNA-Glykosylase). 5-mC kann durch die TET Enzyme (ten-eleven translocation proteins) zunächst zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) und anschließend weiter zu 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxylcytosin (5-caC) umgewandelt werden. (Abbildung modifiziert nach Cadet et al. (2014) [16])

## 1.2 DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus

Der Fokus der hier vorgestellten Arbeit liegt auf der DNA-Methylierung als epigenetische Modifikation. Wie bereits erwähnt erfolgt die Cytosinmethylierung zumeist an einer Cytosin-Base, der direkt eine Guanin-Base in der DNA-Sequenz folgt [17]. Bei dieser Sequenz von zwei Nukleotiden spricht man von einem CpG-Dinukleotid. Etwa 70 % - 80 % aller menschlichen CpG-Dinukleotide liegen methyliert vor [18]. Prinzipiell können auch andere Dinukleotide, z.B. eine Cytosin-Base gefolgt von einer Adenin-Base, methyliert werden. Dies wird dann als non-CpG Methylierung bezeichnet [19].

Die Methylgruppe wird von dem Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) auf das Cytosin der DNA übertragen. Dabei entsteht S-Adosylhomocystein (SAH) [20]. Der Kreislauf von SAM und SAH (siehe Abbildung 3) benötigt Co-Faktoren, die im menschlichen Organismus nicht oder nur in geringen Mengen hergestellt werden können [21]. So ist z.B. Methionin ein wichtiger Bestandteil des Kreislaufs. Diese essenzielle Aminosäure muss dem Körper zugeführt werden [22]. Weiterhin zählt Folat zu den essenziellen Vitaminen [23], um nur zwei der wichtigen Co-Faktoren des DNA-Methylierungskreislaufs zu nennen. Fehlen diese Substanzen, z.B. aufgrund einer nicht ausgewogenen Ernährung, kann der DNA-Methylierungsprozess nicht ordnungsgemäß ablaufen. Dies kann die Expression von Genen direkt beeinflussen [21].



**Abbildung 3:** Ausschnitt aus dem DNA-Methylierungskreislauf. S-Adenosylmethionin ist der Methylgruppendonor des Kreislaufs. Für die Synthese von S-Adenosylmethionin wird u.a. Methionin benötigt. Nach der Abgabe der Methylgruppe, welche von der DNA-Methyltransferase u.a. für die DNA-Methylierung von Cytosin in CpG-Dinukleotiden verwendet wird (fett rot markiertes Cytosin liegt methyliert vor), entsteht S-Adenosylhomocystein. Für die Regenerierung von Methionin aus Homocystein wird Folat benötigt. (Abbildung modifiziert nach Lee et al. (2009) [24])

Die Methylgruppe wird durch DNA-Methyltransferasen von SAM auf das Cytosin übertragen. Für den Erhalt der DNA-Methylierung während der Zellteilung ist die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) verantwortlich [25]. Für die *de novo* DNA-Methylierung, z.B. infolge von Zelldifferenzierungsprozessen, sind die DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B verantwortlich [25]. Die Methylgruppen können aktiv entfernt werden [26].

CpG-Dinukleotide sind innerhalb des Genoms nicht gleichverteilt sondern treten in der DNA-Sequenz gehäuft in sogenannten CpG-Inseln auf. Als CpG-Inseln werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die 200 bp lang sind, einen CpG-Gehalt von 50 % aufweisen und bei denen der erwartete CpG-Gehalt zum tatsächlichen CpG-Gehalt größer 0,6 ist [27]. CpG-Inseln treten häufig in einiger Entfernung zu Transkriptionsstartstellen (transcription start site, TSS) auf [28]. Über die CpG-Methylierung an diesen TSSs kann die Expression der darüber kontrollierten Gene reguliert werden. Dabei inhibieren methylierte CpG-Inseln in der Regel die Expression des nachgeschalteten Gens [28]. Die Expressionshemmung kann einerseits dadurch erfolgen, dass für die Transkription benötigt Faktoren nicht an den Promotor binden können (direkter Mechanismus) [29]. Andererseits können transkriptionshemmende Faktoren, die durch die DNA-Methylierung rekrutiert werden, eine Expression verhindern (indirekter Mechanismus) [29]. Die Transkriptionshemmung scheint hauptsächlich durch den indirekten Mechanismus, über die Rekrutierung von methyl-CpG binding domain (MBD) Proteinen, zu erfolgen [30]. Auch wenn die Mehrzahl der isolierten CpGs im Genom methyliert vorliegen, sind die CpGs in den CpG-Inseln von Promotoren vor allem während der Entwicklung und physiologisch bei transkriptionell aktiven Genen meist unmethyliert [31].

### 1.3 Imprinting als Teilaspekt der Epigenetik

CpG-Inseln spielen insbesondere auch für die Regulation von Genen eine Rolle, die in elterlich geprägten Regionen liegen [32]. Erste Experimente zeigten bereits im Jahre 1984, dass für die normale Entwicklung von Säugetieren sowohl ein maternales als auch ein paternales Genom benötigt werden [33]. Diese Beobachtungen wurden durch die Entdeckung von ausschließlich maternal oder paternal exprimierten Genen gestützt [34]. Dieses Phänomen der spezifischen Expression von Genen abhängig von der elterlichen Herkunft des Allels wird als "Imprinting" oder auch "genomische Prägung" bezeichnet [35]. Heutzutage sind über 80 geprägte Gene bekannt (Beispiele in Tabelle 1 zusammengestellt) [36].

**Tabelle 1:** Auswahl einiger geprägter Gene aus <http://igc.otago.ac.nz/1101Summary-table.pdf> (Zugriff: 15.03.2015)).

chromosomale Lokalisation	Transkriptionseinheit	funktionelle Einheit	aktives Allel
6q24	<i>HYMAI, PLAGL1</i>		pat
6q25	<i>IGF2R</i>		mat
7p12	<i>GRB10</i>		mat/pat <sup>1</sup>
7q32.2	<i>MEST</i>		pat
11p15	<i>H19, KCNQ1, CDKN1C</i>		mat
	<i>IGF2, KCNQ1OT1</i>		pat
13q14	<i>RB1</i>		mat
14q32	<i>DLK1, DIO3</i>		pat
	<i>MEG3, MEG8</i>		mat
15q11q12	<i>MKRN3, MAGL2, NDN</i>		pat
	<i>SNURF-SNRPN</i>	<i>SNURF</i>	pat
		<i>SNRPN</i>	pat
		<i>SNORD107</i>	pat
		<i>SNORD64</i>	pat
		<i>UBE3A-AS</i>	pat
<i>UBE3A</i>		mat	
20q11.23	<i>NNAT, L3MBTL</i>		pat
	<i>BLCAP</i>		mat/pat <sup>1</sup>
20q13	<i>GNAS</i>	<i>NESP55</i>	mat
		<i>GNAS XL</i>	pat
		<i>Exon-1A</i>	pat
		<i>GS-alpha</i>	mat

Abkürzungen: pat: Expression vom paternalen Allel, mat: Expression vom maternalen Allel, <sup>1</sup>: Expression abhängig von der Isoform und dem Transkript

Diese geprägten Gene sind zumeist in sogenannten "Imprintingclustern" organisiert, die beim Menschen u.a. auf Chromosom 6, 7, 11, 14, 15 und 20 vorkommen [37]. Das heißt, mehrere geprägte Gene liegen in räumlicher Nähe und deren Expression wird gemeinsam von einer Imprinting-Kontrollregion (imprinting control region, ICR) kontrolliert [38]. Diese Kontrollregionen sind meist durch Eltern-spezifische DNA-Methylierungsmuster gekennzeichnet und werden daher auch als differenziell methylierte Regionen (DMR) bezeichnet [39]. Wird der DNA-Methylierungszustand einer

solchen geprägten DMR analysiert, liegt der zu erwartende DNA-Methylierungswert um 50 %, da das eine elterliche Allel unmethyliert und das andere elterliche Allel methyliert vorliegen [40].

### **1.3.1 Regulatorische Elemente von Imprintingclustern**

Im Genom können verschiedene differenziell methylierte Regionen unterschieden werden. Neben den DMRs in parental geprägten Regionen wurden u.a. Gewebe-spezifische DMRs (tissue DMRs) und Tumor-spezifische DMRs (cancer DMRs) beschrieben [41]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich DMRs untersucht, die der genomischen Prägung (Imprinting) unterliegen. Daher sollen diese im Folgenden detailliert vorgestellt werden.

DMRs geprägter Regionen zeichnen sich dadurch aus, dass sie auf einem parental Allel methyliert und auf dem anderen unmethyliert vorliegen. Abhängig von dem entwicklungsbiologischen Zeitpunkt der Entstehung werden sie in zwei Klassen unterteilt [42]. Die DNA-Methylierung der primären oder Keimbahn DMRs wird während der Gametogenese als *de novo* DNA-Methylierung, über DNMT3A vermittelt, gesetzt [43]. Die Mehrzahl der primären DMRs werden in den Oozyten methyliert und betreffen damit das maternale Allel. Nur wenige primäre DMRs gehen aus der Spermatogenese hervor und betreffen somit das paternale Allel [44]. Die zweite DMR Gruppe bilden die sogenannten sekundären oder somatischen DMRs. Diese sind im Sinne einer hierarchischen Ordnung abhängig von der Etablierung der primären DMR und entstehen erst nach der Fertilisation [45].

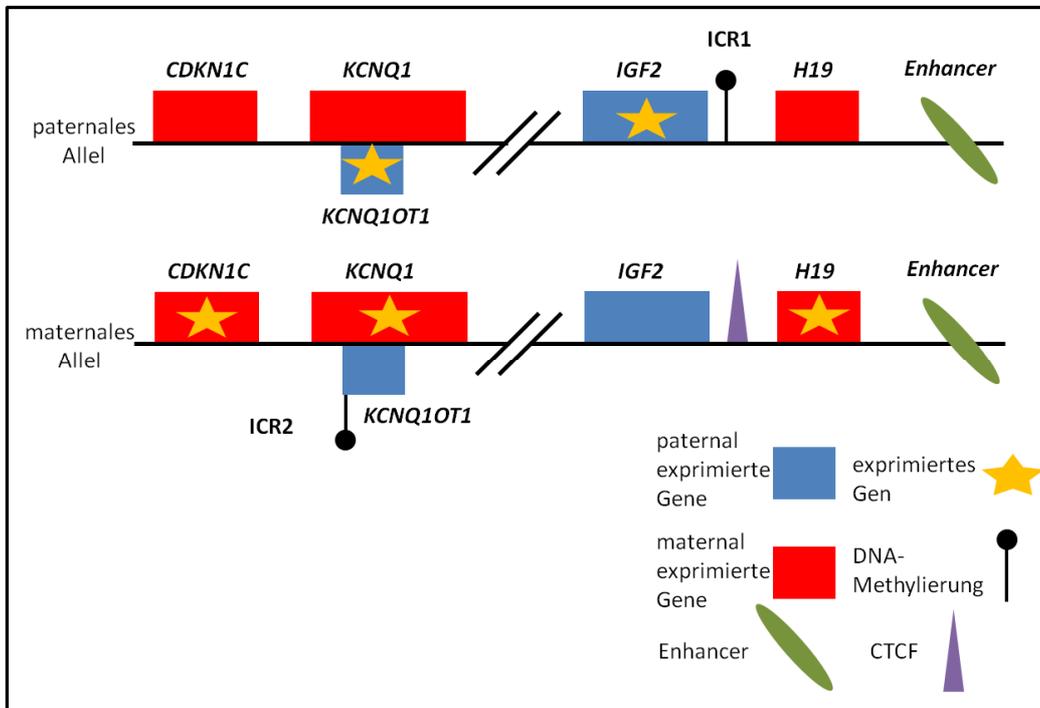
Abhängig vom DNA-Methylierungszustand einer DMR können z.B. Proteine mit methyl-CpG bindenden Domänen (MBD) rekrutiert werden, an den assoziierten Promotor binden und darüber die Transkription regulieren [28].

Weitere wichtige Elemente, die zur Regulation eines Imprintingclusters beitragen, sind die sogenannten Isolator- und Enhancer-Elemente [46], [47]. Ein Isolator-Element kann zwei Funktionen ausüben. Es kann zum einen als Barriere zwischen z.B. transkriptionell aktivem (Euchromatin) und inaktivem Chromatin (Heterochromatin) liegen und damit die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern [47]. Zum anderen kann es aber auch die aktivierende Wirkung eines Enhancer blockieren [47]. Als Enhancer wird eine bestimmte DNA-Sequenzabfolge bezeichnet, welche die Wechselwirkung zwischen Promotor und Transkriptionsmaschinerie verstärkt [48]. Der Enhancer kann dabei viele tausend Basenpaare 5' oder 3' des zu aktivierenden Promotors liegen. Durch Chromatinumbau wird er in räumliche Nähe zum entsprechenden Promotor gebracht [49].

Das Zusammenspiel zwischen DNA-Methylierung einer DMR sowie Enhancer- und Isolator-Elementen soll im Folgenden am Beispiel eines Imprintingclusters beschrieben werden.

### 1.3.2 Beispiel eines Imprintingclusters

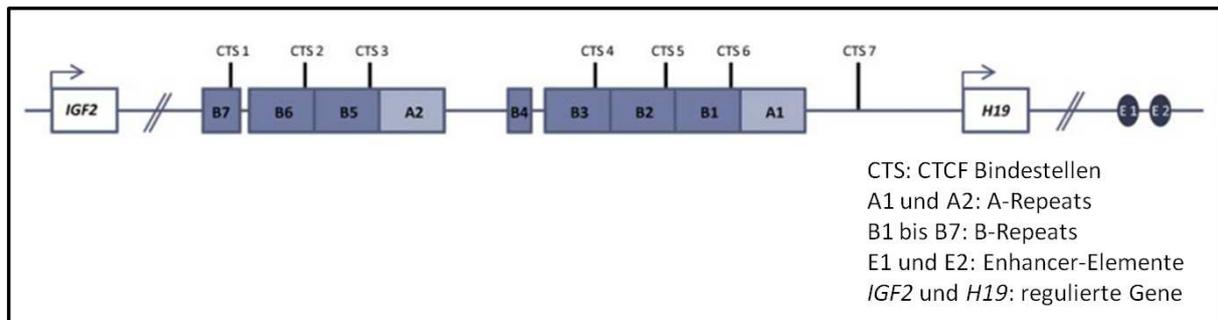
Ein sehr gut charakterisiertes Imprintingcluster liegt auf Chromosom 11p15. Dieses Cluster hat zwei ICRs, die zusammen die Expression von fünf Genen regulieren (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Imprintingcluster auf Chromosom 11p15. Dargestellt ist die chromosomale Region 11p15 mit fünf Elternspezifisch regulierten Genen. Die Imprintingkontrollregion 1 (ICR1) reguliert über die Elternspezifische DNA-Methylierung die Expression von *H19* und *IGF2*. Die ICR1 ist auf dem paternalen Allel methyliert und reguliert so die paternale Expression von *IGF2*. Auf dem maternalen Allel ist die ICR1 nicht methyliert. Dies ermöglicht die Bindung von CTCF und die Expression von *H19*. Die ICR2 reguliert die Expression von drei Genen. Durch die DNA-Methylierung auf dem maternalen Allel wird die Expression von *KCNQ1OT1* verhindert. Dies führt zu einer Expression von *KCNQ1* und *CDKN1C*. Auf dem paternalen Allel ist die ICR2 unmethyliert, damit wird nur *KCNQ1OT1* exprimiert.

Die telomerisch gelegene ICR1 reguliert die Expression von *IGF2* und *H19* [50]. *H19* kodiert für eine nicht-kodierende RNA (ncRNA). Die genaue biologische Funktion dieser ncRNA ist noch nicht vollständig geklärt [51]. *H19* wird vor allem im embryonalen und neonatalen Gewebe stark exprimiert, wohingegen die Expression nach der Geburt nachlässt [52]. Schon im Jahre 1999 postulierten Feinberg und Kollegen, dass *H19* ein Tumorsuppressorgen ist [53]. Seither wird die Rolle von *H19* für die Entstehung von verschiedenen Tumorerkrankungen, wie z.B. Blasentumoren und Speiseröhrenkrebs, intensiv untersucht [54], [55]. *IGF2* kodiert für das insulin-like growth factor 2 Protein. Dieses Protein ist an Wachstums- und Entwicklungsprozesse beteiligt [56]. Die ICR1 beinhaltet zur Regulation der Expression von *H19* und *IGF2* ein Enhancer blockierendes Element, welches das Zinkfingerprotein CTCF (CCCTC binding factor) bindet [57]. Diese ICR1 ist aus mehreren sich wiederholenden A- und B-Repeatelementen aufgebaut und hat insgesamt sieben CTCF Bindestellen (siehe Abbildung 5). Bei CTCF handelt es sich um einen Faktor, der seine

Erkennungssequenz mithilfe von 11 Zinkfingermotiven bindet. Die Bindung erfolgt jedoch nur, wenn die Erkennungssequenz nicht methyliert vorliegt [57]. Durch die Ausbildung von Homodimeren trägt CTCF zur Ausbildung von DNA-Schleifen bei und kann außerdem als Isolator zwischen einem Enhancer und Promotor gebunden wirken [58]. So gebunden kann es die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern [59].



**Abbildung 5:** Organisation der ICR1 auf Chromosom 11p15. Dargestellt ist die Organisation der ICR1, die zwischen den beiden Genen *H19* und *IGF2* liegt. Die ICR1 ist aus zwei Clustern aufgebaut, die aus je einem A-Repeat und mehreren B-Repeats bestehen. Insgesamt beinhaltet die ICR1 sieben CTCF Bindestellen (CTS). (Abbildung modifiziert nach Beygo et al. (2013) [60])

Im physiologischen Zustand wird *H19* nur vom maternalen Allel und *IGF2* nur vom paternalen Allel exprimiert [56]. Dies wird über die differenzielle DNA-Methylierung der ICR1 und die korrespondierende Bindung von CTCF reguliert [61]. Auf dem paternalen Allel liegt die ICR1 methyliert vor [56]. Somit kann CTCF nicht binden. Daher kann auf dem paternalen Allel ein Enhancer-Element mit dem *IGF2* Promotor interagieren und die Expression von *IGF2* verstärken. Neben der ICR1 ist auf dem paternalen Allel auch die Promotorregion von *H19* methyliert, sodass die *H19* Expression verhindert wird [62]. In der unmethylierten ICR1 des maternalen Allels kommt es hingegen zur Bindung von CTCF. Dadurch kommt es zur Ausbildung von Schleifenstrukturen in der DNA, die die Interaktion des Enhancer-Elements mit dem *IGF2* Promotor verhindern. Somit wird die *IGF2* Expression vom maternalen Allel nicht gefördert [61].

Die zentromerisch gelegene ICR2, auch KvDMR genannt, reguliert die maternale Expression von *CDKN1C* und *KCNQ1* und die paternale Expression von *KCNQ1OT1* (*LIT1*) [56]. *CDKN1C* kodiert für den Cyclin abhängigen Kinaseinhibitor 1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C), der ein negativer Regulator des Zellzyklus ist [63]. *KCNQ1* kodiert für einen Ionenkanal der Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle [64]. Das *KCNQ1OT1* Gen kodiert für eine ncRNA, die in Gegenrichtung zu *KCNQ1* exprimiert wird [65]. Die ICR2 liegt im Intron 10 des *KCNQ1* Gens in der Promotorregion der ncRNA *KCNQ1OT1* [66]. Sie ist auf dem maternalen Allel methyliert und auf dem paternalen Allel unmethyliert [61]. Die unmethylierte ICR2 führt zur Expression von *KCNQ1OT1* [65]. Diese untranslatierte RNA inhibiert vermutlich in der Folge die Expression der anderen beiden Gene

auf dem paternalen Allel [67]. Der genaue regulatorische Mechanismus ist noch nicht bekannt. Auf dem maternalen Allel ist die ICR2 methyliert. Somit wird *KCNQ1OT1* nicht exprimiert, was vermutlich die Expression von *CDKN1C* und *KCNQ1* erlaubt [65].

Eine Störung der oben beschriebenen, komplexen Regulation der Gene im Imprintingcluster in 11p15 kann zur Ausprägung des Beckwith-Wiedemann Syndroms (BWS) oder des Silver-Russell Syndroms (SRS) führen, die beide zu den klassischen Imprintingsyndromen zählen [56].

### ***1.3.3 Bestimmung differenziell methylierter Regionen geprägter Gene***

Wie in dem vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die monoallelische Expression geprägter Gene durch die Eltern-spezifische DNA-Methylierung von DMRs reguliert und kann bei Dysregulation zu Imprintingsyndromen führen. Dabei gilt es zu beachten, dass ein Imprinting auch Gewebe-spezifisch sein kann, nur manche Individuen betrifft (polymorphes Imprinting) oder eine gewisse Restaktivität erhalten bleiben kann [37]. Daher geht man davon aus, dass die Zahl der Gene, die dem Imprinting unterliegen, eher unterschätzt wird [68]. Um bisher unbekannte DMRs zu identifizieren, wurden daher verschiedene Methoden und unterschiedliche Modelle verwendet.

Um DMRs in der genomischen Sequenz zu ermitteln, kann man verschiedene Arten von DNA-Methylierungsanalysen durchführen. Dabei wird für eine geprägte Region eine physiologische DNA-Methylierung von 50 % erwartet [40]. Technisch einfacher zu erfassen sind jedoch extreme DNA-Methylierungswerte von 0 % bzw. 100 % [69]. Diese liegen bei einer DMR dann vor, wenn die Allele entsprechend ihrer elterlichen Herkunft getrennt untersucht werden können. Das wiederum ist z.B. im Rahmen einer sogenannten uniparentalen Disomie (UPD) möglich [70]. Bei diesem Zustand stammen beide Allele der betroffenen Region von nur einem Elternteil [71]. Stammen beide Allele von der Mutter, spricht man von einer maternalen UPD, stammen beide Allele vom Vater, spricht man von einer paternalen UPD. Ist eine Region im Rahmen einer maternalen UPD z.B. vollständig methyliert und liegt im Rahmen einer paternalen UPD vollständig unmethyliert vor, kann dies auf eine DMR hinweisen. Uniparentale Disomien werden weiter unterteilt in Isodisomien oder Heterodisomien und des Weiteren in komplette oder partielle UPDs [71]. Bei der Isodisomie liegt dasselbe elterliche Allel zweimal vor, bei der Heterodisomie wurden beide mütterlichen bzw. beide väterlichen Allele vererbt. Komplette UPDs betreffen das gesamte Chromosom, partielle hingegen nur einen bestimmten Abschnitt des Chromosoms [71].

Neben uniparentalen Disomien können auch Blasenmolen zur Bestimmung differenziell methylierter Regionen hilfreich sein. Komplette Blasenmolen entstehen z.B. wenn der maternale Chromosomensatz der befruchteten Oozyte verloren geht und der paternale verdoppelt wird [72]. Somit stammt die gesamte Erbinformation ausschließlich vom Vater [72]. Paternal methylierte DMRs

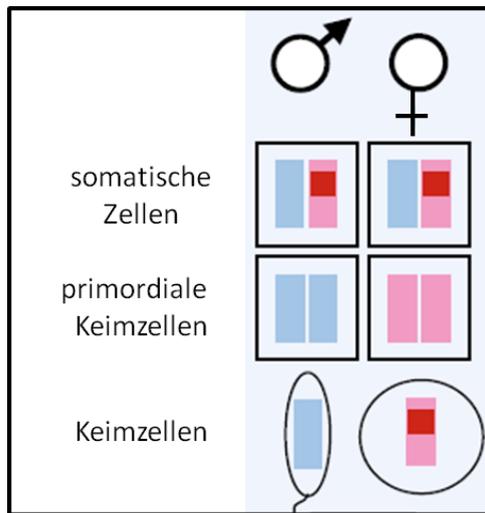
sollten in diesem Fall eine komplette DNA-Methylierung aufweisen, maternal methylierte DMRs in diesem Fall keine DNA-Methylierung zeigen. Ein solcher Zustand, bei dem die gesamte elterliche Information von nur einem Elternteil stammt, wird als genomweite uniparentale Disomie bezeichnet. Die komplette Blasenmole ist ein Beispiel einer genomweiten paternalen uniparentalen Disomie. Genomweite maternale UPDs können *in vitro* erzeugt werden. Dafür werden Oozyten, bei denen die zweite meiotische Zellteilung verhindert wurde, verwendet [73]. Die so entstandenen, als "pathogenetisch aktiviert" bezeichnete Oozyten können zur Entstehung diploider Embryonen führen [73].

Court et al. (2014) verwendeten die zuvor genannten genomweiten UPDs um neue DMRs zu ermitteln [70]. Sie nutzten dabei sowohl den Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array als auch die Methode der gesamtgenomischen Bisulfitsequenzierung. Zunächst identifizierten sie mit diesen Techniken bekannte DMRs in verschiedenen Geweben und DNA-Proben [70]. Nachdem sie mithilfe der beiden DNA-Methylierungsmethoden die bereits bekannten DMRs erfolgreich bestätigen konnten, nutzten sie ihre Herangehensweise um neue DMRs zu ermitteln [70]. Letztendlich konnten sie so 35 bekannte somatisch geprägte DMRs, 14 neue somatisch geprägte DMRs sowie zwei bereits bekannte Plazenta-spezifisch geprägte DMRs und 15 neue Plazenta-spezifisch geprägte DMRs charakterisieren [70]. Bei einer Erweiterung der Analysen konnten die Autoren drei weitere neue Plazenta-spezifisch geprägte DMRs identifizieren. Insgesamt wurden die von ihnen ermittelten DMRs durch 891 CpGs auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip abgedeckt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieselbe Technik wie von Court et al. (2014), der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array, benutzt. Somit konnten positionsgenau die durch Court et al. (2014) ermittelten DMRs bzw. die dem Imprinting unterliegenden CpGs analysiert werden. Die von Court et al. (2014) beschriebenen 891 CpGs wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um eine systematische und umfassende Charakterisierung des DNA-Methylierungsstatus geprägter Loci bei physiologischen Entwicklungsprozessen und im Rahmen von pathologischen Prozessen, wie Entwicklungsstörungen und der Tumorentstehung, durchzuführen. Diese decken bis auf die eine Ausnahme der IG-DMR quasie alle zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung bekannten geprägten DMRs des Menschen ab.

### ***1.3.4 Imprinting in der Embryogenese***

Aus den vorherigen Kapiteln geht hervor, dass ein wesentliches Charakteristikum der DNA-Methylierungsmuster geprägter Regionen die Spezifität für das elterliche Geschlecht ist. Somit müssen vor allem während der menschlichen Embryogenese die Eltern-spezifischen DNA-Methylierungsmuster gelöscht und dann entsprechend des individuellen Geschlechts neu gesetzt

werden (siehe Abbildung 6). Auch das somatische, also Gewebe-spezifische DNA-Methylierungsmuster, muss während der Embryogenese neu etabliert werden.



**Abbildung 6:** Geschlechts-spezifische DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene. Beispielhaft gezeigt sind die DNA-Methylierungsmuster der beiden elterlichen Allele (blau: paternales Allel, rot: maternales Allel) in verschiedenen humanen Zellen. In diesem Beispiel ist in den somatischen Zellen die Eltern-spezifisch geprägte Region auf dem maternalen Allel methyliert (rotes Quadrat) und auf dem paternalen Allel unmethyliert. In den primordialen Keimzellen sind die elterlichen Allele nicht mehr durch eine differenzielle DNA-Methylierung unterscheidbar. In den Keimzellen wird die DNA-Methylierung Geschlechts-spezifisch neu gesetzt. In diesem Fall erhält das maternale Allel die DNA-Methylierung, wohingegen das paternale Allel unmethyliert bleibt. (Abbildung modifiziert nach Horsthemke (2010) [32])

Während dieser Umwandlungsprozesse der DNA-Methylierung werden zwei Phasen der De-Methylierung durchlaufen (siehe Abbildung 7). Die erste De-Methylierung erfolgt während der Keimzellreifung. Primordiale Keimzellen (PKZ) entstehen aus dem Epiblasten und haben zunächst das DNA-Methylierungsmuster ihres Ursprungsgewebes [74]. Die Epiblastzellen wandern in die indifferente Genitalleiste ein, wo die Differenzierung zu den PKZ beginnt [75]. Während dieser Differenzierungsphase erfolgt die erste Welle der De-Methylierung der DNA. Dabei wird die DNA-Methylierung, auch die der geprägten Gene, gelöscht [76]. Die Re-Methylierung der DNA beginnt in den männlichen primordialen Keimzellen kurz nach der kompletten De-Methylierung und hält bis zu der Phase der Pro spermatogonien an [44]. Während der weiblichen Keimzellreifung erfolgt das Setzen der DNA-Methylierungsmuster in der heranreifenden Oozyte nach der Geburt [77]. Die während der Keimzellentwicklung entsprechend des fetalen Geschlechts gesetzte DNA-Methylierung an den geprägten Genen entspricht den primären DMRs.

Die zweite Phase der De-Methylierung der DNA erfolgt in der Embryonalentwicklung, nach der Verschmelzung von Oozyte und Spermium, in der Zygote. Dabei werden die DNA-Methylierungsmuster der Vorkerne zunächst gelöscht. Dieser Prozess erfolgt im paternalen Vorkern aktiv und ist vor der ersten Zellteilung abgeschlossen [78]. Die DNA-Methylierungsmuster der paternal geprägten Gene umgehen diese Welle der De-Methylierung [79]. Das maternale DNA-Methylierungsmuster geht passiv während der ersten Zellteilungen verloren. Auch hier bleibt die DNA-Methylierung der maternalen DMRs erhalten [80]. Nach der De-Methylierung folgt eine über DNMT3A und DNMT3B vermittelte *de novo* DNA-Methylierung die dazu führt, dass die innere

Zellmasse, aus der später der Embryo entsteht (Blastozyste), das somatische DNA-Methylierungsmuster akquiriert [78], [81].

Fehler beim Löschen und Setzen der DNA-Methylierung an den DMRs geprägter Gene können zur Entstehung von Imprintingsyndromen führen [35].

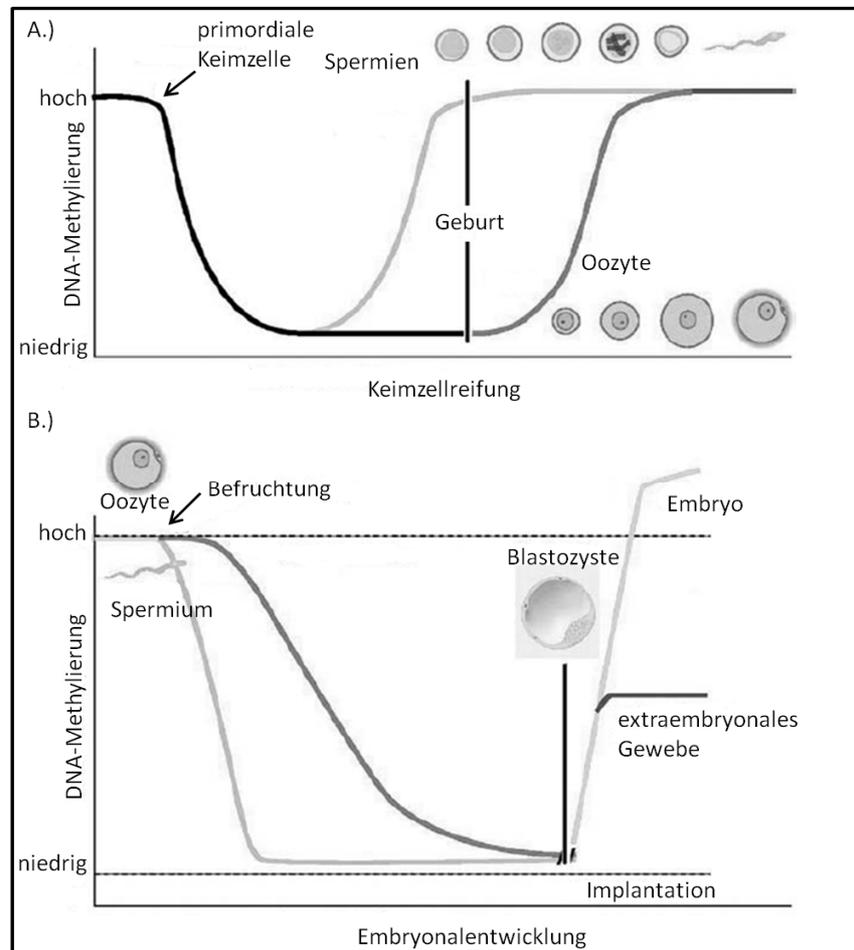


Abbildung 7: De-Methylierung und Re-Methylierung im humanen Organismus. Gezeigt sind die Vorgänge der Veränderung der DNA-Methylierung während der Entstehung der Keimzellen A.) und während der Entwicklung des Embryos B.). Die erste De-Methylierungswelle A.) erfolgt in den primordialen Keimzellen während ihrer Reifung. Das Setzen der Geschlechtsspezifischen DNA-Methylierung beginnt in der Spermatogenese pränatal. Bei Oozyten ist das Setzen der neuen DNA-Methylierung erst im Stadium der reifen Oozyte beendet. Nach der Befruchtung der Oozyte B.) kommt es zur De-Methylierung der mütterlichen und väterlichen DNA (die DNA-Methylierung geprägter Gene bleibt erhalten). Im Blastozysten-Stadium erfolgt dann die Re-Methylierung der DNA. Dabei werden die DNA-Methylierungsmuster Gewebespezifisch gesetzt. (Abbildung modifiziert nach Herrler et al. (2003) [82])

### 1.3.5 Imprinting in der Phylogenese

Der Vorteil der Diploidie, also dem Vorhandensein zweier Genkopien, liegt darin, dass bei Funktionsverlust eines Allels das zweite Allel den Funktionsverlust kompensieren kann [83]. Warum unterliegen dann einige Gene dem Imprinting und werden damit monoallelisch exprimiert? Hierfür wurden verschiedene Theorien entwickelt [84]. Die am meist untersuchte und anerkannteste Theorie ist die sogenannte "parentale Konflikthypothese" [84]. Sie lässt sich z.B. an dem zuvor vorgestellten

Imprintingcluster auf Chromosom 11p15 nachvollziehen (vergleiche (vergl.) Kapitel 1.3.2). Wie beschrieben erfolgte die Expression von *IGF2*, einem wichtigen Wachstumsfaktor, nur vom paternalen Allel. Nach der parentalen Konflikthypothese ist der Vater daran interessiert viele kräftige Nachkommen zu zeugen. Die Mutter muss hingegen ihre eigenen Ressourcen schützen und potenziell weitere Schwangerschaften ermöglichen [85]. Daher ist das Größenwachstum des Kindes durch die monoallelische Expression von *IGF2* begrenzt und wird von dem maternalen Allel nicht gefördert. Diese These wurde durch die Beobachtung gestützt, dass geprägte Gene nur für Säugetiere, insbesondere Beuteltiere und Plazentatiere, beschrieben sind [86]. Erst bei diesen Gattungen kommt es zum elterlichen Konflikt, da die Nachkommen im Mutterleib heranwachsen.

### **1.3.6 Imprinting-Netzwerk**

Da viele der in der vorliegenden Arbeit untersuchten geprägten Gene das (vorgeburtliche) Wachstum von Säugern regulieren, ist es nicht verwunderlich, dass sie untereinander interagieren und ein sogenanntes "Imprinting-Netzwerk" bilden [87].

Analysen an der Maus aus dem Jahre 2006 ergaben, dass das *PLAGL1* Gen in einem Netzwerk zusammen mit anderen geprägten und nicht geprägten Genen die Prozesse des embryonalen Wachstums und der Differenzierung fördert [88]. Des Weiteren konnte in der Maus gezeigt werden, dass die ncRNA H19 zusammen mit MBD1 (methyl-CpG binding domain protein 1) zur H3K9me3 Modifikation der *Igf2* DMR (Chromosom 7) und auch der *Peg1* (auch als *Mest* bekannt) DMR (Chromosom 6) führt und darüber zur Repression dieser Gene beiträgt [89]. In der Maus konnte zudem gezeigt werden, dass das Imprinting-Netzwerk entsprechend der Stärke der Verbindung der involvierten Gene untereinander in drei Gruppen aufgeteilt werden kann [90]. Die erste Gruppe beinhaltet geprägte Gene, die sehr stark miteinander verbunden sind (u.a. *Meg3*, *Ndn*, *Grb10*, *Dlk1*, *Igf2*, *H19*, *Mest*). Die zweite Gruppe beinhaltet geprägte Gene, die eine mittlere Bindung zueinander aufweisen (u.a. *Gnas*, *Magl2*, *Rian*, *Snrpn*, *Airn*). Geprägte Gene mit sehr geringer Bindung, bilden die dritte Gruppe (siehe Abbildung 8) [90].

Weitere Analysen von Adhami et al. zeigten, dass, vergleichbar zur Maus, auch beim Menschen ein Imprinting-Netzwerk existiert [90]. Arima et al. zeigten, dass *PLAGL1* (codiert auf Chromosom 6q24) mit der ICR2 auf Chromosom 11p15 interagiert, die Expression von *KCNQ1OT1* aktiviert und darüber Einfluss auf die Expression von *CDKN1C* hat [91]. Stelzer et al. zeigten, dass die in der AS-PWS kritischen Region kodierte lange nicht-kodierende RNA (long non coding RNA, lncRNA) *IPW* auf Chromosom 15q11q13 für die Regulation der maternal exprimierten Gene auf Chromosom 14 verantwortlich ist [92]. Im physiologischen Zustand wird *IPW* vom paternalen Chromosom 15 exprimiert. Sie rekrutiert die Lysinmethyltransferase G9A an die IG-DMR (14q32.2) des maternalen



DNA-Methylierung früh in der Entwicklung erfolgen, z.B. bei der Entstehung der PKZ, sich diese auf alle somatischen Zellen auswirken. Postzygotisch entstandene DNA-Methylierungsstörungen führen dagegen zu somatischen Mosaiken [61].

Da die Regulation geprägter Gene oft in Clustern erfolgt, kann durch die gestörte DNA-Methylierung einer DMR die Expression mehrerer Gene betroffen sein (vergl. Kapitel 1.3.2 und 1.3.6). Sind übergeordnete Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Regulatoren multipler Gene/Gencluster betroffen, kann es zur Ausprägung sogenannter Multi-Locus Methylierungsstörungen kommen [95].

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die durch Imprintingfehler bedingten Erkrankungen (klassische Imprintingsyndrome und Multi-Locus Methylierungsdefekt) dargestellt. Im Anschluss wird der Einfluss der DNA-Methylierung geprägter Gene bei verschiedenen Entwicklungsstörungen und somatischen Erkrankungen beschrieben. Zunächst soll dafür der Begriff des Imprintingfehlers definiert werden.

### ***1.4.1 Imprintingfehler***

Imprintingfehler entstehen durch sogenannte Epimutationen. Eine Epimutation beschreibt eine Dysregulation des epigenetischen Codes. Sie kann sowohl den Histoncode als auch die DNA-Methylierung betreffen [37]. Dabei werden primäre von sekundären Epimutationen unterschieden [37]. Bei den primären Epimutationen liegt dabei keine Veränderung der DNA-Sequenz vor, wogegen sekundäre Epimutation als direkte Folge einer Mutation auf DNA-Ebene auftreten [96].

Primäre Epimutationen entstehen z.B. durch Fehler bei der DNA-Methylierung [37]. Sie treten in der Regel sporadisch auf [37]. Meist ist nur eine DMR betroffen [37]. Klassische Imprintingsyndrome auf Basis einer primären Epimutation haben daher ein niedriges Wiederholungsrisiko [37]. Bestimmte Faktoren können jedoch das Auftreten einer primären Epimutation begünstigen und damit zu einem erhöhten Wiederholungsrisiko führen [37]. Ein Beispiel für einen Faktor, der das Auftreten von primären Epimutationen begünstigen könnte, ist ein Folsäuremangel. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ist Folsäure ein wichtiger Baustein im DNA-Methylierungskeislauf. Eine Studie von Friso et al. zeigte, dass niedrige Folsäurespiegel zu erniedrigten Level der gesamtgenomischen DNA-Methylierung führen können [97].

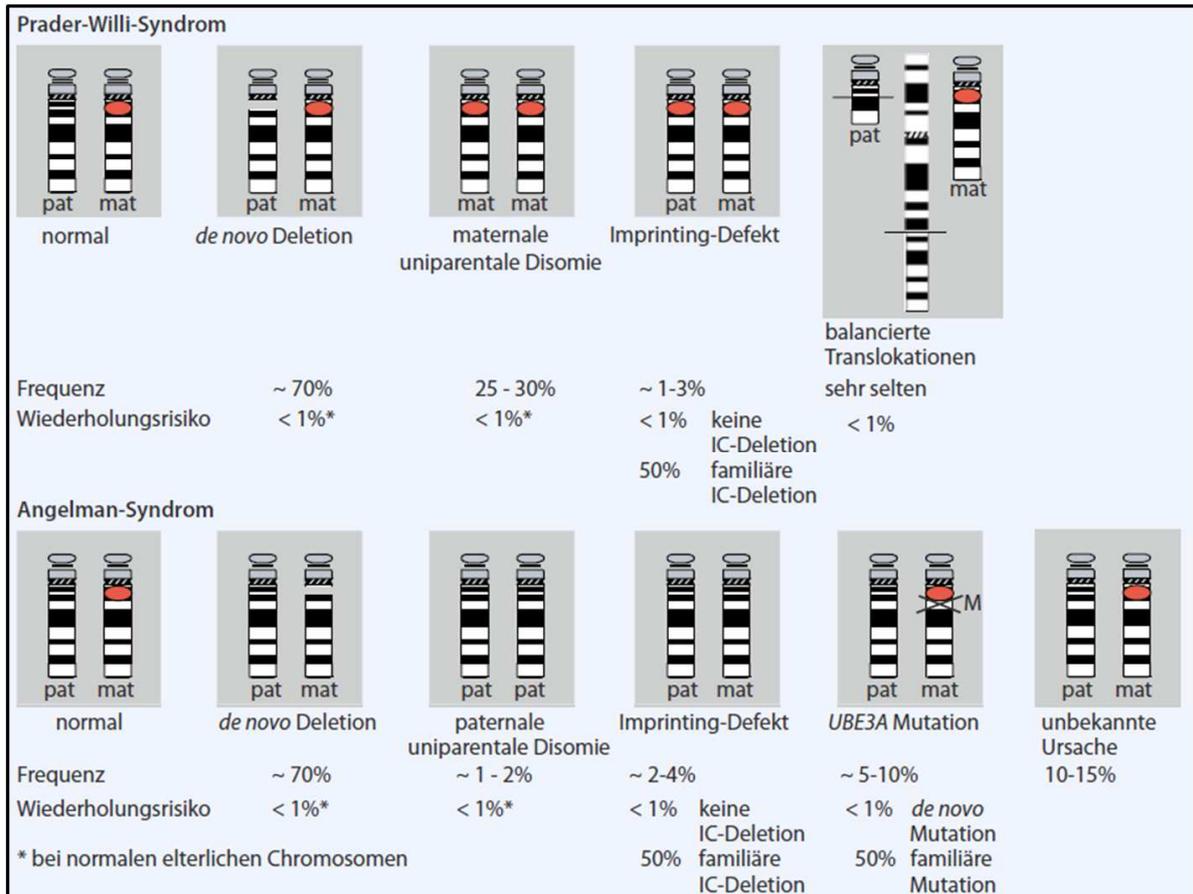
Wird die Störung der DNA-Methylierung durch eine Mutation in der DNA-Sequenz verursacht, spricht man von sekundären Epimutationen [37]. Dabei kann die DNA-Mutation zum einen ein regulatorisches Element, das für die kontrollierte Etablierung der DNA-Methylierung benötigt wird, betreffen [37]. So wird z.B. die als Angelman Syndrom imprinting centre (AS-IC) bezeichnete regulatorische Region auf Chromosom 15 benötigt, um während der weiblichen Keimzellentstehung

das maternale DNA-Methylierungsmuster zu etablieren [37]. Zum anderen kann auch eine Mutation innerhalb eines Gens, das für den regelrechten Prozess der elterlichen Prägung verantwortlich ist, zur Entstehung sekundärer Epimutationen beitragen [37]. Sind die soeben angesprochenen DNA-Mutationen *de novo*, ist das Wiederholungsrisiko für Geschwisterkinder nicht erhöht. Liegt die Mutation in der Keimbahn vor, wird sie zu 50 % an die Kinder weitervererbt [37].

### **1.4.2 Klassische Imprintingsyndrome**

Heutzutage kennt man acht klassische Imprintingsyndrome [98]. Diese werden in der vorliegenden Arbeit auch als Single-Locus Methylierungsdefekte (SLMD) bezeichnet, um sie vom Multi-Locus Methylierungsdefekt (MLMD) abzugrenzen. Bei einem klassischen Imprintingsyndrom ist eine bestimmte geprägte chromosomale Region dysreguliert. Neben einem primären DNA-Methylierungsdefekt kann die Dysregulation auch durch Deletionen, Duplikationen oder uniparentale Disomien hervorgerufen werden. In Abbildung 9 sind zu den Entstehungsmechanismen von Imprintingsyndromen die wesentlichen molekulargenetischen Ursachen am Beispiel des Prader-Willi Syndroms (PWS) und des Angelman Syndroms (AS) gezeigt. In einigen Fällen kann auch eine Mutation oder eine balancierte Translokation die Ursache eines Imprintingsyndroms sein. All diese Mechanismen haben zur Folge, dass die geprägten Gene gar nicht mehr oder statt monoallelisch biallelisch exprimiert werden.

Imprintingsyndrome sind häufig mit einer Entwicklungsverzögerung bzw. -störung assoziiert. Diese kann sowohl die mentale als auch die körperliche Entwicklung betreffen. In Tabelle 2 sind die wesentlichen Charakteristika der acht klassischen Imprintingsyndrome zusammengefasst.



**Abbildung 9:** Ursachen für das Prader-Willi Syndrom und das Angelman Syndrom. Circa 70 % der Patienten mit einem Prader-Willi Syndrom (PWS) oder einem Angelman Syndrom (AS) tragen eine *de novo* Deletion der chromosomalen Region 15q11q13. Die Deletion auf dem paternalen Allel ist mit dem PWS, die Deletion auf dem maternalen Allel mit dem AS assoziiert. Eine maternale UPD des Chromosoms 15 ist bei 25 % bis 30 % der Patienten mit einem PWS zu beobachten. Eine paternale UPD des Chromosoms 15 dagegen bei 1 % bis 2 % der Patienten mit einem AS. Des Weiteren werden Imprintingfehler bei 1 % bis 3 % der Patienten mit einem PWS bzw. bei 2 % bis 4 % der Patienten mit einem AS beobachtet. Diese Fehler führen zu einem maternalen DNA-Methylierungsmuster des paternalen Allels (mit PWS assoziiert) bzw. zu einer Paternalisierung des maternalen Allels (mit AS assoziiert). Neben diesen Ursachen wurden bei Patienten mit einem PWS auch balancierte Translokationen beobachtet. Bei 5 % bis 10 % der Patienten mit einem AS wurden Mutation im *UBE3A* Gen festgestellt und bei 10 % bis 15 % der Fälle konnte keine molekulargenetische Ursache detektiert werden. (Abbildung aus Albrecht et al. (2010) [99])

**Tabelle 2:** Wesentliche Charakteristika der acht klassischen Imprintingsyndrome.

Klassisches Imprintingsyndrom (Abkürzung)	Region	Involvierte Gene (Selektive Expression: <b>mat</b> , <b>pat</b> , Gewebespezifisch)	Genetische Ursachen des Syndroms		ausgewählte Hauptmerkmale
			chromosomale Imbalancen	Epimutation	
Transienter Neonataler Diabetes Mellitus (TNDM)	6q24	<i>PLAGL1</i>	UPD(6)pat (41 %), pat Duplikation <i>PLAGL1</i> (33 %) [100]	<i>PLAGL1</i> ICR Hypomethylierung (26 %) [100]	pränataler Kleinwuchs, transienter Diabetes Mellitus mit Dehydration
Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)	11p15	<i>H19</i> , <i>IGF2</i> , <i>KCNQ1</i> , <i>KCNQ1OT1</i> , <i>CDKN1C</i>	<i>CDKN1C</i> Mutation (bis 50 % familiärer Fälle), KvDMR Mikrodeletion (selten), ICR1 Mikrodeletion (selten), UPD(11)pat (10 % - 20 %) [61]	ICR1 Hypermethylierung (2 % - 7 %), KvDMR Hypomethylierung (50 % - 60 % der sporadischen Fälle) [61]	prä-/postnatale Makrosomie, Makroglossie, Tumorrisiko
Silver-Russell Syndrom (SRS)			7p12	<i>GRB10</i> *	UPD(11)mat (Einzelfälle) mat Duplikation 11p15 (1 % - 2 %) [101]
maternales UPD 14 Syndrom (Temple Syndrom) (TS)	14q32	<i>MEG3</i> , <i>MEG8</i> , <i>RTL1as</i> , <i>DLK1</i> , <i>RTL1</i>	UPD(14)mat (78 %), pat Deletion 14q32 (10 %) [102]	IG-DMR Hypomethylierung (10 %) [102]	prä-/postnataler Kleinwuchs, stammbetonte Adipositas, frühzeitige Pubertät
paternales UPD 14 Syndrom (Kagami-Ogata Syndrom)			UPD(14)pat, mat Deletion der IG-DMR oder <i>MEG3</i> -DMR [103]	IG-DMR Hypermethylierung [103]	Polyhydramnion, glockenförmiger Thorax, <i>coat-hanger rib sign</i>
Angelman Syndrom (AS)	15p11-p13	<i>MKRN3</i> , <i>MAGL2</i> , <i>NDN</i> , <i>C15orf2</i> , <i>SNURF-SNRPN</i> , <i>UBE3A</i> <sup>mat</sup>	IC <i>de novo</i> Deletion mat (70 %), UPD(15)pat (1 % - 2 %), <i>UBE3A</i> Mutation (5 % - 10 %) [99], unbekannte Ursachen (10 % - 15 %)	IC Hypomethylierung (2 % - 4 %) [99]	Mikrozephalie, Ataxie, Epilepsie
Prader-Willi Syndrom (PWS)			IC <i>de novo</i> Deletion pat (70 %), UPD(15)mat (25 % - 30 %) [99]	IC Hypermethylierung (1 % - 3 %) [99]	zunächst Fütterungsprobleme, später Hyperphagie, geistige Behinderung
Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1B (PHP1B)	20q13	<i>Gsa</i> <sup>mat</sup> , <i>Exon1A/B</i> <i>GNAS XL</i> <sup>pat</sup> , <i>GNAS-AS</i> , <i>NESP55</i> ,	maternal vererbte Mikrodeletionen, die zur Hypomethylierung der Exon 1A/B DMR führen	Hypomethylierung der Exon 1A/B DMR, [104]	isolierte renale Parathormonresistenz

Abkürzungen: UPD: Uniparentale Disomie, **mat**: maternal, **pat**: paternal, ICR bzw. IC: Imprintingkontrollregion, DMR: differenziell methylierte Region, \*Isoform- und Gewebe abhängig geprägt (maternal: Plazenta, paternal: Gehirn)

### **1.4.2.1 Imprintingstörungen und assistierte Reproduktion**

Wie im Kapitel 1.4 bereits dargestellt, wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Imprintingsyndromen und dem Vorgang der assistierten Reproduktion diskutiert. In Kapitel 1.3.4 wurde verdeutlicht, dass Fehler beim Setzen und Löschen von DNA-Methylierungsmustern während der frühen Embryonalentwicklung zu Imprintingstörungen führen können. Insbesondere während der De- und Re-Methylierungsphasen laufen viele komplexe Prozesse parallel ab, was die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erhöht [105]. Im mütterlichen Körper sind diese Vorgänge relativ gut vor Umwelteinflüssen geschützt, nicht so bei der assistierten Reproduktion, wo z.B. die Befruchtung der Oozyte *in vitro* erfolgt [105]. Es wird vermutet, dass in dem Zeitraum von Befruchtung der Oozyte bis zur Einnistung der Blastozyste in den Uterus die meisten DNA-Methylierungsstörungen erfolgen [105]. Sind Oozyten und/oder Blastozysten äußeren Faktoren direkt ausgesetzt, wie es z.B. im Prozess der assistierten Reproduktion erfolgen kann, steigt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von DNA-Methylierungsstörungen. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit eines Beckwith-Wiedemann Syndroms oder Angelman Syndroms unter ART geborenen Kindern größer ist, als bei spontan gezeugten Kindern [106]. Holliday et al. ermittelten im Vergleich zu spontan eingetretenden Schwangerschaften ein sechsfach höheres Risiko für die Geburt eines Kindes mit einem Beckwith-Wiedeman Syndrom nach assistierter Reproduktion [107]. Für das Angelman Syndrom wird von Ludwig et al. ein neunfach höheres Risiko nach ART angegeben [108]. Eine Studie von Vermeiden et al. versuchte der Frage nachzugehen, inwieweit ART und die verschiedenen klassischen Imprintingsyndrome zusammen hängen [109]. Die Autoren analysierten dafür mehrere veröffentlichte Studien zu diesem Thema. Sie fanden eine signifikant positive Assoziation zwischen BWS und In-vitro-Fertilisation (IVF)/intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Die Autoren vermuten eine positive Assoziation zwischen SRS und IVF/ICSI. Sie fanden dagegen keine positive Assoziation für AS bzw. PWS und IVF/ICSI. Jedoch konnten sie feststellen, dass die Wahrscheinlichkeit, mit AS oder PWS geboren zu werden, bei Eltern mit Fertilitätsproblemen erhöht ist [109]. Zusammenfassend können diese Studien bis heute nicht endgültig klären, ob das erhöhte Risiko für ein Imprintingsyndrom nach ART nur mit dem ART-Vorgang an sich oder aber mit der Infertilität des Paares zusammenhängt.

### **1.4.3 Multi-Locus Methylierungsdefekt**

Neben den klassischen Imprintingsyndromen, die mit einem bestimmten Imprintingcluster assoziiert sind, wurden in den letzten Jahren Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen an mehreren Genorten beschrieben [91]. Diese Form der gestörten DNA-Methylierung wird als Multi-Locus Methylierungsdefekt (MLMD) bezeichnet. Primär wurden vor allem Patienten mit dem Phänotyp

eines TNDMs beschrieben, die neben der Hypomethylierung der *PLAGL1* DMR auch eine Hypomethylierung in weiteren geprägten Genen aufwiesen [91], [110]. In den letzten Jahren wurde MLMD jedoch auch in Kollektiven von Patienten mit anderen klassischen Imprintingsyndromen beobachtet. So konnten Azzi et al. in Kollektiven von Patienten mit einem Beckwith-Wiedemann Syndrom oder einem Silver-Russell Syndrom auch Patienten mit MLMD identifizieren [111]. Court et al. erweiterten das phänotypische Spektrum von Patienten mit MLMD auf solche, die primär mit dem Phänotyp eines Pseudohypoparathyroidismus Typ 1B auffielen [112]. Über die Ursachen der DNA-Methylierungsstörung an multiplen Genorten ist noch nicht sehr viel bekannt. Bei einigen Patienten mit MLMD konnte jedoch gezeigt werden, dass Mutationen in einem bestimmten Gen als Ursache des MLMDs anzusehen sind [95], [113]. Diese monogenen Mutationen können zu sekundären Epimutationen führen und sind im Folgenden dargestellt.

#### **1.4.3.1 Monogene Ursachen von DNA-Methylierungsstörungen**

Der erste Zusammenhang zwischen einer DNA-Mutation in einem Gen und einer DNA-Methylierungsstörung an mehreren Genorten wurde im Jahre 2008 publiziert. Mackay et al. beobachteten, dass in einem Kollektiv von Patienten mit einem TNDM diejenigen Patienten, die außer der Hypomethylierung in *PLAGL1* auch weitere aberrant methylierte Genorte aufzeigten, biallelische Mutationen in *ZFP57* aufwiesen [95]. *ZFP57* ist ein Zinkfingerprotein, welches an ein methyliertes Hexanukleotid-Motiv (TGCCGC) der DNA bindet, das häufig in ICs vorliegt [114]. *ZFP57* rekrutiert nach der Bindung an methylierte ICs Chromatin-modellierende Faktoren [115]. Mithilfe dieser Faktoren wird über die Rekrutierung von DNMT1 die DNA-Methylierung an der durch *ZFP57* gebundenen IC beibehalten [115]. Ein Funktionsverlust von *ZFP57* bzw. in der Kaskade downstream von *ZFP57* ist im Mausmodell mit einem Verlust der DNA-Methylierung an mehreren Genorten assoziiert [116].

Weiterhin wurden Mutationen der Gene *NLRP2* und *NLRP7* als monogene Ursachen von DNA-Methylierungsstörungen identifiziert [113]. Diese beiden Gene kodieren für Mitglieder einer Familie zytoplasmatischer Proteine, deren Funktion noch nicht genau bekannt ist. Beide Proteine sind homolog und werden in Oozyten und im prä-implantären Embryo exprimiert [117]. Meyer et al. beschrieben eine Familie mit drei Kindern, von denen zwei ein Beckwith-Wiedemann Syndrom aufwiesen [118]. Die molekulargenetischen Analysen bei den beiden mit BWS betroffenen Kindern ergaben eine Hypomethylierung der ICR2 in 11p15. Eine Deletion sowie eine paternale UPD unter Beteiligung von 11p konnten als Ursache ausgeschlossen werden [118]. Segregationsanalysen zeigten, dass die betroffenen Kinder unterschiedliche Allele des Chromosoms 11 von Mutter und Vater geerbt hatten [118]. Ursächlich für dieses familiäre Auftreten von BWS wird von den Autoren

eine homozygote Mutation im *NLRP2* Gen postuliert, die bei der Mutter nachgewiesen wurde [118]. Mutationen von *NLRP7* wurden bei Patientinnen mit familiären biparentalen hydatiformen Molen (FBHM) beschrieben [113]. Bei einigen dieser Patientinnen wurde festgestellt, dass die DNA-Methylierung an den maternalen DMRs in den Oozyten fehlte [119]. Daraus wurde abgeleitet, dass das *NLRP7* Protein an der korrekten Etablierung der DNA-Methylierungsmuster in Oozyten beteiligt ist. Interessanterweise ist, wie in der beschriebenen Familie mit mehreren Kindern mit einem BWS, nicht die Mutationsträgerin selbst, sondern ihre Nachkommen von der Auswirkung der Mutation betroffen. Daher spricht man von einer "maternalen Effekt-Mutation" [120]. Bei einigen Patientinnen mit FBHM ohne Mutationen in *NLRP7* wurden Mutationen in *KHDC3L* (KH domain containing 3-like, subcortical maternal complex member) festgestellt [121]. *KHDC3L* kodiert für ein Mitglied der KH Protein Familie [122]. Die KH Domäne, abgekürzt für "K Homologie Domäne", stammt von dem K Protein, einem mRNA bindenden Protein ab [123]. Erste Analysen lassen jedoch vermuten, dass die atypische KH Domäne dieses Proteins, nicht zur RNA-Bindung beiträgt [124]. *KHDC3L* wird in Oozyten und im frühen Embryo exprimiert. Dabei scheint es mit *NLRP7* zu interagieren und an der Regulation der DMR DNA-Methylierung beteiligt zu sein [121].

#### **1.4.4 Imprinting und Entwicklungsstörungen**

Wie beschrieben können sich Imprintingstörungen als klassische Imprintingsyndrome oder in Form eines Multi-Locus Methylierungsdefekts manifestieren [125]. Das phänotypische Spektrum von Imprintingstörungen jenseits der klassischen acht Imprintingsyndrome ist jedoch wenig bekannt [126]. Untersuchungen auf eine aberrante DNA-Methylierung geprägter Genorte erfolgen demnach primär bei Individuen mit Verdacht auf ein klassisches Imprintingsyndrom. Um das phänotypische Spektrum von Patienten mit DNA-Methylierungsstörung an geprägten Genen zu erweitern, wurden in der vorliegenden Arbeit drei Kollektive von Patienten mit Entwicklungsstörungen mit verschiedenen Ausprägungen von Teilaspekten der klassischen Imprintingsyndrome hinsichtlich einer DNA-Methylierungsstörung an geprägten Genorten untersucht.

Zum Teilaspekt "Wachstumsstörung" wurde ein Kollektiv zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht geborener Kinder (small for gestational age, SGA) untersucht. Differenzialdiagnostisch können sowohl mütterliche als auch fetale, plazentare und exogene Faktoren zur SGA-Geburtlichkeit beitragen [127]. SGA-Geburtlichkeit ist jedoch auch ein Kardinalsymptom einiger klassischer Imprintingsyndrome, wie dem TNDM und SRS. Um die Frequenz von Imprintingstörungen unter Individuen mit einer nicht-syndromalen pränatalen Wachstumsstörung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die DNA-Methylierung geprägter Gene in einem Kollektiv SGA-geborener Kinder untersucht.

Zum Teilaspekt "mentale Retardierung" wurde die DNA-Methylierung geprägter Gene in einem Kollektiv von Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung untersucht. Eine mentale Retardierung (MR) ist neben einer Wachstumsstörung ein weiteres Kardinalsymptom klassischer Imprintingsyndrome, z.B. des Angelman Syndroms und des Prader-Willi Syndroms. Die mentale Retardierung umfasst eine Gruppe verschiedener kognitiver Störungen. Abhängig vom Schweregrad der geistigen Behinderung wird diese nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD) in verschiedene Untergruppen eingeteilt (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#/F70-F79>, Stand April 2015). Differenzialdiagnostisch kann eine mentale Retardierung durch exogene Faktoren (z.B. Infektion, Unfall), monogene Faktoren, chromosomale Störungen und epigenetische Störungen bedingt sein. Einige monogene Störungen, wie z.B. das ICF1-Syndrom, das mit Mutationen in *DNMT3B* assoziiert ist [128], oder das Rett-Syndrom, das durch Mutationen im *MECP2* Gen hervorgerufen wird [129], betreffen Gene, die direkt an der epigenetischen Regulation beteiligt sind [130]. Hieraus wurde abgeleitet, dass Epimutationen ursächlich für ungeklärte mentale Retardierungen sein könnten. Erste Hinweise hierzu lieferten Poole et al. in einer Studie aus dem Jahre 2010. In dieser Studie zeigten die Autoren, dass in einem Patientenkollektiv mit mentaler Retardierung Imprintingstörungen als Ursache der MR unterdiagnostiziert waren [125].

Zum Teilaspekt "Bauchwanddefekte" wurde in der vorliegenden Arbeit das DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene bei Patienten mit verschiedenen Stadien aus dem Blasenektrophie-Epispadie Komplex (BEK) analysiert. Auch Bauchwanddefekte treten als Kardinalsymptome klassischer Imprintingsyndrome auf, z.B. beim Beckwith-Wiedemann Syndrom oder beim Transienten Neonatalen Diabetes Mellitus. Die genetischen Ursachen des Blasenektrophie-Epispadie Komplexes sind noch ungeklärt, es wird jedoch eine multifaktorielle Genese vermutet [131]. Bei der Blasenektrophie handelt es sich um einen Bauchwanddefekt, der entsprechend des Phänotyps in drei Subgruppen eingeteilt wird: Epispadie (mildeste Form), Blasenektrophie (mittlere Form) und kloakalen Ekstrophie (schwerste Form) [132]. Bei letzterer ist der Enddarm zusätzlich betroffen [132]. Zum BEK wird in der Literatur diskutiert, ob der Vorgang der assistierten Reproduktion einen Einfluss auf die Entstehung von BEK hat [133], [134]. Dies würde wiederum eine potenzielle Bedeutung von Epimutationen möglich erscheinen lassen, wie bereits diskutiert. Von den Patienten des in der vorliegenden Arbeit untersuchten BEK-Kollektivs ist die Art der Konzeption bekannt. So konnte diese Kohorte neben Analysen zur Frequenz von Imprintingstörungen bei BEK auch zur Analyse hinsichtlich der Auswirkung der unterschiedlichen Arten der Konzeption herangezogen werden.

### ***1.4.5 Multifaktorielle Erkrankungen und der Einfluss der DNA-Methylierung***

Wie im Kapitel 1.4 erläutert, können DNA-Methylierungsstörungen neben Imprintingstörungen auch im Rahmen der Entstehung benigner und maligner multifaktorieller Erkrankungen beobachtet werden. In dieser Arbeit sollte deshalb die Veränderung der DNA-Methylierung an geprägten Genen exemplarisch bei zwei somatischen multifaktoriell bedingten Erkrankungen analysiert werden, nämlich bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und bei kolorektalen Karzinomen.

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) ist eine erworbene Erkrankung der Leber, die durch vermehrte Fettspeicherung charakterisiert ist [135]. NAFLD wird in verschiedene Stadien eingeteilt [135]. Das frühe Stadium ist durch die Einlagerung von Fett in die Leberzellen (Steatose) charakterisiert. Bei einem fortschreitenden Krankheitsverlauf kann es durch eine Entzündungsreaktion zur Schädigung der Leberzellen kommen. Dieses Stadium wird dann als NASH (non-alcoholic steatohepatitis) bezeichnet. Prinzipiell handelt es sich um eine benigne Erkrankung [136], deren Verlauf aber über eine Leberzirrhose zum hepatozellulären Karzinom fortschreiten kann [137]. Es wird eine multifaktorielle Genese angenommen [138], [139]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Rolle die DNA-Methylierung der geprägten Gene bei der Entstehung und Progression von NAFLD spielt und ob sich diese DNA-Methylierung der geprägten Gene durch eine Therapie modifizieren lässt.

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste tödlich verlaufende Krebserkrankung weltweit [140]. Diese hohe Mortalität hängt u.a. damit zusammen, dass das kolorektale Karzinom (CRC) erst spät klinisch auffällig wird. Neben somatischen Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ist eine Veränderung des epigenetischen Codes im Rahmen der Tumorentstehung umfangreich untersucht [141]. Auf den Stellenwert der epigenetischen Veränderung geprägter Genorte bei der Tumorentstehung soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

### ***1.4.6 DNA-Methylierung und Tumorentstehung***

Die Beobachtung, dass Patienten mit einem Beckwith-Wiedemann Syndrom ein erhöhtes Risiko haben, schon im Kindesalter an Tumoren zu erkranken, lieferte erste Hinweise darauf, dass zwischen der gestörten Expression geprägter Gene und der Entstehung von Tumoren eine direkte Verbindung besteht. Da viele geprägte Gene Wachstumsprozesse regulieren [142], ist es nicht verwunderlich, dass sie bei einer aberranten Expression zur Entstehung von Tumoren beitragen können. Bei Patienten mit einem BWS treten vor allem Wilms Tumore und Hepatoblastome auf, die zu den embryonalen Tumoren zählen. Dabei ist die Inzidenz abhängig von der molekulargenetischen Ursache des BWS [143]. Sie liegt bei Patienten mit einer UPD(11)pat bei 39 %, bei Patienten mit einer Hypermethylierung der ICR1 bei 52 %, bei Patienten mit einer Hypomethylierung der ICR2 bei nur

4 % und bei Patienten mit einer *CDKN1C* Mutation bei 23 % [143]. Für die erhöhte Inzidenz von Tumoren bei einer Hypermethylierung der ICR1 bzw. einer UPD(11)pat scheint die erhöhte *IGF2* Expression ausschlaggebend zu sein [94]. Dafür spricht, dass auch in sporadisch auftretenden Wilms Tumoren eine Überexpression von *IGF2* beobachtet wurde [144]. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich ein loss of imprinting (LOI) [144]. LOI ist definiert als gestörte Expression, d.h. entweder biallelische oder fehlende Expression, geprägter Gene [143]. Ungefähr 50 % bis 60 % der Patienten mit BWS haben eine Hypomethylierung der ICR2. Diese Patienten entwickeln eher Hepatoblastome [145].

Neben dem Auftreten von LOI bei embryonalen Tumoren wurde LOI auch bei im höheren Lebensalter auftretenden Tumorerkrankungen beobachtet [143]. Beim kolorektalen Karzinom scheint z.B. LOI ebenfalls für *IGF2*, bedingt durch eine biallelische Hypermethylierung der ICR1 eine wichtige Rolle zu spielen [146]. Auch wenn bereits zahlreiche umfangreiche Studien zur DNA-Methylierung bei CRC publiziert wurden [147], [148], [149], so wurden systematische DNA-Methylierungsanalysen zu einem LOI aller somatisch und Plazenta-spezifisch geprägten Gene bei CRC bislang noch nicht veröffentlicht. Deshalb sollte in dieser Arbeit die potenzielle Rolle der geprägten Gene für die Entstehung und Progression von CRC analysiert werden.

### ***1.5 DNA-Methylierung geprägter Gene in induzierten pluripotenten Stammzellen***

In den vorherigen Kapiteln wurde beschrieben, wie die DNA-Methylierung zur Expressionskontrolle geprägter Gene beiträgt und was die Folgen einer gestörten Expression geprägter Gene sein können. Es wurde außerdem dargestellt, wie neue DMRs ermittelt und charakterisiert werden können. Die funktionellen Konsequenzen von Imprintingstörungen werden derzeit primär an Tiermodellen untersucht. Einen neuartigen Einblick in die funktionellen Folgen von Imprintingstörungen bei Menschen erhofft man sich durch induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ). Dabei haben iPSZ zur Charakterisierung von Imprintingstörungen zum einen den Vorteil, dass direkt in humanen Zellen gearbeitet wird. Dies ist deshalb von Bedeutung, da es Unterschiede bezüglich des Imprintingstatus bestimmter Gene zwischen Mensch und Maus gibt [150]. Zum anderen können in iPSZ Patientenspezifische DNA-Methylierungsstörungen vor dem individuellen genomischen Hintergrund analysiert werden.

Induzierte pluripotente Stammzellen können aus somatischen Zellen reprogrammiert werden [151]. Dafür müssen zunächst die epigenetischen Markierungen, welche die somatische Zelle ausmachen, auf den Status einer pluripotenten Stammzelle zurückgesetzt werden [152]. Reprogrammierung bezeichnet hierbei den Vorgang, der zu einer molekularen und funktionellen Änderung der

Ausgangszelle zu einer pluripotenten Zelle führt [152]. Nachdem Takahashi und Yamanaka im Jahre 2006 ein Protokoll zur Generierung von iPSZ veröffentlicht hatten [153], wurden aus vielen verschiedenen Geweben, z.B. Leber [154], Gehirn [155] und humanen Fibroblasten [156], iPSZ generiert. Zur Reprogrammierung wurden dabei verschiedene Kombinationen u.a. der vier von Takahashi und Yamanaka et al. genutzten Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2 und c-Myc, und Klf4) oder andere iPSZ induzierender Faktoren, z.B. NANOG und LIN28 [157] verwendet.

Analysen der DNA-Methylierung von geprägten Genen in iPSZ haben gezeigt, dass die IG-DMR und die *MEG3*-DMR in iPSZ oft hypermethyliert vorliegen [158]. In einer Studie von Nator et al. ergab der Vergleich des DNA-Methylierungsmusters humaner induzierter pluripotenter Stammzellen mit dem DNA-Methylierungsmuster des Ursprungsgewebes, dass einige geprägte Gene in iPSZ hypermethyliert (*MEG3*, *MKRN3*, *PEG3*) und andere hypomethyliert (*HYMAI/PLAGL1*, *GRB10*, *KCNQ1*, *SNRPN*, *GNAS*) vorlagen [159]. In iPSZ Linien hoher Passagezahl konnten die Autoren eine Hypermethylierung von *H19* und *GNAS* beobachten [159]. Auch Hiura et al. analysierten das DNA-Methylierungsverhalten in iPSZ für die geprägten Gene *H19*, *IGF2*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT*, *MEG3*, *MEST*, *PEG3*, *NDN*. Die Autoren stellten nur in vereinzelt Klonen die Hypermethylierung in *MEG3* und die Hypomethylierung in *MEST* fest [160]. Für *H19* wurde in iPSZ unterschiedlicher Studien sowohl eine Hypermethylierung [159], als auch eine Hypomethylierung [161], als auch eine Eltern-spezifische DNA-Methylierung [160] der differenziell methylierten Region nachgewiesen. Diese Analysen deuten darauf hin, dass die DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene durch die Reprogrammierung zum Teil zurück gesetzt werden, die Veränderungen aber heterogen sein können.

Bislang wurden nur drei Studien publiziert, welche die DNA-Methylierung in iPSZ von Patienten mit einem Imprintingsyndrom analysierten [92], [162], [163]. Yang et al. reprogrammierten Fibroblasten eines Patienten mit PWS [163]. Der Patient wies eine balancierte Translokation der paternalen Region 15q11q13 auf Chromosom 4 auf [163]. Nach Analysen von Kuslich et al. ist der PWS Phänotyp dieses Patienten bedingt durch den Expressionsverlust von *SNRPN* bei physiologischer DNA-Methylierung der AS/PWS relevanten Region [164]. Daher war bei diesem Patienten das DNA-Methylierungsmuster seiner Fibroblasten für die PWS-kritische Region 15q11q13 Eltern-spezifisch regelrecht [163]. Die von Yang et al. aus diesen Fibroblasten generierten iPSZ wiesen in der DNA-Methylierungsanalyse eine physiologische DNA-Methylierung der PWS kritischen Region auf [163]. Die iPSZ reflektierten somit den konstitutionellen Epigenotyp. Chamberlain et al. reprogrammierten Fibroblasten von Patienten mit PWS auf der Basis einer paternalen Deletion 15q11q13 bzw. mit AS bedingt durch eine maternale Deletion 15q11q13 [162]. Die Patienten-spezifischen iPSZ zeigten das zuvor in den Fibroblasten detektierte Syndrom-spezifische DNA-Methylierungsmuster [162]. Die Analysen von Chamberlain et al. und Yang et al. belegen, dass es möglich ist, aus Fibroblasten von

Patienten mit einem Imprintingsyndrom Patienten-spezifische iPSZ zu reprogrammieren, und dass diese das konstitutionelle DNA-Methylierungsmuster dieser Regionen der Patienten beibehalten. In der Publikation von Stelzer et al. wurden Fibroblasten derselben Patienten mit PWS wie in Yang et al. und Chamberlain et al. zur Herstellung von iPSZ verwendet und analysiert [92].

Einige der geprägten Gene werden Gewebe-spezifisch exprimiert. Ein Beispiel hierfür ist *UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A), welches nur im Gehirn monoallelisch exprimiert wird [162] und dessen gestörte Expression vom maternalen Allel mit dem Angelman Syndrom assoziiert ist [162]. Um die pathologischen Folgen der gestörten *UBE3A* Expression im Gehirn von Patienten mit einem AS besser einschätzen zu können, wäre es notwendig, direkt betroffenes neuronales Gewebe zu untersuchen. Dies ist nur in sehr seltenen Fällen überhaupt möglich. iPSZ können in verschiedene Gewebe differenziert werden, u.a. auch in neuronale Zellen. Entsprechend wurden die zuvor beschriebenen iPSZ Klone der Patienten mit einem PWS und AS von Chamberlain et al. und Yang et al. in neuronale Zellen differenziert [162], [163]. Chamberlain et al. konnten so zeigen, dass in den re-differenzierten Neuronen von Patienten mit einem AS die *UBE3A* Expression reprimiert ist [162]. Dieses Beispiel belegt, dass durch die Re-Differenzierung von Patienten-spezifischen iPSZ in verschiedene Zelltypen die pathologischen Vorgänge in spezifischen Geweben (z.B. in Muskelgewebe von Patienten mit einem BWS) besser charakterisiert werden können.

Die von Chamberlain et al. und Yang et al. generierten Patienten-spezifischen iPSZ stammen von Patienten mit einer sekundären Imprintingstörung auf Basis einer chromosomalen Deletion bzw. Translokation. Soweit bekannt, wurden noch keine DNA-Methylierungsanalysen von iPSZ von Patienten mit primären Epimutationen publiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb iPSZ von Patienten mit primären Epimutationen und von Patienten mit MLMD, die in unserer Arbeitsgruppe von in dieser Dissertation charakterisierten Patienten und deren Angehörigen generiert wurden, hinsichtlich der DNA-Methylierungsmuster geprägter Genen untersucht werden.

## **1.6 Fragestellung**

Wie in der Einleitung dargestellt, ist die Expression elterlich geprägter Gene ein fein regulierter zellulärer Mechanismus, der u.a. über differenziell methylierte Regionen (DMRs) kontrolliert wird. Die Allel-spezifische DNA-Methylierung der DMRs hat die monoallelische Expression vom maternalen oder vom paternalen Allel zur Folge. Neben der Eltern-spezifischen Regulierung der Expression wird die Kontrolle des Imprintings noch dadurch kompliziert, dass manche geprägten Gene nur in einem bestimmten Gewebe monoallelisch und sonst biallelisch exprimiert werden. Um die so regulierte Eltern- und Gewebe-spezifische Expression zu gewährleisten, durchlaufen DMRs während der embryonalen Entwicklung und während der Keimzellreifung des Menschen komplexe Prozesse der

De- und Re-Methylierung, die potenziell in einer pathologisch veränderten DNA-Methylierung resultieren können. Eine solche aberrante DNA-Methylierung kann die Ursache eines klassischen Imprintingsyndroms oder eines Multi-Locus Methylierungsdefekts sein. Neben diesen konstitutionellen Veränderungen der DNA-Methylierung wird die gestörte parentale Expression geprägter Gene auf einer somatischen Ebene bei multifaktoriell bedingten Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, beobachtet.

In jüngster Vergangenheit konnte durch verschiedene Studien ein Katalog der geprägten Genorte des Menschen erstellt werden, welcher zwar wahrscheinlich nicht vollständig aber doch vergleichsweise umfassend ist [70]. Bisher existieren kaum Daten zur DNA-Methylierung der DMRs aller bekannten somatisch und Plazenta-spezifisch geprägten Gene in verschiedenen Geweben und bei konstitutionellen und somatischen Störungen. Die hier durchgeführten DNA-Methylierungsanalysen sollten deshalb dazu dienen, die DNA-Methylierung der DMRs all der aktuell bekannten geprägten Gene des Menschen systematisch in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sowie in benignen und malignen Erkrankungen zu charakterisieren.

Dabei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1.) Kann die DNA-Methylierung geprägter DMRs durch die Fixierung von Probenmaterial beeinflusst werden (Teilprojekt 1)?
- 2.) Zeigt die DNA-Methylierung von DMRs geprägter Gene ein Gewebe-spezifisches Muster in pränatal (Teilprojekt 2) und postnatal (Teilprojekt 3) entnommenen Normalgewebeproben?
- 3.) Verändert sich die DNA-Methylierung in DMRs geprägter Gene in benignen (Teilprojekt 4) und malignen (Teilprojekt 5) somatischen Erkrankungen und kann die DNA-Methylierung therapeutisch modifiziert werden (Teilprojekt 4)?
- 4.) Wie ist das phänotypische und molekulare Spektrum von Störungen der genomischen Prägung bei Patienten, die nur Teilaspekte von klassischen Imprintingsyndromen aufweisen (Teilprojekte 6 bis 8)?
- 5.) Wie sind das Ausmaß und das Muster von DNA-Methylierungsveränderungen in DMRs geprägter Gene bei Patienten mit MLMD (Teilprojekt 9)?
- 6.) Wie verhält sich das DNA-Methylierungsmuster in DMRs geprägter Gene in induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit verschiedenen Störungen der genomischen Prägung (Teilprojekt 10)?

## ***2 Material und Methoden***

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Materialien und angewandten Methoden zur Bearbeitung der verschiedenen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit beschrieben. Labormethoden, Geräte, Reagenzien und Arbeitsanweisungen, die allgemein üblich sind, werden nicht gesondert erwähnt.

### ***2.1 Material***

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Methylierungsuntersuchungen in insgesamt 10 Teilprojekten durchgeführt. Die darin adressierten Fragestellungen konnten durch die Zusammenarbeit des Instituts für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit verschiedenen anderen Institutionen bearbeitet werden. Im Abschnitt 2.1.1 sind die Teilprojekt-spezifischen Probeninformationen angegeben. Wenn die Daten durch eine Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern entstanden, sind die Kooperationspartner dort entsprechend aufgeführt. Die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bzw. die zuständig Ethikkommission der Projektpartner haben die Vorhaben jeweils positiv begutachtet bzw. der Verwendung des analysierten Materials zugestimmt. Entsprechende Details sind in der Beschreibung der Teilprojekte angegeben.

#### ***2.1.1 Probenmaterialien für die DNA-Methylierungsanalyse geprägter Gene***

Im Folgenden werden die verwendeten Proben und die für die jeweiligen Analysen spezifischen Informationen für jedes Teilprojekt zusammengefasst. Zur Vereinfachung wird immer nur der Begriff "Patient" verwendet, ohne damit das Geschlecht der Person zu berücksichtigen.

##### ***2.1.1.1 Pränatal entnommenes Probenmaterial***

Für die Analysen an vorgeburtlichen Gewebeproben wurde Restmaterial von diagnostischen pränatalen Routineuntersuchungen verwendet, für dessen anonyme Verwendung für wissenschaftliche Analysen die Patientinnen zugestimmt hatten. Die Indikationen zur pränatalen Untersuchung waren entweder das mütterliche Alter, eine auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung, ein auffälliges Erst-Trimester-Screening oder eine auffällige Familienanamnese. Die klinischen Informationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Für die vorliegende Arbeit wurde nur Material von Feten mit einem regelrechten Chromosomensatz verwendet.

**Tabelle 3:** Klinische Charakteristika des Kollektivs pränatal entnommener Gewebeproben.

Probenbezeichnung	Gewebeherkunft	Schwangerschaftswoche	mütterliches Alter [Jahre]	Gravida	Para	Indikation
AC1	AC	14+2	32	1	0	mütterliches Alter
AC3	AC	16+2	37	1	0	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
AC4	AC	15+1	36	4	3	mütterliches Alter
AC5	AC	16+2	37	3	1	mütterliches Alter
AC6	AC	16+0	39	5	1	mütterliches Alter
AC7	AC	28+2	25	3	1	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
AC8	AC	15+3	38	3	2	mütterliches Alter
AC9	AC	17	37	4	3	mütterliches Alter
AC10	AC	16+5	37	7	5	mütterliches Alter
AC11	AC	21+4	26	1	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
AC12	AC	16+3	42	2	1	mütterliches Alter
AC13	AC	15+0	20	3	1	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
AC14	AC	18+0	17	1	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
AC15	AC	22+1	28	1	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
AC16	AC	15+6	39	2	1	mütterliches Alter
CV3	CV	13+2	41	4	2	mütterliches Alter
CV4	CV	13+4	37	1	0	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV5	CV	12+4	36	2	1	mütterliches Alter
CV6	CV	13+0	33	3	2	auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV7	CV	12+4	34	3	1	auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV8	CV	14+4	24	1	0	auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV9	CV	12+2	38	3	1	mütterliches Alter
CV10	CV	13+5	41	1	0	mütterliches Alter, auffällige Familienanamnese
CV11	CV	13+2	33	3	1	auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV12	CV	13+0	37	4	3	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV14	CV	12+4	32	1	0	auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV15	CV	13+5	37	2	1	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV17	CV	13+1	44	4	3	mütterliches Alter
CV18	CV	12+0	35	4	2	mütterliches Alter, auffällige Familienanamnese
CV21	CV	12+1	41	3	2	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
CV26	CV	12	35	2	0	mütterliches Alter, erhöhte Nackenfaltentransparenz
CV27	CV	11+6	36	3	1	mütterliches Alter, auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
CV28	CV	11	40	4	3	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening

Fortsetzung **Tabelle 3:**

Probenbezeichnung	Gewebeherkunft	Schwangerschaftswoche	mütterliches Alter [Jahre]	Gravida	Para	Indikation
4	CV	14	33	2	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
5	CV	12+3	35	2	1	mütterliches Alter, erhöhte Nackenfaltentransparenz
8	CV	13	27	1	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
9	CV	13	36	4	3	mütterliches Alter, auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
10	CV	12	35	2	0	mütterliches Alter, erhöhte Nackenfaltentransparenz
12	CV	12+2	36	2	1	mütterliches Alter
13	CV	12+2	33	2	1	auffällige Familienanamnese
14	CV	14+1	40	3	2	mütterliches Alter
15	CV	13	40	1	0	mütterliches Alter
16	CV	13	39	7	5	mütterliches Alter
17	CV	12+5	25	1	0	auffällige pränatale Ultraschalluntersuchung
18	CV	13+3	39	2	1	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
19	CV	12+1	41	3	2	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
20	CV	12+1	40	2	1	mütterliches Alter
21	CV	13+3	30	4	2	auffälliges Erst-Trimester-Screening
22	CV	11+3	42	4	2	mütterliches Alter
23	CV	13+1	34	4	1	auffällige Familienanamnese
24	CV	13+2	37	2	0	mütterliches Alter, auffälliges Erst-Trimester-Screening
26	CV	11+3	30	4	2	auffälliges Erst-Trimester-Screening

Abkürzungen: AC: Amniozentese, CV: Chorionzotten (Tabelle modifiziert nach Eckmann-Scholz et al. (2012) [165])

Insgesamt standen 52 pränatal entnommene Proben zu Verfügung. Es handelte sich bei 15 Proben um Material, das während einer Amniozentese gewonnen wurde und bei 37 Proben um Chorionzottenmaterial. Die Proben wurden aufbereitet, die DNA extrahiert und die Proben auf Infinium HumanMethylation27 BeadChips hybridisiert (Details siehe Eckmann-Scholz et al. [165]). Für die hier beschriebene DNA-Methylierungsanalyse wurden die AVG-Beta Werte der Infinium HumanMethylation27 BeadChip Hybridisierungen verwendet. Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Eckmann-Scholz, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Christian-Albrechts-Universität, Kiel durchgeführt und wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts Universität zu Kiel positiv begutachtet (D447/09, D402/09).

### 2.1.1.2 Lungengewebeproben

Das Untersuchungsmaterial stammte von sechs Patienten, bei denen aufgrund der Diagnose eines Lungentumors eine Lobektomie bzw. eine Pneumektomie in der LungenClinic Grosshansdorf durchgeführt wurde. Bis zur Bearbeitung des Gewebes wurde das entnommene Lungengewebe bei 4°C gekühlt und sowohl Tumorgewebe als auch Normalgewebe (tumorzellfreies Lungengewebe) anschließend mit drei verschiedenen Techniken fixiert. Bei den verwendeten Fixiertechniken handelt es sich um eine HOPE Fixierung [166], eine Standard-Formalin Fixierung und eine Kryokonservierung. Eine kurze Beschreibung der Probenfixierung sowie der anschließenden DNA-Extraktion finden sich in Marwitz et al. [167]. Die genaue Diagnose, das Alter und Geschlecht der Patienten sowie das Tumorstadium sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4:** Klinische Daten zu den verwendeten Lungenproben.

Probenbezeichnung	Patientenalter bei Entnahme [Jahre]	Geschlecht	histologische Diagnose der Tumorprobe	TNM Klassifikation
5285	78	w	Adenokarzinom	pT1B, pN0, L0, V0, R0
5770	70	m	Adenokarzinom	pT2a, N1, V1, L1, G2, R0
15136	73	m	Großzelliges Bronchialkarzinom	pT2a, pN3, G3, R0, L1, V1
15343	59	m	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	pT3, N3, G3, L1, V0, R0
15724	66	m	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	pT3, pN0, G2, R0
15725	79	w	Adenosquämoöses Karzinom	pT2a, pN0, G2, R0, L0, V0

Abkürzungen: w: weiblich, m: männlich, TNM Klassifikatoren: Codesystem aus Buchstaben und Zahlen die den Tumor (T), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt. T: Tumorausdehnung, N: Lymphknotenmetastasen, M: Fernmetastasen, G: Differenzierungsgrad der veränderten Zellen, R: Resttumorgewebe, L: Befall des Lymphgefäßsystems, V: Einbruch in Venen (Tabelle modifiziert nach Marwitz et al. (2014) [167])

Die DNA wurde im Institut für Klinische und Experimentelle Pathologie, Forschungszentrum Borstel, Borstel extrahiert und dem Institut für Humangenetik Kiel durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Goldmann zur Verfügung gestellt. Für die hier beschriebene DNA-Methylierungsanalyse wurden nur die 18 Normalgewebeproben, die alle auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert wurden, ausgewertet. Für die Verwendung des Patientenmaterials für wissenschaftliche Zwecke lag ein positives Votum (AZ 12-220) der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor.

### 2.1.1.3 Kolongewebeproben

Die analysierten DNA-Proben von Kolongewebe stammten aus dem Nationalen Genomforschungsnetzwerk-Projekt „Integrated genomic investigation of colorectal carcinoma“. Die DNA-Proben wurden durch Herrn Prof. Dr. med. Hampe, damals beschäftigt an der Klinik für Innere Medizin I, sowie durch Herrn Prof. Dr. med. Schafmayer, Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-,

Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, zur Verfügung gestellt. Es wurden Dickdarmgewebeproben von an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten untersucht. Bei der Tumorresektion wurde das tumoröse Material zusammen mit umliegendem, nicht-infiltriertem Gewebe entnommen, sodass neben dem Tumorgewebe auch Normalgewebe zur DNA-Methylierungsanalyse bereitstand. Dabei stammen alle hier analysierten Gewebeproben aus verschiedenen Abschnitten des Dickdarms. Das Tumorgewebe wurde durch einen Pathologen untersucht und u.a. der Gesamttumorzellgehalt bestimmt. Es wurden DNA-Proben von 117 Normalgewebeproben und 118 Tumorgewebeproben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Tumorgewebeproben ohne Angaben zum Tumorzellgehalt wurden aus den DNA-Methylierungsanalysen ausgeschlossen, ebenso Tumorgewebeproben mit einem Gesamttumorzellgehalt <10 %. Insgesamt 88 der 118 Tumorgewebe entsprachen diesen Kriterien und gingen in die finale Analyse ein. In Tabelle 5 sind wesentliche klinische Informationen zu den hier ausgewerteten 88 Tumorgewebeproben und 117 Normalgewebeproben zusammengefasst. Alle Patienten haben der Verwendung ihres Probematerials für wissenschaftliche Zwecke schriftlich zugestimmt.

**Tabelle 5:** Klinische Daten zu den DNA-Proben des Kolondatensatzes.

Tumor- und Normalgewebeproben		
Probenbezeichnung	Gesamttumorzellgehalt [%]	Alter bei OP [Jahre]
884	70	59
917	64	60
924	81	77
925	27	57
1098	24	78
1101	56	kA
1113	80	62
1115	60	77
1126	70	76
1127	30	71
1163	42	76
1179	80	57
1243	40	78
1245	70	76
1279	56	46
1292	35	65
1306	18	67
1330	70	59
1335	70	64
1343	42	53
1351	60	66
1374	42	73
1410	20	30
1415	63	62

Fortsetzung **Tabelle 5:**

Tumor- und Normalgewebeproben		
Probenbezeichnung	Gesamttumorzellgehalt [%]	Alter bei OP [Jahre]
1427	80	56
1457	70	79
1470	40	67
1480	10	84
1494	52	75
1502	70	60
1528	40	60
1530	56	82
1531	63	77
1532	70	62
1556	72	84
1583	16	68
1600	72	74
1606	60	72
1607	42	62
1614	80	64
1643	80	69
1706	90	62
1800	85	77
1862	15	78
1867	48	85
1887	70	90
1919	70	82
1966	60	60
1981	45,5	58
1982	80	75
2021	56	86
2127	67,5	56
2145	80	78
2154	65	56
2160	56	72
2191	90	72
2203	56	66
2212	72	81
2229	20	73
2241	45	76
2256	70	68
2261	14	82
2305	60	40
2431	70	57
2475	16	68
2498	85	74
2500	85	78
2583	42	89
2596	76,5	82
2621	32	64
2633	56	72
2767	95	76
2779	42	74

Fortsetzung **Tabelle 5:**

Tumor- und Normalgewebeproben		
Probenbezeichnung	Gesamttumorzellgehalt [%]	Alter bei OP [Jahre]
2788	70	62
2793	56	70
2831	60	61
2902	49	42
2905	90	82
2913	72	69
2989	56	67
3143	63	78
3196	50	72
3212	80	77
3283	42	75
3309	72	52
3326	60	73
3327	13,5	81
Tumorgewebeproben		
Probenbezeichnung	Gesamttumorzellgehalt [%]	Alter bei OP [Jahre]
1822	90	65
Normalgewebeproben		
Probenbezeichnung	Alter bei OP [Jahre]	
878	47	
900	75	
1123	61	
1144	52	
1154	86	
1169	58	
1218	52	
1229	kA	
1264	45	
1340	61	
1390	kA	
1398	65	
1400	46	
1433	59	
1507	62	
1604	75	
1616	71	
1684	62	
1765	69	
1773	62	
1877	92	
1910	71	
1959	54	
1970	58	
2028	77	
2075	81	
2258	77	
2282	64	
2429	72	
2697	61	

Abkürzungen: OP: Operation, kA: keine Angabe

### 2.1.1.4 Lebergewebeproben

Es wurden insgesamt 89 DNA-Proben aus Lebergewebe auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert und anschließend ausgewertet. Diese 89 Hybridisierungen entsprechen 88 Patientenproben, die sich aus folgenden Probengruppen zusammensetzten: 21 Leber-Normalkontrollen (eine dieser DNA-Proben wurde als Duplikat hybridisiert), 33 Proben von Patienten, die fettleibig aber sonst gesund waren, 18 Proben von Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und 17 Proben von Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis (NASH). Das Untersuchungsmaterial wurde perkutan oder intraoperativ entnommen. In dem Untersuchungskollektiv enthalten waren von insgesamt 23 Patienten Proben vor und nach einem bariatrischen Eingriff. Dabei wurde die erste Leberprobe initial während der bariatrischen Operation entnommen und die zweite Probe dann mittels perkutaner Leberbiopsie in einer follow-up Untersuchung meist fünf bis neun Monate nach dem bariatrischen Eingriff (Proben als Verlaufspaltenpaar bezeichnet). Klinische Angaben zu den Patienten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Das Normalkontrollgewebe stammt von Patienten, die sich einer onkologisch bedingten Operation unterzogen. Diese Patienten erhielten vor der Operation keine Chemotherapie. Die anschließende pathologische Untersuchung der Proben ergab keine zirrhotischen oder malignen Veränderungen des Lebergewebes, sodass sie hier als Kontrollen verwendet werden konnten.

Die DNA-Proben wurden durch Herrn Prof. Dr. med. Hampe, damals beschäftigt an der Klinik für Innere Medizin I, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, zur Verfügung gestellt. Zur Verwendung des Probenmaterials lag ein positives Votum (D425/07 und A111/99) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor.

**Tabelle 6:** Klinische Daten zu den DNA-Proben aus Lebergewebe.

Proben Nummer, Angabe ob Verlaufspaltenpaar oder Einzelproben	Patienten Nummer	Leberphänotyp- Gruppe	BARI- Status	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
5304	1	Gesund und Fettleibig	1	w	47	47,40
5621	1	Gesund und Fettleibig	2	w	47	29,89
5336	3	NASH	1	w	50	41,77
5484	3	Gesund und Fettleibig	2	w	50	29,04
5542	4	NASH	1	w	33	53,78
5641	4	NAFLD	2	w	33	40,88
5452	6	NASH	1	w	32	47,32
5678	6	Gesund und Fettleibig	2	w	33	39,30
5426	7	Gesund und Fettleibig	1	w	47	43,03
5603	7	Gesund und Fettleibig	2	w	47	29,04

Fortsetzung **Tabelle 6:**

Proben Nummer, Angabe ob Verlaufspaltenpaar oder Einzelproben	Patienten Nummer	Leberphänotyp- Gruppe	BARI- Status	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		
5527	als Verlaufspaltenpaare klassifizierte DNA-Proben	12	NASH	1	w	41	70,20	
5707		12	NAFLD	2	w	41	49,63	
5431		14	Gesund und Fettleibig	1	w	59	43,41	
5699		14	Gesund und Fettleibig	2	w	60	30,80	
5327		15	NAFLD	1	w	45	43,50	
5501		15	Gesund und Fettleibig	2	w	45	30,86	
5458		20	NAFLD	1	m	60	49,45	
5575		20	NAFLD	2	m	61	40,30	
5397		24	NAFLD	1	w	39	45,91	
5589		24	Gesund und Fettleibig	2	w	39	31,14	
5600		26	NASH	1	w	55	51,53	
5754		26	NASH	2	w	56	40,60	
5576		28	NAFLD	1	m	65	56,18	
5685		28	NAFLD	2	m	65	43,69	
5664		33	NAFLD	1	m	47	47,90	
5780		33	Gesund und Fettleibig	2	m	47	33,90	
5441		39	Gesund und Fettleibig	1	w	45	54,32	
5617		39	Gesund und Fettleibig	2	w	45	38,27	
5392		44	NAFLD	1	w	31	48,55	
5702		44	Gesund und Fettleibig	2	w	31	26,12	
5660		46	NASH	1	w	57	46,71	
5749		46	NAFLD	2	w	66	34,95	
5435		47	Gesund und Fettleibig	1	w	37	42,40	
5571		47	normal	2	w	37	30,00	
5357		52	NAFLD	1	w	24	51,90	
5554		52	Gesund und Fettleibig	2	w	24	32,61	
5624		56	NAFLD	1	m	38	55,50	
5762		56	Gesund und Fettleibig	2	m	38	37,70	
5650		57	Gesund und Fettleibig	1	w	38	53,60	
5756		57	NAFLD	2	w	38	41,80	
5612		59	NAFLD	1	w	49	42,68	
5738		59	normal	2	w	49	27,43	
5410		65	Gesund und Fettleibig	1	w	50	47,75	
5588		65	Gesund und Fettleibig	2	w	50	32,32	
4418		einzelne DNA Proben	27	normal	kA	w	50	23,62
5599			27	Gesund und Fettleibig	kA	w	44	41,35
5494			16	NAFLD	(1)*	w	46	56,02
5634			17	Gesund und fettleibig	(2)*	w	46	40,83
5525			2	NASH	kA	m	48	30,51
5286			5	Gesund und Fettleibig	kA	w	42	40,35
5591			8	NASH	kA	w	37	47,75
5503	9		NASH	kA	m	49	24,38	
4598	10		normal	kA	m	79	25,82	
5728	11		Gesund und Fettleibig	kA	w	58	40,86	
5566	13		NASH	kA	m	46	33,74	
5310	18		Gesund und Fettleibig	kA	w	46	47,97	
5114	19		normal	kA	m	68	26,45	

Fortsetzung **Tabelle 6:**

Proben Nummer, Angabe ob Verlaufspaltenpaar oder Einzelproben	Patienten Nummer	Leberphänotyp- Gruppe	BARI- Status	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	
5581	einzelne DNA Proben	21	Gesund und Fettleibig	kA	w	43	44,53
4473		22	normal	kA	w	70	20,70
5724		23	NASH	kA	w	44	49,35
5573		25	normal	kA	w	41	23,31
4511		29	normal	kA	m	23	26,60
5250		30	NAFLD	kA	m	46	54,82
5706		31	NASH	kA	w	30	63,89
4235		32	normal	kA	w	53	30,49
5481		34	NASH	kA	w	55	48,87
4827		35	NASH	kA	w	46	24,86
5268		36	Gesund und Fettleibig	kA	w	39	55,63
5551		37	NASH	kA	w	44	57,59
5605		38	normal	kA	m	38	24,03
5093		40	Gesund und Fettleibig	kA	w	44	36,13
5691		41	Gesund und Fettleibig	kA	w	38	46,24
4649		42	normal	kA	m	79	26,09
4534		43	normal	kA	m	82	21,97
5577		45	Gesund und Fettleibig	kA	w	57	35,44
5608		48	normal	kA	w	72	20,96
5389		49	normal	kA	m	54	20,81
5553		50	Gesund und Fettleibig	kA	w	32	54,14
4249		51	normal	kA	m	82	25,36
5725		53	NASH	kA	m	49	60,62
5545		54	Gesund und Fettleibig	kA	w	40	44,59
5134		55	normal	kA	w	44	29,38
5131		58	normal	kA	w	45	20,07
5491		60	normal	kA	w	27	17,37
4293		61	normal	kA	m	53	25,76
5727		62	NAFLD	kA	w	32	60,22
5276		63	Gesund und Fettleibig	kA	w	50	49,59
5642		64	normal	kA	w	44	24,91

Abkürzungen: BARI-Status: 1: vor einer bariatrischen Operation, 2: nach einer bariatrischen Operation, w: weiblich, m: männlich, BMI: Body-Mass-Index, NASH: non-alcoholic steatohepatitis (nicht-alkoholische Fettleberhepatitis), NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung), kA: keine Angabe da keine Verlaufspalten, \*Proben als einzelne Proben annotiert. Die Analyse ergab, dass es sich um ein Verlaufspaltenpaar handelt.

### 2.1.1.5 Periphere Blutproben SGA-geborener Kinder

Für dieses Teilprojekt wurden DNA-Proben, von 98 Kindern, die zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht (small for gestational age, SGA) geboren wurden, genutzt, die durch das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Konsortium „Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“ rekrutiert worden waren. SGA-Geburtlichkeit wurde dabei definiert als Geburtslänge und/oder Geburtsgewicht des Kindes unterhalb der zweifachen Standardabweichung für das entsprechende Geburtsalter und Geschlecht [168].

Die DNA-Proben wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert und ausgewertet. Eine Hybridisierung konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden. Des Weiteren erfolgte die Probenhybridisierung von sechs Patienten, bei denen zuvor eines der klassischen Imprintingsyndrome TNDM, BWS, SRS, AS, PWS oder TS aufgrund einer primären Epimutation diagnostiziert wurde. Die klinischen Charakteristika der Kohorte SGA-geborener Kinder sind in Tabelle 7 dargestellt. Alle analysierten DNA-Proben dieser Patienten wurden im Rahmen des Vorhabens, durch die beteiligten Zentren, rekrutiert. Zur Verwendung des Probenmaterials lag ein positives Votum (B305/08 und D401/08) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor.

**Tabelle 7:** Klinische Informationen zum Datensatz SGA-geborener Kinder

Altersgruppen	Gesamt	<2	>2	Daten nicht vorhanden
		Jahre		
Anzahl SGA-geborener Kinder	98	35	63	0
Pränataler Einfluss	Gesamt	Ja	Nein	Daten nicht vorhanden
maternale Nikotinaufnahme	98	21	72	5
EPH-Gestose	98	9	56	33
Schwangerschaftsdiabetes	98	3	47	48
Plazentainsuffizienz	98	28	43	27
Geburtsgewicht <2SD	98	68	30	0
Geburtslänge <2SD	98	73	25	0
Geburtsgewicht und Geburtslänge <2SD	98	58	40	0
Wachstumshormontherapie	63	37	25	1
Entwicklungsverzögerung	98	14	82	2

Abkürzungen: EPH-Gestose: edema-proteinuria-hypertension Gestose (Ödeme-Proteinurie-Hypertonie Gestose), SD: Standardabweichung (Tabelle modifiziert nach Bens et al. (2013) [169])

### **2.1.1.6 Periphere Blutproben von Patienten mit verschiedenen Fehlbildungen aus dem Blasenektrophie-Epispadie-Komplex**

Es wurde die DNA-Methylierung geprägter Gene in peripheren Blutproben von 23 Patienten analysiert, die verschiedene Fehlbildungsstadien aus dem Blasenektrophie-Epispadie-Komplex (BEK) aufzeigten. Dafür wurden DNA-Proben der Patienten auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert und ausgewertet. Die DNA-Proben wurden durch Herrn PD Dr. med. Reutter, Abteilung für Neonatologie, Universitätskinderklinik Bonn und Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, zur Verfügung gestellt. In Tabelle 8 sind die klinischen Informationen zu den Patienten zusammengestellt. Alle Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten hatten einer Verwendung der Proben zu wissenschaftlichen Zwecken schriftlich zugestimmt.

Zur Vereinfachung wird im Folgenden von Patienten mit Blasenektrophie gesprochen, ohne damit den genauen Ektrophie-Typ zu meinen.

**Tabelle 8:** Klinische Daten der Patienten mit verschiedenen Fehlbildungen aus dem Blasenektrophie-Epispadie-Komplex.

Probenbezeichnung	DNA-Extraktions Methode I <sup>1</sup> oder II <sup>2</sup>	BEK-Typ	Alter [Jahre]	Geschlecht	Konzeption
265_501	I	Blasenektrophie klassisch	4	w	IVF
967_501	I	Blasenektrophie klassisch	5	m	hormonelle Stimulation
1051_501	I	Epispadie Grad 1	5	m	hormonelle Stimulation
644_501	I	kloakale Ekstrophie	14	w	spontan
39_501	II	kloakale Ekstrophie	12	m	ICSI
14_501	II	kloakale Ekstrophie	10	w	spontan
298_501	I	kloakale Ekstrophie	14	w	spontan
62_501	I	kloakale Ekstrophie	4	w	spontan
662_501	I	kloakale Ekstrophie	4	m	spontan
686_501	I	kloakale Ekstrophie	8	w	spontan
1000_501	I	kloakale Ekstrophie	15	m	spontan
329_501	I	Blasenektrophie klassisch	2	m	ICSI
3_501	I	Blasenektrophie klassisch	19	w	hormonelle Stimulation
862_501	I	Blasenektrophie klassisch	2	m	hormonelle Stimulation
935_501	I	Blasenektrophie klassisch	10	w	hormonelle Stimulation
370_501	I	Blasenektrophie klassisch	8	m	Insemination
389_501	I	kloakale Ekstrophie	11	w	ICSI
406_501	I	kloakale Ekstrophie	12	w	spontan
407_501	I	kloakale Ekstrophie	12	w	IVF
247_501	I	Blasenektrophie klassisch	10	m	IVF
390_501	I	kloakale Ekstrophie	7	m	IVF
691_501	I	Blasenektrophie klassisch	17	m	hormonelle Stimulation
815_501	I	Blasenektrophie klassisch	15	m	hormonelle Stimulation

Abkürzungen: <sup>1</sup>: Chemagic Magnetic Separation Module I, <sup>2</sup>: QIAamp DNA Blood Kit, BEK: Blasenektrophie-Epispadie-Komplex, IVF: In-vitro-Fertilisation, ICSI: intrazytoplasmatische Spermieninjektion, w: weiblich, m: männlich

### **2.1.1.7 Periphere Blutproben von Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung**

Die DNA-Methylierung geprägter Gene von 82 Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung wurde analysiert. Die klinischen Daten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Diese retrospektiv zusammengestellte Untersuchungsgruppe setzte sich zusammen aus DNA-Proben bzw. peripheren Blutproben von Patienten, bei denen im Institut für Humangenetik Kiel eine Array-CGH bzw. SNP-Array Analyse durchgeführt wurde und diese unauffällige Befunde ergeben hatte (mittlere Auflösung 0,3 Mb bzw. 0,1 Mb). Für die hier beschriebene DNA-Methylierungsanalyse wurden die AVG-Beta Werte der Probenhybridisierungen auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips analysiert. Die

Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten stimmten der anonymen Nutzung von Restmaterial aus der molekularen Diagnostik zu. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß dem Votum (D402/09) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts Universität zu Kiel.

**Tabelle 9:** Klinische Informationen zu den Patienten mit mentaler Retardierung.

	männliche Patienten	weibliche Patienten
Patientenanzahl	46	36
Alter	7 Monate - 17 Jahre	4 Monate - 25 Jahre
<b>Geburtsparameter</b>		
Normal	15	13
SGA	3	4
Großwuchs	0	2
keine Angaben	28	17
	männliche Patienten	weibliche Patienten
<b>Kopfumfang</b>		
Normal	9	14
Mikrozephal	8	5
Makrozephal	2	1
keine Angaben	27	16
<b>Epilepsie</b>		
Vorhanden	20	9
EEG abnormal, keine Anfälle	1	2
keine Angaben	25	25
<b>Fehlbildungen</b>		
Vorhanden	6	6
nicht beschrieben/keine Daten	40	30

Abkürzung: EEG: Elektroenzephalografie, SGA: small for gestational age (zu klein und/oder zu leicht für das Geburtsalter und Geschlecht geboren) (Tabelle modifiziert nach Kolarova et al. (2015) [170])

### ***2.1.1.8 Periphere Blutproben von Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen oder Multi-Locus Methylierungsdefekt***

Die in diesem Teilprojekt analysierten Patienten- und Kontrollkollektive setzten sich aus mehreren Untergruppen zusammen. Alle Patienten wurden im Rahmen des zuvor erwähnten BMBF geförderten Konsortium „Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“ durch die fünf kooperierenden Zentren rekrutiert. Als Kontrollkollektiv dienten 47 Infinium HumanMethylation450 BeadChip Hybridisierungen von 39 SGA-geborenen Kindern, die in einer mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung durchgeführten Voranalyse an 10 geprägten Genorten keine aberrante DNA-Methylierung aufwiesen. Ausschlusskriterien waren eine Wachstumshormontherapie, Dysmorphiezeichen und eine Entwicklungsverzögerung (außer der SGA-Geburtlichkeit). Das Patientenkollektiv setzte sich aus drei Untergruppen zusammen. Die erste Untergruppe bestand aus Probenmaterial von Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom (TNDM, BWS, SRS, PWS, AS). Diese dienten als Positivkontrollen, um die mit diesen Imprintingsyndromen assoziierten aberranten DNA-Methylierungsmuster zu charakterisieren. Dafür wurden DNA-Proben von sechs

Patienten analysiert, wobei für das Silver-Russell Syndrom DNA-Proben von zwei verschiedenen Patienten hybridisiert wurden und außerdem eine der DNA-Proben als Duplikat analysiert wurde.

Als Teilprojekt des BMBF Konsortium wurde bei allen rekrutierten Patienten, die eine Imprintingstörung aufgrund einer Epimutation aufzeigten, eine Bisulfit-Pyrosequenzierung an 10 geprägten Genorten durchgeführt. Aus diesen Analysen gingen 11 Patientenproben hervor, bei denen nicht eindeutig zu klären war, ob sie DNA-Methylierungsveränderungen an nur einem oder an mehreren Genorten aufzeigten. Diese Proben sollten daher mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip weiter untersucht werden und bildeten die zweite Untergruppe des Patientenkollektivs.

Die dritte Untergruppe des Patientenkollektivs bestand aus 20 Patienten, bei denen in Voranalysen die Diagnose eines Multi-Locus Methylierungsdefekts gestellt wurde. In Tabelle 10 ist die Zusammensetzung des MLMD Analysekollektivs zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des MLMD-Untersuchungskollektivs.

Untersuchungskollektiv		Anzahl Patienten	Anzahl Hybridisierungen
Patientenkollektiv	Patienten mit Diagnose MLMD	20	28
	Patienten mit Verdacht auf MLMD	11	13
	Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen	6	7
Kontrollkollektiv	SGA-geborene Kinder	39	47

Abkürzungen: MLMD: Multi-Locus Methylierungsdefekt, SGA: small for gestational age (zu klein und/oder zu leicht für das Geburtsalter und das Geschlecht geboren)

Neben den bereits zuvor hybridisierten DNA-Proben 39 SGA-geborener Kinder (47 Hybridisierungen), die hier als Kontrollkollektiv dienten, wurden insgesamt weitere 37 DNA-Proben (48 Hybridisierungen), die den drei verschiedenen Gruppen zuzuordnen sind, auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert und somit insgesamt eine Analyse für 95 Hybridisierungen durchgeführt. Die klinischen Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Es lag für diese Studie ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts Universität zu Kiel vor (B305/08, D401/08).

**Tabelle 11:** Klinische Daten der drei Patientengruppen für die Analysen zu MLMD.

Gruppe	Diagnose	Patienten Nummer	Geschlecht	Geburtsgewicht [g]	Geburtslänge [cm]	Schwangerschafts- woche bei Geburt	Konzeption
klassisches Imprinting- syndrom	SRS	D09_2383	w	1520	40	38	hormonelle Stimulation
	SRS	D10_1559	w	1480	42	39	spontan
	BWS	D09_2262	m	3980	53	38	kA
	AS	D10_1676	w	kA	kA	kA	kA
	PWS	D10_1658	w	kA	kA	kA	kA
	TNDM	D10_1174	w	2947	50,8	40	spontan
Verdacht auf MLMD	AS	D12_198	w	kA	kA	kA	kA
	AS	D12_199	w	3360	kA	kA	spontan
	AS	D12_200	m	kA	kA	kA	kA
	AS	D09_1434	w	3390	50	39	kA
	PWS	D12_201	w	kA	kA	kA	kA
	PWS	D12_202	m	kA	kA	kA	kA
	BWS	D11_115, D12_203	m	4190	55	39	kA
	BWS	D12_204	m	2680	50	34	kA
	SRS	D10_1562	m	1270	37	33	spontan
	BWS	D12_247, D14_72	m	kA	kA	kA	kA
BWS	D10_231	m	4965	54	37	spontan	

Fortsetzung **Tabelle 11:**

Gruppe	Diagnose	Patienten Nummer	Geschlecht	Geburtsgewicht [g]	Geburtslänge [cm]	Schwangerschafts-woche bei Geburt	Konzeption
MLMD diagnostiziert	BWS/MLMD	D13_1381	m	1150	38	32	spontan
	BWS/MLMD	D10_3155	w	2900	48	31	spontan
	PHP 1B/MLMD	D11_1626	m	3600	54	40	spontan
	SRS/MLMD	D09_2218	w	995	35	31	spontan
	SRS/MLMD	D09_2772	m	980	35	36	IVF
	SRS/MLMD	D09_2224	w	2240	46	40	spontan
	BWS/MLMD	D11_472	m	kA	kA	kA	ICSI
	BWS/MLMD	D12_246, D14_73	m	kA	kA	kA	kA
	TS/MLMD	D11_118, D13_1618	w	2000	48	40	kA
	AS/MLMD	D10_1678	m	kA	kA	kA	kA
	SRS/MLMD	D13_1140	w	kA	kA	kA	kA
	SRS/MLMD	D13_1143	m	kA	kA	kA	kA
	BWS/MLMD	D13_1146	m	3070	50	37	spontan
	BWS/MLMD	D13_1149	w	3300	49	39	spontan
	SRS/MLMD	D13_1139	m	1510	39,5	41	spontan
	BWS/MLMD	D14_77	w	kA	kA	kA	kA
	BWS/MLMD	D14_78	w	kA	kA	kA	kA
	BWS/MLMD	D14_76	w	kA	kA	kA	kA
	BWS/MLMD	D14_75	w	kA	kA	kA	kA
	BWS/MLMD	D14_74	w	kA	kA	kA	kA

Abkürzungen: w: weiblich m: männlich, kA: keine Angabe, g: Gramm, cm: Zentimeter, MLMD: Multi-Locus Methylierungsdefekt, TNDM: Transienter Neonataler Diabetes Mellitus, BWS: Beckwith-Wiedemann Syndrom, SRS: Silver-Russell Syndrom, AS: Angelman Syndrom, PWS: Prader-Willi Syndrom, TS: Temple Syndrom, PHP-1b: Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1B, IVF: In-vitro-Fertilisation, ICSI: Intrazytoplasmatische Spermieninjektion, kA: keine Angabe

### 2.1.1.9 Probenmaterial von verschiedenen Geweben zur Analyse der DNA-Methylierung in induzierten pluripotenten Stammzellen

Für die Generierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) wurden Fibroblastenzelllinien von vier Personen verwendet. Die iPSZ wurden im Rahmen des BMBF geförderten Konsortium: „Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“ in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Zentrum für Integrative Psychiatrie, durch die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Müller generiert. Dabei wurde Material von drei Patienten mit einer Imprintingstörung und der Mutter eines dieser Patienten verwendet. Es wurde sowohl DNA aus iPSZ- und Fibroblastenzelllinien als auch DNA aus peripheren Blutproben für die DNA-Methylierungsanalysen genutzt. Insgesamt wurden damit 16 DNA-Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert und anschließend ausgewertet (siehe Tabelle 12). Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel positiv begutachtet (B305/08, D401/08, A145/11).

**Tabelle 12:** Angaben zur Herkunft und Anzahl analysierter Proben im Datensatz iPSZ Analyse.

Person/Imprintingstörung	Anzahl analysierter Proben je Gewebe		
	peripheres Blut	Fibroblastenzelllinien	induzierte pluripotente Stammzelllinien
TNDM	1	1	1
MLMD_1	2	1	1
MLMD_2	1	1	1
Mutter des MLMD_2 Patienten	2	1	3

Abkürzungen: iPSZ: induzierte pluripotente Stammzellen, TNDM: Transienter Neonataler Diabetes Mellitus, MLMD: Multi-Locus Methylierungsdefekt

### 2.1.2 Kontrollen

Im Folgenden werden die Funktionen der mitgeführten Kontrollen dargestellt.

Bei der Bisulfit-Pyrosequenzierung wurden vier verschiedene Kontrollen mitgeführt. In der Amplifikationsreaktion wurde eine Wasserkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt, um für Kontaminationen der verwendeten Reagenzien zu kontrollieren. Der normale DNA-Methylierungsstatus der zu analysierenden Region wurde mithilfe einer Pool-DNA bestimmt. Die Pool-DNA setzte sich zusammen aus DNA-Proben, die aus peripherem Blut von zehn weiblichen und zehn männlichen gesunden Individuen extrahiert wurde. Des Weiteren wurden eine kommerziell erhältliche hochmethylierte Kontroll-DNA (methylierte Kontrolle, MK) analysiert, mit der die obere DNA-Methylierungsgrenze der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion festgelegt wurde. Mit der eingesetzten gesamtgenom-amplifizierten DNA (whole genome amplified DNA, WGA-DNA) konnte die untere DNA-Methylierungsgrenze des Bisulfit-Pyrosequenzierassays festgestellt werden, da diese keine

DNA-Methylierung aufweist. Die Herstellung der WGA aus Pool-DNA wird im Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

Für die Auswertung der Methylierungs-spezifischen multiplex-ligationsabhängigen Probenamplifikation (MS-MLPA) wurden die Analyseergebnisse der Patienten-DNA-Probe mit denen von Normalkontrollen verglichen. Die dafür verwendeten Normalkontrollen stammten aus der Routinediagnostik des Instituts für Humangenetik, Kiel.

Als Positivkontrolle für den Erfolg der Amplifikation bei der Mikrosatellitenanalyse wurde ebenfalls DNA von Normalkontrollen aus der Routinediagnostik des Instituts für Humangenetik, Kiel verwendet.

In Tabelle 13 sind die verwendeten Kontrollen und die entsprechende Technik kurz zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Angaben zur Herkunft und zum Anwendungsbereich der mitgeführten Kontrollen.

Kontrollmaterial	Genutzt für	Herkunft
Pool-DNA	Bisulfit-Pyrosequenzierung	DNA-Gemisch von zehn männlichen und zehn weiblichen gesunden Individuen
vollständig methylierte Kontroll-DNA (MK), i.) CpGenome universal methylated DNA (Millipore) ii.) Human highly methylated genomic DNA (EpigenDx)	Bisulfit-Pyrosequenzierung	i.) Millipore, Darmstadt, Deutschland ii.) EpigenDx, Hopkinton, USA
gesamtgenom-amplifizierte DNA	Bisulfit-Pyrosequenzierung	gesamtgenom-amplifizierte DNA aus Pool DNA (Details siehe Kapitel 2.2.7)
Normalkontrollen	MS-MLPA	Unauffälliges Probenmaterial aus der Routinediagnostik des Instituts für Humangenetik, Kiel
Referenz-DNA	Mikrosatellitenanalyse	Unauffälliges Probenmaterial aus der Routinediagnostik des Instituts für Humangenetik, Kiel

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 14 sind die verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet.

**Tabelle 14:** Auflistung verwendeter Chemikalien und Reagenzien sowie deren Lieferanten.

Chemikalien und Reagenzien	Lieferant
10 % Tween-20	Thermo Scientific, Waltham, USA
10 x Tris-Borat-ETDA Puffer (TBE Puffer)	Life Technologies, Carlsbad, USA
5 M NaCl	Life Technologies, Carlsbad, USA
5 M Tetramethylammoniumchlorid-Lösung (TMACL)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Aqua bidest (ddH <sub>2</sub> O)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Betaine Lösung 5M	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Fortsetzung **Tabelle 14:**

Chemikalien und Reagenzien	Lieferant
biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, USA
CEQ Separation Gel (für das CEQ-8000 Kapillarelektrophoresesystem)	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
CpGenome universal methylated DNA	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Denhardt's Solution 50x Concentrate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) ReagentPlus ≥99,5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DNA Step Ladder 25bp	Promega, Madison, USA
dNTP Set 4x25µmol	Roche, Rotkreuz, Schweiz
EB Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol absolut	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Ethidumbromid Lösung ~1% in H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Formamid ≥99,5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GeneScan 500 ROX Size Standard	Life Technologies, Carlsbad, USA
Glycerol ReagentPlus	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Herring Sperm DNA 100mg	Promega, Madison, USA
Hha I (1000 U)	Promega, Madison, USA
Hi-Di Formamid	Life Technologies, Carlsbad, USA
Human Cot-1 DNA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Human highly methylated genomic DNA	EpigenDx, Hopkinton, USA
HyperLadder 1kb Längenstandard	Bioline, Taunton, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
LiChrosolv H <sub>2</sub> O	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) Hydrat ≥99,5%, pH-,5-40 SigmaUltra	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
MES Natriumsalz ≥99,5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Mineralöl	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Molecular Biology Grade Water	Lonza, Köln, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat, ≥99,5%	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid Plättchen	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
POP-7-Polymer für den 3130 Genetic Analyzer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Proben-Lade-Lösung	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Proteine-Präzipitations-Lösung	Qiagen, Hilden, Deutschland
Puffer 10 x mit EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Annealing-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binde-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RBC-Lösung	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sakem LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sequenzier-Separations-Puffer	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, München, Deutschland
Streptavidin, R-phycoerythrin conjugate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tetrabromphenolsulfonphthalein (Bromphenolblau)	Serva, Heidelberg, Deutschland
TriDye 100 pb DNA Ladder Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt Main, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ultra Pure 20x SSPE Puffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zelllysis-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.1.4 Geräte und Zubehör

In Tabelle 15 sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

**Tabelle 15:** Angaben zu den verwendeten Geräten/Zubehör inklusive Typbezeichnung und Lieferant.

Gerät/Zubehör	Typbezeichnung	Lieferant
4-Kapillarsequenzierer (Mikrosatellitenanalyse)	ABI Prism 3130 Genetic Analyzer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Agarosegeldokumentationsanlage	BioDoc Analyser	Biometra, Göttingen, Deutschland
Agarosegel-Elektrophoresekammer	verschiedene Größen	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Aufreinigungsstation	Wizard DNA Clean-up System	Promega, Madison, USA
BeadChip Hybridisierungszubehör (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)		Illumina, Eindhoven, Niederlande
Exsikator (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	Bel-art	Illumina, Eindhoven, Niederlande
Färbeinkubator (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	Rack-Chamber, 48Pos, Te-Flow, Tecan	Illumina, Eindhoven, Niederlande
Filtersonden für Aufreinigungsstation (Bisulfit-Pyrosequenzierung)	PyroMark Vakuum Prep Filter Probe	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fluorometer	Qubit 2.0 Fluorometer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hybridisierungsöfen	Hybaid	Biometra, Göttingen, Deutschland
Hybridisierungsöfen (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	Hybrid Oven	Illumina, Eindhoven, Niederlande
Kapillare für DNA-Fragmentauftrennung (Mikrosatellitenanalyse)	3130 Genetic Analyzer Capillaries	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Kapillare für DNA-Fragmentauftrennung (MS-MLPA)	Separation Capillary Array 33-75-B	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Kapillarelektrophorese-System (MS-MLPA Analyse)	CEQ 8000 GeXP Genetic Analysis System	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Kartusche für Nukleotid, Substrat- und Enzymmix (Bisulfit-Pyrosequenzierung)	PSQ 96 Reagent Cartridge	Qiagen, Hilden, Deutschland
Laborzentrifuge	Megafuge 40R	Heraeus Kulz GmbH, Dormagen, Deutschland
Magnetständer	MagnaRack	Life Technologies, Carlsbad, USA
Minizentrifuge	Sprout Mini-Zentrifuge	Biozyme, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR Aufreinigungsstation (Bisulfit-Pyrosequenzierung)	Vacuum Prep Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plattenschüttler (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	High-Speed Microplate Shaker	Illumina, Eindhoven, Niederlande
Plattenschüttler (Bisulfit-Pyrosequenzierung)	IKA MS3 basic	IKA, Wilmington, USA
Platteninkubator (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	Hybex Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale, USA
Pyrosequenziergerät	Pyro Mark ID	Qiagen, Hilden, Deutschland
Scanner (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	iScan	Illumina, Eindhoven, Niederlande

Fortsetzung **Tabelle 15:**

Gerät/Zubehör	Typbezeichnung	Lieferant
Stromversorgung der Agarosegelkammern	Electrophoresis Power Supply ST606	Life Technologies, Carlsbad, USA
Stromversorgung der Agarosegelkammern	El.pho.-Powerpack P24	Life Technologies, Carlsbad, USA
Thermoblock	UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	DNA Engine-Thermocycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikro200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vakuumpumpe (Bisulfit-Pyrosequenzierung)	MultiScreen HTS Vakuum Manifold	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe (Infinium HumanMethylation450 BeadChips)	Model 2534C-02	Welch, Niles, USA
Vakuumpumpe (Herstellung von WGA-Kontroll-DNA)	Labport	KNF, Freiburg, Deutschland
Verschweißgerät für 96-Well Platten	ALPS 25	Life Technologies, Carlsbad, USA
Vortexgerät	REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie 2	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge primoR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge X1R	Heraeus, Hanau, Deutschland
0,2 µm Filter	Filter Steritop-GP	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hybridisierungsöfen (SNP 6.0 Arrays)	GeneChip Hybridisierungsöfen 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Scanner (SNP 6.0 Arrays)	GeneChip Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Wasch- und Färbereinheit (SNP 6.0 Arrays)	GeneChip Fluidics-Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
Heizplatte mit Aufsatz für 96 Well Platte (Bisulfite-Pyrosequenzierung)	Hotplate	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.5 Kits

Die in der Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 16 aufgelistet.

**Tabelle 16:** Bezeichnung und Lieferant verwendeter Kits.

Kit Bezeichnung	Lieferant
Agencourt AMPure XP Kit	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
AmpliTaQ Gold Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
CEQ DNA Size Standard Kit-600	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
Genome-Wide Human SNP Array 6.0 Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare, München, Deutschland

Fortsetzung **Tabelle 16:**

Kit Bezeichnung	Lieferant
Infinium HumanMethylation 450k BeadChip Kit	Illumina, Eindhoven, Niederlande
Nsp I (1250Units)	New England Biolabs, Frankfurt Main, Deutschland
PyroMark Gold Q96 Reagents Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Carlsband, USA
SALSA MLPA EK1 Reagent Kit	MRC Holland, Amsterdam, Niederlande
SALSA MLPA ME032-A1 Kit	MRC Holland, Amsterdam, Niederlande
Sty I (3000 Units)	New England Biolabs, Frankfurt Main, Deutschland
T4 DNA Ligase (400 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt Main, Deutschland
Titanium DNA Amplification Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

### 2.1.6 Software

In Tabelle 17 sind die verwendeten Programme und Internet-Tools tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 17:** Auflistung der verwendeten Softwares und Internet-Tools.

Software oder Internet-Tool	genutzt für:
<b>Software</b>	
Command Console(Affymetrix)	Gerätesoftware für die GeneChip Fluidics-Station 450
GeneMapper 5 Software (Life Technologies)	Auswertung der Mikrosatellitenanalyse
Genomelab GeXP Genetic Analysis (Version 10.2, Beckmann Coulter)	Gerätesoftware für das CEQ8000 Kapillarelektrophoresesystem
GenomeStudio (Version2011.1, Methylation Analysis Module Version 1.9.0, Illumina Inc)	Auswertung der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Methylierungsarrays
Genotyping Console (Affymetrix)	Auswertung der SNP Arrays
Microsoft Office 2007	Ergebnisdokumentation und -auswertung
Omics Explorer (Version 3.0, Qlucore, Lund, Schweden)	Auswertung der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Methylierungsarrays
PyroQ-CpG Software (Version 1.0.11, Qiagen, Hilden, Deutschland)	Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung
PyroMark Assay Design (Version 2.0, Qiagen, Hilden, Deutschland)	Primerdesign für Bisulfit-Pyrosequenzierung
R (Version 3.0.0, R Studio Inc, Bosten, USA)	Statistische und grafische Auswertung
<b>Internet-Tools</b>	
<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>	u. a. Primerdesign
<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>	Informationen zu den analysierten Genen
<a href="http://www.geneimprint.com/">http://www.geneimprint.com/</a>	Informationen zu den analysierten Genen
<a href="http://igc.otago.ac.nz/home.html">http://igc.otago.ac.nz/home.html</a>	Informationen zu den analysierten Genen

## **2.1.7 Puffer und Lösungen**

### Probenladepuffer für Agarosegelelektrophorese

- ❖ Für 100 ml Probenladepuffer wurden 125 mg Bromphenolblau und 28,7 g Glycerol mit Aqua bidest (ddH<sub>2</sub>O) auf 100 ml aufgefüllt.

### 70%iger Ethanol

- ❖ 70%iger Ethanol wurde aus 140 ml 99%igem Ethanol aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 ml hergestellt.
- ❖ Wurden andere Ethanolverdünnungen benötigt, erfolgte deren Herstellung entsprechend der hier beschriebenen Art und Weise.

### Waschpuffer für Bisulfit-Pyrosequenzierung

- ❖ 6,5 g TRIS wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 5 l aufgefüllt und gelöst.

### 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung für Bisulfit-Pyrosequenzierung

- ❖ Es wurde eine 2 M Stammlösung aus 80 g NaOH mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt hergestellt. Vor der Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde eine 0,2 M NaOH Arbeitsverdünnung im Verhältnis 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt.

### 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung für Infinium HumanMethylation450 BeadChip Probenprozessierung

- ❖ Als Stammlösung wurde eine 1 M NaOH Lösung, bestehend aus 2 g NaOH in 50 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, hergestellt. Für die 0,1 M NaOH Arbeitsverdünnung wurde die Stammlösung 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

### 95%ige Formamid/1 mM EDTA-Lösung für Infinium HumanMethylation450 BeadChip Probenprozessierung

- ❖ Für diese Lösung wurden 38 ml 100%iges Formamid und 80 µl einer 0,5 M EDTA Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 40 ml aufgefüllt.

### 0,5 M EDTA Lösung für Infinium HumanMethylation450 BeadChip Probenprozessierung

- ❖ Zur Herstellung einer 0,5 M EDTA Lösung wurden 7,3 g EDTA in 50 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3 M Natriumacetat Lösung zur Fällung der WGA DNA-Proben

- ❖ 20,4 g Anti-Natriumacetat-Trihydrat wurden in 50 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### Holding Puffer für die SNP-Array 6.0 Probenprozessierung

- ❖ 50 ml Holding Puffer wurden hergestellt aus 50 µl Tween-20 (10 %), 4,15 ml MES Stock Puffer, 9,25 ml NaCl (5 M) und 36,55 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### 12 x 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Stock Puffer für die SNP-Array 6.0 Probenprozessierung

- ❖ Für einen 500 ml Ansatz wurden 35,2 g MES Hydrat und 96,65 g MES Natriumsalz abgewogen und auf 500 ml mit Molecular Biology Grade Water aufgefüllt und gemischt. Der pH-Wert wurde auf 6,5 bis 7,5 (mit Natronlauge bzw. Salzsäure) eingestellt. Anschließend wurde der Puffer über einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

#### Waschpuffer A zur Vorbereitung der Fluidics Station für die SNP-Arrays 6.0

- ❖ Für 1 l Waschpuffer A wurde 1 ml Tween-20 (10 %) zu 300 ml 20 x SSPE gegeben und mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend über einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

#### Waschpuffer B zur Vorbereitung der Fluidics Station für die SNP-Arrays 6.0

- ❖ Für 1 l Waschpuffer B wurde 1 ml Tween-20 (10 %) zu 30 ml 20 x SSPE gegeben und mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend über einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

#### Stain Puffer für die beim SNP-Array 6.0 verwendeten Färbelösungen 1 und 2

- ❖ Der Stain Puffer wurde hergestellt aus 360 µl Natriumchlorid-Natriumhydrogenophosphat-EDTA (SSPE)-Puffer (20 x), 3,96 µl Tween-20 (3 %), 24 µl Denhardt's Solution (50 x) und wurde aufgefüllt mit 800 µl Molecular Biology Grade Water.

#### 0,5 mg/ml Anti-Streptavidin Antikörperlösung für die beim SNP-Array 6.0 verwendete Färbelösung 2

- ❖ 0,5 mg Anti-Streptavidin Antikörper wurden in 1 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.1.8 Primersequenzen**

Informationen zu den Primern, die für die Bisulfit-Pyrosequenzierung oder Mikrosatellitenanalyse verwendet wurden, sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Alle Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) in lyophilisierter Form bezogen und zunächst durch das Lösen in ddH<sub>2</sub>O auf eine Stammkonzentration von 200 pmol/µl eingestellt.

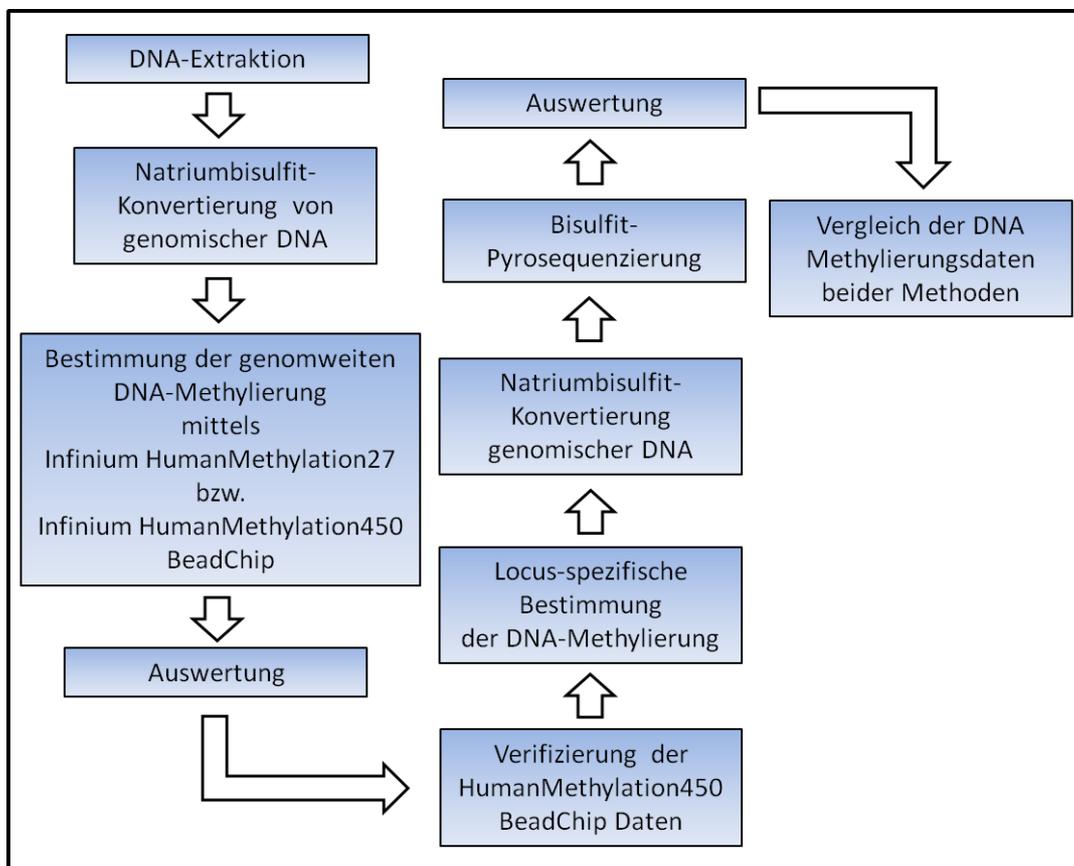
**Tabelle 18:** Informationen zu den im Rahmen der Arbeit verwendete Primern.

Bezeichnung _ chromosomale Lokalisation	Primer Sequenz (5'...3')	Amplikon- länge [bp] und PCR Kit	Annealing- temperatur [°C]	Projekt
<b>Primer für die Bisulfit-Pyrosequenzierung</b>				
PPIEL_ 1p34.3	F: TGGGTAGTTTTAGTAGGTATTATTAT R: CCCCTTCTTCCTTAATCT-Biotin S: GGATGAGTAGGGTTATG	271 PM-Kit	55	MR
ZDBF2_ 2q33.3	F: GGGGAAATTAGTATTTATTTTG-Biotin R: CCTAACCCCTTCTAAAACT S: ACTATATACAACAAAAAAT	219 PM-Kit	55	SGA, MLMD
FAM50B_ 6p25.2	F: GAGGAGGGTTGGAGAGTAG R: CTCAACCCTACCCAACC-Biotin S: GGTTTTGGGTGGT	198 PM-Kit	67	MR, MLMD
IG-DMR_ 14q32.2	F: TTTGGTATTTGTAGTTTTATGTTAAGAT R: AATCAAAAACAACCTCAATCCTTTATAAC- Biotin S: AATTGGGTTTGTAGTAG	196 PM-Kit	64	MR
BLCAP_ 20q11.23	F: GTTGTGAGAGGGATTATAAGA R: TTTCCACCTCAATCTTCC-Biotin S: GGATTAGTTTTATTTGGA	206 PM-Kit	55	MR
<b>Primer für die Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 2</b>				
D2S1782_ 2q33.3	F: HEX-5'-CTGACTTCACTGCTGAATTGC R: AAAGGCAAAGAAAGGGACTG	119-135 ATG-Kit	60	SGA
D2S155_ 2q33.3	F: FAM-5'-ACAGAAAACATACGTGTGTG R: CGGAACCTAGCAAACTAC	162-171 ATG-Kit	60	SGA
D2S369_ 2q33.3	F: HEX-5'-AGTTTTGACCACATGGC R: CCTCAGGAAAGTTTTATATGTATG	153-167 ATG-Kit	60	SGA
D2S422_ 2q33.3	F: FAM-5'-GCTGGCATGATAAATTGCTT R: AAATGGCCACTCCCTAAAAC	145-154 ATG-Kit	60	SGA
<b>Primer für die Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 14</b>				
D14S1006_ 14q32.2	F: FAM-5'-TTCCACAGGGCAAGCAGTA R: TTCTGGCAAACCCAACC	121-155 ATG-Kit	55	MR
D14S985_ 14q32.2	F: HEX-5'-CAGTGTGACCTTAAACAAGTCG R: CCTGTGGGGTAGATACACGA	118-142 ATG-Kit	65	MR
CHLC.GCT14E06_ 14q32.31	F: FAM-5'-AGAGCAGGGAGTCAAGCC R: CCCTGCCTTTCTGCAGG	~145 ATG-Kit	60	MR
D14S1051_ 14q32.31	F: HEX-5'-TCAATGAGGCCAAAGC R: TGTTGACGGTCCCTTG	175-195 ATG-Kit	55	MR
D14S1009_ 14q21.3	F: FAM-5'-CATGTGGACTTCAAATAAAGGTG R: GAAAGTACAATGCCATGTTCCATC	216-256 ATG-Kit	60	MR
D14S1433_ 14q24.3	F: HEX-5'-ACAGTTCCCAAGACTAAACAGC R: TGGAATTCAGTTATTTGTTAATGC	162-176 ATG-Kit	60	MR

Abkürzungen: F: Vorwärts Primer, R: Rückwärts Primer, S: Sequenzier Primer, FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachlorfluorescein, MR: mentale Retardierung, SGA: zu klein und/oder zu leicht für das Geburtsalter und Geschlecht geboren, MLMD: Multi-Locus Methylierungsdefekt, bp: Basenpaar, PM-Kit: PyroMark PCR Kit, ATG-Kit: AmpliTaq Gold Kit

## 2.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die angewandten Methoden erläutert. Das Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel führt molekulargenetische Untersuchungen nach den Bestimmungen der DIN ES ISO 15189:2007 bzw. 2014 durch, sodass die meisten hier verwendeten Protokolle als Standardarbeitsanweisungen vorliegen und entsprechend genutzt wurden. Einige durchgeführte Methoden wurden durch die Technischen Assistentinnen des Instituts für Humangenetik unterstützt oder durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Arbeiten bei Raumtemperatur (RT). Als Übersicht der angewandten Methoden soll die Abbildung 10 dienen, die den Ablauf der verschiedenen Arbeitsschritte darstellt.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe zur Analyse der DNA-Methylierung. Wenn nicht direkt DNA zur Analyse zur Verfügung stand, wurde zunächst aus dem Probenmaterial DNA extrahiert. Die zu analysierende DNA wurde mit Natriumbisulfit konvertiert und die DNA-Methylierung mittels Infinium HumanMethylation27 bzw. Infinium HumanMethylation450 BeadChip bestimmt. Einzelne DNA-Methylierungswerte wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung, mit vorheriger Natriumbisulfit-Konvertierung einer weiteren DNA-Probe, verifiziert.

In der Folgenden Darstellung der angewandten Methoden wird, abweichend von der obigen Darstellung, zunächst auf die rein DNA-basierten Analysen eingegangen. Im zweiten Teil werden dann die Locus-spezifischen und genomweiten DNA-Methylierungsanalysen dargestellt.

### **2.2.1 DNA-Extraktion**

Die genomische DNA (gDNA) wurde aus peripherem Blut (pB) und Zelllinienpellets extrahiert. Die dafür verwendeten Protokolle werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

#### **2.2.1.1 DNA-Extraktion aus peripherem Blut**

Die DNA-Extraktion aus peripherem Blut erfolgte entweder aus frischem oder tiefgefrorenem Blut. Das verwendete Protokoll wird im Folgenden kurz wiedergegeben. Zum Einsatz kamen zwei Zentrifugen, einerseits die Megafuge 1.OR (Rotorradius: 15,5 cm) und andererseits die Biofuge primoR (Rotorradius: 8,7 cm).

- ❖ 3 ml einer pB-Probe wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, 9 ml RBC-Lösung hinzugegeben und beides durch Schwenken gut gemischt. Es wurde 5 Minuten - 10 Minuten (min) bei 391 xg in einer Megafuge 1.OR (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 9 ml RBC-Lösung resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis das Pellet eine weißliche Farbe angenommen hatte. Das Pellet wurden dann in 3 ml Zelllysis-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension anschließend 16 Stunden - 72 Stunden (h) bei 37 °C unter ständiger Bewegung in einem Hybaid Hybridisierungssofen (Biometra) inkubiert.
- ❖ Die Zellsuspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor 1 ml Protein-Präzipitations-Lösung hinzugegeben wurde. Es wurde eine Minute mithilfe eines Vortexgeräts (REAX 2000, Heidolph) gemischt und anschließend das Gemisch für mindestens 10 min auf Eis inkubiert.
- ❖ Die Probe wurde in einer auf 4 °C vorgekühlten Megafuge 1.OR (Heraeus) für 15 min - 30 min bei 3.515 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 4 ml reines Isopropanol (Sigma Aldrich) zum Überstand gegeben. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes fiel die DNA als weißer Faden aus.
- ❖ Der DNA-Faden wurde mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 500 µl 70%igem Ethanol, überführt und durch zentrifugieren für 5 min bei 219 xg in einer Biofuge primoR (Heraeus) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen.
- ❖ Fiel nach Zugabe des Isopropanols kein DNA-Faden aus, wurde das Reaktionsgefäß erneut bei 219 xg für 10 min in einer Biofuge primoR (Heraeus) zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und 500 µl des 70%igen Ethanols hinzugegeben wurde, wurde nach kurzem starken Mischen mittels eines Vortexgeräts (REAX 2000, Heidolph) erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

- ❖ Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend, je nach Pelletgröße, in Aqua bidest (ddH<sub>2</sub>O) bei RT für mindestens 16 h gelöst.

### ***2.2.1.2 DNA-Extraktion aus kultivierten Zellen***

Für die DNA-Extraktion aus Fibroblastenzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) lag das Material in Form von tiefgefrorenen Zellpellets (Lagerung bei -80 °C) vor. Das angewandte Protokoll wird untenstehend beschrieben. Zentrifugiert wurde mittels Biofuge primoR Zentrifuge von Heraeus (Rotorradius: 8,7 cm).

- ❖ Das Zellpellet, aufbewahrt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, wurde auf Eis aufgetaut. Bei RT wurden zu dem Pellet 300 µl Zellysis-Puffer gegeben und das Pellet durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 16 h - 72 h bei 37 °C unter ständiger Bewegung in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert.
- ❖ Die Zellsuspension wurde auf RT abgekühlt und anschließend 100 µl Protein-Präzipitations-Lösung hinzugegeben. Nach einer Minute starken Mischens mittels eines Vortexgeräts (REAX 2000, Heidolph) wurde das Gemisch für mindestens 10 min auf Eis inkubiert.
- ❖ In einer auf 4 °C vorgekühlten Biofuge primoR Zentrifuge (Heraeus) wurde die Probe für 20 min bei 9.744 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 400 µl reines Isopropanol (Sigma Aldrich) wurden zum Überstand gegeben und das Reaktionsgefäß 5 min bei 21.924 xg in einer Biofuge primoR (Heraeus) zentrifugiert.
- ❖ Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 70%igen Ethanol in das Reaktionsgefäß hinzugegeben. Nach kurzem starken Mischen mittels eines Vortexgeräts (REAX 2000, Heidolph) wurde 5 min bei 21.924 xg in einer Biofuge primoR (Heraeus) zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.
- ❖ Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend, je nach Pelletgröße, in ddH<sub>2</sub>O bei RT für mindestens 16 h gelöst.

### ***2.2.2 Quantifizierung der DNA mithilfe eines Fluorometers***

Die extrahierte DNA wurde im nächsten Schritt mithilfe des Qubit 2.0 Fluorometers (Life Technologies) quantifiziert. Bei dieser Methode der Quantifizierung geben fluoreszierende Farbmoleküle nur ein Fluoreszenzsignal ab, wenn diese an spezifische Zielmoleküle, in diesem Fall an doppelsträngige DNA, binden. Zur Quantifizierung wurde das Qubit DNA BR Assay Kit (Life Technologies) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.3 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese diente bei den hier beschriebenen Methoden als Mittel zur Überprüfung von z.B. DNA-Amplifikationsprodukten. Die Methode basiert auf der Trennung von DNA-Molekülen in Abhängigkeit von ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit. Dabei bedient man sich der negativen Ladung der DNA. Nach Anlegen einer Spannung bewegen sich die DNA-Moleküle zum positiven Pol. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Fragmentgröße und der Porengröße des Agarosegels. Je nach zu erwartender DNA-Fragmentgröße wurden 1%ige Agarosegele für DNA-Fragmente bis >1.000 bp, 2%ige Agarosegele bei DNA-Fragmenten <1.000 bp oder 3%ige Agarosegele für DNA-Fragmente ~100 bp hergestellt. Zusammen mit den DNA-Proben wurde immer ein Längenstandard geführt. Bei den 1%igen und 2%igen Gelen war dies der TriDye 100 pb DNA Ladder Längenstandard (New England Biolabs). Bei 3%igen Gelen wurde der HyperLadder 1 kb Längenstandard (Bioline) mitgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 3 µl der Proben mit 3,5 µl Probenladepuffer (Herstellung vergl. Kapitel 2.1.7) und ddH<sub>2</sub>O abhängig vom Taschenvolumen gemischt und aufgetragen. Beim Einsatz des PyroMark PCR Kits wurde das PCR-Amplifikat direkt auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm bei den 1%igen und 2%igen Agarosegelen bzw. bei 10 V/cm bei den 3%igen Gelen. Durch den Vergleich von Längenstandard und DNA-Fragment wurde die Größe des DNA-Fragments bestimmt.

Für die Herstellung eines 2%igen Agarosegels (Standardgel) wurde zunächst eine 1:10 Verdünnung der 10 x TBE Stammlösung (Life Technologies) mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. 4 g Agarose (Biozym) wurden in 200 ml 1 x TBE Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Das Gemisch wurde auf Handwärme abgekühlt und 10 µl Ethidiumbromid (Sigma Aldrich) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Gemisch in eine Gelkammer mit den zu verwendeten Gelkämmen (peqLab Biotechnologie) überführt, wo sich bei Zimmertemperatur das Gel ausbildete.

Für die Herstellung unterschiedlich konzentrierter Agarosegele wurden jeweils Agarosemenge, 1 x TBE Puffervolumen und einzusetzendes Ethidiumbromid (5 µl/100 ml Gellösung) entsprechend angepasst.

### **2.2.4. SNP-Array Analyse**

Uniparentale Disomien und chromosomale Imbalancen können eine Ursache von DNA-Methylierungsstörungen sein (vergl. Kapitel 1.4.2). Folglich werden zur weiteren Abklärung der Ursache einer aberranten DNA-Methylierung Analysen durchgeführt, mit denen UPDs oder Imbalancen nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden können. In dieser Arbeit kam dazu die SNP-Array Analyse zum Einsatz. Mithilfe des hier verwendeten Genome-Wide Human SNP 6.0 Array (Affymetrix) können über 900.000 genomweit verteilte SNPs analysiert werden. Werden die

Genotypen der analysierten SNPs eines Indexpatienten mit denen seiner Eltern verglichen, kann eine Aussage bezüglich einer UPD getroffen werden.

Auf dem Trägermaterial des SNP-Arrays sind 25 bp lange Oligonukleotide fixiert. Diese, auch als Sonden bezeichneten Oligonukleotide, binden entweder das A oder das B Allel eines SNPs spezifisch und werden daher auch als perfect match probes (PM-Sonden) bezeichnet. Die Biotin-markierten DNA-Fragmente binden entsprechend ihres SNPs an einer der beiden PM-Sonden oder, wenn der SNP heterozygot vorliegt, zu gleichen Teilen an beiden PM-Sonden. Nicht gebundene DNA-Fragmente werden entfernt. Die mit DNA gebundenen PM-Sonden geben nach der Färbung ein spezifisches Fluoreszenzsignal ab.

Die SNP-Array Analyse diente hier bei einem Patienten zur Abklärung eines auffälligen DNA-Methylierungsbefunds im *ZDBF2* Gen. Es wurde das Genome-Wide Human SNP 6.0 Array Kit (Affymetrix) gemeinsam mit dem Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit (Affymetrix) verwendet. Das Protokoll zur Probenvorbereitung und Hybridisierung wird im Folgenden kurz dargestellt und entspricht den Angaben des Herstellers (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 User Guide).

- ❖ Die genomische DNA des Patienten wurde durch die beiden Restriktionsenzyme Nsp I und Sty I (New England Biolabs) so fragmentiert, dass die DNA-Fragmente einen Überhang aufwiesen.
- ❖ Restriktionsenzym-spezifische Adapter (Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit (Affymetrix)), welche die 4 bp Überhänge der fragmentierten DNA-Proben erkennen, wurden an die DNA-Fragmente ligiert.
- ❖ In einer anschließenden PCR-Reaktion erkennen Primer (Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit (Affymetrix)) spezifische Sequenzen der Adaptern, sodass die DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die dabei gewählten PCR-Bedingungen bevorzugen die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 200 bp und 1100 bp. Es wurden pro Patient mehrere PCR-Ansätze durchgeführt, um ausreichend Hybridisierungsmaterial zu generieren. Nach der Amplifikation wurden die Reaktionsansätze eines Patienten, die mit dem gleichen Restriktionsenzym fragmentierten wurden, zusammengeführt und mithilfe von magnetischen Beads (Beckmann Coulter) aufgereinigt.
- ❖ Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend durch DNase I (Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit (Affymetrix)) enzymatisch fragmentiert, Biotin-markiert (Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit (Affymetrix)) und auf dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0 hybridisiert (Genome-Wide Human SNP 6.0 Array Kit (Affymetrix)).

- ❖ Mithilfe des GeneChip Scanners (Affymetrix) wurden die Daten des SNP Arrays 6.0 ausgelesen. Die Auswertung der Arrays erfolgte mithilfe der Genotyping Console Software (Affymetrix). Die Analyse und Auswertung wurde von Frau Dr. rer. nat. Inga Vater (Institut für Humangenetik, Kiel) durchgeführt.

### **2.2.5. Mikrosatellitenanalyse**

Eine zweite Methode, die zur weiteren Ursachenklärung bei DNA-Methylierungsstörungen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist die Mikrosatellitenanalyse. Auch mithilfe dieser Methode können UPDs diagnostiziert oder ausgeschlossen werden. Bei der Mikrosatellitenanalyse macht man sich repetitive DNA-Sequenzen, sogenannte Mikrosatelliten, zu nutze. Diese repetitiven Sequenzen bestehen aus zwei bis vier Nukleotiden, die sich bis zu 100-mal wiederholen können. Die Anzahl der Wiederholungen je Individuum ist dabei variabel. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen die gleiche Wiederholungsanzahl eines oder mehrerer Mikrosatelliten aufzeigen ist gering. Untersucht man einen Set verschiedener Mikrosatelliten eines Indexpatienten und dessen Eltern, kann idealerweise darüber geklärt werden, ob die zwei Allele des Indexpatienten zu gleichen Anteilen von Mutter und Vater vererbt wurden, oder ob beide von nur einem Elternteil stammen, also eine uniparentale Disomie vorliegt. Daher muss, um eine Aussage über eine uniparentale Disomie treffen zu können, als Vergleichsmaterial DNA-Material der leiblichen Eltern zur Verfügung stehen. Methodisch werden die DNA-Sequenzen der zu analysierenden Mikrosatelliten des Indexpatienten und der Eltern in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die PCR-Fragmente eines Mikrosatelliten zeigen, je nach Wiederholungsanzahl der repetitiven Sequenz, unterschiedliche Größen. Werden die PCR-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, kann durch den Vergleich mit den elterlichen DNA-Proben der Ursprung der Allele des Indexpatienten festgestellt werden. Wenn kein elterliches DNA-Material zugänglich ist, kann nur eine Isodisomie ausgeschlossen werden. Bei einer Isodisomie liegt dasselbe elterliche Chromosom zweifach vor.

Die Mikrosatellitenanalyse wurde im Teilprojekt "MR Analyse" und im Teilprojekt "SGA Analyse" durchgeführt. Im Teilprojekt "SGA Analyse" wurden Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 2 untersucht. Für diese Analyse stand DNA-Material der Eltern und zweier Geschwister des Indexpatienten zur Verfügung. Im Teilprojekt "MR Analyse" wurden Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14 untersucht. Für diese Analyse stand nur DNA-Material des Indexpatienten zur Verfügung.

Das durchgeführte Protokoll wird im Folgenden kurz dargestellt. Die verwendeten Primer richteten sich nach den zu analysierenden Mikrosatelliten und sind im Kapitel 2.1.8 in Tabelle 18 aufgeführt. Die PCR-Fragmentauftrennung erfolgte mittels ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies).

- ❖ 1 µl einer 100 ng/µl konzentrierten DNA-Probe des Indexpatienten, der Eltern sowie einer Kontroll-DNA wurde je in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die Kontroll-DNA diente als PCR-Amplifikationskontrolle. Je 24 µl eines Mastermixes wurden zu den vorgelegten DNA-Proben bzw. dem ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Der Mastermix für die Mikrosatellitenanalyse mithilfe des AmpliTaq Gold Polymerase Kits setzte sich wie folgt zusammen:

ddH <sub>2</sub> O	17,3 µl
10 x Amplitaq Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTPs (5 mM je Nukleotid)	1 µl
F-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl
R-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl
AmplitaqGold Polymerase	0,2 µl
<b>Gesamt</b>	<b>24 µl</b>

Die Amplifikationsreaktion erfolgte in einem Thermocycler. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach dem eingesetzten Primerpaar (vergl. Kapitel 2.1.8). Folgend sind die PCR-Bedingungen angegeben:

95 °C	5 min	} 36 Zyklen
95 °C	30 s	
55/60/65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	

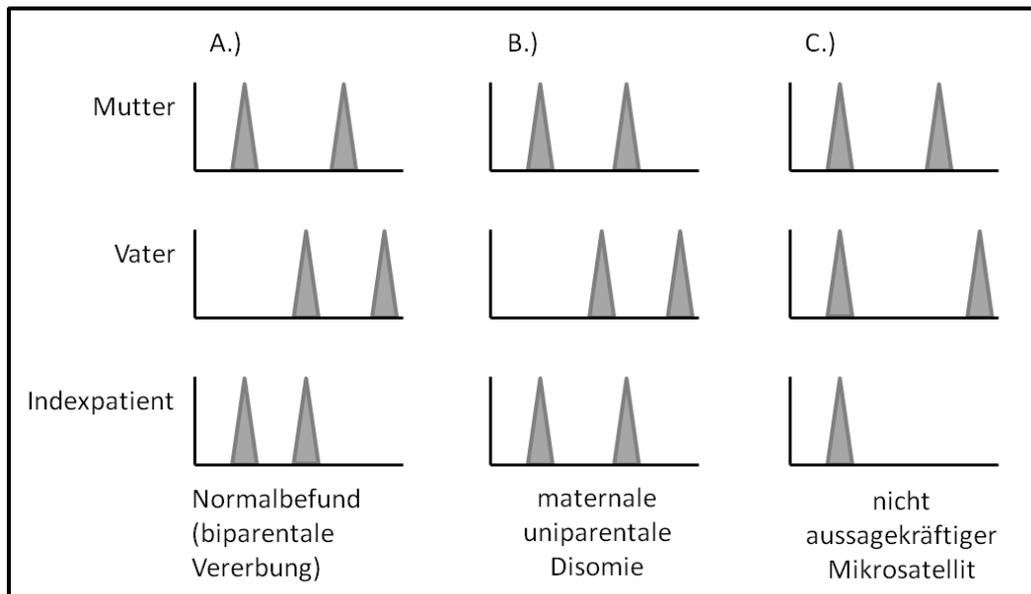
- ❖ Auf einem 2%igen Agarosegel wurden 10 µl jedes PCR-Ansatzes aufgetragen, um mithilfe der Bandenintensität die Ausbeute der Amplifikation zu kontrollieren. Entsprechend der Bandenintensität wurde entschieden, wie stark die einzelnen PCR-Produkte für die Analyse im Kapillarelektrophorese-Gerät verdünnt werden müssen. In der Regel wurden die PCR-Produkte 1:10 oder 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.
- ❖ Pro zu analysierender Probe wurde ein Mastermix aus 9,5 µl Hi-Di Formamide (Life Technologies) und 0,5 µl GeneScan 500 ROX Size Standard (Life Technologies) angefertigt. Zu 10 µl dieses Mastermixes wurde 1 µl des gegebenenfalls vorverdünnten PCR-Produkts pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden 5 min bei 95 °C im Thermocycler denaturiert und anschließend im Thermocycler auf 4 °C gekühlt.
- ❖ Von jedem Reaktionsansatz wurden 10 µl in ein Well einer 96-Well-Platte mittels einer Pipette überführt. Die Fragmentauftrennung erfolgte auf dem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) mit einer Injektionszeit von 15 s und einer Laufzeit von 30 min.

- ❖ Die Auswertung erfolgte mithilfe der GeneMapper 5 Software (Life Technologies), welche die Fragmentgröße der PCR-Amplifikate in Form von Peaks ausgibt.

Jedes untersuchte Individuum trägt den zu analysierenden Mikrosatelliten auf beiden Chromosomen, dabei kann sich die Anzahl sich wiederholender, repetitiver Sequenzen auf den beiden Chromosomen unterscheiden. Das bedeutet, dass für jedes untersuchte Individuum je Mikrosatellit zwei Peaks in der Auswertung zu sehen sein können. Trägt der Untersuchte allerdings auf beiden Chromosomen eine repetitive Sequenz gleicher Größe, ist nur ein Peak in der Auswertung nachweisbar.

Für den Nachweis einer möglichen UPD des Chromosoms 2 wurde das Peakmuster des Indexpatienten aus dem Teilprojekt "SGA Analyse" mit dem seiner Eltern verglichen. Dabei wurde darauf geachtet, ob das Peakmuster des Indexpatienten auch in der Auswertung der Eltern zu sehen war. Bei einer unauffälligen biparentalen Vererbung würde sich ein Peak in der Auswertung der Mutter und der zweite in der Auswertung des Vaters wiederfinden. Der Indexpatient hätte dann diesen Mikrosatelliten, und damit mindestens diesen Anteil seines Chromosoms 2, zu gleichen Anteilen von seinen Eltern geerbt. Bei einer uniparentalen Vererbung wäre hingegen beim Indexpatienten nur das Peakmuster eines Elternteils nachweisbar. Die Mikrosatellitenanalyse wurde für mehrere Mikrosatelliten auf dem zu analysierenden Chromosom durchgeführt, sodass darüber theoretisch eine Aussage über das Ausmaß einer UPD (partielle *versus* komplette) getroffen werden könnte. Nicht aussagekräftige Mikrosatelliten zeigen bei beiden Elternteilen das gleiche Peakmuster. Das heißt beide Elternteile tragen den Mikrosatelliten in gleicher Größe. Somit kann der Vergleich der Peakmuster von Indexpatient und Eltern nicht dazu herangezogen werden, eine UPD nachzuweisen oder auszuschließen. In der Abbildung 11 wurden einige der hier beschriebenen potenziellen Ergebnisse dargestellt.

Stand kein Material der Eltern zur Verfügung, kann mithilfe der Mikrosatellitenanalyse nur eine Isodisomie ausgeschlossen werden. Bei einer Isodisomie stammen beide Chromosomen des Untersuchten von einem Elternteil. Dabei liegt dasselbe elterliche Chromosom zweifach vor. Daher wurde jeder auf dem betroffenen Chromosom untersuchte Mikrosatellit nur eine bestimmte Größe und damit in der Mikrosatellitenauswertung nur einen Peak aufzeigen. Diese Analyse wurde für einen Indexpatienten aus dem Teilprojekt "MR Analyse" für das Chromosom 14 durchgeführt.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse einer Mikrosatellitenanalyse. Dargestellt sind für drei untersuchte Individuen (Mutter, Vater und Indexpatient), je drei schematische Auswertungen einer Mikrosatellitenanalyse. Jedes Dreieck stellt einen durch die Auswertesoftware ermittelten Peak dar, der wiederum PCR-Fragmente bestimmter Größe widerspiegelt. Je weiter rechts ein Dreieck gezeigt ist, umso größer ist das entsprechende PCR-Fragment, umso länger die untersuchte, repetitive Mikrosatellitensequenz. A.) Im Normalbefund erkennt man, dass der Indexpatient Peaks aufzeigt, von denen jeweils einer auch bei den Eltern zu sehen ist. Das heißt, diesen Mikrosatelliten hat der Indexpatient zu gleichen Anteilen von seinen Eltern geerbt. B.) Bei dem Befund der maternalen uniparentalen Disomie ist zu erkennen, dass die Peaks des Indexpatienten den Peaks der Mutter entsprechen. Kein Peakmuster des Vaters ist in der Mikrosatellitenanalyse des Indexpatienten zu sehen. C.) In der Darstellung des nicht aussagekräftigen Mikrosatelliten sind für die Eltern jeweils zwei Peaks zu erkennen von denen jeweils einer die identische Länge aufweist. Der Indexpatient zeigt nur den Peak, der bei Mutter und Vater identisch vorliegt. Somit ist unklar, ob der Indexpatient den Mikrosatelliten des Vaters, der Mutter oder jeweils von beiden geerbt hat.

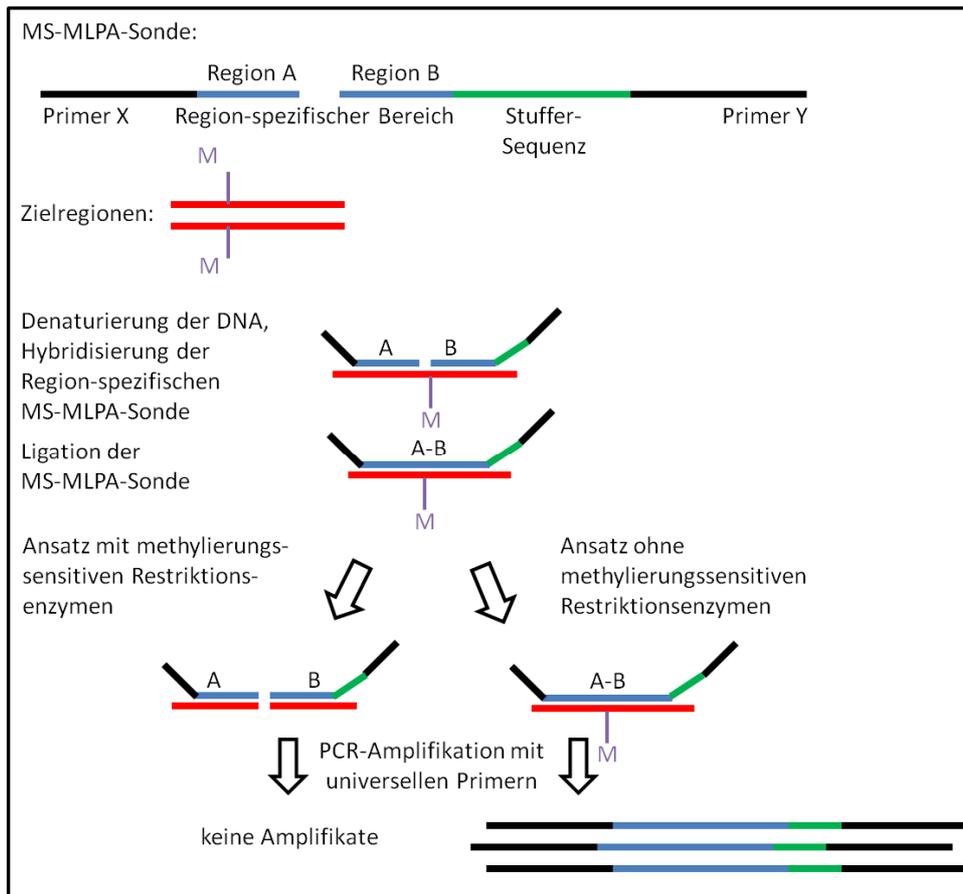
### 2.2.6. *Methylierungs-spezifische multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation*

Die Methylierungs-spezifische multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation (MS-MLPA) stellt derzeit den Goldstandard in der Routinediagnostik von Imprintingssyndromen dar. Mithilfe dieser Technik können zwei potenzielle Ursachen von Imprintingstörung detektiert werden. Zum einen wird in der MS-MLPA die Kopienzahl der analysierten Region bestimmt, sodass sowohl chromosomale Verluste als auch Zugewinne als mögliche Ursache von Imprintingstörungen detektiert werden können. Zum anderen wird durch das Verwenden eines methylierungssensitiven Restriktionsenzym (RE) der DNA-Methylierungsstatus geprägter Regionen analysiert, sodass auch primäre DNA-Methylierungsdefekte erkannt werden. Wird nur die Kopienzahl bestimmter chromosomale Region analysiert spricht man von der multiplex-ligationsabhängige Probenamplifikation (MLPA).

Die MS-MLPA wurde in der vorliegenden Arbeit zur Verifizierung der DNA-Methylierungsveränderung am *MEG3* Genort (Teilprojekt "MR Analyse") sowie am *PLAGL1* Genort (Teilprojekt "Ekstrophie Analyse") verwendet. Methodische Grundlage ist die parallele PCR-basierte Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen in einem Reaktionsansatz.

Jede MLPA-Sonde besteht aus zwei Oligonukleotiden, die wiederum aus mindestens zwei Sequenzanteilen aufgebaut sind. Ein Anteil ist komplementär der zur analysierenden DNA-Sequenz. Der zweite Anteil ist komplementär zu eingesetzten PCR-Primern. Des Weiteren enthält eines der beiden Oligonukleotide der MLPA-Sonde eine sogenannte Stuffer-Sequenz, die je MLPA-Sonde eine variable aber spezifische Länge aufweist. Die einzelnen Primer eines Sondenpaars sind so hergestellt, dass sie in der normalen DNA-Sequenz direkt nebeneinander hybridisieren. In einem Ligationsschritt werden beide Primer durch eine Ligase ligiert und in der folgenden PCR-Reaktion mithilfe universeller Primer, die an die PCR-Primer Sequenz der MLPA-Sonden binden, amplifiziert. In jedem MLPA Kit sind mehrere solcher MLPA-Sonden enthalten, sodass unterschiedliche DNA-Sequenzen parallel amplifiziert werden können. Die entstehenden PCR-Produkte können aufgrund der Länge der jeweils spezifischen Stuffer-Sequenzen unterschieden werden. Ist eine zu analysierende Region deletiert, fehlt das PCR-Produkt der entsprechenden Größe oder es ist vermindert. Ist die Sequenz, z.B. aufgrund eines Zugewinns vervielfältigt, erhält man das entsprechende PCR-Produkt in erhöhter Menge. Über diesen Teil der Analyse erhält man Auskunft über die Kopienzahl der zu analysierenden Regionen.

Um parallel auch Informationen über den DNA-Methylierungsstatus zu erhalten, werden in einem zweiten Reaktionsansatz die Ligationsprodukte vor der PCR-Amplifikationsreaktion mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen verdaut. Diese Enzyme verdauen bzw. schneiden doppelsträngige DNA nur, wenn die CpGs in ihrer Erkennungssequenz nicht methyliert vorliegen. Ist die Erkennungssequenz z.B. aufgrund eines Imprintingfehlers hypomethyliert, wird das DNA-Molekül verdaut. In der Amplifikationsphase kann das entsprechende DNA-Molekül somit nicht vervielfältigt werden und das PCR-Produkt der entsprechenden Größe fehlt. Bei einer methylierten Erkennungssequenz kann die PCR-Amplifikation normal stattfinden und das PCR-Produkt entsprechender Größe wird detektiert. Bei einer Hypermethylierung liegen die Erkennungssequenzen beider Allele methyliert vor. Somit werden beide Allele nicht verdaut. Dies führt in der Amplifikationsreaktion zur Vervielfältigung beider Allele, sodass das entsprechende PCR-Produkt anschließend in doppelter Menge vorliegt. Abbildung 12 fasst die verschiedenen Schritte der MS-MLPA zusammen.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung einer Methylierungs-spezifischen multiplex-ligationsabhängigen Probenamplifikation (MS-MLPA). Region-spezifische MS-MLPA-Sonden bestehen aus zwei Oligonukleotiden. Jedes davon ist aufgebaut aus der Region-spezifischen Sequenz (blau dargestellt) und der universellen Primersequenzen (schwarz dargestellt). Ein Oligonukleotid der MS-MLPA-Sonde enthält außerdem eine Stuffer-Sequenz (grün dargestellt), welche die für die MS-MLPA-Sonde spezifische Länge besitzt. Die doppelsträngige Proben-DNA wird denaturiert und die Sonden an die komplementäre DNA hybridisiert. In einem Ligationsschritt werden die nebeneinander liegenden MS-MLPA-Sonden ligiert. Anschließend erfolgt ein Verdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen (RE). Methylierte Erkennungssequenzen der RE werden nicht, unmethylierte Sequenzen werden geschnitten. Nur unverdaute Regionen können in der nachfolgenden PCR-Reaktion amplifiziert und später der Größe nach aufgetrennt werden. (Abbildung modifiziert nach Nygren et al. (2005) [171])

Im Folgenden wird das Protokoll für die MS-MLPA zur Analyse der geprägten Regionen auf Chromosom 6, Chromosom 7 und Chromosom 14 beschrieben. Das SALSA MLPA Kit ME032-A1 enthält die dafür spezifischen Sonden. Des Weiteren wurde für die Durchführung ein Reagenz Kit benötigt. Alle Kits wurden nach den Herstellerangaben (MRC Holland) verwendet. Die anschließende Fragmentanalyse erfolgte mit dem Kapillarelektrophoresegerät CEQ 8000 (Beckmann Coulter).

- ❖ 5 µl der auf 50 ng/µl - 100 ng/µl mit ddH<sub>2</sub>O voreingestellten Patienten-DNA, drei Kontroll-DNA Proben (vergl. Kapitel 2.1.2) sowie 5 µl ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) wurden jeweils in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und 10 min bei 98 °C in einem Thermocycler denaturiert. Alle Reaktionsansätze wurden im Thermocycler auf 25 °C abgekühlt. Danach wurden 1,5 µl SALSA Sondenmix (SALSA MLPA Kit ME032-A1, MRC Holland) und 1,5 µl SALSA MLPA Puffer (SALSA

MLPA Reagent Kit, MRC Holland) hinzu pipettiert. Diese Ansätze wurden 1 min bei 95 °C und anschließend für mindestens 16 h bei 60 °C im Thermocycler inkubiert.

- ❖ Zu jedem Ansatz wurden 3 µl Ligase Puffer A (SALSA MLPA Reagent Kit, MRC Holland) und 10 µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert, durch auf- und abpipettieren gut gemischt und anschließend das Volumen jedes Ansatzes auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Alle Reaktionsansätze wurden 1 min im Thermocycler bei 48 °C inkubiert und verblieben anschließend weiterhin im Thermocycler. In eines der zwei Reaktionsgefäße pro DNA-Probe wurden 10 µl Ligase-65 Mix hinzupipettiert. Dieser Reaktionsansatz diente später zur Analyse der Kopienzahl. In das zweite Reaktionsgefäß wurde für den Test des DNA-Methylierungsstatus je Probe 10 µl Ligase-Verdau-Mix hinzupipettiert. Im Folgenden werden die Zusammensetzungen des Ligase-65 Mixes und des Ligase-Verdau-Mixes aufgeführt. Der Ligase Puffer B und die SALSA Ligase-65 sind im SALSA MLPA Reagent Kit (MRC Holland) enthalten. Das eingesetzte Hha I Enzym stammt von der Firma Promega.

	<u>Ligase-65 Mix</u>	<u>Ligase-Verdau-Mix</u>
ddH <sub>2</sub> O	8,25 µl	7,75 µl
Ligase Puffer B	1,5 µl	1,5 µl
SALSA Ligase-65	0,25 µl	0,25 µl
Hha I		0,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

Alle Reaktionsansätze wurden zunächst 30 min bei 48 °C und anschließend 5 min bei 98 °C im Thermocycler inkubiert.

- ❖ Nach der Inkubationszeit wurden 5 µl Polymerase-Mix, welcher sich aus 1 µl SALSA PCR Primer und 0,25 µl SALSA Polymerase (beides SALSA MLPA Reagent Kit, MRC Holland) sowie 3,75 µl ddH<sub>2</sub>O zusammensetzt, zu den Reaktionen gegeben und eine PCR mit den folgenden Bedingungen gestartet:

95 °C	30 s	} 35 Zyklen
60 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	20 min	
15 °C	∞	

10 µl jedes Reaktionsansatzes wurden mit 3 µl Probenladepuffer (Herstellung vergl. Kapitel 2.1.7) versetzt und anschließend zu Kontrollzwecken auf einem 2%igem Agarosegel aufgetragen. Die zu erwartenden Fragmentgrößen lagen zwischen 100 bp und 500 bp.

- ❖ Die Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe erfolgte mithilfe des CEQ8000 Kapillarelektrophorese-Systems (Beckmann Coulter). Je 1 µl der PCR-Produkte wurden mit 0,5 µl CEQ DNA Size Standard Kit-600 Reagenz (Beckmann Coulter) und 32 µl Proben-Lade-Lösung (Beckmann Coulter) in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert und mit Mineralöl (Beckmann Coulter) überschichtet. In einer zweiten 96-Well Platte wurden dieselben Positionen mit Sequenzier-Separations-Puffer (Beckmann Coulter) gefüllt. Beide Platten wurden entsprechend der Geräteanleitung in das Kapillarelektrophoresegerät CEQ 8000 gestellt und die Analyse gestartet.
- ❖ Die verschiedenen Fragmentgrößen wurden durch die GenomeLab GeXP Genetic Analysis Software (Beckmann Coulter) als Peaks in einem Elektropherogramm dargestellt.
- ❖ Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mithilfe einer institutsinternen, Excel-basierten Auswertemethode. In jedem MS-MLPA Kit sind MLPA-Sonden für chromosomale Regionen enthalten, die in anderen nicht mit der Fragestellung assoziierten Regionen liegen. Mithilfe dieser Referenzregionen erfolgte die relative Quantifizierung. Es wurde das Verhältnis der Peakhöhen von der zu analysierenden DNA-Probe zu den mitgeführten Kontroll-DNA-Proben pro zu analysierender Region gegen das Verhältnis jeder Referenzprobe normalisiert. Anschließend wurde der Mittelwert über alle Verhältniswerte je MLPA-Sonde ermittelt und graphisch dargestellt. Über diesen Mittelwert wurden Abweichungen der normalen Kopienzahl und/oder Abweichungen vom normalen DNA-Methylierungsstatus der zu analysierenden DNA-Probe ermittelt. Für den unverdauten Ansatz zeigten Mittelwerte zwischen 0,65 und 1,34 eine physiologische Kopienzahl an. Niedrigere Mittelwerte sprachen für chromosomale Verluste, höhere Mittelwerte entsprechend für chromosomale Zugewinne. Für den verdauten Ansatz lagen die Grenzen für die nicht die DNA-Methylierung analysierenden Sonden ebenfalls bei Mittelwerten zwischen 0,65 und 1,34. Mittelwerte der methylierungssensitiven Sonden kleiner einem Wert von 1 sprachen für eine Hypomethylierung, größere Mittelwerte für eine Hypermethylierung der analysierten Region.

### ***2.2.7 Herstellung der gesamtgenom-amplifizierten DNA aus Pool-DNA***

Gesamtgenom-amplifizierte DNA und Pool-DNA wurden, wie in Kapitel 2.2.1 kurz dargestellt, als Kontrollen für die DNA-Methylierungsanalysen verwendet. Ihre Zusammensetzung und Herstellung wird im Folgenden dargestellt.

Die Pool-DNA setzte sich zusammen aus DNA-Proben, die aus peripherem Blut von zehn weiblichen und zehn männlichen gesunden Individuen extrahiert wurden. Jede zu verwendende DNA-Probe wurde auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Die Pool-DNA setzte sich dann zusammen aus

je 1 µl jeder dieser insgesamt 20 DNA-Proben. Wurde ein Aliquot dieser Pool-DNA gesamtgenom-amplifiziert, erhielt man die sogenannte WGA-Kontrolle (whole genome amplification, WGA). Diese DNA-Proben weisen keine DNA-Methylierung auf, weil in dem Prozess der Amplifikation nur unmethylierte Cytosine eingebaut werden. Das WGA Protokoll wird im Folgenden kurz dargestellt. Es wurde das illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) verwendet. Für die Zentrifugationsschritte wurde die Tischzentrifuge Mikro200 (Hettich) (Rotorradius: 8,5 cm) oder die Multifuge X1R (Heraeus) (Rotorradius: 9,8 cm) verwendet.

- ❖ Die benötigten Reagenzien (Proben Puffer, Peaktions-Puffer und Enzym Mix) aus dem illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Es wurden immer mehrere Aliquots (je 1 µl) der Pool-DNA und eine Wasserkontrolle behandelt.
- ❖ Bei Raumtemperatur wurden je 1 µl Pool-DNA bzw. 1 µl ddH<sub>2</sub>O mit 9 µl Proben Puffer (illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit) in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Alle Proben wurden in einem Thermocycler bei 95 °C für 3 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.
- ❖ Für die Amplifikationsreaktion wurde für jede Probe ein Mastermix aus 9 µl Reaktions-Puffer und 1 µl Enzym Mix (jeweils aus dem illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit) pro Probe auf Eis zusammenpipettiert und davon je 10 µl in jeden Reaktionsansatz gegeben. Die isothermale Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler für 90 min bei 30 °C. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung für 10 min bei 65 °C.
- ❖ 2,5 µl jedes Ansatzes wurden mit 3,5 µl Probenladepuffer (Herstellung vergl. Kapitel 2.1.7) versetzt und die Amplifikationsreaktion auf einem 1,5%igen Agarosegel kontrolliert.
- ❖ Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mittels Wizard DNA Clean-Up System (Promega). Zunächst wurde das Wizard DNA Clean-UpResin per Hand geschüttelt, damit sich eventuell entstandene Kristalle auflösten. Das Wizard DNA Aufreinigungssystem wurde entsprechend der Herstellerangaben aufgebaut, wobei Syringe Barrels und Minifiltersäulen zusammgebaut wurden. Die Amplifikate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Amplifikate, die ein Volumen unter 50 µl aufwiesen, wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl eingestellt. 1 ml Wizard DNA Clean-UpResin wurde zu jeder Probe pipettiert und dieser Mix in die Syringe Barrels überführt. An das Aufreinigungssystem und darüber auf die Syringe Barrels, wurde solange Vakuum angelegt, bis die gesamte Flüssigkeit aus den Syringe Barrels entfernt war. Anschließend wurden auf jeden Filter der Minifiltersäulen 2 ml 80%iges Isopropanol (Herstellung vergl. Kapitel 2.1.7) pipettiert und erneut die gesamte Flüssigkeit durch Anlegen von Vakuum entfernt. Das Vakuum wurden ca. 30 s aufrechterhalten, um die DNA zu trocknen. Die Minifiltersäulen wurden von den Syringe

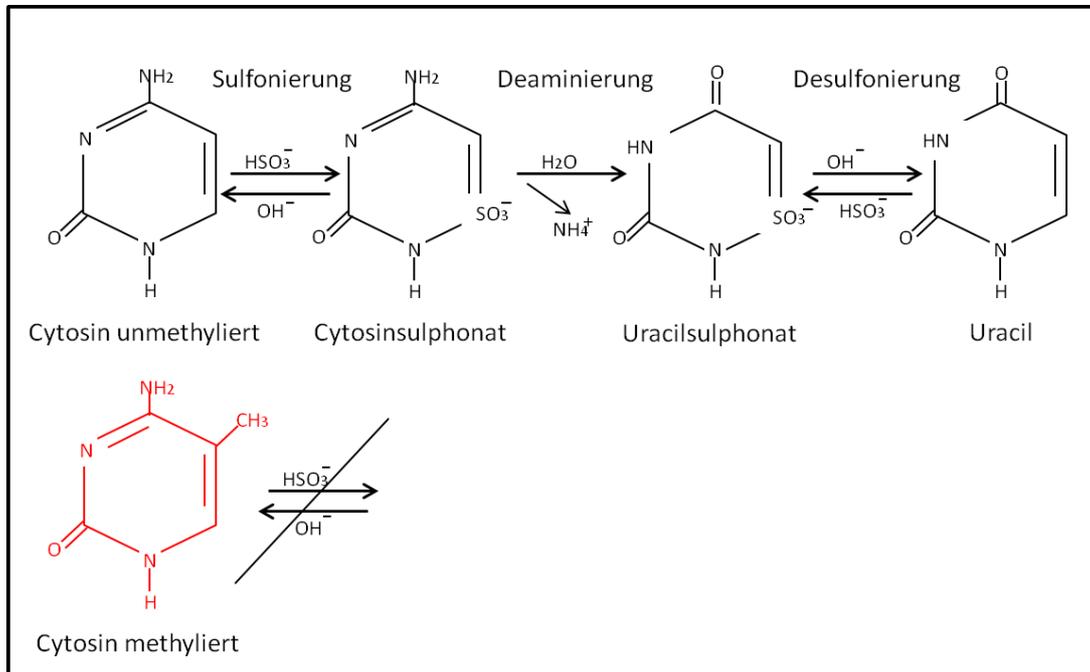
Barrels getrennt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt und für 2 min bei 95 xg in einer Tischzentrifuge Mikro200 (Hettich) zentrifugiert. Die Minifiltersäulen wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 50 µl auf 70 °C erwärmtes ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben, 1 min bei RT inkubiert und schließlich für 20 s bei 18,659 xg in einer Tischzentrifuge Mikro200 (Hettich) zentrifugiert.

- ❖ Es folgte die Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels. 2,5 µl der eluierten DNA wurden mit 3,5 µl Probenladepuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben auf dem Agarosegel erfolgte zur Kontrolle der Amplifikations- und Aufreinigungsreaktion.
- ❖ Die WGA DNA-Proben wurden anschließend gefällt. Hierfür wurden eluierte DNA und absoluter Ethanol zu gleichen Teilen gemischt. Außerdem wurden 10 µl einer 3 M Natriumacetatlösung dazu pipettiert. Die DNA-Proben inkubierten eine Stunde bei RT und wurden anschließend 20 min in einer auf 4 °C gekühlten Multifuge X1R (Heraeus) bei 247 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70%igem Ethanol aufgewirbelt und erneut für 5 min in einer Multifuge X1R (Heraeus) bei 247 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und anschließend in 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.
- ❖ Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Qubit® 2.0 Fluorometers (Life Technologies) quantifiziert (vergl. Kapitel 2.2.2).

### ***2.2.8 Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA***

Um die DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung und Infinium HumanMethylation BeadChip Arrays bestimmen zu können, muss die gDNA zunächst mit Natriumbisulfit behandelt werden. Dabei werden unmethylierte Cytosine (C) unter alkalischen Bedingungen und einer relativ kurz gehaltenen Reaktionszeit zu Uracil umgewandelt. Bei einem methylierten Cytosin erfolgt diese Umwandlung sehr viel langsamer als bei einem unmethylierten Cytosin, sodass diese unverändert aus der Reaktion hervorgehen [172]. Die Konvertierung eines unmethylierten Cytosins zu Uracil wird schematisch in Abbildung 13 gezeigt. Nach der Konvertierung folgt eine Amplifikationsreaktion in der Uracil (U) durch Thymin (T) ersetzt wird, sodass beim anschließenden Sequenzieren unmethylierte Cytosine als Thymine detektiert werden. Die Natriumbisulfit-Konversion mit anschließender Amplifikation hat zur Folge, dass zwei nicht mehr komplementäre DNA-Stränge am Ende der Reaktion vorliegen. Wenn in der vorliegenden Arbeit von der "Konvertierung" oder von einer "konvertierten DNA-Probe" gesprochen wird, ist gemeint, dass beide Prozesse, die Konversion eines unmethylierten C zu U und der Austausch von U zu T, abgelaufen sein sollte.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Konvertierungsprotokolle verwendet. Für die hier beschriebene Natriumbisulfit-Konvertierung wurde als optimale Ausgangsmenge 1 µg genomischer DNA eingesetzt.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Natriumbisulfit-Konvertierung genomischer DNA. Durch die Methylgruppe am fünften Kohlenstoffatom kann das Cytosin in der Reaktion mit Natriumbisulfit unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht zu Uracil umgewandelt werden. Dagegen wird nicht-methyliertes Cytosin unter Entstehung von Zwischenprodukten zu Uracil konvertiert. T: Thymin, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin (Abbildung modifiziert nach Carew et al. (1985) [172])

### 2.2.8.1 Natriumbisulfit-Behandlung von Proben zur anschließenden Bestimmung der DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

Für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wurden die DNA-Proben zunächst mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) konvertiert. Als Kontrollen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wurden neben den zu analysierenden DNA-Proben je Konvertierungsansatz sowohl eine vollständig methylierte Kontrolle (MK, Millipore oder EpigenDX), eine vollständig unmethylierte Kontrolle (WGA) sowie eine Normalkontrolle (Pool-DNA) (Pool-DNA und WGA-Herstellung vergl. Kapitel 2.2.7) mitgeführt. Das für die Konvertierung verwendete Protokoll wird im Folgenden kurz beschrieben und entspricht den Herstellerangaben des verwendeten Kits. Wenn nicht anders angegeben wurde für die Zentrifugationsschritte die Tischzentrifuge Mikro200 (Hettich) (Rotorradius: 8,5cm) verwendet.

- ❖ In einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß wurde 1 µg auf 50 ng/µl vorverdünnte DNA vorgelegt. Nach anschließender Zugabe von 85 µl Bisulfit Mix (EpiTect Bisulfite Kit) und 35 µl DNA Protect Puffer (EpiTect Bisulfite Kit) wurde das Endvolumen auf 140 µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

99 °C	5 min
60 °C	25 min
99 °C	5 min
60 °C	85 min
99 °C	5 min
60 °C	175 min
20 °C	∞

- ❖ Jeder Reaktionsansatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 560 µl BL Puffer (EpiTect Bisulfite Kit) hinzugegeben. Proben, die nicht mehr die optimale Ausgangsmenge DNA aufwiesen, wurden mit 5,6 µl Carrier RNA (EpiTect Bisulfite Kit) versetzt. Die Reaktionsansätze wurden gut gemischt, leicht mittels einer Minizentrifuge (Biozyme) anzentrifugiert, auf EpiTect Säulen überführt und diese 1 min bei 18.659 xg zentrifugiert.
- ❖ Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen wieder in das Reaktionsgefäß gestellt. 500 µl BD Puffer (EpiTect Bisulfite Kit) wurden auf die Säulen pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 min bei 18.659 xg zentrifugiert.
- ❖ Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl BW Puffer (EpiTect Bisulfite Kit) auf die Säulen gegeben. Die Proben wurden 1 min bei 18.659 xg zentrifugiert und dieser Waschschrift erneut wiederholt.
- ❖ Die Säulen wurden in neue 1,5 ml Sammelgefäße überführt und 1 min bei 18.659 xg zentrifugiert. Erneut wurden die Säulen in saubere 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 µl ddH<sub>2</sub>O auf die Säulenmembran pipettiert. Durch Zentrifugation (1 min bei 17.709 xg) wurde die konvertierte DNA von der Säule eluiert. Die DNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### ***2.2.8.2 Natriumbisulfit-Behandlung von DNA-Proben zur anschließenden Bestimmung der DNA-Methylierung mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array***

Sollte die DNA-Methylierung mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip bestimmt werden, wurde das EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) für die Natriumbisulfit-Behandlung der DNA-Proben verwendet. Die Konvertierung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben und wird hier kurz wiedergegeben. Für die Zentrifugationsschritte wurde die Tischzentrifuge Mikro200 (Hettich) (Rotorradius: 8,5cm) verwendet.

- ❖ 1 µg der Ausgangs-DNA wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße überführt und auf 45 µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt. Das Endvolumen wurde mit M-Dilution Puffer (EZ DNA Methylation Kit) auf 50 µl eingestellt. Die DNA-Proben wurden für 15 min bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert.

- ❖ Zu jeder DNA-Probe wurden 100 µl des CT Konversions-Reagenz (EZ DNA Methylation Kit) gegeben und durch auf- und abpipettieren gut gemischt. Die Konvertierungsreaktion erfolgte in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

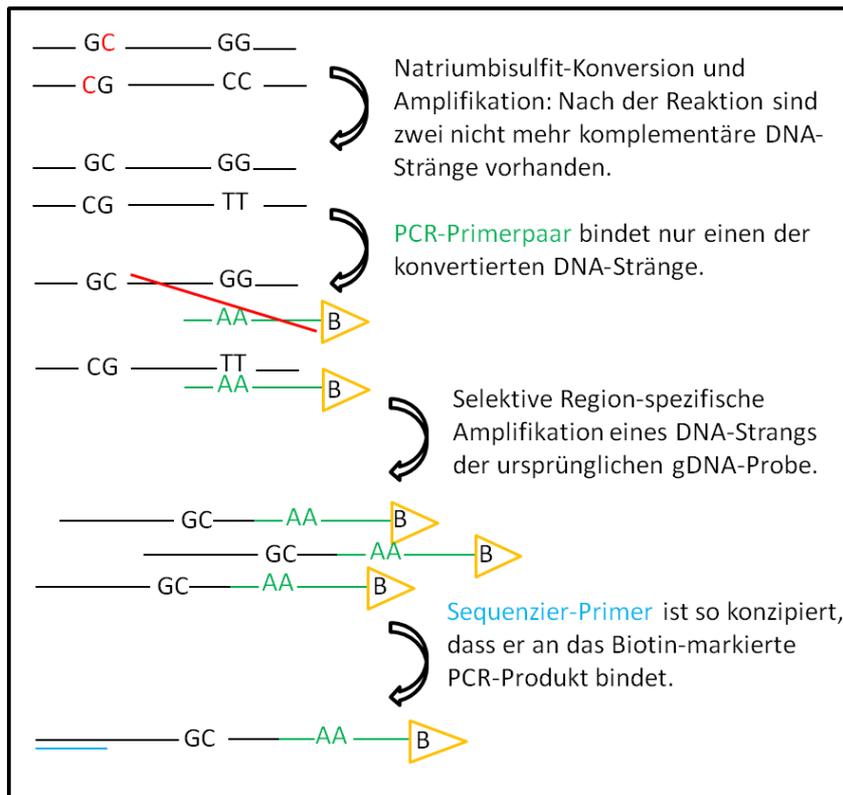
95 °C	30 s	}	16 Zyklen
50 °C	60 min		
4 °C	∞		

Anschließend wurden die DNA-Proben 10 min in einem Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

- ❖ Zymo-Spin Säulen (EZ DNA Methylation Kit) wurden in die Sammelreaktionsgefäße gestellt (EZ DNA Methylation Kit) und je 400 µl Binde-Puffer (EZ DNA Methylation Kit) auf jede Säule gegeben. Jede konvertierte DNA-Probe wurde auf eine so vorbereitete Säule pipettiert und mit dem Puffer durch auf- und abpipettieren vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden 30 s bei 18.659 xg zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen.
- ❖ 100 µl M-Wasch-Puffer (EZ DNA Methylation Kit) wurden auf die Säulen pipettiert und 30 s bei 18.659 xg zentrifugiert. Als nächstes wurden 200 µl M-Desulphonierungs-Puffer (EZ DNA Methylation Kit) hinzugegeben und bei RT 15 min - 20 min inkubiert. Es wurde 30 s bei 18.659 xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
- ❖ Auf jede Säule wurden 200 µl M-Wasch-Puffer (EZ DNA Methylation Kit) pipettiert und 30 s bei 18.659 xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und nachfolgend die Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.
- ❖ Die konvertierte DNA wurde durch Zugabe von 10 µl ddH<sub>2</sub>O und eine Zentrifugation über 30 s bei 18.659 xg von der Säule eluiert. Die DNA wurde entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### ***2.2.9 Regionen-spezifische DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung***

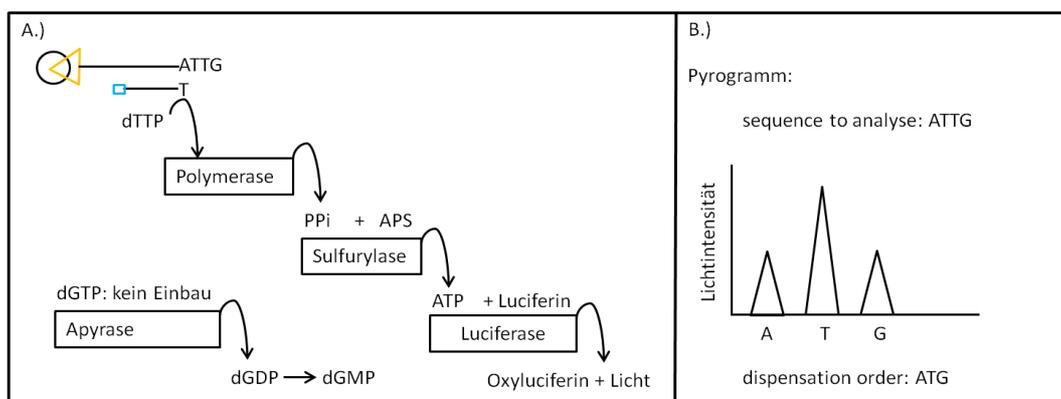
Mithilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung kann die Cytosinmethylierung Region-spezifisch ermittelt werden. Nach der Natriumbisulfit-Konvertierung der gDNA wird die zu analysierende DNA-Sequenz mit spezifischen Primern amplifiziert. Dabei ist wichtig, dass ein Primer des Primerpaars am 5'-Ende Biotin-markiert ist. Nach der PCR-Amplifikation werden die Amplifikate mithilfe Streptavidin-gekoppelter Sepharosebeads aufgereinigt. Über die Biotinmarkierung wird der Primer und damit das zu analysierende Amplifikat an die Streptavidin-gekoppelten Sepharosebeads gebunden (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Bindung der Bisulfit-Pyrosequenzier-Primer an konvertierte DNA. Nach Natriumbisulfit-Konversion und anschließender Amplifikation liegen methylierte Cytosine der gDNA (in rot dargestellt) als Cytosine und unmethylierte Cytosine als Thymin vor. Daraus folgt, dass nach der Konversionsreaktion zwei nicht mehr komplementäre DNA-Stränge vorliegen. Die PCR-Primer (ein Primer des Primerpaares ist in grün dargestellt), die vor der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion zur Amplifikation der gewünschten Region verwendet werden, binden nur einen der konvertierten DNA-Stränge. Die Sequenz der PCR-Primer ist nicht komplementär zum zweiten DNA-Strang, sodass die Primer daran nicht hybridisieren können (mit rotem Strich durchgestrichen dargestellt). Es kommt zur selektiven Amplifikation nur eines DNA-Strangs. Da einer der PCR-Primer Biotin-markiert ist (dargestellt durch ein gelbes Dreieck mit B), entstehen PCR-Amplifikate, von denen je ein Strang Biotin-markiert ist. Der später eingesetzte Sequenzier-Primer (in blau gezeigt) ist so konzipiert, dass er nur an den Biotin-markierten PCR-Strang bindet.

Nach einem Denaturierungsschritt liegen die PCR-Amplifikate einzelsträngig vor. Die nicht an Streptavidin-gekoppelte Sepharosebeads gebundene PCR-Amplifikate werden entfernt und letztendlich der Sequenzierprimer gebunden. Entsprechend der dem Gerät vorgegebenen zu analysierenden DNA-Sequenz (sequence to analyse) ermittelt die PyroQ-CpG Software die Reihenfolge, in der die vier verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) – Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), Desoxyadenosin-Alpha-Thiotriphosphat (dATP $\alpha$ S) – in die Sequenzierreaktion zugegeben werden müssen (dispensation order). Eine DNA-Polymerase baut das benötigte dNTP an das 3'-Ende des Sequenzierprimers, komplementär zum Ausgangsstrang, ein. Das dabei frei werdende Pyrophosphat (PPi) wird von einer Sulfurylase als Co-Faktor für die Entstehung von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Dieses wiederum wird von einer Luciferase als Co-Faktor für die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin genutzt. Während dieser enzymatischen Reaktion wird Energie in Form von Licht frei, welches über einen Detektor des Pyrosequenziergeräts gemessen

wird. Die Intensität des frei werdenden Lichts korreliert mit der Anzahl eingebauter Nukleotide und wird als Peak in einem Pyrogramm dargestellt. Bevor das nächste dNTP in die Reaktion gegeben wird, baut eine Apyrase nicht eingebaute dNTPs ab. In dieser beschriebenen Sequenzierreaktion wird anstatt dATP dATP $\alpha$ S verwendet. Dieses kann von der DNA-Polymerase eingebaut werden, dient der Sulfurylase jedoch nicht als Co-Faktor. Alle verwendeten Enzyme und Substrate werden als Enzym- bzw. Substratmix in die Reaktion gegeben [173]. In der Abbildung 15 sind sowohl die vier enzymatischen Schritte der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion (Abbildung 15 A) als auch ein schematisches Pyrogramm (Abbildung 15 B) als Form der Auswertung einer solchen Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion dargestellt.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der aufeinander folgenden Schritte der Bisulfit-Pyrosequenzierung. A.) Über die Biotinmarkierung (gelbes Dreieck) eines Primers des PCR-Primerpaars bindet die einzelsträngige DNA an Streptavidin-gekoppelte Sepharosebeads (Kreis). Der Sequenzierprimer (blaues Viereck) bindet an die DNA, die DNA-Polymerase kann den komplementären DNA-Strang aufbauen. Nukleotide werden in einer vorbestimmten Reihenfolge (Dispensionsreihenfolge), entsprechend der zu analysierenden Sequenz, in die Reaktion gegeben. Ist das eingespritzte Nukleotid komplementär zum gebundenen DNA-Molekül, wird es durch die DNA-Polymerase eingebaut und Pyrophosphat (PPi) wird freigesetzt. PPi wird durch eine Sulfurylase zusammen mit Adenosinphosphosulfat (APS) zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt. Das frei werdende ATP wird durch die Luciferase zusammen mit Luciferin zu Oxyluciferin und Licht umgesetzt. Ist das eingespritzte Nukleotid nicht komplementär zum gebundenen DNA-Molekül, wird es durch eine Apyrase abgebaut. Die Lichtsignale werden durch eine Kamera detektiert und in Form eines Pyrogramms für die Auswertung dargestellt. B.) Entsprechend der zu analysierenden Sequenz (sequence to analyse) wird die Dispensionsreihenfolge (dispensation order) bestimmt. In dieser Reihenfolge werden die Nukleotide in die Sequenzierreaktion gegeben. Die Ausgabe der Bisulfit-Pyrosequenzierungsergebnis erfolgt u.a. in Form eines Pyrogramms. dTTP: Desoxythymidintriphosphat, PPi: Pyrophosphat, APS: Adenosinphosphosulfat, ATP: Adenosintriphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dGDP: Desoxyguanosindiphosphat, dGMP: Desoxyguanosinmonophosphat (Abbildung modifiziert nach Tost et al. (2007) [62])

An potenziell methylierte DNA-Sequenzen kann entweder ein C (wenn das C in der Ausgangssequenz methyliert vorlag) oder ein T (wenn das Ausgangs-CpG unmethyliert vorlag) in den neu-synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden. Daher werden an solchen Positionen die beiden möglichen Desoxynukleosidtriphosphate, d.h. dTTP und dCTP, in die Sequenzierreaktion gegeben. Je nachdem, in welchem Verhältnis diese Nukleotide eingebaut werden, entstehen im Pyrogramm unterschiedlich hohe Peaks. Die PyroQ-CpG Software ermittelt aus der Fläche unter diesen Peaks den DNA-Methylierungswert an dieser Position und gibt ihn in Prozent an.

### 2.2.9.1 Erstellung und Optimierung von Bisulfit-Pyrosequenzierassays

Durch die Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array Analyse wurde die DNA-Methylierung geprägter CpG Loci ermittelt. Bestimmte DNA-Methylierungswerte wurden exemplarisch mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung verifiziert. Für die Erstellung entsprechender Assays wurden zunächst Primer erstellt, ausgetestet und optimiert. Im folgenden Abschnitt werden die entsprechenden Arbeitsschritte vorgestellt.

- ❖ Jeder CpG Locus auf dem Infinium HumanMethylation27 bzw. Infinium HumanMethylation450 BeadChip besitzt eine eindeutige "TargetID". Mithilfe dieser Bezeichnung können alle CpG Loci im Genome browser (<http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) lokalisiert werden. Für das Erstellen der Primer für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wird die den CpG Locus umgebende DNA-Sequenz benötigt. Dafür wurde die "TargetID" des zu verifizierenden CpGs in das Suchfeld auf der Internetseite eingegeben. Über die Schaltflächen "View" und anschließend "DNA" kann die das CpG umgebende DNA-Sequenz (Schaltfläche "get DNA") heruntergeladen werden. Diese DNA-Sequenz wurde für das Primerdesign in die PyroMark Assay Design Software (Version 2.0) eingeladen und optimal aufeinander abgestimmte Vorwärts-, Rückwärts- und Sequenzierprimer erstellt. In Tabelle 19 sind die hierfür angewandten Kriterien angegeben. Für die spätere Aufreinigung der PCR-Produkte ist es notwendig, dass ein Primer des PCR-Primerpaars am 5'-Ende Biotin-markiert vorliegt. Der Sequenzierprimer wiederum bindet das Biotin-markierte PCR-Produkt.

**Tabelle 19:** Bedingungen zur Erstellungen der Bisulfit-Pyrosequenzier Primer.

Bedingungen	PCR-Primer	Sequenzier-Primer
minimale Primerlänge	18 Nukleotide	15 Nukleotide
maximale Primerlänge	45 Nukleotide	25 Nukleotide
optimale Amplikonlänge	50 Nukleotide	
maximale Amplikonlänge	250 Nukleotide	
Schmelztemperatur-Algorithmus	Nearest Neighbor	Nearest Neighbor
minimale Schmelztemperatur	50 °C	29 °C
maximale Schmelztemperatur	72 °C	59 °C
maximale Schmelztemperatur-Differenz	10 °C	
maximale CG-Differenz	50 %	

- ❖ Für die PCR-Amplifikation wurden das für Bisulfit-Pyrosequenzierreaktionen optimierte PyroMark PCR Kit (Qiagen) oder das AmpliTaq Gold Kit (Life Technologies) verwendet. Für die Primeraustestung diente je 1 µl konvertierter DNA (Details vergl. Kapitel 2.2.8.1) als Ausgangsmaterial. In jeder Optimierungsreaktion wurden MK, Pool-DNA, WGA-DNA, gDNA und ddH<sub>2</sub>O als Kontrollen eingesetzt. Bisulfit-konvertierte vollständig methylierte DNA (MK, Millipore

oder EpigenDX) diente als Positivkontrolle. Mithilfe dieser DNA-Proben wurde die obere DNA-Methylierungsgrenze des Bisulfit-Pyrosequenzierassays ermittelt. Bisulfit-konvertierte Pool-DNA (Details vergl. Kapitel 2.2.7) wurde als Normalkontrolle eingesetzt. Die DNA-Methylierung in dieser Probe spiegelt den normalen DNA-Methylierungsstatus in der Bevölkerung wider. Bisulfit-konvertierte WGA (Details vergl. Kapitel 2.2.7), eine DNA-Probe ohne DNA-Methylierung, wurde verwendet, um die untere DNA-Methylierungsgrenze eines Bisulfit-Pyrosequenzierassays zu bestimmen. Genomische DNA wurde zur Kontrolle der spezifischen Primerbindung verwendet. Die Primer für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wurden so erstellt, dass sie nur an natriumbisulfit-konvertierte DNA hybridisieren. Würden die Primer auch an gDNA hybridisieren, könnte dies bei einer inkompletten Bisulfit-Konvertierung der DNA zu Problemen führen. Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Entsprechend des verwendeten PCR Kits wurden zunächst Standardreaktionsansätze unter Standardreaktionsbedingungen getestet. Standardreaktionsansätze wurden als Mastermix zusammengestellt und zu 1 µl der entsprechenden DNA pipettiert.

Die Standardreaktionsansätze für die PCR-Amplifikation mit dem PyroMark (Qiagen) oder AmpliTaq Gold Kit (Life Technologies) setzten sich wie folgt zusammen:

PyroMark Kit:		AmpliTaq God Kit:	
ddH <sub>2</sub> O	8 µl	ddH <sub>2</sub> O	17,5 µl
PyroMark MasterMix	12,5 µl	10 x Puffer	2,5 µl
Coral Load	2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer (20 pmol/µl)	je 0,5 µl	dNTPs (5 mM je Nukleotid)	1 µl
		Primer (20 pmol/µl)	je 0,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>24 µl</b>	<b>Gesamt</b>	<b>24 µl</b>

Als Standardreaktionsbedingungen wurden zunächst 55 °C, 60 °C und 65 °C als Hybridisierungstemperatur (HT) ausgetestet:

PyroMark Kit:		AmpliTaq Gold Kit:	
95 °C	15 min	95 °C	5 min
94 °C	30 s	95 °C	45 s
HT °C	30 s	HT °C	45 s
72 °C	30 s	72 °C	45 s
72 °C	10 min	72 °C	5 min
4 °C	∞	4 °C	∞
} 45 Zyklen		} 45 Zyklen	

5 µl jedes PCR-Produkts wurden entweder direkt oder nach Zugabe von Probenladepuffer auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen und der Erfolg der Amplifikation kontrolliert. Die

Primeroptimierung wurde als erfolgreich angesehen, wenn in den MK-, WGA- und Pool-Kontrollen PCR-Banden mit der erwarteten PCR-Produktgröße zu sehen waren. Des Weiteren sollten in der ddH<sub>2</sub>O und gDNA-Kontrolle keine PCR-Banden der erwarteten PCR-Produktgröße zu erkennen sein. Die zu erwartende PCR-Produktgröße war vom Primerdesign aus der PyroMark Assay Design Software bekannt. Durch den Vergleich der Bandengröße des PCR-Produkts mit einem Größenstandard auf dem Agarosegel wurde kontrolliert, ob die tatsächliche Bandengröße der zu erwartenden Bandengröße entsprach. Weiteres Kriterium einer erfolgreichen Amplifikation war eine hohe Bandenintensität. Darüber wurde die Effizienz der Amplifikationsreaktion kontrolliert. Konnten die angeführten Kriterien zunächst nicht erreicht werden, wurde versucht, durch Verändern des Standardreaktionsansatzes die Amplifikationsreaktion zu optimieren. Durch Zugabe von Magnesiumchlorid kann z.B. die Salzkonzentration des Mastermixes verändert und damit die Aktivität der DNA-Polymerase verbessert werden. Bei DNA-Sequenzen mit einem hohen Gehalt an G und C Nukleinbasen kann auch die Zugabe von Betain (Sigma Aldrich) oder Q-Solution (im PyroMark PCR Kit enthalten) die Effizienz der DNA-Polymerase steigern, da Betain und Q-Solution das Auflösen von Sekundärstrukturen fördern. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung ist die Veränderung der Hybridisierungstemperatur, um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen.

Nach erfolgreicher Optimierung der Primer wurde das PCR-Produkt mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert.

In der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion selbst war es möglich, durch Variieren des Sequenzierprimervolumens die Peakhöhe des Histogrammes zu optimieren. Dafür wurde das Volumen des Sequenzierprimers von 0,5 µl (Standard) auf 1 µl erhöht. Bei zu niedrigen Peaks kann das Auswerteprogramm das ermittelte Signal nicht vom Hintergrundrauschen unterscheiden, sodass die Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion dann nicht auswertbar ist.

### ***2.2.9.2 Durchführung der Bisulfit-Pyrosequenzierung***

Die Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion an sich erfolgte mithilfe des PyroMark ID Geräts (Qiagen). Die Durchführung wird im Folgenden kurz dargestellt.

- ❖ Das nach dem Auftragen auf dem Agarosegel verbliebene Restvolumen jedes PCR-Produkts von ca. 20 µl wurde mittels einer Pipette auf eine 96-Well Platte überführt und das Reaktionsvolumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 40 µl eingestellt.
- ❖ Ein Mastermix aus je 40 µl Binde-Puffer (Qiagen) und 5 µl Streptavidin-gekoppelte Sepharosebeads (GE Healthcare) wurde pro zu analysierender DNA-Probe hergestellt. 43 µl

dieses Mastermixes wurden zu jeder dieser zuvor in eine 96-Well Platte überführten PCR-Produkte pipettiert. Die 96-Well Platte (Probenplatte) wurde mit einer selbstklebenden Abdeckfolie abgedichtet und für ca. 10 min auf höchster Stufe eines Plattenschüttlers (IKA) geschüttelt. Während dieser Zeit erfolgte die Bindung des biotinylierten Primers an die Streptavidin-gekoppelten Sepharosebeads (GE Healthcare).

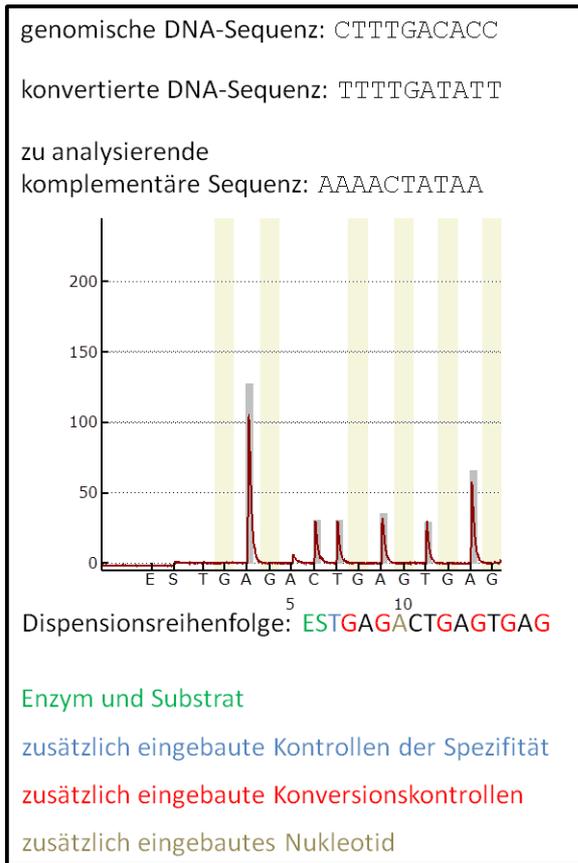
- ❖ In der Zwischenzeit wurde, in einer weiteren 96-Well Platte (Sequenzierplatte) ein Mastermix aus 40 µl Annealing-Puffer (Qiagen) und 0,5 µl bzw. 1 µl des Assay-spezifischen Sequenzierprimers pro Well hergestellt und jeweils 40 µl in jedes Well vorgelegt.
- ❖ Mithilfe der Vacuum Prep Workstation (Qiagen) und des Vacuum Prep Tools (Qiagen) wurden nicht gebundene Primer entfernt. Das Vacuum Prep Tool wurde, nach Anlegen von Vakuum, in die Probenplatte gehalten. Die gesamte Flüssigkeit wurde durch das Vacuum Prep Tool aufgenommen. Die PCR-Produkte verblieben, durch die Bindung der biotinylierten Primer an die Streptavidin-gekoppelten Sepharosebeads (GE Healthcare), an den Filtern des Vacuum Prep Tools. Das Vacuum Prep Tool wurden danach in 70%igem Ethanol (Details vergl. Kapitel 2.1.7) getaucht und dadurch die immobilisierten PCR-Produkte gewaschen. Durch das anschließende Eintauchen in eine 0,2 M Natriumhydroxidlösung (Details vergl. Kapitel 2.1.7) wurden die PCR-Produkte denaturiert. Dadurch lagen die an den Streptavidin-gekoppelten Sepharosebeads immobilisierten PCR-Produkte nach diesem Schritt einzelsträngig vor. Die einzelsträngigen PCR-Produkte wurden anschließend in Waschpuffer (Details vergl. Kapitel 2.1.7) erneut gewaschen. Im Rahmen dieser Schritte wurde das Vacuum Prep Tool nacheinander über drei mit den entsprechenden Reagenzien gefüllte Wannen der Vacuum Prep Workstation geführt. Durch das dauerhaft angelegte Vakuum wurde die jeweilige Flüssigkeit über das Vacuum Prep Tool abgesaugt. Zuletzt wurde das Vacuum Prep Tool über die Sequenzierplatte gehalten und das Vakuum abgestellt. Durch Eintauchen und leichtes Schütteln des Vacuum Prep Tools wurden die aufgereinigten PCR-Produkte in die Sequenzierplatte überführt.
- ❖ Der Reaktionsansatz wurde zur erneuten Denaturierung für 2 min bei 85 °C auf einer Heizplatte (VWR International GmbH) inkubiert. Die Hybridisierung des Sequenzierprimers erfolgte während der kurzen anschließenden Abkühlung auf Raumtemperatur.
- ❖ Die Sequenzierplatte wurde in das PyroMark ID Gerät gestellt. Bevor die Sequenzierreaktion durchgeführt werden konnte, musste in die Gerätesoftware (PyroQ-CpG) die zu analysierende Sequenz eingegeben werden. Mit Hilfe dieser Sequenz ermittelt die Software die Reihenfolge, in der die vier verschiedenen Nukleotide in die Sequenzierreaktion gegeben werden müssen (Dispensionsreihenfolge). Die Software baut in die Dispensionsreihenfolge zusätzliche Nukleotide ein, mit denen unter anderem der Erfolg der Bisulfit-Konversion kontrolliert werden

kann. Entsprechend der Dispensionsreihenfolge ermittelt die Software das benötigte Volumen von Enzymmix, Substratmix und den Nukleotiden (alle Reagenzien im PyroMark Gold Q96 Reagents Kit von Qiagen enthalten). Gemäß diesen Angaben wurde die Kartusche (Qiagen) beladen und auch diese in das Gerät gestellt.

### ***2.2.9.3 Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung***

Die Korrelation zwischen eingebautem Nukleotid und entstehendem Lichtsignal wird von der PyroQ-CpG Software als Pyrogramm dargestellt. Neben der zum Ausgangsstrang komplementären DNA-Sequenz erhält man Informationen zum analysierten Verhältnis von C und T bzw. G und A am analysierten CpG. Dieses Verhältnis spiegelt den Grad der DNA-Methylierung wider. Des Weiteren werden von der Software Informationen zur Qualität der Bisulfit-Konvertierung und der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion angegeben. So wird z.B. aufgeführt, ob die ermittelte Sequenz mit der zu erwartenden übereinstimmt (Darstellung über ein Histogramm der Sequenz). Stimmen diese beiden Sequenzen nicht überein, hat z.B. der Sequenzierprimer nicht spezifisch an die zu analysierende Region gebunden. Grund dafür könnten SNPs sein, die eine komplementäre Bindung erschweren/verhindern. Mithilfe eines neuen Sequenzierprimers, der an einer anderen Position des zu analysierenden Strangs bindet, könnte dieses Problem gelöst werden. Eine nicht vollständig natriumbisulfit-konvertierte gDNA-Probe kann in der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion zu falsch positiven Ergebnissen führen. Eine unvollständige Denaturierung der zu konvertierenden gDNA verhindert die komplette Bisulfit-Konvertierung, sodass auch unmethylierte Cytosine als Cytosine aus der Reaktion hervorgehen könnten. Die Effizienz der Natriumbisulfit-Konvertierung kann anhand zusätzlich in die Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion eingebauter Konversionskontrollen überprüft werden (siehe Abbildung 16). Dafür kann z.B. vor und nach einem A in der zu analysierenden Sequenz, das in der genomischen DNA einem unmethylierten C entspricht, ein G in die Dispensionsreihenfolge eingebaut werden. Wurde das unmethylierte C in der genomischen Sequenz ordnungsgemäß in ein T umgewandelt, und wird an der Position ein G in die Sequenzierreaktion gegeben, sollte an der Position kein Peak entstehen. Erst durch die Zugabe von A sollte ein Peak auftreten.

Weitere von der Software detektierte Qualitätseinschränkungen führten zu einer erneuten Optimierung des Primerpaars. So konnte z.B. eine Steigerung der PCR-Produktmenge zur Erhöhung des spezifischen Peaks im Pyrogramm führen und so die signal-to-noise ratio optimiert werden. Gravierende Qualitätseinschränkungen, durch die Software z.B. durch den Zusatz "overall" angegeben oder unspezifische/zu flache Pyrogramme, die nicht optimierbar waren, führten zum Ausschluss des entsprechenden Primerpaars.



**Abbildung 16:** Beispiele eingebauter Kontrollen in der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Gezeigt ist ein Pyrogramm. Zusätzlich angegeben sind die genomische DNA-Sequenz, die Natriumbisulfit-konvertierte DNA-Sequenz und die mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierte DNA-Sequenz. Des Weiteren ist die Dispensionsreihenfolge angegeben, in der die benötigten Substanzen (Enzym (E), Substrat (S) und Nucleotide) in die Bisulfit-Pyrosequenzierungsreaktion eingegeben werden. Das erste in die Bisulfit-Pyrosequenzierungsreaktion eingegebene Nucleotid (T) kommt nicht in der zu analysierenden Sequenz vor. Damit wird überprüft, ob der Sequenzier-Primer spezifisch gebunden hat und somit die zu erwartende DNA-Sequenz analysiert werden kann. Die im Pyrogramm gelb unterlegten Nucleotide, die außerdem in der Dispensionsreihenfolge rot dargestellt sind (G), entsprechen den Konversionskontrollen. Wenn an der Position des ersten eingespritzten G die Konversion der gDNA nicht vollständig abgelaufen wäre, würde an dieser Stelle ein Peak entstehen, da in der zu analysierenden Sequenz an der Position ein C anstelle des T vorliegen würde. Da an keiner dieser Konversionskontrollen ein Peak zu erkennen ist, hat die Konversionsreaktion der gDNA vollständig stattgefunden. In braun ist ein weiteres Nucleotid (A), das nicht in der zu analysierenden Sequenz vorkommt in die Bisulfit-Pyrosequenzierungsreaktion gegeben. Dieses zusätzlich eingebaute Nucleotid wurde aufgrund des davor liegenden Nucleotidrepeats eingebaut. Dadurch soll sichergestellt werden, dass in allen neu-synthetisierten DNA-Strängen das Repeat vollständig aufgebaut ist.

Primerpaare, die den Optimierungsprozess erfolgreich durchlaufen haben, wurden für die DNA-Methylierungsanalyse der Patienten DNA-Proben verwendet. Das Vorgehen entspricht den zuvor beschriebenen Schritten der Amplifikation, Aufreinigung und Bisulfit-Pyrosequenzierung. Auch die Auswertung erfolgte nach den gleichen Richtlinien wie die Bisulfit-Pyrosequenzierung der Kontrollen zur Austestung der Primer. Neben den zu analysierenden DNA-Proben wurden bei jedem Bisulfit-Pyrosequenzierungsassay mindestens eine Negativkontrolle, eine methylierte Kontrolle und eine WGA oder Pool-Kontrolle mit analysiert.

### 2.2.10 Bestimmung der DNA-Methylierung mittels BeadChip Technologie

Für die Analyse der genomweiten DNA-Methylierung wurde der Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) genutzt. BeadChips zählen zu den Microarrays. Ein BeadChip ist aus einer Matrix aufgebaut, auf der viele einzelsträngige Oligonucleotide immobilisiert wurden. Zur Bestimmung der DNA-Methylierung werden die natriumbisulfit-konvertierten DNA-Proben spezifisch an diese Oligonucleotide hybridisiert. Die immobilisierten Oligonucleotide ermöglichen dabei die parallele Analyse vieler genau bekannter Cytosin-Guanin- und Nicht-Cytosin-Guanin-Dinucleotide, die nach der Natriumbisulfit-Konvertierung als C/T Polymorphismen vorliegen.

### ***2.2.10.1 Infinium HumanMethylation27 und Infinium HumanMethylation450 BeadChips***

Der Infinium HumanMethylation27 BeadChip ermöglicht die parallele Analyse von 27.578 CpG-Dinukleotiden, welche 14.495 Genen zuzuordnen sind. Dabei können pro BeadChip parallel 6 DNA-Proben analysiert werden. Auf diesem BeadChip befinden sich für jeden zu analysierenden CpG Locus zwei Beadtypen. Diese Beads tragen Sonden, die am 3'-Ende der Sondensequenz entweder komplementär zum methylierten CpG Locus oder zum unmethylierten CpG Locus sind. Sie werden daher als methylierter und unmethylierter Beadtyp bezeichnet. Die konvertierten DNA-Fragmente binden gemäß ihrer Sequenz an den entsprechenden Beadtyp. Die Sonde wird, komplementär zum gebundenen DNA-Fragment, um ein markiertes Nukleotid nach dem zu analysierenden CpG-Dinukleotid verlängert. Die Adenin (A) und Thymin (T) Nukleinbasen sind dabei mit 2,4-Dinitrophenol (DNP) und die Cytosin (C) und Guanin (G) Nukleinbasen mit Biotin markiert. Die markierten Nukleinbasen werden dann durch Fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden und das Fluoreszenzsignal für beide Beadtypen in einem Farbkanal des iScan Messgeräts ausgelesen. Dieser Assay-Typ wird als "Infinium I Methylation Assay" bezeichnet.

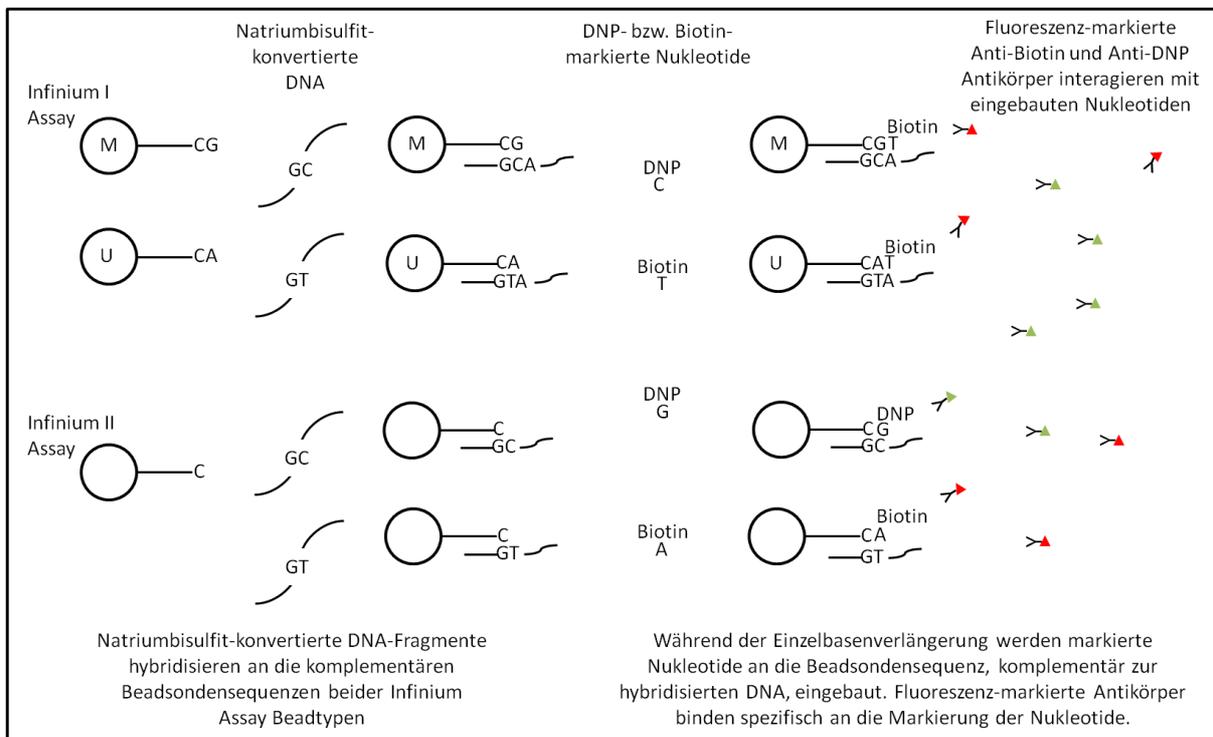
Durch die Weiterentwicklung zum Infinium HumanMethylation450 BeadChip ist es möglich 485.577 Loci, welche 21.231 Genen zuzuordnen sind, und 12 DNA-Proben pro BeadChip parallel zu analysieren. Diese Loci lassen sich wie folgt unterteilen. 65 Loci repräsentieren Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) und werden mit rs bezeichnet. 3.091 Loci sind nicht-CpG Loci. Dabei kann das Cytosin in einem Nicht-Cytosin-Guanin-Dinukleotid methyliert vorliegen. Diese Loci werden mit ch bezeichnet. 482.241 Loci gehören zu den CpG Loci und werden mit cg bezeichnet. Auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array wird neben dem zuvor beschriebenen "Infinium I Methylation Assay" auch der sogenannte "Infinium II Methylation Assay" eingesetzt [174]. Für den "Infinium II Methylation Assay" gibt es auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip nur einen Beadtyp pro zu analysierendem CpG Locus. Die Sondensequenz des Beads endet z.B. mit dem C im CpG Locus, sodass bei der Einzelbasenverlängerung entweder ein DNP-markiertes A Nukleotid (unmethyliert Locus) oder ein Biotin-markiertes G Nukleotid (methylierter Locus) eingebaut wird. Fluoreszenz-markierte Anti-DNP oder Anti-Biotin Antikörper binden an die entsprechend markierte Nukleinbase. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden zwei verschiedene Cyaninfarbstoffe verwendet, Cy3 (am Anti-DNP-Antikörper) und Cy5 (am Anti-Biotin Antikörper), die im grünen bzw. roten Wellenlängenbereich angeregt werden. Nach der Antikörperbindung wird das Fluoreszenzsignal in dem sogenannten roten (unmethylierter CpG Locus) oder grünen (methylierter CpG Locus) Farbkanal des iScan Messgeräts ausgelesen. Für beide Methylierungs-Assay-Typen entsprechen die am Ende der Analyse angegebenen Beta-Werte dem Verhältnis des methylierten

Signals zu der Summe der methylierten und unmethylierten Signale an einem analysierten Locus. Die Beta-Werte können Werte zwischen 0 (komplett unmethyliert) und 1 (komplett methyliert) annehmen [175]. Die Formel zur Bestimmung des Beta Werts lautet [174]:

$$\frac{\text{Intensität unmethylierter Bead Typ}}{\text{Intensität unmethylierter Bead Typ} + \text{Intensität methylierter Bead Typ} + 100}$$

Für jeden zu analysierenden Locus befinden sich auf dem BeadChip bis zu 30 Replikate der zu analysierenden Sequenz [176]. Der AVG-Beta Wert entspricht damit dem durchschnittlichen Beta Wert über alle Replikate eines spezifischen CpG Locus [177].

Abbildung 17 gibt eine Übersicht über den "Infinium I Methylation Assay" und "Infinium II Methylation Assay".



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der beiden "Infinium Methylation Assays" des Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Jeder Bead trägt eine zur zu analysierenden DNA-Sequenz komplementäre Sondensequenz, die entweder mit dem zu analysierenden Locus ("Infinium I Methylation Assay") oder einer Base vor dem zu analysierenden Locus ("Infinium II Methylation Assay") endet. Für den "Infinium I Methylation Assay" gibt es je zu analysierendem Locus zwei Beadtypen, welche die DNA abhängig vom Methylierungsstatus des zu analysierenden Cytosins binden. "Infinium II Methylation Assay" Beads binden unabhängig vom Methylierungsstatus des zu analysierenden Cytosins komplementäre DNA-Fragmente. Während der Einzelbasenverlängerung werden Biotin- bzw. 2,4-Dinitrophenol-markierte Nucleotide, komplementär zur hybridisierten DNA, an die Sondensequenz hybridisiert. Die Markierung der Nucleotide wird durch Fluoreszenz-markierte Antikörper erkannt und darüber der gebundene Bead markiert. M: methylierter Beadtyp, U: unmethylierter Beadtyp, A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin, DNP: 2,4-Dinitrophenol (Abbildung modifiziert nach Bibikova et al. (2011) [174])

### **2.2.10.2 Probenhybridisierung auf dem Infinium HumanMethylation 450 BeadChip**

Während auf die bereits vorhandenen Infinium HumanMethylation27 BeadChip Daten zugegriffen werden konnte, wurden für die Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse die DNA-Proben im Rahmen dieser Arbeit zunächst auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Dafür wurden die DNA-Proben zunächst mittels EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) konvertiert (vergl. Kapitel 2.2.8.2). Wenn möglich wurde dafür 1 µg (bis minimal 500 ng) gDNA als Ausgangsmenge eingesetzt. Die Natriumbisulfit-konvertierten DNA-Proben wurden auf Infinium HumanMethylation 450 BeadChips (Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit, Illumina) hybridisiert. Die Durchführung der Probenvorbereitung bis hin zur Färbung der Infinium HumanMethylation450 BeadChips erfolgte nach dem "Illumina Infinium HD Methylation Assay, Manual Protocol", Stand April 2011 und wird im Folgenden kurz wiedergegeben.

- ❖ Nach der Aufreinigung der konvertierten DNA wurde diese enzymatisch fragmentiert. Die DNA-Proben wurden mittels absolutem Isopropanol (Sigma Aldrich) präzipitiert und anschließend in einem Hybridisierungspuffer (Infinium HumanMethylation450k BeadChip Kit) resuspendiert. Die so vorbereiteten DNA-Proben wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips pipettiert und dann für mindestens 16 h (maximal 22 h) bei 48 °C im Hybridisierungsöfen für BeadChips (Illumina) inkubiert. Während dieser Zeit hybridisierten die fragmentierten DNA-Moleküle an die komplementäre SONDENSEQUENZ. Damit wurden die fragmentierten DNA-Moleküle durch die Beads immobilisiert. Nicht hybridisierte DNA-Moleküle wurden durch anschließend folgende WaschschrITte entfernt. Für die darauf anschließende Einzelbasenverlängerung wurden markierte Nukleotide (Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit) auf die BeadChips gegeben. Mithilfe dieser Nukleotide wurde die SONDENSEQUENZ verlängert. Im Anschluss wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper (Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit) auf die BeadChips gegeben. Diese interagierten mit der Markierung der eingebauten Nukleinbasen. Die dabei frei werdenden Fluoreszenzsignale wurden durch ein iScan Gerät (Illumina) (Grundeinstellung des iScans entsprechend der zu scannenden Infinium HumanMethylation450 BeadChips) erfasst und in Form von IDAT Dateien gespeichert.

### **2.2.11 Angewandte statistische Verfahren**

Im folgenden Kapitel wird die Auswertung der erhobenen DNA-Methylierungsdaten dargestellt und verwendete statistische Methoden und Darstellungsformen erläutert.

### ***2.2.11.1 Bioinformatische Auswertung der Infinium HumanMethylation450 BeadChips und Qualitätskontrolle der Daten***

Für die Auswertung der Infinium HumanMethylation27 BeadChips bzw. der Infinium HumanMethylation450 BeadChips wurde die GenomeStudio Software (Version 2011.1) mit dem Methylation Module (Version 1.9.0) (Illumina) verwendet. Damit wurden aus den IDAT (intensity data) Dateien des iScan Geräts AVG-Beta Werte für alle analysierten Loci generiert. Die Software ermöglicht es, zwischen bestimmten Analyseparametern zu wählen. Bei allen durchgeführten Analysen wurde als Analysetyp eine Methylierungsanalyse durchgeführt, die Methylierungswerte wurden nur durch interne Arraykontrollen normalisiert und die Subtraktion des Hintergrunds wurde nicht durchgeführt. Eine wichtige Angabe die der GenomeStudio Software entnommen werden kann, ist der Wert des detection P-value (DetPval) für jeden Locus. Er wird ermittelt durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität jedes zu analysierenden Locus mit der Fluoreszenzintensität BeadChip-interner Negativkontrollen. Ein DetPval Wert  $<0,01$  gibt an, dass die gemessene Fluoreszenzintensität des zu analysierenden Locus höher ist als der Hintergrund.

Nach Generierung der AVG-Beta Werte mithilfe der GenomeStudio (GS) Software, wurde zunächst die Qualität der einzelnen Hybridisierungen eines Datensatzes kontrolliert. Als Datensatz wird hier der Zusammenschluss der Daten aller Hybridisierungen, die gemeinsam in einem Projekt analysiert wurden, bezeichnet. Zunächst wurde der Quotient aus der Anzahl tatsächlich analysierter Loci einer Hybridisierung (von der GS Software als detected CpG bezeichnet) und aller auf dem Array vorhandener Loci (Infinium HumanMethylation27 BeadChip: 27.568, Infinium HumanMethylation450 BeadChip: 485.577) multipliziert mit dem Wert 100 ermittelt. Dieser Wert wird im Folgenden als loci detection rate (LDR) bezeichnet. Die LDR sagt aus, wie viele der Sondensequenzen tatsächlich mit der DNA hybridisiert haben und gibt somit eine Aussage zur Hybridisierungseffizienz. Die Angaben zu den tatsächlich analysierten Loci werden durch die Software für zwei p-Werte angegeben (0,01 und 0,05), sodass die LDR für zwei p-Werte bestimmt werden konnte. Hybridisierungen, die eine LDR (0,01)  $<98\%$  aufzeigten, wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

Des Weiteren wurden nur Loci analysiert, die in allen Hybridisierung einen DetPval  $<0,01$  aufzeigten. Loci, die auch nur in einer Hybridisierung des Datensatzes einen größeren DetPval aufwiesen, wurden aus der finalen Analyse des Datensatzes ausgeschlossen. So wurde sichergestellt, dass nur Loci analysiert wurden, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein Fluoreszenzsignal aufzeigten, welches deutlich höher ist als das Hintergrundsignal.

Hybridisierungen mit einer LDR  $>98\%$  und Loci mit einem DetPval  $<0,01$  wurden aus der GenomeStudio Software exportiert. Neben den AVG-Beta Werten wurden folgende weiteren Informationen exportiert: TargetID, Chromosom, Mapinfo, UCSC Refgenname, UCSC\_Genegroup und

Relation to UCSC CpG Island. Diese und weitere Angaben werden von der Software mitgeliefert und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Genome build 37 (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) bzw. 36 (Infinium HumanMethylation27 BeadChip).

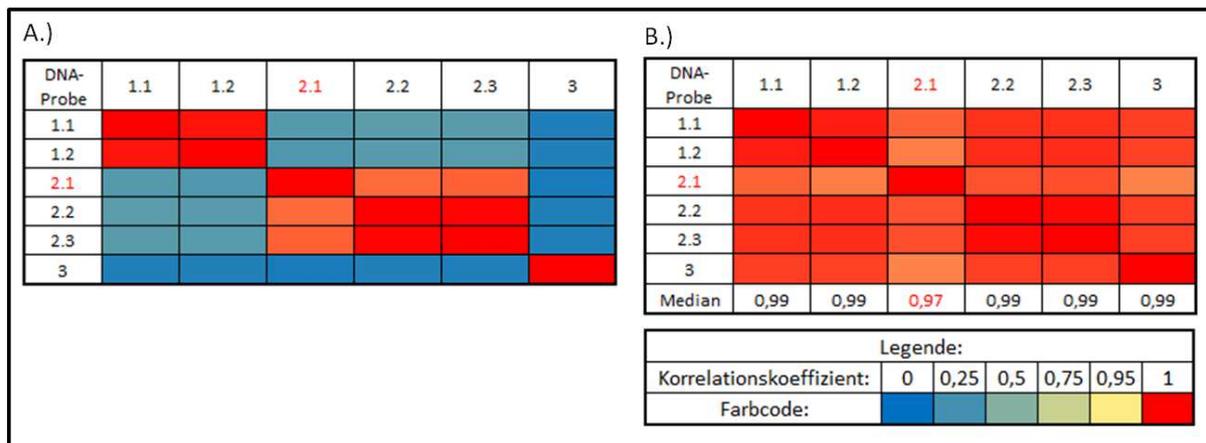
Als nächstes wurde die Qualität jedes Datensatzes mithilfe von Korrelationsmatrices überprüft (siehe Kapitel 2.2.11.2).

### ***2.2.11.2 Korrelationsanalyse der AVG-Beta Werte als Form der Qualitätskontrolle***

Neben der bereits im vorherigen Kapitel dargestellten Qualitätskontrolle der mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip generierten Daten erfolgte als weitere Form der Qualitätskontrolle eine Korrelationsanalyse der AVG-Beta Werte. Dafür wurden für jeden Datensatz zunächst zwei separate CSV (comma-separated values) Dateien (Program: Excel, Microsoft Office 2007) erstellt. Eine der Dateien enthielt alle AVG-Beta Werte der mit rs bezeichneten Loci zur Erstellung der SNP-Korrelationsanalyse. Diese Qualitätskontrolle war für die Hybridisierungen auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip Array nicht möglich, da keine rs Loci auf diesem BeadChip Array abgedeckt sind. Die zweite Datei enthielt alle AVG-Beta Werte der restlichen, mit cg und ch bezeichneten Loci für die Erstellung der Gesamtkorrelationsanalyse. Für die Korrelationsmatrices wurden nur Probenbezeichnung und AVG-Beta Werte benötigt, alle anderen Angaben wurden aus der Datei entfernt. Für die weitere Bearbeitung der Daten musste sichergestellt werden, dass für jede Hybridisierung und für jeden Locus entweder ein AVG-Beta Wert angegeben ist oder, wenn kein AVG-Beta Wert durch die GenomeStudio Software ermittelt wurde, das leere Feld mit "NA" ausgefüllt wurde. Mithilfe des Statistikprogramms R (Version 3.0.0) wurden je Datensatz eine SNP- und eine Gesamtkorrelationsmatrix erstellt. Dafür wurde eine Korrelationsanalyse aller AVG-Beta Werte nach der Pearson Methode durchgeführt. In der Korrelationsanalyse wird allgemein untersucht, ob es zwischen den AVG-Beta Werten einer Hybridisierung und den AVG-Beta Werten aller anderen Hybridisierungen des Datensatzes einen linearen Zusammenhang gibt. Je näher der Korrelationskoeffizient (R) bei dem Wert 1 ist, umso deutlicher ist der lineare Zusammenhang. In der Gesamtkorrelation, d.h. der Korrelation aller als cg und ch bezeichneten Loci eines homogenen Datensatzes sollten alle Proben hohe R-Werte aufweisen. Enthält ein Datensatz Hybridisierungen nur einer Gewebeart, z.B. nur pB-Proben, sollte der Median über alle Korrelationskoeffizienten einer Hybridisierung Werte  $>0,98$  aufzeigen. Der ermittelte Korrelationskoeffizient wurde für jede Hybridisierung ausgegeben und in Excel, zur besseren Darstellung, in einem asymmetrischen Farbcode bedingt formatiert (0=blau, ab 0,95=gelb, 1=rot). Wenn in einer Gesamtkorrelationsanalyse eines homogenen Datensatzes eine Hybridisierung einen Median über alle Korrelationskoeffizient dieser Hybridisierung (Median(R)-Wert)  $<0,98$  aufzeigte, wurde diese Hybridisierung aus allen

weiteren Analysen ausgeschlossen. Dieser Grenzwert wurde nur für Normalgewebeproben und nicht für Tumorgewebeproben verwendet, da Tumorgewebeproben an sich ein sehr heterogenes DNA-Methylierungsmuster aufweisen. Des Weiteren galt der Grenzwert nur, wenn die Hybridisierungen alle aus einem Gewebe stammten.

Anders verhielt es sich für die Korrelation der rs Loci AVG-Beta Werte. Hier sollten nur Hybridisierungen, die von derselben Person stammen, also entweder technische oder biologische Replikate, hohe R-Werte aufweisen. DNA-Proben, die als Replikate hybridisiert wurden, mussten zueinander R-Werte  $\geq 0,99$  aufweisen. Zeigten DNA-Proben, die nicht als Replikate hybridisiert wurden, solche R-Werte, konnte eine Probenverwechslung oder Fehlbezeichnung der DNA-Probe nicht ausgeschlossen werden. Die Hybridisierungen solcher DNA-Proben wurden daher aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Einen Überblick über die Auswertung der Korrelationsanalysen gibt Abbildung 18.



**Abbildung 18:** Korrelationsmatrices eines Infinium HumanMethylation450 BeadChip Datensatzes. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten eines Normalgewebe-Datensatzes wurden durch eine asymmetrische Formatierung entsprechend der Werte der Korrelationskoeffizienten dargestellt: 0: blau, 0,95: gelb, 1: rot. A.) Gezeigt ist eine Korrelationsmatrix ermittelt durch die AVG-Beta Werte der 65 mit rs bezeichneten Loci. Mehrfach hybridisierte DNA-Proben zeigen hohe Korrelationskoeffizienten, dargestellt durch die rote Färbung innerhalb der Matrix. B.) Gezeigt ist eine Gesamtkorrelation mit ermittelten Median(R)-Werten (Median) über alle AVG-Beta Werte pro DNA-Probe. In roter Schrift ist eine DNA-Probe markiert, die einen ermittelten Median(R)-Wert über alle Korrelationskoeffizienten  $< 0,98$  aufzeigt und die aus weiteren Analysen ausgeschlossen werden würde. Diese DNA-Probe ist auch in der SNP-Korrelationsanalyse in roter Schrift gezeigt und zeigt auch hier eine geringere Korrelation.

### 2.2.11.3 Teilprojekt-spezifische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Loci analysiert, die dem Imprinting unterliegen. Von den 485.577 Loci auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip unterliegen, basierend auf einer Arbeit von Court et al. (2014), 891 dem Imprinting [70]. Mit dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip Array können 138 dem Imprinting unterliegende CpG Loci analysiert werden. Die dem Imprinting unterliegenden CpGs liegen in den sogenannten differenziell methylierten Regionen (DMR), die in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft des Allels entweder methyliert oder

unmethyliert vorliegen. Daher wurden für die hier durchgeführten Analysen bei einem erwarteten Verhältnis der elterlichen Allele von 1:1 DNA-Methylierungswerte im mittleren Bereich der DNA-Methylierung (theoretisch ~50 %) erwartet.

Die Auswertung der AVG-Beta Werte erfolgte Teilprojekt-spezifisch. Die mittels BeadChip ermittelten AVG-Beta Wert je CpG Locus entsprechen der DNA-Methylierung. Dabei stehen niedrige Werte für eine geringe DNA-Metylierung des analysierten CpGs, hohe AVG-Beta Werte für eine hohe DNA-Methylierung und Werte um 0,5 für eine mittlere DNA-Methylierung (50 %) des analysierten CpGs. Werden diese AVG-Beta Werte mit dem Wert 100 multipliziert, erhält man den "DNA-Methylierungswert" in Prozent angegeben.

- Geprägte Genorte:

Für alle durchgeführten Analysen wurden zunächst die AVG-Beta Werte der CpG Loci, die dem Imprinting unterliegen und den Qualitätskriterien entsprachen, aus GenomeStudio exportiert und entsprechend ihrer chromosomalen Lage sortiert. CpG Loci, die zu einem geprägten Gen oder einer geprägten Region gehören, wurden zu einem sogenannten Genort zusammengefasst. Zum Beispiel wurden die vier CpG Loci cg10243676, cg11704876, cg22862450 und cg15057250, die alle auf Chromosom 1 liegen und mit dem Gen *PPIEL* assoziiert sind, zu dem Genort *PPIEL* zusammengefasst. Auf diese Art und Weise ergaben sich für die Analyse der Infinium HumanMethylation450 BeadChips insgesamt 54 Genorte, von denen 20 zu den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten und 34 zu den somatisch geprägten Genorten zählen. In der Tabelle 20 sind die analysierten Genorte aufgelistet. Bei der Analyse mit den Infinium HumanMethylation27 BeadChips, ergaben sich 20 somatisch und 6 Plazenta-spezifisch geprägte Genorte. In derselben Tabelle 20 sind in blauer Schrift die Genort-spezifischen Informationen zum Infinium HumanMethylation27 BeadChip angegeben.

**Tabelle 20:** Auflistung der analysierten geprägten Genorte.

somatisch geprägte Genorte (n=34) (n=20)			
<i>PPIEL</i> (4)	<i>DIRAS3</i> (25), (12)	<i>ZDBF2</i> (8)	<i>NAP1L5</i> (15), (2)
<i>FAM50B</i> (25), (2)	<i>PLAGL1</i> (16), (7)	<i>IGF2R</i> (2)	<i>WDR27</i> (2)
<i>GRB10</i> (9), (5)	<i>PEG10</i> (53), (7)	<i>MEST</i> (55), (2)	<i>HTR5A</i> (6), (1)
<i>CXORF56 pseudogene/ERLIN2</i> (7)	<i>TRAPPC9</i> (8)	<i>INPP5Fv2</i> (4)	<i>ICR1</i> (58), (4)
KvDMR1 (30), (1)	<i>RB1</i> (12), (9)	<i>MEG3</i> (33), (6)	<i>MEG8</i> (1)
Chromosome 15 imprinted Region (60), (20)	<i>IGF1R</i> (7)	<i>ZNF597</i> (2)	<i>ZNF597/NAA60</i> (11)
<i>ZNF331</i> (15), (1)	<i>PEG3</i> (36), (13)	<i>MCTS2/HM13</i> (9)	<i>BLCAP/NNAT</i> (35), (7)
<i>L3MBTL</i> (25), (3)	<i>GNAS</i> (23), (7)	<i>NESP-AS/GNAS-AS/GNAS XL</i> (68), (12)	<i>GNAS Ex1</i> (38), (2)
<i>WRB</i> (4)	<i>NHP2L1</i> (8)		

Fortsetzung **Tabelle 20:**

Plazenta-spezifisch geprägte Genorte (n=20) (6)			
<i>GPR1-AS</i> (3)	<i>RPN1</i> (8)	<i>MCCC1</i> (13), (2)	<i>PDE4D</i> (7)
<i>LIN28</i> (8)	<i>AIM1</i> (19), (2)	<i>SCIN</i> (15)	<i>AGBL3</i> (12)
<i>ZFAT</i> (3)	<i>GLIS3</i> (9)	<i>DCAF10</i> (5), (2)	<i>FAM196A/DOCK1</i> (10)
<i>ZC3H12C</i> (9)	<i>N4BP2L1</i> (13)	<i>RGMA</i> (8)	<i>FAM20A</i> (4), (1)
<i>ZBF396</i> (9), (1)	<i>DNMT1</i> (10), (2)	<i>MIR512-12 cluster</i> (6)	<i>CABIN1</i> (6)

In runden Klammern in schwarzer Schrift ist die Anzahl der CpG Loci angegeben, mit der dieser Genort auf dem Infinium HumanMethylation450 bzw. in runden Klammern in blauer Schrift auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip abgedeckt ist.

Bei mehrfach hybridisierten DNA-Proben desselben Gewebes desselben Individuums, bei technischen Replikaten also, die in der SNP-Korrelationsanalyse wie erwartet hohe Korrelationskoeffizienten aufwiesen und die innerhalb der Replikate gleiche AVG-Beta Werte aufwiesen, wurde für jedes analysierte CpG der Mittelwert der einzelnen AVG-Beta Werte gebildet. Replikate, die in der SNP-Korrelationsanalyse zu niedrige Korrelationskoeffizienten aufwiesen oder deren AVG-Beta Werte unterschiedlich waren, wurden aus den finalen Analysen ausgeschlossen.

- Genort-spezifische Auswertung der AVG-Beta Werte:

Für den Genort-spezifischen Analyseansatz wurde zunächst der Mittelwert der AVG-Beta Werte für jede Hybridisierung über alle CpG Loci eines Genorts bestimmt. Am Beispiel des hier analysierten Datensatzes pränataler Gewebe bedeutet dies, dass für jede einzelne Hybridisierung für jeden analysierten Genort zunächst je Hybridisierung der Mittelwert über alle AVG-Beta Werte jedes zuvor definierten Genorts gebildet wurde. Das bedeutet, dass z.B. für die DNA-Probe "AC1" sechs Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die sechs Plazenta-spezifisch geprägten Genorte sowie 20 Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die 20 somatisch geprägten Genorte bestimmt wurden. Konnte der zu analysierende Datensatz nicht in eine Kontrollgruppe und eine Patientengruppe eingeteilt werden, wurden die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der verschiedenen Genorte optisch durch eine "Heatmap" dargestellt. Bei einer solchen "Heatmap" (HM) wurden die Mittelwerte der AVG-Beta Werte pro Genort in Prozent angegeben (d.h. AVG-Beta Wert\*100) und folgendermaßen bedingt formatiert: 0 %=grün, 50 %=schwarz, 100 %=rot. Genorte die sehr niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte aufwiesen, sind damit in der HM grün dargestellt. Genorte die stark methyliert vorlagen und damit hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte aufwiesen, sind in der HM rot dargestellt. Mittelwerte der AVG-Beta Werte mit mittlerer DNA-Methylierung sind schwarz dargestellt. Mithilfe solch einer HM konnten die Mittelwerte der AVG-Beta Werte verschiedener Hybridisierungen miteinander verglichen werden. Diese Auswertemethode kam u.a. bei dem Teilprojekt "Pränatale Gewebeanalyse" zum Einsatz. In diesem Teilprojekt wurde des Weiteren untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte für die analysierten Genort

zwischen den beiden Gewebegruppen "Amnionzellen" und "Chorionzotten" gibt. Dafür wurde zunächst mittels F-Test kontrolliert, ob die Mittelwerte der AVG-Beta Werte je Genort in den beiden Gewebegruppen eine gleiche oder ungleiche Varianz aufzeigten. Entsprechend dieses Ergebnisses wurde danach der zwei-seitige t-Test zur Überprüfung der Signifikanz verwendet, wobei der ermittelte p-Wert mit der Anzahl der Einzelvergleiche ( $n=26$ ) multipliziert wurde, um so für das multiple Testen (nach Bonferroni [178]) zu korrigieren.

Neben dem Mittelwert der AVG-Beta Werte pro Genort und Hybridisierung wurde auch an einigen Stellen der Auswertung der Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte (übergeordneter Mittelwert) pro Genort, das heißt aller Hybridisierungen eines Datensatzes, gebildet. So wurde z.B. der Mittelwert aller 18 Lungengewebe-Hybridisierungen für den Genort *DIRAS3* ermittelt.

Als weitere statistische Größe wurden an einigen Stellen der Auswertung die Varianz über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte pro Genort bestimmt. Die Varianz ist als die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert der Daten definiert [178]. Die Varianz wird errechnet, in dem der Mittelwert der Daten bestimmt wird, die Abweichung für jeden Datenpunkt vom Mittelwert errechnet und quadriert wird, die Abweichungen aller Datenpunkte addiert werden und dann durch die Anzahl der Datenpunkte  $-1$  dividiert wird. Eine große Varianz für einen bestimmten Genort gibt damit an, dass die ermittelten Mittelwerte der AVG-Beta Werte innerhalb dieses Genorts relativ unterschiedlich sind. Dagegen steht ein niedriger Varianzwert dafür, dass die ermittelten AVG-Beta Werte des Genorts ähnlich sind.

- Bestimmung des normalen DNA-Methylierungsbereichs somatisch geprägter Genorte für den Datensatz SGA-geborener Kinder:

Der SGA-Datensatz besteht aus DNA-Proben von SGA-geborenen Kindern sowie von Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen. Bei den Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom wurde durch vorhergehende Analysen der DNA-Methylierung mit anderen Techniken die Syndrom-spezifisch aberrante DNA-Methylierung ermittelt, sodass sie an dieser Stelle als Positivkontrollen dieser Syndrom-spezifischen Genorte verwendet wurden. Zunächst sollte der normale DNA-Methylierungsbereich (NMB) der somatisch geprägten Genorte für die SGA-geborenen Kinder definiert werden. Dafür wurden in einem ersten Schritt die Mittelwerte der AVG-Beta Werte aller somatisch geprägten Genorte für alle 96 SGA-geborenen Kinder, das entspricht 3.264 Mittelwerten, der Größe nach aufsteigend sortiert und der Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte (übergeordneter Mittelwert) ermittelt. Im zweiten Schritt wurden die Grenzen des normalen DNA-Methylierungsbereichs für die geprägten Genorte des Kollektivs SGA-geborener Kinder bestimmt. Die Grenzen des NMB sollten so liegen, dass alle Syndrom-spezifisch betroffenen Genorte der Positivkontrollen als aberrant erkannt werden. Außerdem sollte die Anzahl zusätzlich als aberrant

detektierter Genorte in den Positivkontrollen möglichst gering sein. Bei Definition des NMB als übergeordneter Mittelwert  $\pm$  die zweifache Standardabweichung (SD) fanden sich in den Kontrollen 7/7 richtig positiv aberrant methylierte Genorte und 12 zusätzlich aberrant methylierte Genorte. Bei einem NMB definiert als übergeordneter Mittelwert  $\pm 3$  SD ergaben sich fünf richtig positiv aberrant methylierte Genorte sowie zwei zusätzlich aberrant methylierte Genorte in den Positivkontrollen. Damit wurden zwei Syndrom-spezifisch aberrante DNA-Methylierungsmuster in den Positivkontrollen nicht erkannt, die Falsch-Positiv-Rate lag somit bei 2/7. Bei Festlegung des normalen DNA-Methylierungsbereichs auf 1 % der kleinsten und 1 % der größten Mittelwerte der somatisch geprägten Genorte für das Kollektiv SGA-geborener Kinder, fanden sich 7/7 richtig positiv aberrant methylierte Genorte und neun zusätzlich aberrant methylierte Genort in den Positivkontrollen. Der zuletzt beschriebene NMB erfaßt 98 % aller Meßwerte und zeigte in den Positivkontrollen eine Sensitivität von 100 % sowie eine relativ niedrige geschätzte Falsch-Positiv-Rate. Diese Falsch-Positiv-Rate kann nicht genau bestimmt werden, da der reale Status der zusätzlich als aberrant ermittelten Genorte nicht bekannt war. Von den drei Ansätzen erfüllte somit der letzte Ansatz in den Kontrollen am ehesten die a priori definierten Bedingungen. Anhand der so definierten Grenzen des NMB lagen unterhalb der unteren Grenze per Definition 33 Mittelwerte der AVG-Beta Werte der somatisch geprägten Genorte im Kollektiv SGA-geborener Kinder. Der 34. kleinste Mittelwert dieser somatisch geprägten Genorte im Kollektiv SGA-geborener Kinder ( $\sim 41$  %) bildete die untere Grenze. Oberhalb der oberen Grenzen lagen ebenfalls per Definition 33 Mittelwerte der somatisch geprägten Genorte. Der obere Grenzwert wurde durch den 34. größten Mittelwert der somatisch geprägten Genorte im Kollektiv SGA-geborener Kinder ( $\sim 73$  %) gebildet.

- Auswertung der AVG-Beta Werte bei vorhandener Kontrollgruppe:

Konnte der zu analysierende Datensatz in die Subgruppen "Kontrollen" und "Patienten" aufgeteilt werden, erfolgte die Auswertung in Anlehnung der bei Court et al. (2013) beschriebenen Auswertestrategie [112]. Kurz zusammengefasst wurde für jeden der 54 Genorte der Mittelwert der AVG-Beta Werte für jeden Patienten und jede Kontrolle gebildet. Im Anschluss wurde anhand der Mittelwerte der AVG-Beta Werte der Kontrollen pro Genort ("MW/Genort") der übergeordnete AVG-Beta Mittelwert ("MWK/Genort") mit der entsprechenden Standardabweichung berechnet. Der normale DNA-Methylierungsbereich pro Genort wurde dann als der "MWK/Genort"  $\pm 3$  SD definiert. Im nächsten Schritt wurde der Mittelwert der AVG-Beta Werte jedes Patienten mit dem NMB für jeden Genort verglichen. Lag der Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten innerhalb des NMB, zeigte der Patient keine DNA-Methylierungsauffälligkeit. Lag der Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten jedoch außerhalb der NMB, wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten und dem "MWK/Genort" bestimmt. Negative Differenzen stehen für eine

Hypomethylierung und positive Differenzen zeigen eine Hypermethylierung der Patienten-DNA im Vergleich zu den Kontrollen. Als Grenzen für die Definition einer technisch validen aberranten DNA-Methylierung mit vermutlich biologischer Relevanz und in Anlehnung an die Literatur wurde eine DNA-Methylierungsdifferenz von  $\geq 10\%$  gewählt [179]. Diese Methode der Auswertung wurde u.a. bei den Teilprojekten "Ekstrophie Analyse" und "MLMD Analyse" angewandt.

- Auswertestrategie für die AVG-Beta Werte aus dem Leberprobendatensatz:

In dem Leberprobendatensatz waren Leberproben enthalten, die von 23 Patienten vor und nach einer bariatrischen Operation entnommen wurden (n=46 DNA-Proben). Um die Veränderung der DNA-Methylierung in diesen als Verlaufspaltenpaare bezeichneten DNA-Proben zu analysieren, wurde eine Erweiterung der zuvor genannten Methode genutzt. Auch hier wurde zunächst für alle DNA-Proben und jeden Genort der Mittelwert der AVG-Beta Werte gebildet. Anschließend wurde für jedes Verlaufspaltenpaar und jeden Genort die Differenz aus Mittelwert der AVG-Beta Werte nach dem Eingriff und dem Mittelwert der AVG-Beta Werte vor dem Eingriff ermittelt. Differenzen  $\geq 10\%$  wurden auch hier als biologisch relevant definiert.

#### **2.2.11.4 Sonstige statistische Verfahren**

Zur optischen Darstellung der ermittelten DNA-Methylierungswerte wurden verschiedene Methoden gewählt, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

- Statistische Auswertung mittels Omics Explorer:

Unsupervidierte Hauptkomponentenanalysen (principal component analysis, PCA oder PC-Analyse) und supervidierte, hierarchische Clusteranalysen wurden mit dem Omics Explorer (Qluore) durchgeführt. Beide Analysen wurden eingesetzt, um eine mögliche Subgruppenbildung im analysierten Datensatz zu erkennen. Für beide Analysen wurden zunächst alle AVG-Beta Werte der qualitätskontrollierten geprägten CpG Loci in den Omics Explorer eingeladen. Der Omics Explorer ermöglicht den Vergleich zweier Gruppen (t-Test Statistik) oder den Vergleich mehrerer Gruppen (ANOVA) mit einer fließenden Einstellung der false discovery rate (FDR) oder des p-Werts. Auch wenn der t-Test streng mathematisch zur statistischen Auswertung von AVG-Beta Werten nicht optimal ist, da die Daten nicht gleichverteilt sind, ist diese Art der statistischen Auswertung von AVG-Beta Werten eine anerkannte Methode und wird in der Literatur entsprechend verwendet [179]. In den hier durchgeführten Analysen wird u.a. die false discovery rate angewandt, da diese für das multiple Testen korrigiert (Korrektur nach Benjamini-Hochberg [180]). Für die mittels Omics Explorer durchgeführten hierarchischen Clusteranalysen wird das euklidische Distanzmaß und der Average Linkage Clusteralgorithmus verwendet. Für die durchgeführten Clusteranalysen wurde eine

FDR  $q \leq 0,05$  als signifikant erachtet. Die unsupervidierte Hauptkomponentenanalyse sowie die supervidierte, hierarchische Clusteranalyse wurden z.B. für das Teilprojekt "pränatale Gewebeanalyse" verwendet.

Die Abbildungen aus dem Omics Explorer sind in der vorliegenden Arbeit mittels der Darstellungsform "Mean=0" gezeigt. Das bedeutet, dass der Mittelwert über alle AVG-Beta Werte eines analysierten Locus auf 0 gesetzt wurde. Damit entsprechen die in der Darstellung gezeigten DNA-Methylierungswerte nicht mehr den tatsächlich bestimmten AVG-Beta Werten. Des Weiteren existieren durch diese Darstellungsform positive und negative DNA-Methylierungswerte.

- Boxplotdarstellung bzw. Histogrammdarstellung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte:

Zur Veranschaulichung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte wurden zwei graphische Darstellungsformen gewählt, mit deren Hilfe die Verteilung der Werte analysiert werden kann. Diese Darstellungsformen werden im Folgenden kurz erläutert.

In einer Boxplotdarstellung werden 50 % der zu analysierenden Daten innerhalb der Box dargestellt. Der Strich innerhalb der Box gibt den Median der Datenreihe wieder. Die Grenzen der Box werden durch das 1. und 3. Quartil der Datenreihe begrenzt, sodass die gesamte Box dem Interquartilsabstand entspricht. Die auch als whiskers bezeichneten von der Box abgehenden Striche bilden zusammen mit den Ausreißern die gesamte Datenreihe ab. Die whiskers enden in der hier gewählten Darstellung (Boxplot mittels R Software (Version 3.0.0) erstellt) mit dem letzten Mittelwert der AVG-Beta Werte der noch innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands liegt. Ausreißer sind damit Mittelwerte der AVG-Beta Werte, die außerhalb dieses 1,5-fachen Interquartilsabstands liegen. Die Boxplotdarstellung wurde verwendet, um einzelne Mittelwerte der AVG-Beta Werte von Hybridisierungen aus dem Kollektiv von Kolonproben besser darzustellen (siehe Kapitel 3.4.2).

Als zweite Form der Darstellung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte wurden Histogramme mithilfe des Statistikprogramms R (Version 3.0.0) erstellt. Für diese Art der Darstellung wird der gesamte Datensatz in sogenannten Klassen (bins) eingeteilt, die auf der X-Achse dargestellt werden. Auf der Y-Achse wird die Anzahl der Elemente, in diesem Fall der Mittelwerte der AVG-Beta Werte, je Klasse angegeben. Diese Form der Darstellung wurde u.a. gewählt, um die Verteilung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte ausgewählter Genorte im Kollektiv SGA-geborener Kinder zu zeigen (siehe Kapitel 4.3.2).

- Liniendiagramm für den Vergleich von DNA-Methylierungswerten bestimmt mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung und Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array:

Zur Verifizierung von DNA-Methylierungswerten, die mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip ermittelt wurden, wurde die Bisulfit-Pyrosequenzierung genutzt. Die Auswertung erfolgte u.a. durch die Darstellung der ermittelten DNA-Methylierungswerte in einem Liniendiagramm (erstellt mittels Excel, Microsoft Office 2007). Dabei wurden auf der X-Achse die DNA-Methylierungswerte bestimmt mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip aufgetragen und auf der Y-Achse die DNA-Methylierungswerte aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung (modifiziert nach [69]). Durch das Setzen einer Trendlinie wurde das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und gibt das Verhältnis von erklärter Varianz zur Gesamtvarianz an [178]. Je näher dieser Wert bei dem maximalen Wert liegt, umso weniger weichen die Messwerte von der Trendlinie ab.

### **3 Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der DNA-Methylierung elterlich geprägter Genorte im Kontext der physiologischen Entwicklung und pathologischer Prozesse. Da viele Gewebeproben nach der Entnahme fixiert werden, sollte zunächst in einem Teilprojekt ein möglicher technischer Einfluss der Fixierung auf die DNA-Methylierung geprägter Gene untersucht werden. In zwei Teilprojekten wurde anschließend das physiologische DNA-Methylierungsmuster von verschiedenen pränatal und postnatal gewonnenen Gewebeproben analysiert und miteinander verglichen. Um den Einfluss pathophysiologischer Faktoren zu bestimmen, wurde das DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene beispielhaft bei Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, der Leber und der Lunge, sowie bei Entwicklungsstörungen analysiert.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen dargestellt. Zunächst werden übergeordnete Ergebnisse zu technischen Aspekten vorgestellt. Danach folgt die Darstellung der Ergebnisse zu den einzelnen biologischen Fragestellungen. Im elektronischen Anhang (Anhang Tabelle A1 bis Anhang Tabelle A17) befinden sich Tabellen, welche die AVG-Beta Werte der geprägten CpGs aller in der vorliegenden Arbeit analysierten Datensätze enthalten. Des Weiteren sind dort die vollständigen Auswertetabellen gespeichert, von denen in den folgenden Kapiteln aus platztechnischen Gründen nur Ausschnitte gezeigt werden können, gespeichert.

#### **3.1 Technische Aspekte und Qualitätskontrolle bei den durchgeführten Analysen**

Insgesamt wurde in dieser Arbeit die DNA-Methylierung in 688 Hybridisierungen untersucht. Insgesamt 517 Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst prozessiert und anschließend ausgewertet. Von weiteren 171 DNA-Proben wurden die bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen DNA-Methylierungsdaten ausgewertet.

##### **3.1.1 Übersicht über die verwendeten Gewebe für die einzelnen Teilprojekte**

Die verschiedenen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurden in 10 Teilprojekten adressiert. Eine Kurzbeschreibung dieser Teilprojekte befindet sich in Tabelle 21.

**Tabelle 21:** Zusammenfassung der Analysen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Teilprojekte.

Fragestellungen → Kurzbeschreibung (Teilprojekt)	Analysiertes Gewebe	Projekt- bezeichnung
Kann die Gewebefixierung zur Veränderung der DNA-Methylierung geprägter Gene führen? → Abhängigkeit der DNA-Methylierung von der Fixiertechnik (TP1)	Lunge	HOPE Analyse

Fortsetzung **Tabelle 21:**

Fragestellungen →Kurzbeschreibung (Teilprojekt)	Analysiertes Gewebe	Projekt- bezeichnung
Wie ist die DNA-Methylierung der DMRs geprägter Gene in Geweben pränatalen Ursprungs? → DNA-Methylierungsanalyse pränatal entnommener Normalgewebe (TP2)	Amnionzellen, Chorionzotten	Pränatale Gewebeanalyse
Wie ist die DNA-Methylierung der DMRs geprägter Gene in postnatal entnommenen Geweben? → DNA-Methylierungsanalyse postnatal entnommener Normalgewebe (TP3)	peripheres Blut Lunge, Leber, Darm,	Normalgewebe Analyse
Ist das DNA-Methylierungsmuster der DMRs geprägter Gene bei somatischen Erkrankungen verändert? →DNA-Methylierungsveränderung in benignen Prozessen (TP4) →DNA-Methylierungsveränderung in malignen Prozessen (TP5)	Leber	NAFLD Analyse
	Darm	CRC Analyse
Ist das DNA-Methylierungsmuster der DMRs geprägter Gene bei Entwicklungsstörungen verändert? →Analyse des DNA-Methylierungsmusters bei Kindern, die zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht (SGA) geboren wurden (TP6) →Analyse des DNA-Methylierungsmusters in einer Kohorte von Patienten mit Blasenektrophie (TP7) →Analyse des DNA-Methylierungsmusters in einer Patientengruppe mit ungeklärter mentaler Retardierung (TP8)	peripheres Blut	SGA Analyse
	peripheres Blut	Ekstrophie Analyse
	peripheres Blut	MR Analyse
Welche aberrant methylierten DMRs geprägter Genorte können bei Patienten mit einem Multi-Locus Methylierungsdefekt (MLMD) beobachtet werden? Gibt es Genorte die bei allen Patienten betroffen sind? →Analyse des DNA-Methylierungsmusters in einer Gruppe von Patienten mit Multi-Locus Methylierungsdefekt (TP9)	peripheres Blut	MLMD Analyse
Ist das aberrante DNA-Methylierungsmuster in peripherem Blut von Patienten mit Imprintingstörungen auch in ihren Patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) zu beobachten? →Analyse von induzierten pluripotenten Stammzellen und anderen Geweben von Patienten mit einer Methylierungsstörung (TP10)	peripheres Blut, Fibroblasten, iPSZ,	iPSZ Analyse

Abkürzungen: DMR: differenziell methylierte Region, HOPE: Hapes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect, CRC: colorectal carcinoma (kolorektales Karzinom), NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung), SGA: small for gestational age (zu klein und/oder zu leicht für Geburtsalter und Geschlecht geboren), MR: mentale Retardierung, MLMD; Multi-Locus Methylierungsdefekt, iPSZ: induzierte pluripotente Stammzellen, TP: Teilprojekt

Aus den Teilprojekten "HOPE Analyse" (TP1), "Pränatale Gewebeanalyse" (TP2), "NAFLD Analyse" (TP4) und "MR Analyse" (TP8) sind die Ergebnisse von zuvor durchgeführten genomweiten Analysen ohne Fokus auf geprägte Genorte unter Mitwirkung der Verfasserin bereits veröffentlicht worden.

In die drei Teilprojekte "SGA Analyse" (TP6), "Ekstrophie Analyse" (TP7) und "MLMD Analyse" (TP9) sind DNA-Methylierungsdaten SGA-geborener Kinder eingegangen, die teilweise innerhalb der Teilprojekte TP7 und TP9 als Kontrollkollektiv dienten. Die DNA-Methylierungsdaten des Kollektivs SGA-geborener Kinder sind bereits, unter anderen als den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Gesichtspunkten, ebenfalls unter Mitwirkung der Verfasserin bereits publiziert.

Im Folgenden sind die entsprechenden Publikationen mit dem dazugehörigen Teilprojekt angegeben.

-TP1: Marwitz\* S, Kolarova J\*, Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Schädlich I, Haake A, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, Ammerpohl O, **The tissue is the issue: improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE technique**, Lab Invest 2014 Aug; 94(8):927-33 (\* geteilte Erstautorenschaft)

-TP2: Eckmann-Scholz C, Bens S, Kolarova J, Schneppenheim S, Caliebe A, Heidemann S, von Kaisenberg C, Kautza M, Jonat W, Siebert R, Ammerpohl O, **DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples**, PLoS One 2012; 7(6):e39014

-TP4: Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Kolarova J, Bens S, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Erhart W, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Häsler R, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Siebert R, Schafmayer C, Hampe J, **DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery**, Cell Metab 2013 Aug 6; 18(2):296-302

-TP8: Kolarova J\*, Tangen I\*, Bens S, Gillessen-Kaesbach G, Gutwein J, Kautza M, Rydzanicz M, Stephani U, Siebert R, Ammerpohl O, Caliebe A, **Array-based DNA-methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype**, EJMG 2015, 10.1016/j.ejmg.2015.05.001 (\* geteilte Erstautorenschaft)

-TP6, TP7 und TP9: Bens S, Haake A, Richter J, Lehold J, Kolarova J, Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillessen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R, **Frequency and characterization of DNA-methylation defects in children born SGA**, Eur J Hum Genet 2013 Aug; 21(8):838-43

-TP6, TP7 und TP9: Kolarova J, Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe FG, Eggermann T, Caliebe A, Holterhus PM, Siebert R, Bens S, **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans**, PLoS One 2015 Mar 18; 10(3):e0120463

In den benannten Publikationen wurde zudem die DNA-Methylierung gesamtgenomisch, d.h. auch außerhalb der geprägten Gene analysiert. Diesbezüglich sei auf die entsprechende Publikation verwiesen, da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die geprägten Regionen des humanen Genoms betrachtet werden.

Eine Reihe der in diesen Publikationen beschriebenen Hybridisierungen wurden auch für andere Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit verwendet, z.B. für TP3 ("Normalgewebe Analyse").

### ***3.1.2 Verwendete BeadChip Arrays***

Auf den Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays wurden insgesamt 636 Proben hybridisiert (TP1, TP3 bis TP10). Dessen Vorläufer, der Infinium HumanMethylation27 BeadChip Array, diente zur Bestimmung der DNA-Methylierung bei 52 DNA-Proben im TP2. Von diesen 52 DNA-Proben wurden die bereits im Institut für Humangenetik Kiel vorhandenen Daten ausgewertet.

### ***3.1.3 Qualitätskontrolle der mittels BeadChip generierten DNA-Methylierungsdaten***

Für jedes Teilprojekt der vorliegenden Arbeit erfolgte die erste Qualitätskontrolle durch die Bestimmung der loci detection rate (LDR). Hybridisierungen, die eine LDR <98 % und damit eine geringe Hybridisierungseffizienz aufzeigten, wurden von der finalen Analyse ausgeschlossen. Dies war für 19 der insgesamt 688 Hybridisierungen in dieser Arbeit der Fall. Als zweite Qualitätskontrolle wurden Korrelationsanalysen der AVG-Beta Werte angefertigt. Dafür wurden jeweils eine SNP-Korrelationsanalyse basierend auf den AVG-Beta Werten aller als rs bezeichneten Loci sowie eine Gesamtkorrelationsanalyse basierend auf die übrigen Loci (mit ch und cg bezeichnet) je Datensatz erstellt. Für die Korrelationsanalyse wurden nur die AVG-Beta Werte von Loci verwendet, die in der GenomeStudio Software einen Detection P-value <0,01 aufwiesen. Mithilfe des Statistikprogramms R (Version 3.0.0) wurden je Datensatz eine SNP- und eine Gesamtkorrelationsmatrix erstellt. Der ermittelte Korrelationskoeffizient wurde für jede Probe ausgegeben und in Excel bedingt formatiert (0=blau, ab 0,95=gelb, 1=rot) (Details vergl. Kapitel 2.2.11.2). In der Korrelationsanalyse wird untersucht, ob es zwischen den AVG-Beta Werten einer Hybridisierung und den AVG-Beta Werten aller anderen Hybridisierungen eines Datensatzes einen linearen Zusammenhang gibt. Je näher der Korrelationskoeffizient bei dem Wert 1 ist, umso deutlicher ist der lineare Zusammenhang. Von DNA-Proben aus dem gleichen Gewebe verschiedener gesunder Individuen wird erwartet, dass die AVG-Beta Werte ähnlich sind und damit die Gesamtkorrelationsanalyse hohe Korrelationskoeffizienten aufweist. Details zu den Qualitätskontrollen vergl. Kapitel 2.2.11.1 und 2.2.11.2.

In Tabelle 22 sind für jedes Teilprojekt die Anzahl ausgeschlossener und letztendlich in die finale Analyse eingehender Hybridisierungen zusammengefasst. Zunächst ist angegeben in welchen Teilprojekten Hybridisierungen aufgrund einer zu niedrigen LDR aus der finalen Analyse ausgeschlossen wurden. Weiterhin finden sich Angaben zu der Anzahl der aus der GenomeStudie Software exportierten und für die Analyse geeigneten Loci für jedes der Teilprojekte. Schließlich sind die Anzahl aufgrund der SNP- oder Gesamtkorrelationsanalysen ausgeschlossener Hybridisierungen angegeben. Zu beachten ist, dass einzelne Hybridisierungen z.T. in mehrere Teilprojekte eingegangen sind und analysiert wurden.

Die AVG-Beta Werte, die den DMRs der geprägten Genorte zuzuordnen sind und die alle Qualitätsparameter erfüllten, wurden letztendlich für die finale DNA-Methylierungsanalyse verwendet.

Die durchgeführten Qualitätskontrollen führten zum Ausschluss von 19 Hybridisierungen aus dem Teilprojekt "Pränatale Gewebeanalyse" aufgrund einer zu niedrigen LDR. Außerdem wurden aus der finalen Analyse dieses Teilprojekts zwei weitere Hybridisierungen, aufgrund einer auffälligen Gesamtkorrelationsanalyse (siehe Kapitel 3.3.1), ausgeschlossen.

In dem Teilprojekt "NAFLD Analyse" wurden aufgrund eines niedrigen Korrelationskoeffizienten sieben Hybridisierungen ausgeschlossen. Im Teilprojekt "CRC Analyse" wurden 10 Hybridisierungen ausgeschlossen. Diese zeigten in der SNP-Korrelationsanalyse keine eindeutige Zuordnung von Normalgewebeprobe und Tumorgewebeprobe desselben Patienten. Da die Normalgewebeproben auch in das Teilprojekt "Normalgewebe Kolon" eingegangen sind, wurden diese Proben in der Folge auch aus der Analyse "Normalgewebe Kolon" ausgeschlossen. Aus dem Teilprojekt "SGA Analyse" und damit auch aus dem Teilprojekt "MLMD Analyse" wurden aufgrund der Gesamtkorrelationsanalyse zwei Hybridisierungen, die in beiden Teilprojekten analysiert werden sollten, ausgeschlossen. Diese Hybridisierungen zeigten einen Medianwert über alle Korrelationskoeffizienten der jeweiligen Hybridisierungen  $<0,98$ .

Insgesamt wurden damit 40 Hybridisierungen aus den weiterführenden DNA-Methylierungsanalysen ausgeschlossen, 21 Hybridisierungen, die auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip, und 19 Hybridisierungen, die auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip erfolgten. Dies entspricht bei insgesamt 636 Hybridisierungen auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip einem Ausfall von 3 % und für die 52 Hybridisierungen auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip einem Ausfall von 40 %.

## Ergebnisse

**Tabelle 22:** Angaben zu den ausgeschlossenen und den final analysierten Hybridisierungen und Loci jedes Teilprojekts.

Projektbezeichnung (TP) [Anzahl aller Hybridisierungen <sup>1</sup> ]	Anzahl ausgeschlossener Hybridisierungen nach LDR Bestimmung	Exportierte Loci mit einem DetPVal <0,01 (in % von den möglichen 485.577 Loci oder 27.568 Loci <sup>2</sup> )		nach Korrelation ausgeschlossene Hybridisierungen		Anzahl der Hybridisierungen für die finale Analyse
		exportierte Loci (%)	Anteil der geprägten Loci (%)	SNP-Korrelation	Gesamtkorrelation	
HOPE Analyse (TP1) [n=18]	0	483.318 (99,5 %)	889 (99,8 %)	0	0	18
Pränatale Gewebe Analyse (TP2) [n=52]	19	26.471 (96,0 %)	132 (95,8 %)	0	2	31
Normalgewebe Analyse: peripheres Blut (TP3) [n=47]	0	482.871 (99,4 %)	889 (99,8 %)	0	1	46
Normalgewebe Analyse: Lunge (TP3) [n=6]	0	484.777 (99,4 %)	891 (100 %)	0	0	6
Normalgewebe Analyse: Leber (TP3) [n=21]	0	483.482 (99,6 %)	889 (99,8 %)	0	0	21
Normalgewebe Analyse: Darm (TP3) [n=117]	0	465.946 (95,9 %)	886 (99,4 %)	6	0	111
NAFLD Analyse (TP4) [n=89]	0	482.859 (99,4 %)	891 (100 %)	0	7	82
CRC Analyse (TP5) [n=235]	0	473.082 (97,4 %)	890 (99,9 %)	10	0	195 <sup>3</sup>
SGA Analyse (TP6) [n=114]	0	482.612 (99,4 %)	889 (99,8 %)	0	2	112
Ekstrophie Analyse (TP7) [n=33]	0	483.405 (99,6 %)	890 (99,9 %)	0	0	33
MR Analyse (TP8) [n=101]	0	482.207 (99,3 %)	889 (99,8 %)	0	0	100
MLMD Analyse (TP9) [n=95]	0	480.112 (98,9 %)	887 (99,6 %)	0	2	93
iPSZ Analyse (TP10) [n=16]	0	482.751 (99,4 %)	888 (99,7 %)	0	0	16

Abkürzungen: TP: Teilprojekt, LDR: loci detection rate, DetPVal: detection P-value, HOPE: Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect, CRC: colorectal carcinoma, NASH: non-alcoholic steatohepatitis, SGA: small for gestational age, MR: mentale Retardierung, MLMD: Multi-Locus Methylierungsdefekt, iPSZ: induzierte pluripotente Stammzellen,

<sup>1</sup>: Einige Hybridisierungen wurden in mehr als nur einem Teilprojekt analysiert, zudem wurden einige DNA-Proben mehrfach hybridisiert.

<sup>2</sup>:  $n_{\text{gesamt}}$ : 485.577 Loci auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip,  $n_{\text{gesamt}}$ : 27.568 Loci auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip (nur für TP2 verwendet)

<sup>3</sup>: 30 DNA-Proben aus Tumorgewebe wurden ausgeschlossen wegen fehlender Angabe zum Gesamttumorzellgehalt bzw. aufgrund eines zu niedrigen Gesamttumorzellgehalts.

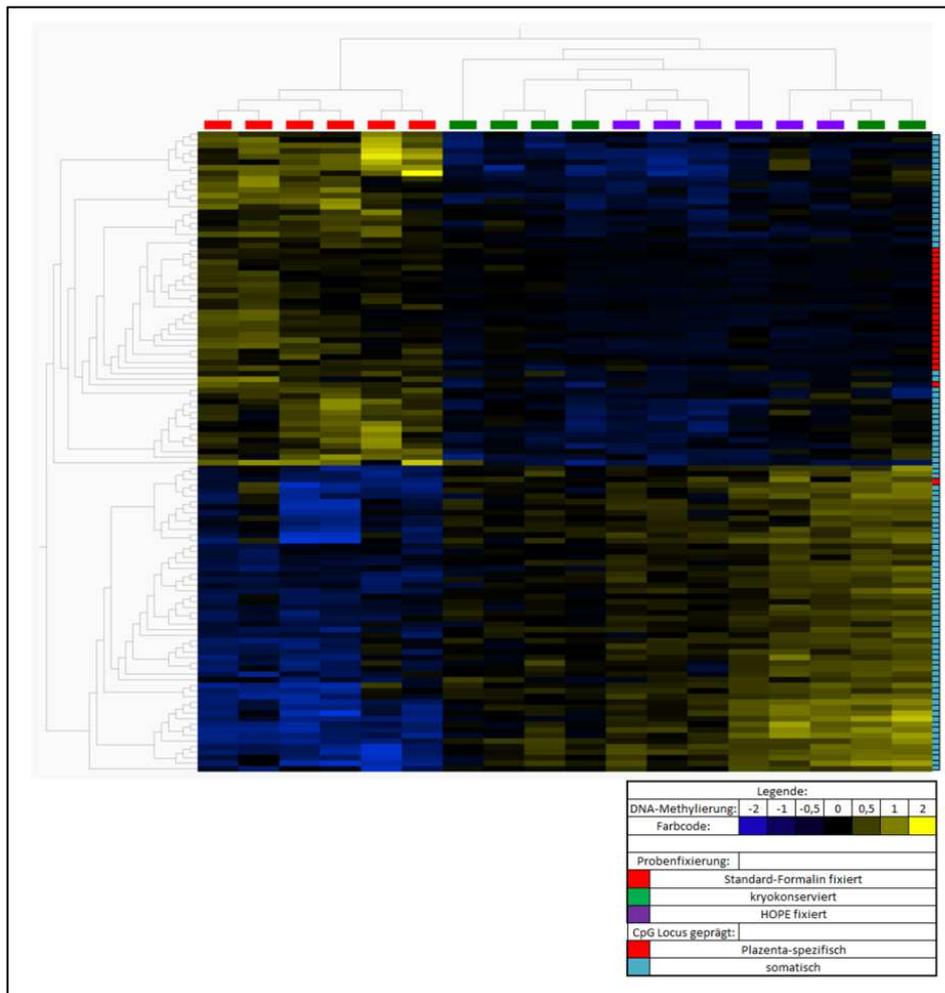
### ***3.2 Abhängigkeit der DNA-Methylierung von der Fixiermethode***

Viele Gewebeproben, die z.B. zur Analyse der DNA-Methylierung entnommen werden, werden direkt nach der Gewebeentnahme fixiert. Dabei kennt man verschiedene Techniken der Gewebefixierung. Das erste hier bearbeitete Teilprojekt beschäftigte sich mit dem möglichen Einfluss der gewählten Fixiermethode, im Sinne eines technischen Artefakts, auf die Bestimmung der DNA-Methylierung mithilfe des Infinium HumanMethylation450 BeadChips.

Dazu wurde Probenmaterial von sechs Individuen analysiert, das jeweils mit drei verschiedenen Fixiertechniken behandelt wurde. Das zu analysierende Lungengewebe jedes Patienten wurde kryokonserviert, HOPE fixiert und Standard-Formalin fixiert (vergl. Kapitel 2.1.1.2). Die DNA-Proben wurden durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Goldmann, zur Verfügung gestellt. Insgesamt 18 DNA-Proben wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays hybridisiert. Im Gegensatz zur genomweiten Analyse dieses Datensatzes, die bereits zu einer separaten Publikation der Verfasserin der vorliegenden Arbeit mit geteilter Erstautorenschaft führte (Marwitz, Kolarova et al., Lab Invest. 2014), fokussierte sich die nachfolgend dargestellte Analyse auf CpG Loci geprägter Gene.

Nach der Qualitätsfilterung wurden die AVG-Beta Werte von 483.318 Loci analysiert. Zunächst wurde eine SNP- sowie eine Gesamtkorrelationsanalyse erstellt (siehe Anhang, Abbildung A1). In der SNP-Korrelationsanalyse zeigten die zu einem Patienten zugehörigen Hybridisierungen hohe Korrelationskoeffizienten. Die Auswertung der Gesamtkorrelationsanalyse zeigte in zwei Standard-Formalin fixierten Gewebeproben, "15343\_Form" und "15725\_Form", Medianwerte über alle Korrelationskoeffizienten der jeweiligen Gewebeproben unterhalb der Grenze von 0,98. Auch wenn die niedrigen Median(R) Werte innerhalb einer Gewebegruppe normalerweise zum Ausschluss dieser Probe führen würden, erfolgte die Analyse der AVG-Beta Werte auch für diese beiden Proben. Grund dafür war, dass an dieser Stelle geklärt werden sollte, ob eine bestimmte Fixiertechnik Einfluss auf die ermittelten DNA-Methylierungswerte aufweisen kann. Ein solcher Einfluss kann sich prinzipiell auch in der Qualität der Daten bzw. in einer schlechten Korrelation widerspiegeln.

Die AVG-Beta Werte von 889 geprägten CpG Loci, die den Qualitätskriterien entsprachen, wurden der weiteren Analyse zugeführt (siehe Anhang Tabelle A1). Zunächst wurde eine supervidierte hierarchische Clusteranalyse des gesamten Datensatzes, entsprechend der drei genutzten Fixierungen (Kryokonserviert vs. HOPE fixiert vs. Standard-Formalin fixiert), durchgeführt. Dafür wurden alle AVG-Beta Werte der 889 geprägten CpG Loci verwendet (siehe Abbildung 19).



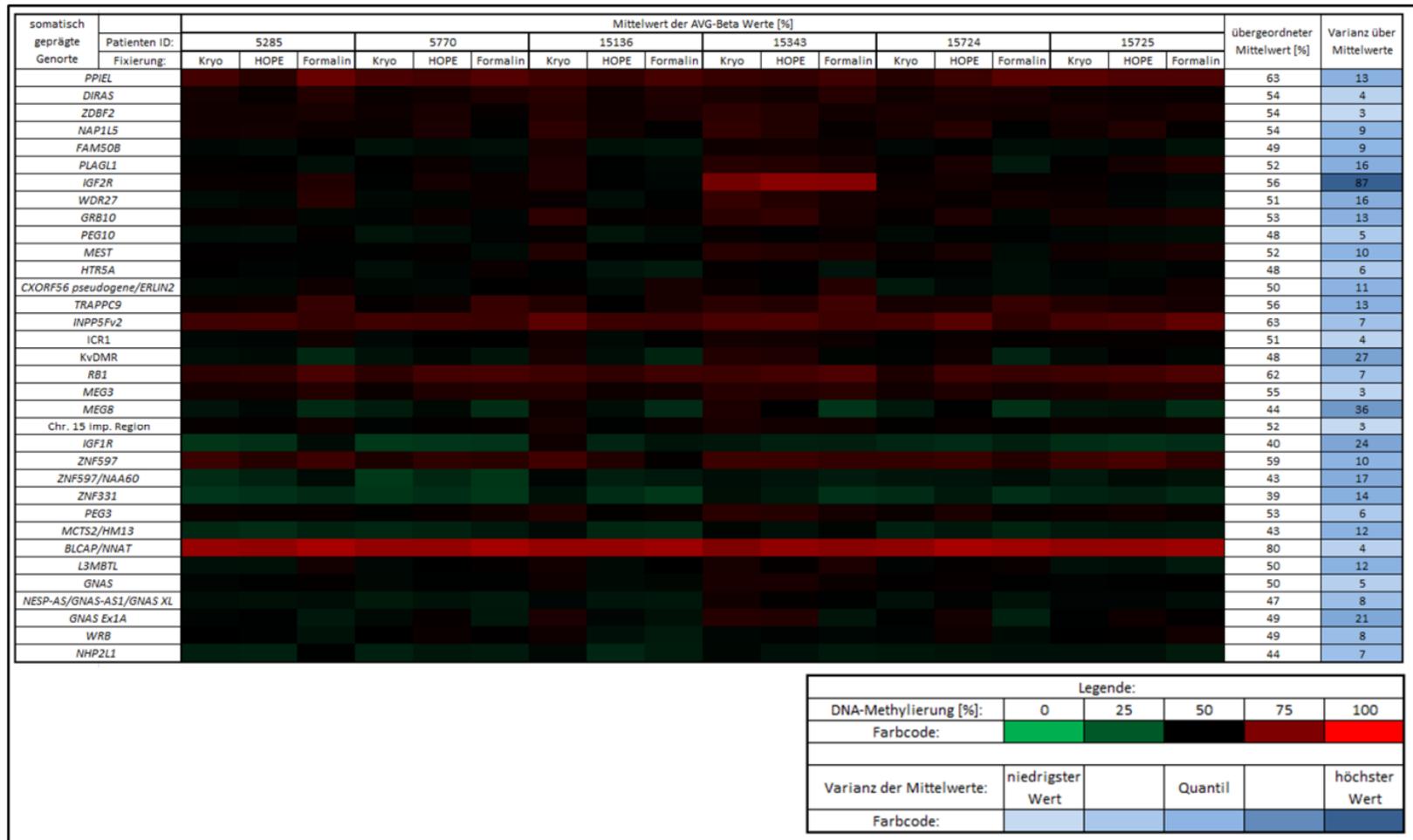
**Abbildung 19:** Supervidierte, hierarchische Clusteranalyse mit den AVG-Beta Werten der DNA-Methylierungsanalyse von Lungennormalgewebeproben. DNA-Proben von sechs Patienten mit jeweils drei verschiedenen Formen der Fixierung wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Bei einer FDR von  $q \leq 0,05$  zeigen 115 der 889 geprägten CpG Loci signifikant unterschiedliche AVG-Beta Werte zwischen den Fixiergruppen. Mit diesen CpGs zeigen sich Cluster, die mit der Fixiermethode assoziiert sind. Jede Zeile stellt einen dieser 115 CpG Loci dar, jede Säule eine Hybridisierung. Farbige Rechtecke oberhalb der Säulen repräsentieren die verschiedenen Formen der Fixierung: rot: Standard-Formalin fixiert; grün: kryokonserviert; lila: HOPE fixiert. Blau dargestellte CpG Loci entsprechen niedrigen AVG-Beta Werten, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Die Farbe der Rechtecke rechts am Cluster zeigt an, ob der Locus Plazenta-spezifisch geprägt (rot) oder somatisch geprägt (petrol blau) ist. (Darstellungsform: Mean=0)

Die supervidierte hierarchische Clusteranalyse der drei verschiedenen Fixiergruppen ergab bei einer FDR von  $q \leq 0,05$  115 geprägte CpG Loci mit einem signifikanten Unterschied in den AVG-Beta Werten. Die AVG-Beta Werte dieser 115 CpGs separieren den Datensatz in zwei Cluster: Ein Cluster beinhaltet die Standard-Formalin fixierten Proben, das zweite Cluster wurde durch die kryokonservierten und HOPE fixierten Proben gebildet. An der Auftrennung der Cluster waren 24/177 Plazenta-spezifische geprägte und 91/712 somatisch geprägte CpGs beteiligt. Die 24 Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci ließen sich 11/20 Plazenta-spezifisch geprägten Genorten zuordnen. Die 91 somatisch geprägten CpG Loci ließen sich 22/34 somatisch geprägten Genorten zuordnen. Diese Analyse zeigt, dass sich die DNA-Methylierungswerte geprägter CpGs nach Kryokonservierung

und HOPE Fixierung wenig unterscheiden, während die Standard-Formalinfixierung mit deutlichen Veränderungen der DNA-Methylierungswerte assoziiert ist.

Im nächsten Schritt wurde eine individuelle Analyse der somatisch geprägten Genorte durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs der DMRs dieser Genorte bestimmt (siehe Abbildung 20). Zunächst fiel auf, dass einige der analysierten Genorte Mittelwerte der AVG-Beta Werte aufzeigten, die deutlich unterhalb bzw. oberhalb des erwarteten DNA-Methylierungswerts von 50 % lagen. Der Genort *IGF2R* zeigte z.B. bei dem Patienten 15343 einen übergeordneten Mittelwert der AVG-Beta Werte über alle drei Hybridisierungen von 75 %. Bei den anderen Patienten lag der übergeordnete Mittelwert der AVG-Beta Werte für die drei verschieden fixierten Lungengewebeproben zwischen 50 % bis 53 %. Daher zeigte dieser Genort die größte Varianz (Varianz: 87). Die Hypermethylierung des *IGF2R* Genorts ist in der Literatur beschrieben, wobei die klinische Relevanz nicht geklärt ist [125] und die Hypermethylierung als epigenetischer Polymorphismus diskutiert wird [169]. Neben diesen Auffälligkeiten zeigten alle Lungengewebeproben relativ hohe Mittelwerte der DNA-Methylierung im Genort *BLCAP/NNAT* (Übergeordneter Mittelwert der AVG-Beta Werte: 80 %). Des Weiteren war auffällig, dass an einigen analysierten Genorten die jeweil Standard-Formalin fixierte Probe eines Patienten andere Mittelwerte der AVG-Beta Werte aufzeigte als die anderen beiden Proben desselben Patienten. Diese Variationen zwischen Standard-Formalin fixierter Gewebeprobe und HOPE bzw. kryokonservierter Gewebeprobe waren besonders deutlich z.B. in dem Genort KvDMR (Varianz: 27) für die DNA-Proben mit den Patienten Identifikationsnummer (ID) 5285, 15136 und 15724 sowie für alle Hybridisierungen im Genort *MEG8* (Varianz: 36). Diese beiden Genorte beinhalten zusammen 11 CpG Loci, die schon in der supervidierten Analyse zur Auftrennung der DNA-Proben entsprechend der Fixierung beitrugen (vergl. Abbildung 19). In diesen Genorten zeigte die jeweils Standard-Formalin fixierte Gewebeprobe niedrigere Mittelwerte der AVG-Beta Werte. In Tabelle 23 sind exemplarisch für die Genorte KvDMR und *MEG8* die Mittelwerte der AVG-Beta Werte aller CpGs der DMRs für die beiden Genorte angegeben.

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** DNA-Methylierungsanalyse der somatisch geprägten Genorte für sechs Lungengewebeproben, die jeweils mit drei verschiedenen Methoden fixiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs der DMRs für die geprägten Genorte der unterschiedlich fixierten Gewebeproben (Kryo: kryokonserviert, HOPE: HOPE fixiert, Formalin: Standard-Formalin fixiert) sowie der übergeordnete Mittelwert (Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte) und die Varianz je Genort. Gezeigt sind die Daten von sechs Patienten. Die Hybridisierung der DNA-Proben erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte jedes Genorts wurden durch einen Farbcode ersetzt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte werden, umso dunkler die Blaufärbung. Unterschiede in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte zwischen den Fixiermethoden sind insbesondere für die Genorte *MEG8* und *KvDMR* zu erkennen. Diese Genorte zeigen, nach *IGF2R*, die größten Varianzen.

**Tabelle 23:** Mittelwerte der AVG-Beta Werte aller CpGs der DMRs für die zwei Genorte KvDMR und *MEG8* in den verschiedenen fixierten Lungengewebebeobachten.

Patienten ID	Mittelwert der AVG-Beta Werte für den Genort KvDMR [%]		
	Kryokonserviert	HOPE fixiert	Standard-Formalin fixiert
5285	46	47	39
5770*	45	48	45
15136	54	47	40
15343*	57	56	49
15724	49	53	40
15725*	47	50	48
Patienten ID	Mittelwert der AVG-Beta Werte für den Genort <i>MEG8</i> [%]		
	Kryokonserviert	HOPE fixiert	Standard-Formalin fixiert
5285	45	48	39
5770	43	48	38
15136	53	46	38
15343	56	50	35
15724	44	49	36
15725	45	45	38

Abkürzungen: ID: Identifikationsnummer, HOPE: Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect

\* Mittelwerte der AVG-Beta Wert dieser Individuen wiesen in diesem Genort keine Auffälligkeiten zwischen den drei Fixiermethoden auf.

Auch wenn in der zuvor gezeigten supervidierten hierarchischen Clusteranalyse 24 der Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci zur Auftrennung des Datensatzes entsprechend der Fixierung beitragen, so zeigte die individuelle Analyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte, dass diese Genorte unabhängig von der Fixierung ein sehr homogenes DNA-Methylierungsmuster aufwiesen (siehe Abbildung 21). Die drei Plazenta-spezifisch geprägten Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* zeigten unabhängig der Fixierung sehr hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte (übergeordneter Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte: 85 %, 88 %, 90 %). Von den übrigen 17 Genorten dagegen zeigten 16 sehr niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte (Spanne der übergeordneten Mittelwerte über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte: 7 % bis 15 %), während der Genort *LIN28B* eine intermediäre DNA-Methylierung mit einem übergeordneten Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte von 24 %, aufwies.

## Ergebnisse

Plazenta-spezifisch geprägte Genorte	Patienten ID: Fixierung:	Mittelwert der AVG-Beta Werte [%]																		Übergeordneter Mittelwert [%]	Varianz über Mittelwerte		
		5285			5770			15136			15343			15724			15725						
		Kryo	HOPE	Formalin	Kryo	HOPE	Formalin	Kryo	HOPE	Formalin	Kryo	HOPE	Formalin	Kryo	HOPE	Formalin	Kryo	HOPE	Formalin				
GPR1-AS																					85	11	
RPN1																						7	4
MCCC1																						8	3
PDE4D																						11	5
LIN28B																						24	6
AIM1																						11	4
SCIN																						12	5
AGBL3																						9	4
ZFAT																						88	10
GLIS3																						7	3
DCAF10																						10	6
FAM196A/DOCK1																						15	14
ZC3H12C																						14	3
N4BP2L1																						9	2
RGMA																						12	3
FAM20A																						9	3
ZNF396																						14	4
DNMT1																						10	3
MIR512-1 cluster																						90	3
CABIN1																						8	3

Legende:					
DNA-Methylierung [%]:	0	25	50	75	100
Farbcode:					
Varianz der Mittelwerte:	niedrigster Wert		Quantil		höchster Wert
Farbcode:					

**Abbildung 21:** DNA-Methylierungsanalyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte für sechs Lungengewebeprobe, die jeweils mit drei verschiedenen Methoden fixiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs in den DMRs der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte der unterschiedlich fixierten Lungengewebeprobe (Kryo: kryokonserviert, HOPE: HOPE fixiert, Formalin: Standard-Formalin fixiert) sowie der übergeordnete Mittelwert (Mittelwert über alle diese Mittelwerte der AVG-Beta Werte) und die Varianz je Genort. Gezeigt sind die Hybridisierungen von sechs Patienten. Die Hybridisierung der DNA-Proben erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte jedes Genorts wurden durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte werden, umso dunkler die Blaufärbung. Alle analysierten Genorte zeigen in den unterschiedlich fixierten Gewebeprobe sehr ähnliche Mittelwerte der AVG Beta Werte und niedrige Varianzen.

Zusammenfassend zeigte diese Teilanalyse, dass es Variationen in den DNA-Methylierungswerten geprägter Genorte in Abhängigkeit von der Probenfixierung geben kann. Eine supervidierte Analyse zeigte für 115 der 889 geprägten CpG Loci signifikante Unterschiede, die mit der Fixiertechnik assoziiert sind. Die Analyse nach Genorten zeigte für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte ein unabhängig der Fixiermethode homogenes Muster der AVG-Beta Mittelwerte. In der Analyse somatisch geprägter Genorte konnten Unterschiede zwischen den fixierten Lungengewebeproben eines Probanden aufgedeckt werden. Alle hier gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die gemessenen DNA-Methylierungswerte einzelner geprägter CpGs abhängig von der gewählten Fixiermethode beeinflusst werden können. Die HOPE Fixierung liefert dabei der Kryokonservierung ähnlichere DNA-Methylierungswerte als Standard-Formalin fixierte Gewebeproben. Im Folgenden wurden für die Untersuchungen deshalb Standard-Formalin fixierte Gewebeproben ausgeschlossen. Nur kryokonserviertes bzw. nicht-fixiertes Material wurde für die weiteren DNA-Methylierungsanalyse verwendet.

### ***3.3 DNA-Methylierung geprägter Gene in verschiedenen Normalgeweben***

Im folgenden Teil der Arbeit wurde die DNA-Methylierung der differenziell methylierten Regionen (DMRs) geprägter Gene in Probensätzen von verschiedenen Normalgeweben ermittelt. Dabei stammte das Normalgewebe entweder von gesunden Individuen oder von einem nicht durch die Erkrankung betroffenen Gewebeanteil eines Individuums.

Ziel dieser Analysen war es, den physiologischen Zustand der DNA-Methylierung der differenziell methylierten Regionen geprägter Gene in unterschiedlichen Geweben zu ermitteln.

#### ***3.3.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in pränatal entnommenen Normalgeweben***

Für die Analyse standen insgesamt 52 DNA-Proben, 15 Proben aus Zellen des Fruchtwassers (Amnionzellen) und 37 Proben aus Chorionzotten, zur Verfügung (vergl. Kapitel 2.1.1.1). Die DNA-Proben aus Amnionzellen werden im Folgenden mit der Abkürzung AC (amniotic cell) bezeichnet. Die DNA-Proben aus Chorionzotten werden im Folgenden mit der Abkürzung CV (chorionic villi) bezeichnet. Die Hybridisierung der DNA-Proben erfolgte auf Infinium HumanMethylation27 BeadChips.

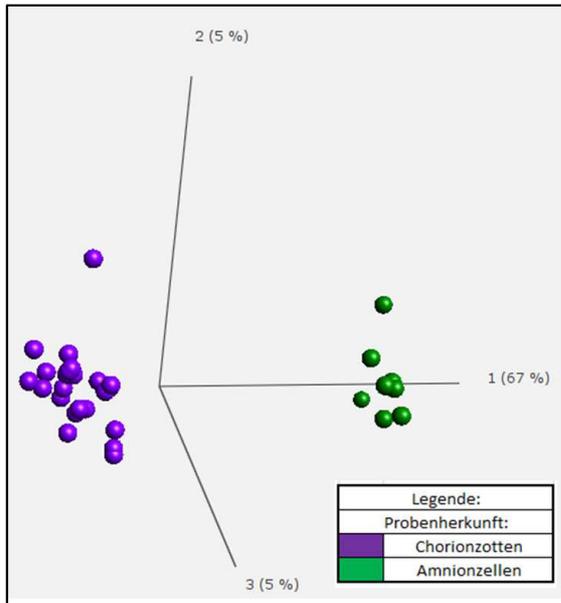
Der hier analysierte Datensatz wurde initial im Rahmen einer Fragestellung genutzt, um die DNA-Methylierung aller durch den Infinium HumanMethylation27 BeadChip abgedeckten CpGs zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden unter Mitwirkung der Verfasserin bereits

publiziert (Eckmann-Scholz et al., PLoS One, 2012). Dabei führte das Mitwirken an den Arbeiten zu dieser Publikation zu einer Co-Autorenschaft. Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Re-Analyse der geprägten Genorte.

Nach der Qualitätskontrolle wurden 8 AC-Proben und 25 CV-Proben sowie 26.471 Loci in die weitere Analyse eingeschlossen. Die AVG-Beta Werte dieser Loci wurden exportiert und zunächst für die Gesamtkorrelationsanalyse (siehe Anhang, Abbildung A2) verwendet. In der hier durchgeführten Gesamtkorrelationsanalyse zeigten die Hybridisierungen, die zu einem Gewebe gehören, untereinander höhere Korrelationskoeffizienten als zu den Hybridisierungen des jeweils anderen Gewebes. Die Korrelationskoeffizienten von zwei AC-Proben, AC1 und AC5, zeigten allerdings deutlich von den anderen Hybridisierungen der Gewebegruppe abweichende Korrelationskoeffizientenmuster. Diese beiden Hybridisierungen lieferten nur hohe Korrelationskoeffizienten mit sich selbst. Auch wenn diese Hybridisierungen in der Korrelationsanalyse auffällig waren, wurden sie nicht aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da sie kein Ausschlusskriterium erfüllten. In der Gruppe der CV-Proben waren die Korrelationskoeffizienten der Proben CV15 und CV26 auffällig. Diese zwei Hybridisierungen lieferten sowohl zu sich selbst als auch zu der jeweils anderen der zwei Hybridisierungen einen vergleichsweise hohen Korrelationskoeffizienten. Ähnlich hohe Korrelationskoeffizienten sind normalerweise bei Duplikaten zu erwarten. Die Hybridisierungen der DNA-Proben CV15 und CV26 wurden deshalb aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Dies führte dazu, dass in die finale Analyse 8 AC-Proben und 23 CV-Proben eingeschlossen wurden.

Von den insgesamt 138 geprägten CpG Loci, die auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip abgedeckt sind, wurden die AVG-Beta Werte von 132 CpG Loci, welche die Qualitätskriterien erfüllten, aus der GenomeStudio Software exportiert und der weiteren Analyse zugeführt (siehe Anhang, Tabelle A2).

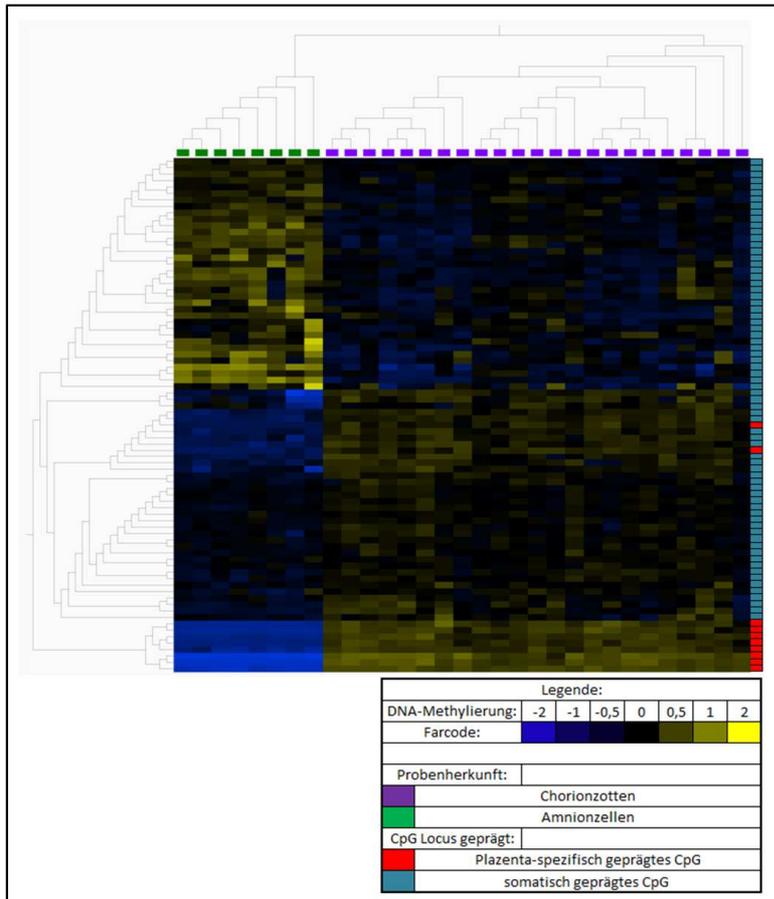
Zunächst wurde eine unsupervidierte Hauptkomponentenanalyse (PC-Analyse, principal component analysis) mit den AVG-Beta Werten aller dieser 132 geprägten CpG Loci durchgeführt (siehe Abbildung 22). In dieser trennten sich die Hybridisierungen gemäß ihrer Gewebeherkunft auf. Somit kann geschlussfolgert werden, dass sich das DNA-Methylierungsmuster geprägter Genorte zwischen AC- und CV-Proben unterscheidet.



**Abbildung 22:** Unsupervidierte PC-Analyse der AVG-Beta Werte der CpG Loci geprägter Gene. In diese Analyse eingegangen sind die AVG-Beta Werte von 31 pränatal entnommenen DNA-Proben, die zuvor auf Infinium HumanMethylation27 BeadChip Arrays hybridisiert wurden. Die Analyse zeigt eine komplette Auftrennung des Datensatzes in DNA-Proben aus Chorionzotten (lila Kugeln) und DNA-Proben aus Amnionzellen (grüne Kugeln). (Darstellungsform: Mean=0)

Für eine anschließend durchgeführte supervidierte hierarchische Clusteranalyse zwischen beiden Gewebegruppen wurden alle AVG-Beta Werte der 132 geprägten CpG Loci eingesetzt. Bei einer FDR von  $q \leq 0,05$  zeigten 80 CpG Loci signifikante Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen den beiden Gewebegruppen Amnionzellen und Chorionzotten (siehe Abbildung 23).

Diese 80 differenziell methylierten CpG Loci enthalten 70/122 somatisch geprägte und 10/10 Plazenta-spezifisch geprägte CpGs. Die 70 differenziell methylierten somatisch geprägten CpGs sind in 14/20 der somatisch geprägten Genorte enthalten. Keine signifikant differenziell methylierten CpG zwischen AC- und CV-Proben finden sich in den Genorten *NAP1L5*, *MEST*, *KvDMR*, *L3MBTL*, *NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL* und *GNAS Ex1A*. Die Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci waren durch eine im Vergleich zu den somatisch geprägten CpGs deutlich ausgeprägte Hypomethylierung in den AC-Proben charakterisiert und ordneten sich entsprechend bis auf zwei Loci alle auf einem Zweig an.



**Abbildung 23:** Supervidierte hierarchische Clusteranalyse der AVG-Beta Werte der CpGs in DMRs geprägter Gene in pränatalen Gewebeproben. DNA-Proben von insgesamt 31 pränatal entnommenen Gewebeproben wurden auf Infinium HumanMethylation27 BeadChip Arrays hybridisiert. Gezeigt ist die Clusteranalyse bei einer FDR  $q \leq 0,05$ . Bei dieser Analyse zeigen die AVG-Beta Werte von 80/132 CpG Loci in DNA-Proben aus Amnionzellen (grüne Rechtecke) und DNA-Proben aus Chorionzotten (lila Rechtecke) signifikante Unterschiede. Jede Zeile stellt dabei die AVG-Beta Werte eines CpGs dar. Blau dargestellte CpG Loci entsprechen einem niedrigen AVG-Beta Wert, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Rechts außen ist die Gruppenzugehörigkeit der CpGs dargestellt: petrol blau: somatisch geprägte CpG Loci, rot: Plazenta-spezifisch geprägte CpG Loci. (Darstellungsform: Mean=0)

In einem zweiten Ansatz zur Auswertung dieses Datensatzes wurden die AVG-Beta Werte nach der chromosomalen Lage der CpG Loci sortiert. Die CpG Loci, die einem einzigen Genort bzw. einer geprägten Region zuzuordnen waren, wurden gruppiert und es wurde für jede Hybridisierung der Mittelwert der AVG-Beta Werte über diesen Genort gebildet sofern die Genorte mehr als ein CpG enthielten (Details vergl. Kapitel 2.2.11.2). Die Auswertung der Mittelwerte erfolgte für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte separat von den somatisch geprägten Genorten.

Die Analyse der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte zeigte wiederum, dass die DNA-Proben aus Amnionzellen in allen Genorten sehr niedrige übergeordnete Mittelwerte über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte je Genort (Spanne der übergeordneten Mittelwerte je Genort: 4 % - 7 %) aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten die DNA-Proben aus Chorionzotten höhere Mittelwerte (Spanne der übergeordneten Mittelwerte je Genort: 41 % - 77 %) (siehe Abbildung 24). Der jeweilige Unterschied der Mittelwerte der AVG-Beta Werte je Genort ist dabei für jeden Plazenta-spezifisch geprägten Genort signifikant ( $q < 0,05$ ) (t-Test, 2-seitig, auf Varianz(un)gleichheit getestet, Bonferroni korrigiert). Diese signifikanten Unterschiede in der DNA-Methylierung wurden auch schon in der zuvor gezeigten supervidierten hierarchischen Clusteranalyse der einzelnen CpG Loci deutlich, bei der alle Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci



## Ergebnisse

sوماتisch geprägte Genorte (Anzahl CpGs je Genort)	Mittelwert der DNA-Methylierung [%]																										übergeordneter Mittelwert [%]		signifikanter p-Wert								
	DNA-Proben aus Zellen des Amnions								DNA-Proben aus Chorionzottenbiopsie																		AC	CV									
	AC 1	AC 3	AC 4	AC 5	AC 6	AC 7	AC 9	AC 10	CV 3	CV 4	CV 6	CV 7	CV 9	CV 10	CV 11	CV 12	CV 14	CV 17	CV 18	CV 21	4	10	12	13	17	18				19	20	23	24	26			
<i>DIRAS3</i> (12)																																	54	46	2.39E-04		
<i>NAP1L5</i> (2)																																	67	63			
<i>FAM50B</i> (2)																																	49	56			
<i>PLAGL1</i> (7)																																	66	70	8.50E-05		
<i>GRB10</i> (5)																																	64	60	2.23E-03		
<i>PEG10</i> (7)																																		51	55	3.00E-03	
<i>MEST</i> (2)																																		44	45		
<i>HTRSA</i> (1)																																		29	53		
<i>ICR1</i> (4)																																		45	39		
<i>KvDMR1</i> (1)																																		55	55		
<i>RB1</i> (9)																																		76	66		
<i>MEG3</i> (6)																																		54	45	2.26E-06	
Chr. 15 imp. Region (20)																																		48	38	2.78E-07	
<i>ZNF597/NAA60</i> (1)																																		41	30	5.84E-05	
<i>PEG3</i> (13)																																			55	57	
<i>BLCAP/NNAT</i> (7)																																			70	83	1.82E-03
<i>L3MBTL</i> (2)																																			60	58	
<i>GNAS</i> (7)																																			53	61	1.29E-04
<i>NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL</i> (12)																																			52	60	
<i>GNAS Ex1A</i> (2)																																			52	51	

Legende:					
DNA-Methylierung [%]:	0	25	50	75	100
Farbcode:					

**Abbildung 25: Mittelwert der DNA-Methylierung der somatisch geprägten Genorte in den pränatal entnommenen Amnionzellen (AC) und Chorionzotten (CV).** Für jede DNA-Probe, die auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip hybridisiert wurde, ist der Mittelwert der gruppierten AVG-Beta Werte jedes somatisch geprägten Genorts in einem Farbcode dargestellt. Der Farbcode ist: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Außerdem ist der übergeordnete Mittelwert (Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte) je Gewebegruppe (AC bzw. CV) angegeben. Die Anzahl der CpGs, die in einen Genort eingehen, ist in Klammern hinter der Bezeichnung des Genorts angeführt. Die Verteilung der DNA-Methylierung in beiden Geweben ist relativ homogen. Der Genort *BLCAP/NNAT* zeigt in den DNA-Proben aus Chorionzotten tendenziell höhere Mittelwerte der AVG-Beta Werte als in den DNA-Proben aus Amnionzellen. Wenn der Genort signifikant differenziell methyliert (p-Wert <0,05) ist zwischen den beiden Gewebegruppen ist der ermittelte p-Wert für den Genort angegeben.

Zusammenfassend ergab die Analyse pränatal entnommener Normalgewebe, dass der Datensatz anhand der AVG-Beta Werte der geprägten Genorte in die beiden Gruppen Amnionzellen und Chorionzotten aufgetrennt werden konnte. Die differenzielle Gewebe-spezifische DNA-Methylierung war insbesondere in den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten zu erkennen. Nur die DNA-Proben aus Chorionzotten zeigten hier Mittelwerte der DNA-Methylierung die für ein elterlich geprägtes DNA-Methylierungsmuster sprechen (41 % - 77 %). Die Proben aus Amnionzellen waren an diesen CpGs homogen unmethyliert. Die DNA-Methylierung der somatisch geprägten CpGs trug auch zu der signifikanten Auftrennung des Datensatzes bei und zeigte auch in der Analyse der Mittelwerte der Genorte signifikante DNA-Methylierungsunterschiede zwischen beiden Gewebegruppen. Die Methylierungsunterschiede der somatisch geprägten Genorte zwischen beiden Geweben waren dabei allerdings deutlich geringer und lagen bei den Mittelwerten der AVG-Beta Werte zwischen 14 % und 113 %.

### ***3.3.2 DNA-Methylierung geprägter Gene in postnatal entnommenen Normalgeweben***

In der zuvor dargestellten DNA-Methylierungsanalyse konnte für unterschiedliche pränatale Gewebe gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung in den geprägten DMRs z.T. Gewebe-spezifisch ist. In der folgenden Analyse wurde untersucht, ob solche Gewebe-spezifischen DNA-Methylierungsmuster in den DMRs geprägter Gene auch in postnatal entnommenen, differenzierten Gewebeproben nachzuweisen sind. Für diese Analyse wurde die DNA-Methylierung in peripherem Blut, Leber-, Lungen- und Kolongewebe analysiert. Bei den hier analysierten DNA-Proben handelte es sich jeweils um die Kontrollkollektive der im späteren Teil der Arbeit beschriebenen weiteren Teilprojekte zu pathologischen Fragestellungen. Insgesamt wurde die DNA-Methylierung in 47 Hybridisierungen von DNA-Proben aus peripherem Blut (vergl. Kapitel 2.1.1.5), 6 DNA-Proben von kryokonserviertem Lungengewebe (vergl. Kapitel 2.1.1.2), 21 DNA-Proben von Lebergewebe (vergl. Kapitel 2.1.1.4) und 117 DNA-Proben von Kolongewebe (vergl. Kapitel 2.1.1.3) analysiert.

Die Qualitätskontrolle für die Hybridisierungen erfolgte in Gewebe-spezifischen Datensätzen. Die Bestimmung der LDR hatte dabei keinen Probenausschluss zur Folge. Für jeden Gewebe-spezifischen Datensatz wurden die AVG-Beta Werte aller Loci mit einem DetPval  $<0,01$  aus GenomeStudio exportiert. Für die durchgeführten Korrelationsanalysen wurden die CpG Loci verwendet, die in dem jeweiligen Datensatz den Qualitätskriterien entsprachen. Die damit durchgeführten SNP-Korrelationsanalysen führten in dem Kolongewebedatensatz zum Ausschluss von sechs Proben. Diese Proben zeigten Korrelationskoeffizienten, die Probenpaaren zuzuordnen waren, obwohl es sich bei den DNA-Proben nicht um Probenpaare desselben Individuums handelte (Details siehe Kapitel 3.4.2). Die Gesamtkorrelationsanalyse im Datensatz der pB-Proben führte aufgrund eines zu niedrigen Medians aller Korrelationskoeffizienten zum Ausschluss einer Probe (siehe Anhang Abbildung A3). Die finale Anzahl der Loci welche die Qualitätskriterien erfüllten ist in Tabelle 22 zusammengefasst.

Für die DNA-Methylierungsanalyse geprägter Genorte wurden nur die geprägten CpG Loci ausgewertet, die in allen vier Datensätzen den Qualitätskriterien entsprachen. Von den insgesamt 891 geprägten CpG Loci, die mithilfe des Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays analysiert werden können, wurden deshalb letztendlich 885 geprägte CpG Loci analysiert. Zunächst wurde der Mittelwert der AVG-Beta Werte jedes zu analysierenden CpGs in jedem Gewebe-spezifischen Datensatz ermittelt. Das heißt z.B., dass aus allen AVG-Beta Werte für das cg10243676 aller zu analysierenden Leberproben der Mittelwert gebildet wurde (siehe Anhang Tabelle A3). Anschließend wurde der Mittelwert der AVG-Beta Werte für jeden zuvor definierten Genort in jedem Gewebe-spezifischen Datensatz ermittelt und in separaten Ansätzen für die somatisch geprägten Genorte bzw. die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte analysiert.

Die individuelle Analyse der 34 somatisch geprägten Genorte ist in der Abbildung 26 gezeigt.



**Abbildung 26:** DNA-Methylierungsanalyse der somatisch geprägten Genorte für postnatal entnommene Normalgewebe. Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die somatisch geprägten Genorte in vier verschiedenen Normalgeweben: peripheres Blut, Lunge, Leber und Kolon. Zunächst wurde der Mittelwert aus den AVG-Beta Werten der Infinium HumanMethylation450 BeadChip DNA-Methylierungsanalysen von 47 peripheren Blutproben, 6 Lungenproben, 21 Leberproben und 111 Kolonproben für jeden zu analysierenden CpG Locus bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte für jeden Genort in jedem Datensatz ermittelt. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte sind hier durch einen Farbcode dargestellt. Farbcode: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Es wurde des Weiteren für jeden Genort ein übergeordneter Mittelwert über die vier Gewebe sowie die Varianz über die vier Gewebe-spezifischen Mittelwerte bestimmt. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte, umso dunkler die Blaufärbung. Die peripheren Blutproben und Leberproben zeigen, bis auf den Genort *BLCAP/NNAT* in den Leberproben, Mittelwerte der AVG-Beta Werte um 50 %. In den Lungenproben und Kolonproben zeigen vereinzelte Genorte niedrigere Mittelwerte der AVG-Beta Werte. Der Genorte *BLCAP/NNAT* zeigt in drei der vier Gewebe höhere Mittelwerte der AVG-Beta Werte, die ermittelte Varianz ist in diesem Genort am größten.

Übergeordnet ist festzustellen, dass viele der analysierten Genorte einen Mittelwert der AVG-Beta Werte im Bereich um 50 % aufzeigten. Die Spanne der übergeordneten Mittelwerte der AVG-Beta Werte über alle Normalgewebebedatensätze je Genort reichte von 40 % bis 77 %. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der DNA-Proben aus peripherem Blut und Leber ähnelten sich am meisten. Sowohl der Lungengewebedatensatz und noch stärker der Kolongewebedatensatz zeigten vereinzelte

Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte. Die größte Varianz (Varianz: 90) zeigte der Genort *BLCAP/NNAT*. Nur der Datensatz aus peripheren Blutproben zeigte für diesen Genort einen Mittelwert der AVG-Beta Werte, der das erwartete hemi-methylierte Verhalten geprägter Gene aufwies (63 %). In den anderen Geweben findet sich für diesen Genort tendenziell eine Hypermethylierung (78 % - 84 %) im Vergleich zu der aufgrund der differentiellen DNA-Methylierung der parentalen Allele erwarteten DNA-Methylierung von 50 %.

Die Auswertung der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte ist in Abbildung 27 gezeigt.

Plazenta-spezifisch geprägte Genorte	Mittelwert der AVG-Beta Werte [%]				übergeordneter Mittelwert [%]	Varianz der Mittelwerte
	peripheres Blut	Lunge	Leber	Kolon		
<i>GPR1-AS</i>	87	87	87	87	87	2
<i>RPN1</i>	6	6	6	6	6	0
<i>MCCC1</i>	8	8	8	8	8	1
<i>PDE4D</i>	14	14	14	14	14	34
<i>LIN28B</i>	30	30	30	30	30	151
<i>AIM1</i>	9	9	9	9	9	2
<i>SCIN</i>	11	11	11	11	11	5
<i>AGBL3</i>	8	8	8	8	8	0
<i>ZFAT</i>	89	89	89	89	89	2
<i>GLIS3</i>	6	6	6	6	6	0
<i>DCAF10</i>	9	9	9	9	9	1
<i>FAM196A/DOCK1</i>	12	12	12	12	12	20
<i>ZC3H12C</i>	12	12	12	12	12	6
<i>N4BP2L1</i>	8	8	8	8	8	0
<i>RGMA</i>	12	12	12	12	12	3
<i>FAM20A</i>	8	8	8	8	8	1
<i>ZNF396</i>	11	11	11	11	11	6
<i>DNMT1</i>	10	10	10	10	10	3
<i>MIR512-1 cluster</i>	90	90	90	90	90	2
<i>CABIN1</i>	7	7	7	7	7	0

Legende:					
DNA-Methylierung [%]:	0	25	50	75	100
Farbcode:	grün	grün	schwarz	rot	rot
Varianz der Mittelwerte:	niedrigster Wert		Quantil		höchster Wert
Farbcode:	hellblau		hellblau		dunkelblau

**Abbildung 27:** DNA-Methylierungsanalyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte für postnatal entnommene Normalgewebe. Gezeigt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs der DMRs für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte der vier verschiedenen Normalgewebedatensätze: peripheres Blut, Lunge, Leber und Kolon. Zunächst wurde der Mittelwert aus den AVG-Beta Werten der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Methylierungsanalyse von 47 peripheren Blutproben, 6 Lungenproben, 21 Leberproben und 111 Kolonproben für jeden zu analysierenden CpG Locus gebildet. Danach wurde daraus der Mittelwert der AVG-Beta Werte für jeden Genort pro Datensatz ermittelt. Diese Mittelwerte der AVG-Beta Werte sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Außerdem wurde für jeden Genort ein übergeordneter Mittelwert über alle AVG-Beta Werte sowie die Varianz über die vier Gewebe-spezifischen Mittelwerte der AVG-Beta Werte bestimmt. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte umso dunkler die Blaufärbung. Alle analysierten Genorte zeigen in den verschiedenen Normalgewebedatensätzen sehr ähnliche Mittelwerte der AVG-Beta Werte.

Die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte wiesen kaum Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte zwischen allen Normalgewebeproben auf. Die ermittelten Varianzen sind überwiegend niedrig. Die drei Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* zeigten in allen vier untersuchten Normalgeweben hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte (übergeordneter Mittelwert

über alle Normalgewebemittelwerte der drei Genorte: 87 %, 89 % und 90 %). Die restlichen Genorte wiesen in den verschiedenen Normalgeweben sehr niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte auf (übergeordneter Mittelwert über alle Normalgewebemittelwerte von 6 % bis 14 %), mit Ausnahme des Genorts *LIN28B*. Dieser zeigte einen intermediären übergeordneten Mittelwert von 30 % und dabei die größte Varianz aller Plazenta-spezifisch geprägten Genorte (Varianz: 151).

Zusammenfassend zeigte die DNA-Methylierungsanalyse Plazenta-spezifisch geprägter Genorte an verschiedenen postnatal entnommenen Normalgeweben, wenn überhaupt, nur wenig Gewebespezifität in der DNA-Methylierung. Insgesamt 16 der 20 Plazenta-spezifisch geprägten Genorte waren in den postnatal entnommenen Gewebeproben weitestgehend unmethyliert, drei quasi vollständig methyliert und ein Genort intermediär methyliert. Von den 34 somatisch geprägten Genorten zeigten 33 keine Gewebespezifität sondern das hemi-methylierte DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene. Einzig der Genort *BLCAP/NNAT* zeigte eine gewisse Variabilität der DNA-Methylierung in verschiedenen Normalgeweben.

### ***3.4 Erworbene Veränderung der DNA-Methylierung am Beispiel zweier somatischer Erkrankungen***

In den soeben beschriebenen Teilprojekten wurde nachgewiesen, dass DNA-Methylierungsmuster der DMRs geprägter Gene sowohl durch technische Variablen (z.B. Fixiertechniken) als auch durch physiologische Vorgänge (z.B. Entwicklungsprozesse und Gewebeherkunft) in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst werden. Diese Ergebnisse schufen den technischen und biologischen Rahmen für die DNA-Methylierungsanalyse geprägter Genorte bei pathophysiologischen Prozessen.

In den beiden folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen geprägter Gene bei zwei somatischen Erkrankungen gezeigt.

#### ***3.4.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in verschiedenen Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung***

Im folgenden Teilprojekt sollte analysiert werden, ob benigne Prozesse zu einer Veränderung der DNA-Methylierung geprägter Gene führen. Diese Analyse wurde am Beispiel der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung durchgeführt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine Therapie der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung die DNA-Methylierung geprägter Genorte verändern kann. Da von einigen Patienten Leberproben vor und nach einem bariatrischen Eingriff zur Verfügung standen, wurde deshalb anhand dieser Proben überprüft, ob eine Veränderung der DNA-Methylierung nach einem solchen Eingriff beobachtet werden kann. Diese Proben werden im

Folgenden als Verlaufsprobenpaare bezeichnet. Die analysierten DNA-Proben wurden durch Herrn Prof. Dr. med. Hampe zur Verfügung gestellt (Details vergl. Kapitel 2.1.1.4).

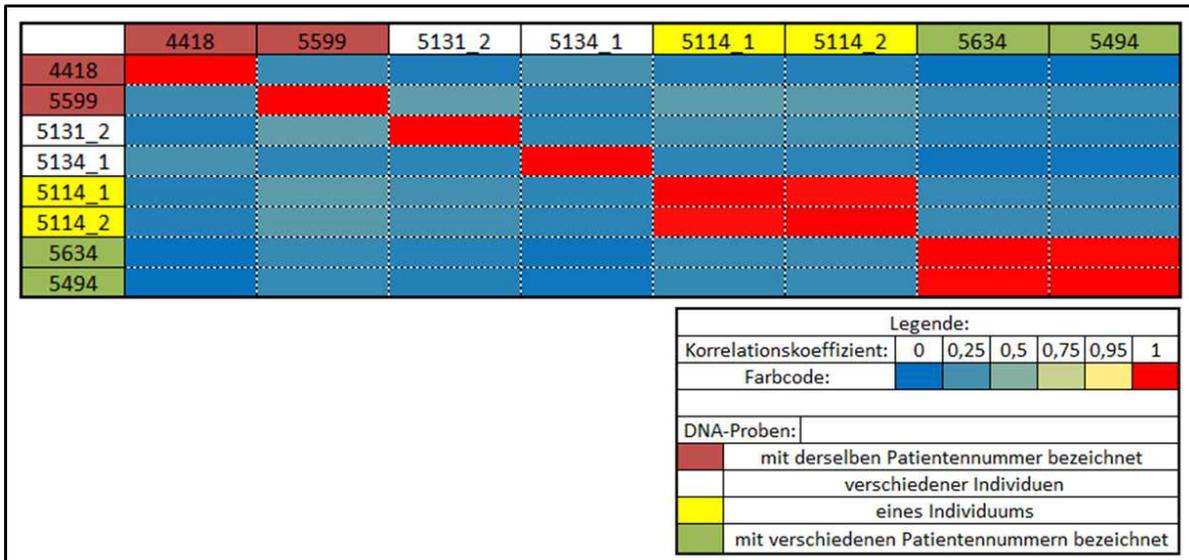
Während sich die Analyse der vorliegenden Arbeit auf geprägte Genorte fokussiert, wurden weiterführende Fragen an diesem Datensatz auch in einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse bearbeitet. Die Mitarbeit an diesen Analysen führte zur Co-Autorenschaft der Verfasserin in der Veröffentlichung der Ergebnisse (Ahrens et al., Cell Metab., 2013). Hinsichtlich dieser genomweiten Analysen sei der Leser auf die benannte Publikation verwiesen.

Für die hier bearbeitete Fragestellung wurden 89 DNA-Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays hybridisiert (vergl. Kapitel 2.1.1.4). Von 23 Patienten war jeweils eine DNA-Probe aus Lebergewebe extrahiert vor und eine DNA-Probe nach einem bariatrischen Eingriff verfügbar (Verlaufsprobenpaare. Eine weitere DNA-Probe wurde als technisches Duplikat hybridisiert.

Nach Qualitätsanalysen wurden von 89 DNA-Proben und 482.859 Loci die AVG-Beta Werte aus der GenomeStudio Software exportiert. Die Verlaufsprobenpaare bzw. das Duplikat wurden mittels SNP-Korrelationsanalyse als solche bestätigt (siehe Anhang Abbildung A4). Zwei Hybridisierungen, bezeichnet mit den Probennummern (Proben Nr.) 5634 und 5494, zeigten Korrelationskoeffizienten, die Duplikaten bzw. Verlaufsprobenpaaren entsprechen könnten. Die eingesetzten DNA-Proben waren jedoch mit zwei verschiedenen Patientennummern (16 und 17) gekennzeichnet. Zwei weitere Hybridisierungen, die als Verlaufsprobenpaar gekennzeichnet waren, bezeichnet mit den Proben Nr. 4418 und 5599, wurden in der SNP-Korrelationsanalyse eindeutig als zwei DNA-Proben unterschiedlichen Ursprungs identifiziert (siehe Abbildung 28). Diese Hybridisierungen wurden für die Analyse geprägter Genorte als separate Hybridisierungen (Proben Nr.: 4418 und 5599) bzw. als Verlaufsprobenpaare (Proben Nr.: 5634 und 5494) ausgewertet.

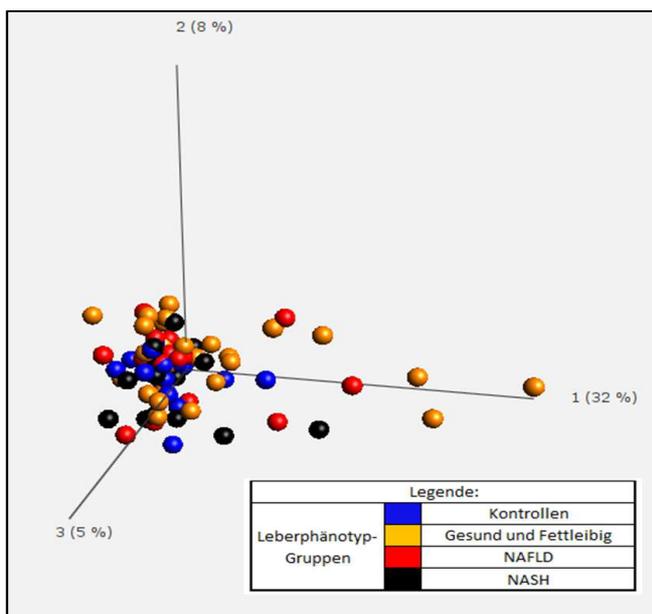
Nach der Gesamtkorrelationsanalyse wurden sieben Hybridisierungen ausgeschlossen, da diese Hybridisierungen einen Medianwert über alle Korrelationskoeffizienten der Probe  $<0,98$  aufwiesen (siehe Anhang Abbildung A4). Somit stand von insgesamt 23 Verlaufsprobenpaaren in zwei Fällen nur noch jeweils eine Hybridisierung zur Verfügung, sodass letztendlich 21 Verlaufsprobenpaare analysiert wurden.

Nach diesen Qualitätskontrollen setzte sich der finale Datensatz aus Hybridisierungen der folgenden Leberphänotyp-Gruppen zusammen: 19 Hybridisierungen von Kontrollen, 32 Hybridisierungen der Leberphänotyp-Gruppe "Gesund und Fettleibig", 16 Hybridisierungen aus der "NAFLD" (non-alcoholic fatty liver disease, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung) Gruppe und 15 Hybridisierungen der "NASH" (non-alcoholic steatohepatitis, nicht-alkoholische Fettleberhepatitis) Gruppe. Somit gingen die Hybridisierungen von 82 Lebergewebeproben in die finale Analyse ein.



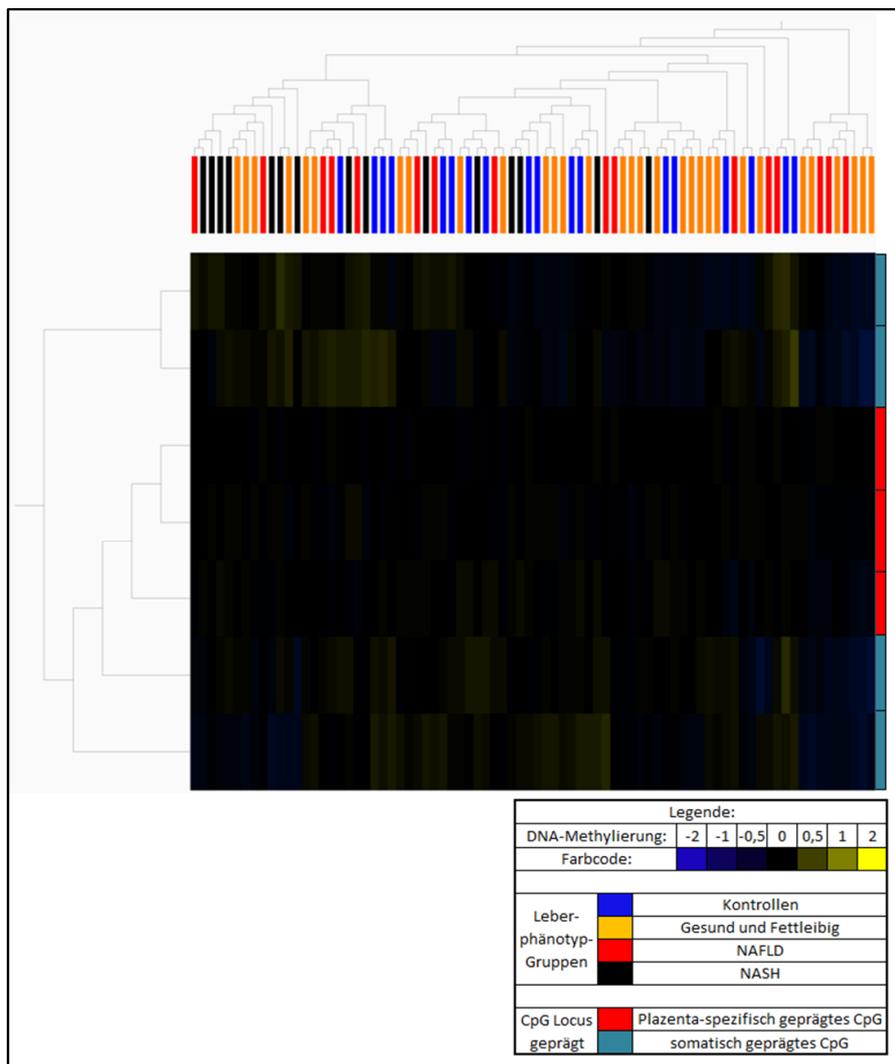
**Abbildung 28:** Ausschnitt aus der SNP-Korrelationsanalyse der Lebergewebeprobe. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode dieser Korrelationskoeffizienten innerhalb der Matrix ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1:rot. Die rot markierten Rechtecke oberhalb der Matrix stehen für DNA-Proben mit der gleichen Patientennummer. Die hier gezeigte Analyse lässt vermuten, dass es sich nicht um DNA-Proben desselben Patienten handeln kann. Als Vergleich dazu sind weiß markiert Hybridisierungen von verschiedenen Patienten, und gelb markierte Hybridisierungen eines Patienten gezeigt. In grün sind die zwei Hybridisierungen der DNA-Proben dargestellt, die zwei verschiedene Patientennummern haben, jedoch nach der SNP-Korrelationsanalyse von demselben Patienten abstammen könnten.

Für den Datensatz wurden nach Qualitätsfilterung alle 891 geprägten CpG Loci analysiert (AVG-Beta Werte siehe Anhang Tabelle A4). Eine unsupervidierte PC-Analyse konnte den Datensatz nicht in die vier Leberphänotyp-Gruppen "Kontrollen", "Gesund und Fettleibig", "NAFLD" und "NASH" auftrennen (siehe Abbildung 29).



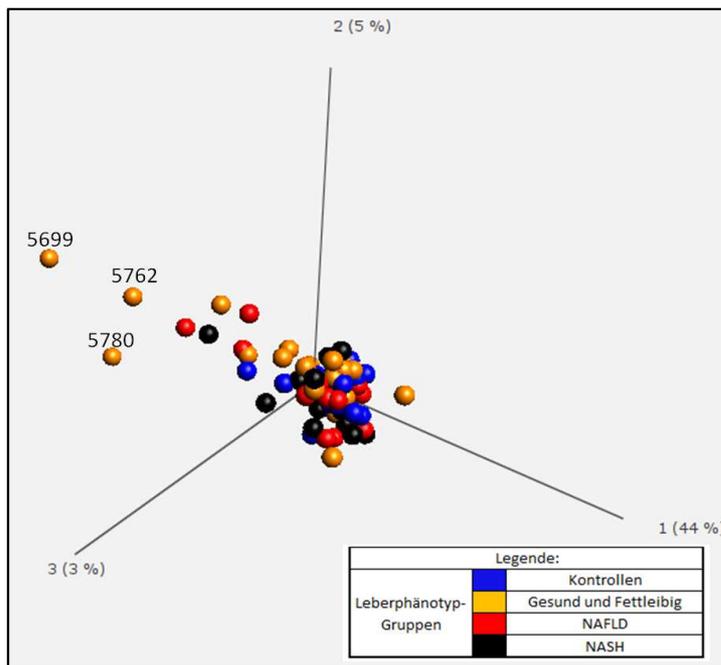
**Abbildung 29:** Unsupervidierte PC-Analyse des gesamten Leber-Datensatzes. In diese Analyse sind die AVG-Beta Werte der 891 CpGs der geprägten Genorte von 82 Leber-DNA-Proben, die zuvor auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays hybridisiert wurden, eingegangen. Die Analyse zeigt, dass der Datensatz aufgrund der AVG-Beta Werte der geprägten CpGs nicht in die vier Leberphänotyp-Gruppen "Kontrollen" (blaue Kugeln, n=19), "Gesund und Fettleibig" (orange Kugeln, n=32), "NAFLD" (rote Kugeln, n=16) und "NASH" (schwarze Kugeln, n=15) aufgetrennt wird. (Darstellungsform: Mean=0)

Eine daraufhin durchgeführte supervidierte hierarchische Clusteranalyse der 891 geprägten CpG Loci entsprechend der Leberphänotyp-Gruppen zeigte bei einer FDR  $q \leq 0,05$  keine signifikant unterschiedlich methylierten CpG Loci. Nach Relaxierung der Parameter auf  $p \leq 0,01$  ergab diese Analyse sieben differenziell methyliert geprägte CpG Loci, deren AVG-Beta Werte jedoch nicht zur Auftrennung des Datensatzes entsprechend der Leberphänotyp-Gruppen führten (siehe Abbildung 30). Insgesamt drei der sieben CpGs waren den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten, *GLIS3* (n=1), *ZNF396* (n=1) und *MIR512-1 cluster* (n=1), zuzuordnen, und vier der sieben CpGs gehörten zu den somatisch geprägten Genorten *DIRAS3* (n=1), *ZDBF2* (n=1), *PEG3* (n=1) und *INPP5Fv2* (n=1).



**Abbildung 30:** Supervidierte, hierarchische Clusteranalyse des gesamten Leber-Datensatzes entsprechend der Leberphänotyp-Gruppen. In diese Analyse sind alle AVG-Beta Werte der 891 geprägten CpG Loci aus der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse eingegangen. Jede Zeile stellt eines der sieben, bei einem p-Wert  $p \leq 0,01$  als signifikant differenziell methyliert identifizierten CpG Loci dar, jede Säule eine Probe des Gesamtkollektivs. Farbige Rechtecke oberhalb der Säulen repräsentieren die verschiedenen Leberphänotyp-Gruppen: blau: "Kontrollen", orange: "Gesund und Fettleibig", rot: "NAFLD", schwarz: "NASH". Blau dargestellte CpG Loci entsprechen einem niedrigen AVG-Beta Wert, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Bei einem p-Wert  $p \leq 0,01$  separiert der Datensatz nicht entsprechend der Leberphänotyp-Gruppen. (Darstellungsform: Mean=0)

Die weiteren Analysen dieses Datensatzes erfolgten in zwei separaten Ansätzen: Im ersten Ansatz wurden alle 82 Hybridisierungen, im zweiten Ansatz wurden nur die Verlaufsprobenpaare analysiert. Für die erste Analyse über alle 82 Hybridisierungen wurde zunächst eine unsupervidierte PC-Analyse der 714 somatisch geprägten CpG Loci durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass alle Proben unabhängig von der Leberphänotyp-Gruppe weitgehend zusammen gruppieren. Eine Ausnahme bildeten drei Proben aus der Leberphänotyp-Gruppe "Gesund und Fettleibig" (Proben Nr.: 5699, 5762 und 5780), die in Richtung der Hauptkomponente 1 deutlich außerhalb dieses Clusters lagen (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Unsupervidierte PC-Analyse des gesamten Leber-Datensatzes für 714 somatisch geprägte CpG Loci. In diese Analyse sind die AVG-Beta Werte aller Leber-DNA-Proben der vier Leberphänotyp-Gruppen "Kontrollen" (blaue Kugeln, n=19), "Gesund und Fettleibig" (orange Kugeln, n=32), "NAFLD" (rote Kugeln, n=16) und "NASH" (schwarze Kugeln, n=15), aus der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse, eingegangen. Drei DNA-Proben (bezeichnet mit der Proben Nr.) liegen deutlich außerhalb des sonst weitgehend homogenen Clusters aller Proben. (Darstellungsform: Mean=0)

Die DNA-Methylierung aller geprägten CpGs für die 82 Hybridisierungen wurde als nächstes mit einem individuellen Ansatz analysiert. Dafür wurden zunächst alle 82 Hybridisierungen entsprechend der Gruppeneinteilung "Kontrollen", "Gesund und Fettleibig", "NAFLD" und "NASH" sortiert. Um die DNA-Methylierungsmuster aller geprägten Genorte der verschiedenen Hybridisierungen innerhalb der Leberphänotyp-Gruppen besser einschätzen zu können, wurde für jede Hybridisierung die Anzahl aberrant methylierter Genorte ermittelt. Dafür wurde zunächst für jeden Genort, sowohl für die somatisch geprägten als auch für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte, der Mittelwert der AVG-Beta Werte pro Hybridisierung und Genort bestimmt. Der normale DNA-Methylierungsbereich (NMB) jedes Genorts wurde als Mittelwert der AVG-Beta Werte des Genorts plus/minus der 3-fachen Standardabweichung dieses Genorts in den "Kontrollen" (n=19) definiert. Der Mittelwert der AVG-Beta Werte je Genort und Hybridisierung wurde mit dem NMB verglichen. Für DNA-Proben, die

Mittelwerte der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB aufwiesen, wurde die Differenz zwischen Mittelwert der AVG-Beta Werte der Hybridisierung und dem Mittelwert der AVG-Beta Werte der Kontrollen bestimmt. Waren diese Differenzen  $\geq 10\%$ , wurden sie als aberrant und biologisch relevant gewertet (siehe Anhang Tabelle A5). Die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte wiesen nach dieser Analysemethode und diesen Kriterien keine aberranten DNA-Methylierungsmuster auf. In Abbildung 32 sind die Hybridisierungen mit den so als aberrant methyliert detektierten somatisch geprägten Genorten dargestellt. Insgesamt zeigten 12/63 Hybridisierungen eine aberrante DNA-Methylierung geprägter Genorte im Vergleich zu den "Kontrollen". Aberrante DNA-Methylierungsergebnisse wurden in 8/32 (25 %) der Hybridisierungen der Gruppe "Gesund und Fettleibig", in 3/15 (20 %) der Hybridisierungen der Gruppe "NASH" und in 1/16 (6 %) der Hybridisierung der Gruppe "NAFLD" beobachtet. Insgesamt 7/12 Hybridisierungen mit aberrant methylierten Genorten zeigten ausschließlich hypomethylierte Genorte im Vergleich zu den "Kontrollen". Insgesamt 5/12 Hybridisierungen mit aberrant methylierten Genorten zeigten dagegen ausschließlich hypermethylierte Genorte im Vergleich zu den "Kontrollen". Zusammengefasst lagen ein Genort (*WDR27*) hypermethyliert, 20 Genorte hypomethyliert und drei Genorte (*PPIEL*, *FAM50B* und *IGF1R*) sowohl hypo- als auch hypermethyliert vor. Von den 34 somatisch geprägten Genorten waren 24 Genorte mindestens in einer Hybridisierung und maximal in vier Hybridisierungen aberrant methyliert. Die in der zuvor durchgeführten unsupervidierten PC-Analyse nach der gewählten Definition auffälligen Hybridisierungen mit den Proben Nr. 5699, 5762 und 5780 waren auch in der individuellen Analyse als Hybridisierungen mit aberranten DNA-Methylierungsmustern somatisch geprägter Genorte auffällig. Diese drei Hybridisierungen lagen in der unsupervidierten PC-Analyse deutlich außerhalb des sonst homogenen DNA-Probenclusters und auch in der individuellen Analyse zeigten sie die meisten aberrant methylierten Genorte (Spanne aberrant methylierter Genorte in diesen drei Patientenproben: 6 bis 22, sonst 1 bis 2).

Ergebnisse

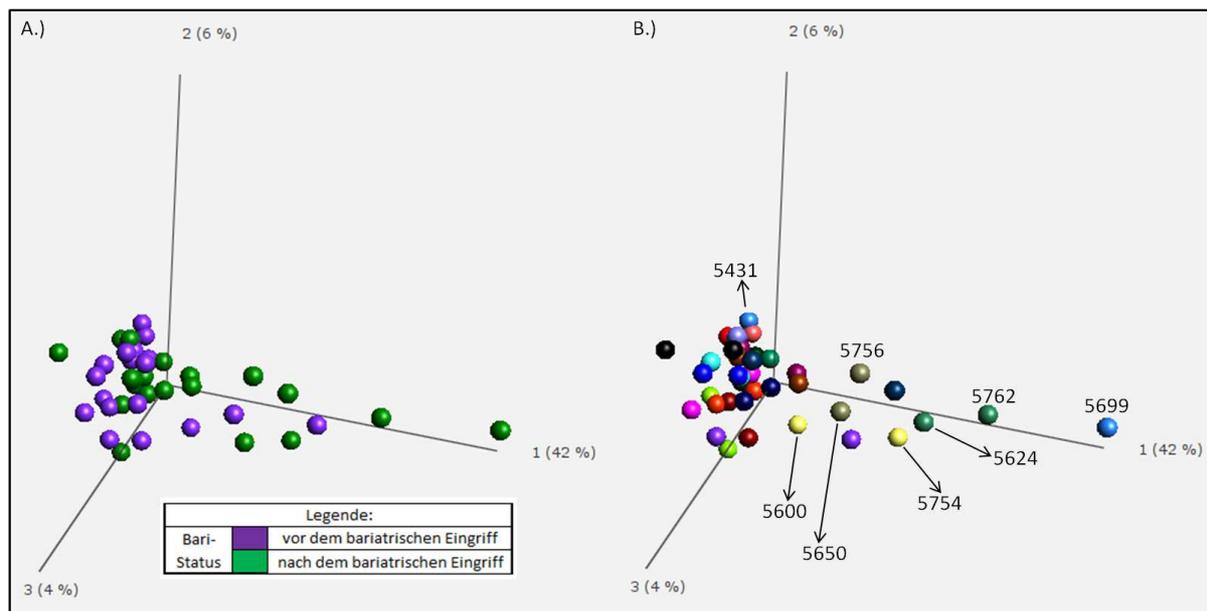
somatisch geprägte Genorte (Anzahl betroffener Individuen)	Differenz zwischen Mittelwert der AVG-Beta Werte einer Hybridisierung und Mittelwert der AVG-Beta Werte der Kontrollen [%], angegeben wenn $\geq 10\%$													
	Gruppe:	Gesund und Fettleibig								NAFLD		NASH		
	Patienten Nr.:	14	33	56	52	57	45	27	6	57	53	23	3	
	Proben Nr.:	5699	5780	5762	5554	5650	5577	5599	5678	5756	5725	5724	5336	
BARI-OP:	nach	nach	nach	nach	vor	keine	keine	nach	nach	keine	keine	vor		
PPIEL (4)	-18			-12	-13					12				
DIRAS3 (0)														
ZDBF2 (0)														
NAP1L5 (1)	-10													
FAM50B (3)	-13	-10				10								
PLAGL1 (1)	-11													
IGF2R (0)														
WDR27 (1)											26			
GRB10 (1)	-10													
PEG10 (1)	-12													
MEST (1)	-13													
HTR5A (0)														
CXORF56 pseudogene/ERLIN2 (1)	-11													
TRAPPC9 (2)	-11	-10												
INPP5Fv2 (1)			-11											
ICR1 (0)														
KvDMR1 (3)	-14	-11	-10											
RB1 (2)	-14		-10											
MEG3 (0)														
MEG8 (3)	-12	-10	-10											
Chr.15 imp. Region (0)														
IGF1R (3)	-12						11					14		
ZNF597 (3)	-16							-13	-12					
ZNF597/NAA60 (3)	-16	-12							-10					
ZNF331 (2)	-12	-10												
PEG3 (1)	-11													
MCTS2/HM13 (3)	-15	-11	-10											
BLCAP/NNAT (0)														
L3MBTL (2)	-13	-10												
GNAS (0)														
NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL (1)	-11													
GNAS Ex1A (3)	-13	-10	-10											
WRB (0)														
NHP2L1 (2)	-12	-10												
Anzahl aberrant methylierter Genorte je Individuum:	22	10	6	1	1	1	1	1	2	1	1	1		

Legende:					
Methylierungsdifferenz [%]:	-100	-50	0	50	100
Farbcode:					
Leberphänotyp-Gruppen:	NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung			
	NASH	nicht-alkoholische Fettleberhepatitis			
BARI-OP:	nach	nach bariatrischer Operation			
	vor	vor bariatrischer Operation			
	keine	keine bariatrische Operation erhalten			

**Abbildung 32:** Ausschnitt aus der DNA-Methylierungsanalyse der somatisch geprägten Genorte des Leber-Datensatzes. Mithilfe der AVG-Beta Werte der 19 "Kontrollen" wurde der normale DNA-Methylierungsbereich (NMB) für alle geprägten Genorte bestimmt (Mittelwert der AVG-Beta Werte pro Genort aller Kontrollen  $\pm$  dreifache Standardabweichung). Gezeigt sind Hybridisierungen deren Mittelwert der AVG-Beta Werte je Genort für mindestens einen Genort außerhalb dieses NMB liegt und die eine Abweichung zwischen dem Mittelwert des Patienten und dem Mittelwert der Kontrollen  $\geq 10\%$  aufweisen. Angegeben ist die jeweils ermittelte Differenz. Negative Differenzen (blau markiert) zeigen im Vergleich zum Kontrollkollektiv erniedrigte Mittelwerte der AVG-Beta Werte an und positive Differenzen (rot markiert) bezeichnen im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Mittelwerte der AVG-Beta Werte pro Genort in den untersuchten Hybridisierungen. In den betroffenen Hybridisierungen ist jeweils mindestens ein somatisch geprägter Genort aberrant methyliert, maximal 22 Genorte. Der am häufigsten aberrant methylierte Genort ist PPIEL.

Um der Frage nachzugehen, ob ein therapeutischer Ansatz, wie ein bariatrischer Eingriff, Auswirkungen auf die DNA-Methylierung haben kann, wurden in einem zweiten Ansatz die 21 Verlaufsprobenpaare analysiert (AVG-Beta Werte siehe Anhang Tabelle A6). Zunächst wurde eine unsupervidierte PC-Analyse der 21 Verlaufsprobenpaare für die AVG-Beta Werte aller geprägten CpG Loci durchgeführt (siehe Abbildung 33). Es zeigte sich, dass es keinen Gruppenunterschied zwischen den DNA-Proben vor bzw. nach dem bariatrischen Eingriff gibt (siehe Abbildung 33 A) und dass einige der Verlaufsprobenpaare in der Analyse nahe beieinander liegen (siehe Abbildung 33 B).



**Abbildung 33:** Unsupervidierte PC-Analyse der 21 Verlaufsprobenpaare. In diese Analyse sind die AVG-Beta Werte aller 891 geprägten CpG Loci aus der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse eingegangen. In A.) sind DNA-Proben entsprechend der beiden Gruppen "vor dem bariatrischen Eingriff" (lila) und "nach dem bariatrischen Eingriff" (grün) eingefärbt. Eine klare Auftrennung des Datensatzes in die beiden Gruppen ist nicht erkennbar. In B.) ist dieselbe Analyse gezeigt. Hier sind die zwei Hybridisierungen eines Patienten in derselben Farbe markiert. Viele der Verlaufsprobenpaare zeigen wenig Variation in den AVG-Beta Werten, sie liegen in der Analyse nahe zusammen. Einige Hybridisierungen weisen jedoch deutliche Unterschiede der AVG-Beta Werte vor und nach dem Eingriff auf. Die größte Variation ist in den Duplikaten des Patienten 14 (hier durch die Proben Nr. 5431 und 5699 repräsentiert) zu sehen. (Darstellungsform: Mean=0)

Für eine individuelle Analyse der geprägten Genorte wurden Einzelpaarvergleiche durchgeführt. Dafür wurde zunächst der Mittelwert der AVG-Beta Werte pro geprägtem Genort in jedem der 21 Verlaufsproben gebildet. Anschließend wurde dieser Mittelwert der AVG-Beta Werte nach dem bariatrischen Eingriff vom Mittelwert der AVG-Beta Werte vor dem Eingriff je Probenpaar und Genort subtrahiert. Bei einer Differenz zwischen beiden Hybridisierungen eines Patienten von  $\geq 10\%$  wurde der Genort als unterschiedlich methyliert definiert. In den 21 Probenpaaren war das für fünf Patientenproben der Fall (siehe Abbildung 34).

## Ergebnisse

somatisch geprägte Genorte	Gruppe	Differenz Methylierung nach OP - Methylierung vor OP [%]										
		NASH	Gesund und Fettleibig	Gesund und Fettleibig	Gesund und Fettleibig	NASH	NASH	NAFLD	Gesund und Fettleibig	Gesund und Fettleibig	NAFLD	
		Proben Nr.:	5336	5484	5431	5699	5600	5754	5624	5762	5650	5756
		BARI-OP:	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
	Patienten Nr.:	3		14		26		56		57		
	PPIEL				-15							
	DIRAS3											
	ZDBF2											
	NAP1L5				-11							
	FAM50B				-13							
	PLAGL1				-12							
	IGF2R											
	WDR27				-18	14		-10				
	GRB10				-12							
	PEG10				-11							
	MEST				-12							
	HTR5A											
	CXORF56 pseudogene/ERLIN2				-13							
	TRAPPC9				-13							
	INPP5Fv2											
	ICR1											
	KvDMR1				-13							
	RB1				-14							
	MEG3				-10							
	MEG8				-12							
	Chr.15 imp. Region											
	IGF1R	-13			-15							
	ZNF597				-11					-12		
	ZNF597/NAAG60				-16							
	ZNF331				-14							
	PEG3				-11							
	MCTS2/HM13				-15							
	BLCAP/NNAT											
	L3MBTL				-14							
	GNAS				-10							
	NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL				-11							
	GNAS Ex1A				-14							
	WRB											
	NHP2L1				-14							

Legende:					
Methylierungsdifferenz [%]:	-100	-50	0	50	100
Farbcode:					

**Abbildung 34:** Vergleich der Mittelwerte der AVG-Beta Werte somatisch geprägter Genorte zwischen Verlaufspaltenpaaren vor und nach einer bariatrischen Operation. Dargestellt sind fünf Patienten, die eine Methylierungsdifferenz  $\geq 10\%$  zwischen den DNA-Proben vor und nach einem bariatrischen Eingriff für mindestens einen geprägten Genort aufzeigen. Eine negative Differenz (blau markiert) bedeutet, dass die DNA-Probe nach dem Eingriff einen niedrigeren Mittelwert der AVG-Beta Werte aufwies als eine Probe desselben Individuums vor dem bariatrischen Eingriff. Eine positive Differenz (rot markiert) bedeutet, dass die DNA-Probe nach dem Eingriff einen höheren Mittelwert der AVG-Beta Werte aufwies als vor dem Eingriff. Patient 14 zeigt dabei DNA-Methylierungsverluste an 25/34 Genorten. Die anderen betroffenen Patienten zeigen ein aberrantes DNA-Methylierungsverhalten an nur einem Genort. Der Genort *WDR27* war dreimal betroffen. Dieser zeigte sowohl Verluste als auch Zugewinne der DNA-Methylierung nach einem bariatrischen Eingriff.

Diese Analyse der 21 Verlaufspaltenpaare ergab für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten der AVG-Beta Werte vor und nach dem bariatrischen Eingriff. Somatisch geprägte Genorte zeigten dagegen in fünf von 21 Patienten AVG-Beta Werte mit Differenzen von  $\pm 0,1$  (entspricht  $\pm 10\%$  DNA-Methylierung) nach bariatrischer Operation. Die DNA-Probe des Patienten 14 nach dem bariatrischen Eingriff (Proben Nr. 5699) zeigte in 25 der 34 somatisch geprägten Genorte niedrigere Mittelwerte der AVG-Beta Werte im Vergleich zur DNA-

Probe vor dem Eingriff. Die anderen vier Patienten zeigten DNA-Methylierungsunterschiede in nur einem Genort. Die DNA-Proben der Patienten 3 und 57 zeigten nach dem bariatrischen Eingriff niedrigere Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die Genorte *IGF1R* bzw. *ZNF597*. Für den Genort *WDR27* zeigten die zwei Patienten 26 und 56 gegensätzliche Veränderungen des Mittelwerts der AVG-Beta Werte nach dem bariatrischen Eingriff. Die DNA-Probe des Patienten 26 zeigte nach dem Eingriff einen höheren Mittelwert der AVG-Beta Werte, die DNA-Probe des Patienten 56 (sowie die DNA-Probe des Patienten 14) dagegen einen niedrigeren Mittelwert der DNA-Methylierung.

Die DNA-Proben mit den Proben Nr. 5699 (nach dem bariatrischen Eingriff, Patient 14) und 5762 (nach dem bariatrischen Eingriff, Patient 56) waren schon in der unsupervidierten PC-Analyse des gesamten Datensatzes der AVG-Beta Werte aller 714 somatisch geprägten CpG Loci (vergl. Abbildung 31) aufgefallen. Dort lagen diese beiden DNA-Proben deutlich außerhalb des sonst homogenen Probenclusters. Das bedeutet, dass sich die AVG-Beta Werte der geprägten CpG Loci nach dem bariatrischen Eingriff bei diesen Patienten so verändert haben, dass sie sich nicht mehr zu den AVG-Beta Werten der Kontrollen einordnen. Auch in der unsupervidierten PC-Analyse aller Verlaufspaltenpaare (vergl. Abbildung 33) clusterten diese DNA-Proben, aber auch die DNA-Proben nach dem bariatrischen Eingriff der Patienten 57 (Proben Nr. 5756) und 26 (Proben Nr. 5754), separat der meisten anderen DNA-Proben.

Zusammenfassend zeigten die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für alle Lebergewebebeobachten in der Analyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte, sowohl im Leberphänotyp-Gruppenvergleich als auch nach einem bariatrischem Eingriff, homogene DNA-Methylierungsmuster und keine signifikanten Unterschiede der DNA-Methylierung. Hingegen ergab die Analyse somatisch geprägter Genorte für einzelne Patienten deutliche Unterschiede der DNA-Methylierung zwischen den verschiedenen Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und der Kontrollkohorte. In einem unabhängigen Ansatz konnte gezeigt werden, dass das DNA-Methylierungsmuster somatisch geprägter CpG Loci bei fünf von 21 Patienten nach einem bariatrischen Eingriff verändert ist. Einheitliche Muster der DNA-Methylierung vor bzw. nach bariatrischer Operation finden sich aber nicht.

### ***3.4.2 DNA-Methylierung geprägter Gene bei kolorektalen Karzinom***

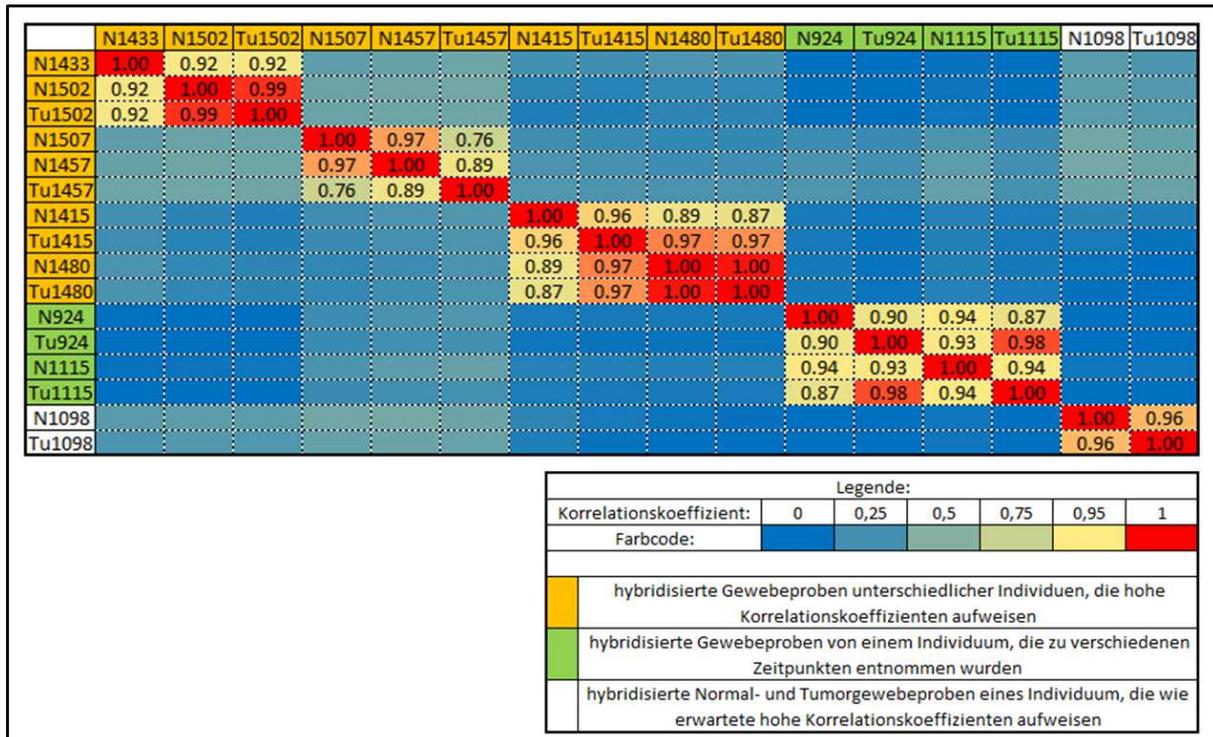
In der zuvor dargestellten Teilanalyse wurde gezeigt, dass benigne Prozesse zu einer Veränderung der DNA-Methylierung geprägter Genorte führen können. Im folgenden Teilprojekt wurde am Beispiel des kolorektalen Karzinoms die Veränderung der DNA-Methylierung geprägter Gene bei einer malignen Störung untersucht.

In dem hier analysierten Datensatz wurden insgesamt 235 DNA-Proben von Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, analysiert. Die DNA-Proben wurden von Herrn Prof. Dr. med. Hampe und Herrn Prof. Dr. med. Schafmayer (vergl. Kapitel 2.1.1.3) zur Verfügung gestellt. Es standen von den meisten Patienten DNA-Proben aus zwei Gewebeproben zur Verfügung: nicht Tumor-infiltriertes Normalgewebe und Tumorgewebe. Diese Gewebe wurden parallel von einem Pathologen untersucht und u.a. der Gesamttumorzellgehalt in den Tumorgewebeproben bestimmt. Ziel der durchgeführten DNA-Methylierungsanalyse war es, die Veränderung des DNA-Methylierungsmusters geprägter Genorte im Rahmen der Tumorentstehung zu charakterisieren.

Die 235 DNA-Proben (117 Normalgewebe- und 118 Tumorgewebeproben) wurden auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip hybridisiert (vergl. Kapitel 2.1.1.3). Für die hier durchgeführten Analysen wurden nur Tumorgewebeproben mit einem Gesamttumorzellgehalt >10 % genutzt. Proben ohne Angaben zum Gesamttumorzellgehalt wurden ausgeschlossen. Insgesamt 88 der 118 Tumorgewebeprobentypen erfüllten diese Kriterien. Die Bestimmung der LDR ergab für alle diese Hybridisierungen Werte >98 %. Die DNA-Methylierungswerte von 473.082 Loci, die den Qualitätskriterien entsprachen, wurden aus der GenomeStudio Software exportiert und analysiert. In der SNP-Korrelationsanalyse (siehe Anhang Abbildung A5) zeigten 10 Proben, vier Tumorgewebeproben und sechs Normalgewebeproben, unerwartet hohe Korrelationskoeffizienten. Diese Hybridisierungen zeigten Korrelationskoeffizienten, wie man sie bei DNA-Proben mit Herkunft von demselben Individuum erwarten würde, obwohl diese DNA-Proben von unterschiedlichen Individuen stammen sollten (siehe Abbildung 35). Diese Proben wurden aus der finalen DNA-Methylierungsanalyse ausgeschlossen, weil nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob das ähnliche Korrelationsmuster in Hybridisierungen verschiedener Patienten durch eine Kontamination der DNA-Proben verursacht wurde. Damit wurden 195 DNA-Proben (84 Tumorgewebeproben und 111 Normalgewebeproben) final analysiert.

Die Gesamtkorrelationsanalyse der AVG-Beta Werte aller Loci zeigte zwei verschiedene Korrelationskoeffizientenmuster. Diese unterschieden primär zwischen den Tumorgewebeproben und Normalgewebeproben (vergl. Anhang Abbildung A5). Die Normalgewebeproben zeigten eher höhere Korrelationskoeffizienten (in der Gesamtkorrelationsmatrix durch rote Felder innerhalb der Matrix verdeutlicht) als die Tumorgewebeproben (in der Gesamtkorrelationsmatrix durch primär gelbe Felder innerhalb der Matrix verdeutlicht). Das zeigt, dass die Gruppe der Normalgewebeproben weniger Variationen in den AVG-Beta Werten und somit homogenere DNA-Methylierungsmuster aufwies als die Gruppe der Tumorgewebeproben.

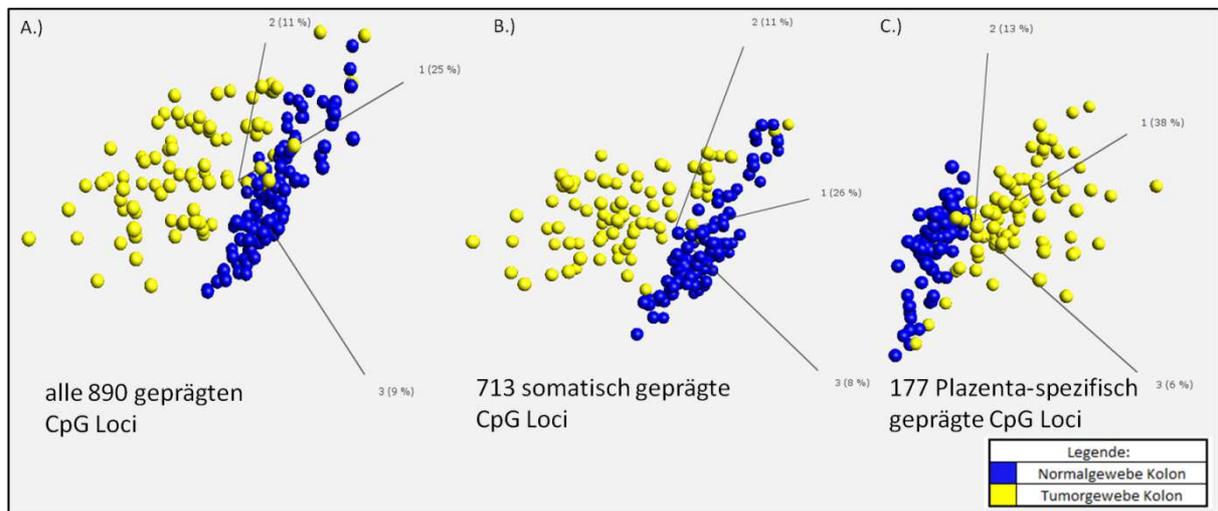
Letztendlich wurden von 195 DNA-Proben die AVG-Beta Werte der qualitätskontrollierten 890 geprägten CpG Loci aus GenomeStudio exportiert (siehe Anhang Tabelle A7).



**Abbildung 35:** Ausschnitt aus der SNP-Korrelationsmatrix des Datensatzes der Kolonproben. In den Rechtecken oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix sind die DNA-Probenbezeichnungen angegeben. Die Reihenfolge der DNA-Proben ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Wurde von einem Patienten sowohl die Normalgewebeprobe (mit N bezeichnet) als auch die Tumorgewebeprobe (mit Tu bezeichnet) analysiert, liegen diese beiden Hybridisierungen in der Matrix direkt neben- bzw. untereinander. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode der innerhalb der Matrix gezeigten Werte der Korrelationskoeffizienten ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Zur besseren Verdeutlichung sind die Korrelationskoeffizienten der betroffenen Hybridisierungen auch als Wert sichtbar dargestellt. In orange markiert sind die Hybridisierungen, die auffällige Korrelationskoeffizienten aufweisen. Auffällig heißt, dass die beiden Hybridisierungen des Patienten zueinander hohe Korrelationskoeffizienten aufweisen, aber auch zu Hybridisierungen eines anderen Patienten. In grün sind Hybridisierungen von Gewebeprobe aufgezeigt, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten von ein und demselben Individuum entnommen wurden. Weiß unterlegt sind Tumor- und Normalgewebeprobe eines willkürlich ausgesuchten Patienten, die ein wie zu erwartendes Korrelationsmuster aufzeigen. Da die orange unterlegten Normalgewebeprobe und Tumorgewebeprobe eines Patienten zu sich aber auch zu Hybridisierungen anderer Patienten hohe Korrelationskoeffizienten aufweisen, kann eine Kontamination der DNA-Proben nicht ausgeschlossen werden. Diese Hybridisierungen wurden aus den finalen Analysen ausgeschlossen.

Als erstes wurde untersucht, ob die erhobenen AVG-Beta Werte der 890 geprägten CpG Loci den Datensatz in Normalgewebe- und Tumorgewebeprobe auf trennen. Daher wurde zunächst eine unsupervidierte PC-Analyse mit allen 890 geprägten AVG-Beta Werten durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die AVG-Beta Werte dieser 890 CpGs den Datensatz deutlich, wenn auch nicht vollständig, in Normal- und Tumorgewebeprobe separieren (Abbildung 36 A). Daraufhin wurde analysiert ob auch die AVG-Beta Werte nur der 713 somatisch geprägten CpG Loci und nur der 177 Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci den Datensatz in die beiden Gruppen Normal- und Tumorgewebeprobe separieren können (Abbildung 36 B und 36 C). Auch in diesen beiden separaten unsupervidierten PC-Analysen war die Auftrennung des Datensatzes in die beiden Gewebegruppen

zu beobachten. Die Verteilung der DNA-Proben in den PC-Analysen suggerierte, dass die AVG-Beta Werte der Tumorgewebebeurteilungen heterogener sind als die der Normalgewebebeurteilungen.



**Abbildung 36:** Unsupervidierte PC-Analysen des Darm-Proben Datensatzes. Für die hier dargestellten PC-Analysen wurden die AVG-Beta Werte des gesamten Datensatzes ( $n=890$ , Abb. 29 A.), nur der somatisch geprägten CpG Loci ( $n=713$ , Abb. 29 B.) oder nur der Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci ( $n=177$ , Abb. 29 C.) von insgesamt 195 auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisierten DNA-Proben verwendet. In allen Analysen ist zu sehen, dass sich der Datensatz in DNA-Proben aus Normalgewebe (blaue Kugeln) und Tumorgewebe (gelbe Kugeln) auftrennt. Die Auftrennung ist in allen Analysen gut aber nicht vollständig, in Analyse 29 C.) allerdings am deutlichsten. (Darstellungsform: Mean=0)

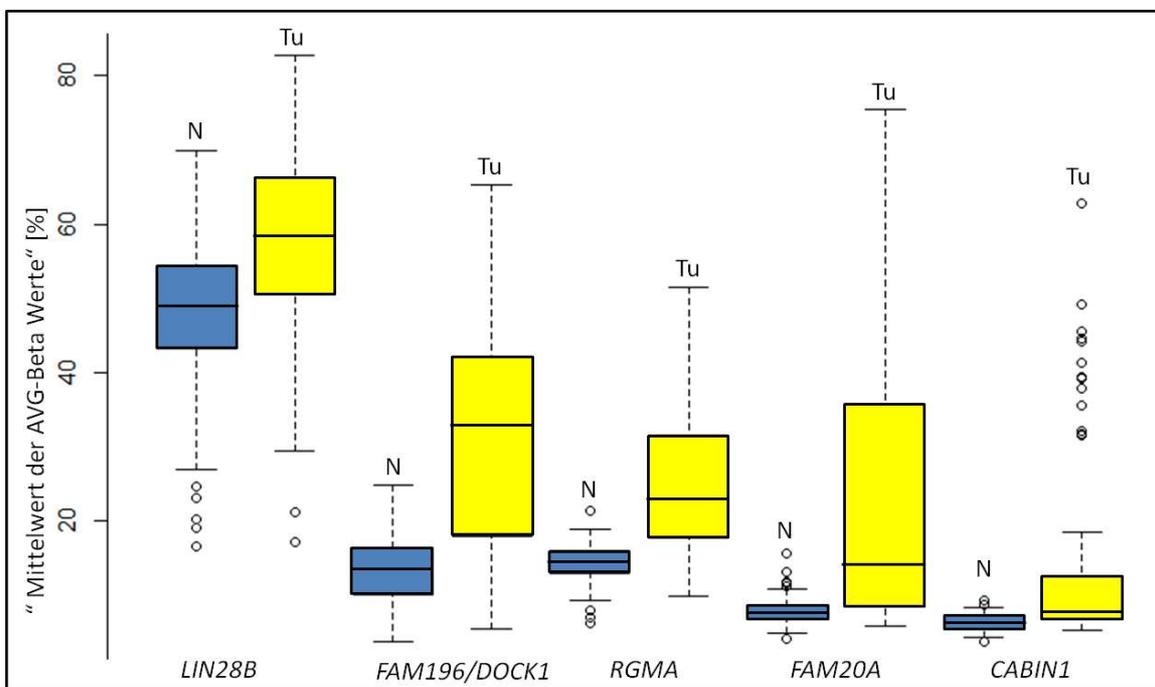
Eine supervidierte, hierarchische Clusteranalyse, durchgeführt mit den AVG-Beta Werten der 890 qualitätskontrollierten geprägten CpGs, ergab bei einer FDR von  $q \leq 0,05$  eine deutliche wenn auch nicht vollständige Auftrennung des gesamten Datensatzes in Normal- und Tumorgewebebeurteilungen aufgrund der differentiellen DNA-Methylierung von 467 CpGs. Dieses Ergebnis zeigt, dass 52 % der analysierten geprägten CpGs zur Auftrennung in Normal- und Tumorgewebe beitragen und verdeutlicht damit die schon in der Literatur beschriebenen DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe, die oft mit LOI in Verbindung gebracht werden. Da LOI in CRC für somatisch geprägte Gene schon vielfach analysiert wurde und weil die unsupervidierte PC-Analyse für die 177 Plazenta-spezifisch geprägten CpG Loci die geringste Durchmischung von Normal- und Tumorgewebebeurteilungen aufwies, fokussierte sich die anschließende Analyse in dem individuellen Ansatz auf die Subgruppe Plazenta-spezifisch geprägter CpG Loci. Dafür wurden die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs der DMRs in den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten bestimmt. Außerdem wurde die Varianz der Mittelwerte über den Genort in den Normalgewebe- und den Tumorgewebebeurteilungen ermittelt. Diese Analyse zeigte ein heterogenes Muster einiger Mittelwerte, vor allem in der Gruppe der Tumorgewebebeurteilungen (siehe Abbildung 37). Hier wird die zuvor suggerierte Heterogenität in den AVG-Beta Werten in den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten der Tumorgewebebeurteilungen noch deutlicher.



**Abbildung 37: DNA-Methylierungsanalyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte für 111 Normalgewebe- und 84 Tumorgewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom.** Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die DMRs der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte aller Proben des Darm-Datensatzes sowie die ermittelten Varianzen für Normal- (N) bzw. Tumorgewebe (Tu). Die Hybridisierung der Proben erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Die Mittelwerte der DNA-Methylierung für jeden Genort sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte umso dunkler die Blaufärbung. Zwischen Normal- und Tumorgewebeproben sind Variationen in den Mittelwerten der DNA-Methylierung zu erkennen. Die Tumorgewebeproben untereinander aber auch im Vergleich zu den Normalgewebeproben zeigen in den Genorten *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1* ein heterogenes DNA-Methylierungsmuster. Der Genort *LIN28B* zeigt in Normal- und Tumorgewebeproben hohe Werte der Varianz in den Mittelwerten der DNA-Methylierung.

Die Analyse der DMRs der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte zeigte sowohl in den Normalgewebeproben als auch in den Tumorgewebeproben wiederum hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die drei Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* (übergeordneter Mittelwert für die Normalgewebeproben: 87 %, 88 %, 88 %, übergeordneter Mittelwert für die Tumorgewebeproben: 82 %, 88 %, 82 %). Solche hohen Mittelwerte in diesen Genorten waren auch in den zuvor gezeigten Normalgewebe-Analysen erkennbar. Wie auch in den Normalgewebe-Analysen gezeigt, wurden für die meisten anderen Plazenta-spezifisch geprägten Genorte niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte ermittelt. Die Spanne der übergeordneten Mittelwerte für diese unauffälligen Genorte mit niedrigen Mittelwerten der AVG-Beta Werte reichte für die Normalgewebeproben von 5 % bis 9 % und für die Tumorgewebeproben von 7 % bis 10 %. Hier zeigten die Mittelwerte der AVG-Beta Werte wenige Variationen zwischen Normalgewebe- und Tumorgewebeproben. Vor allem in den vier Genorten *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1* zeigten die Tumorgewebeproben ein heterogenes DNA-Methylierungsmuster. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte einiger Tumorgewebeproben zeigten in diesen Genorten, im Vergleich zu den Normalgewebeproben und zu den nicht auffälligen Tumorgewebeproben, höhere Mittelwerte der AVG-Beta Werte. Die ermittelten Varianzen für diese Genorte zählten zu den

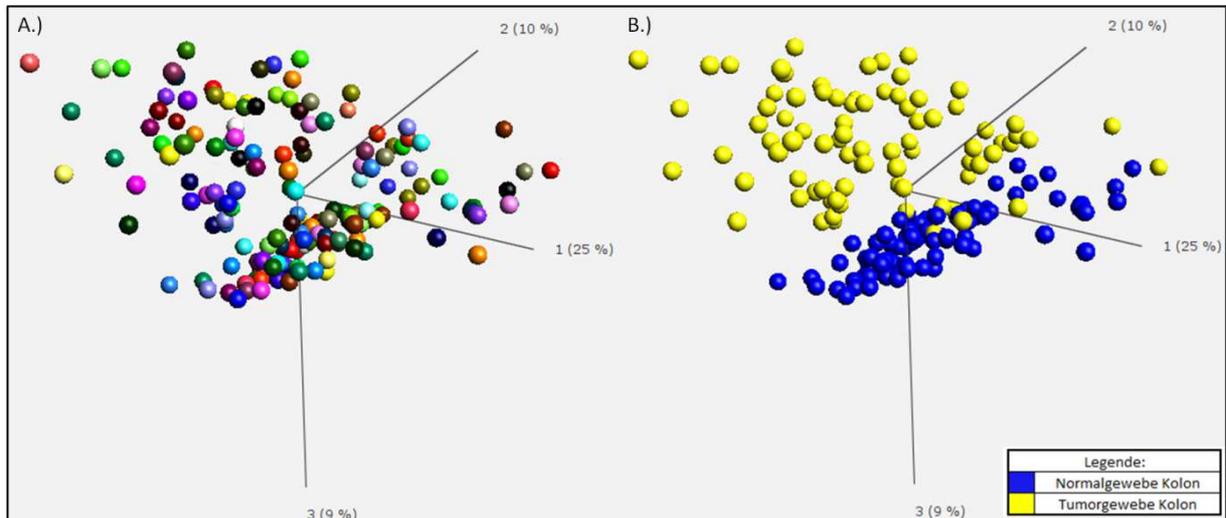
höchsten für die Tumorgewebeprobe. Der Genort mit der größten Varianz war *LIN28B*. Dieser Genort zeigte in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte der Normalgewebeprobe, wie schon in den Voranalysen, eine intermediäre DNA-Methylierung. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für diesen Genort lagen im mittleren Bereich der DNA-Methylierung (übergeordneter Mittelwerte der AVG-Beta Werte der Normalgewebeprobe: 47 %, übergeordneter Mittelwerte der AVG-Beta Werte der Tumorgewebeprobe: 59 %). Die Varianz in den Normalgewebeprobe lag bei 102, in den Tumorgewebeprobe bei 160. In Abbildung 38 ist die Verteilung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die auffälligen Plazenta-spezifisch geprägten Genorte (definiert als Varianz >90 in Tumorgewebe) für die Normalgewebe- und Tumorgewebeprobe gezeigt. Alle fünf Plazenta-spezifisch geprägten Genorte sind durch eine höhere DNA-Methylierung in Tumor- als in Normalgewebe charakterisiert.



**Abbildung 38:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte *LIN28B*, *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1*. Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte von 111 Normalgewebeprobe (blau markiert und mit N bezeichnet) und 84 Tumorgewebeprobe (gelb markiert und mit Tu bezeichnet) für die fünf Plazenta-spezifisch geprägten Genorte, die in dem Darm-Datensatz die größte Varianz (>90) innerhalb der Tumorgewebeprobe aufzeigen. Bei allen fünf Genorten zeigen die Tumorgewebeprobe höhere Mittelwerte der AVG-Beta Werte und eine größere Variabilität als die Normalgewebeprobe. (Details zur Boxplotdarstellung von Daten vergl. Kapitel 2.2.11.4)

Von insgesamt 87 Patienten wurden sowohl Normalgewebe- als auch Tumorgewebeprobe analysiert. Die AVG-Beta Werte der 890 geprägten CpG Loci wurden für diese Probenpaare in einer unsupervidierte PC-Analyse analysiert. Die Fragestellung war, ob die DNA-Proben von Normalgewebe- und Tumorgewebeprobe oder DNA-Proben eines Individuums aufgrund der DNA-

Methylierung an den geprägten CpGs zusammen gruppieren. Die Analyse ergab, dass die DNA-Methylierung der geprägten CpGs den Datensatz nach Tumorgewebe und Normalgewebe separieren und nicht nach Individuum (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** PC-Analyse der Normal- und Tumorgewebeproben von 87 Tumor- und Normalgewebe Probenpaaren. Die AVG-Beta Werte aller 890 geprägten CpG Loci für insgesamt 87 DNA-Probenpaare sind in die PC-Analyse eingegangen. In A.) sind die Probenpaare je Individuum farblich markiert, wobei eine Farbe für mehrere Probenpaare verwendet wurde. In B.) sind die Proben nach der Gewebegruppe Normalgewebe (blau) und Tumorgewebe (gelb) gekennzeichnet. Die Analyse zeigt, dass die AVG-Beta Werte den Datensatz entsprechend der beiden Gewebegruppen Normalgewebe und Tumorgewebe auftrennen, Proben eines Individuums liegen eher nicht beieinander.

Zusammenfassend zeigte die DNA-Methylierungsanalyse von Normalgewebeproben und Tumorgewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom, dass sich die DNA-Methylierungsmuster geprägter Genorte im Rahmen der Tumorentstehung verändern. Dabei fanden sich deutliche Hypermethylierungen in den Tumorgewebeproben insbesondere in den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten *LIN28B*, *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1*.

### ***3.5 Analysen der DNA-Methylierung in Patientenkollektiven mit verschiedenen Entwicklungsstörungen***

In den zuvor vorgestellten Teilprojekten wurde die DNA-Methylierung geprägter Genorte untersucht, die bei somatischen Erkrankungen sekundär auftreten und den Phänotyp bzw. Krankheits- und/oder Heilungsprozess beeinflussen können. DNA-Methylierungsstörungen geprägter Genorte treten jedoch auch primär auf und sind dann mit den in der Einleitung beschriebenen acht klassischen Imprintingsyndromen assoziiert. Die phänotypische Breite von Imprintingkrankungen ist nicht vollständig bekannt. Das liegt unter anderem daran, dass nur bei Patienten mit Verdacht auf eine Imprintingstörung die zum Nachweis einer DNA-Methylierungsveränderung notwendigen diagnostischen Analysen eingeleitet werden. Es ist also wenig bekannt, ob auch Störungen des

Imprintings bei Entwicklungsstörungen auftreten, die nicht an ein klassisches Imprintingsyndrom denken lassen. Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil sich Imprintingsyndrome phänotypisch unterschiedlich ausgeprägt manifestieren können. Um das phänotypische Spektrum von Imprintingstörungen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb die DNA-Methylierung geprägter Genorte bei verschiedenen Entwicklungsstörungen analysiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

### ***3.5.1 DNA-Methylierung geprägter Gene bei zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht geborenen Kindern***

Zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht geborene Kinder (small for gestational age, SGA) zeigen vor, und einige von ihnen auch nach, der Geburt Wachstumsstörungen. Da das Symptom der Wachstumsstörung auch bei klassischen Imprintingsyndromen auftritt, sollte analysiert werden, ob in einem Kollektiv SGA-geborener Kinder DNA-Methylierungsstörungen geprägter Gene festzustellen sind.

DNA-Methylierungsanalysen zu dem hier untersuchten Kollektiv SGA-geborener Kinder wurden bereits mit dem Fokus auf 10 geprägte Genorte (Bens et al., Eur J Hum Genet, 2013) bzw. zu einer anderen Fragestellung als der hier bearbeiteten (Kolarova et al., PLoS One, 2015), jeweils unter Mitwirkung der Verfasserin der vorliegenden Arbeit, bereits veröffentlicht.

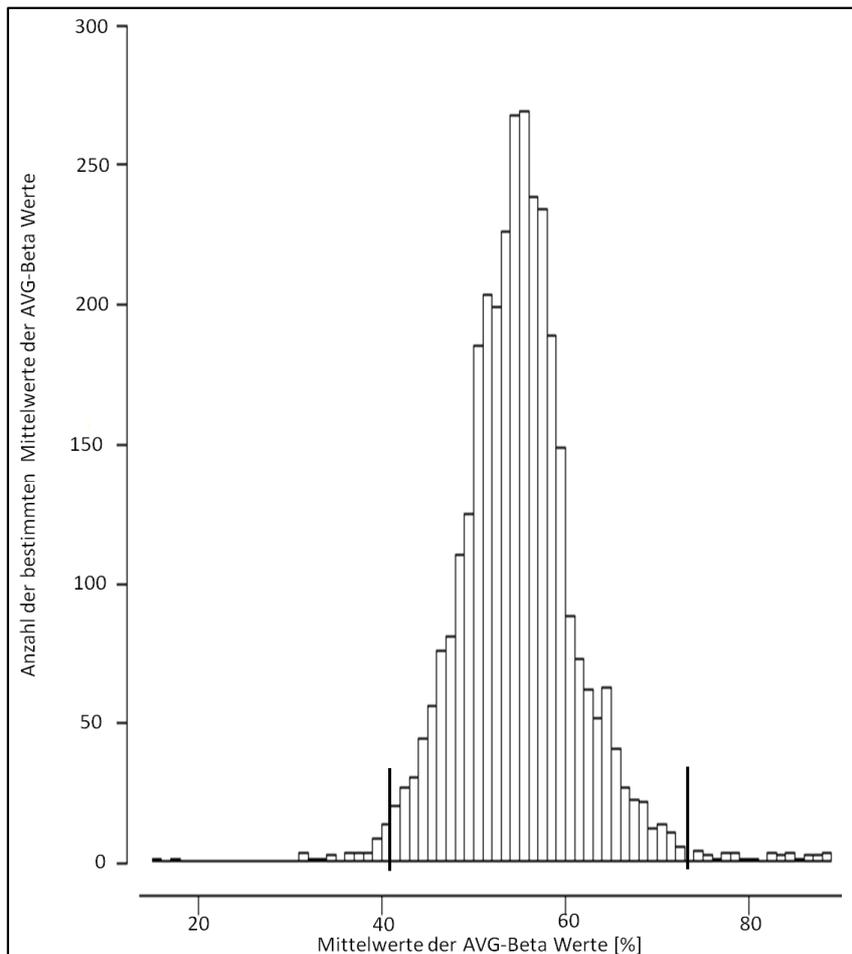
Für die hier durchgeführte DNA-Methylierungsanalyse wurden periphere Blutproben von 97 zu klein und/oder zu leicht für ihr Geburtsalter und Geschlecht geborene Kinder und Proben von sechs Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen (TNDM, BWS, SRS, TS, AS und PWS) analysiert (vergl. Kapitel 2.1.1.5). Insgesamt wurden 114 DNA-Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert, davon sieben als Duplikate und zwei als Triplikate. Nach Qualitätskontrollen wurden die AVG-Beta Werte von 482.612 Loci von 114 Hybridisierungen aus der GenomeStudio Software exportiert. Die SNP-Korrelationsanalyse mit den AVG-Beta Werten der rs Loci ergab, dass die mehrfach hybridisierten DNA-Proben korrekt annotiert waren (siehe Anhang Abbildung A6). Die Gesamtkorrelationsanalyse mit den AVG-Beta Werten der ch und cg Loci führte aufgrund eines Medianwertes aller Korrelationskoeffizienten von  $<0,98$  zum Ausschluss zweier Hybridisierung, so dass die Analyse letztendlich 112 DNA-Proben einschloss (siehe Anhang Abbildung A6).

Nach Filterung der geprägten CpG Loci wurden die AVG-Beta Werte dieser 112 DNA-Proben und 889 geprägter CpG Loci exportiert (siehe Anhang Tabelle A8) und die AVG-Beta Werte der mehrfach hybridisierten DNA-Proben gemittelt. Letztendlich wurden insgesamt 112 Hybridisierungen, 96 DNA-

Proben SGA-geborener Kinder und sechs DNA-Proben von Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom (plus Mehrfachhybridisierungen), ausgewertet.

Es wurden die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für jeden geprägten Genort pro Patient (sowohl der SGA-geborenen Kinder als auch der Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen) gebildet.

Für die Analyse der somatisch geprägten Genorte erfolgte zunächst die Bestimmung des normalen DNA-Methylierungsbereichs (NMB) der somatisch geprägten Genorte. Dafür wurde als erstes ein Histogramm über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte aller 34 somatisch geprägten Genorte für alle SGA-geborenen Kinder (n=96) angefertigt (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Histogramm der Mittelwerte der AVG-Beta Werte der DMRs der somatisch geprägten Genorte für die 96 SGA-geborenen Kinder. Zunächst wurde für jeden der 34 somatisch geprägten Genorte der Mittelwert der AVG-Beta Werte für jedes der 96 SGA-geborenen Kinder gebildet. Dann wurden diese Werte der Größe nach geordnet und ihre Häufigkeit in Form des Histogramms dargestellt. Die Grenzen des gewählten normalen DNA-Methylierungsbereichs (siehe Text) liegen zwischen 41 % und 73 % (mit senkrechtem Strich dargestellt). (bins=100)

Diese Darstellung ergab, dass der übergeordnete Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte der somatisch geprägten Genorte entgegen der Erwartung von 50 % leicht nach rechts verschoben bei 55 % lag. Die Grenzen des NMB wurden mithilfe der Kontrollen für die klassischen Imprintingsyndrome, die hier als Positivkontrollen herangezogen wurden, festgelegt. Sie können an dieser Stelle als Positivkontrollen verwendet werden, weil die Syndrom-spezifisch aberrante DNA-Methylierung durch Voranalysen mit unabhängigen Techniken bestätigt wurde. Die Kriterien für die

Grenzen des NMB wurden so gesetzt, dass die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der Syndrom-spezifisch aberrant methylierten Genorte der Positivkontrollen außerhalb des NMB liegen müssen. Gleichzeitig sollte die Anzahl aberrant methylierter Genorte außerhalb der durch die klassischen Imprintingsyndrome definierten Regionen bei den Positivkontrollen möglichst gering sein. Klassischerweise wird der NMB als Mittelwert plus/minus der zwei- oder dreifachen Standardabweichung definiert. Diese Grenzen führten in den Positivkontrollen zu falsch-negativen bzw. zu vielen positiven Resultaten außerhalb der Syndrom-spezifischen Regionen. Deshalb wurden die äußeren Seiten der Verteilung, d.h. 1 % der Randwerte der AVG-Beta Werte der somatisch geprägten Genorte im Kollektiv SGA-geborener Kinder, als aberrant definiert. Damit liegen 1 % der größten und 1 % der kleinsten Mittelwerte der AVG-Beta Werte dieser somatisch geprägten Genorte außerhalb des NMB. Auf diese Weise wurde ein NMB bestimmt der zwischen dem Mittelwert der AVG-Beta Werte der somatisch geprägten Genorte, bestimmt im Kollektiv SGA-geborener Kinder, von 41 % bis 73 % lag (Details vergl. 2.2.11.3). Per Definition der Grenzen des NMB liegen damit alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte der Syndrom-spezifisch aberrant methylierten Genorte der Positivkontrollen außerhalb des NMB. In Tabelle 24 sind die Mittelwerte für diese aberrant methylierten Genorte angegeben.

**Tabelle 24:** Mittelwerte der AVG-Beta Werte von Patienten, die als Positivkontrollen für DNA-Methylierungsveränderungen an den mit den klassischen Imprintingsyndromen assoziierten Genorten dienen.

Patient mit klassischem Imprintingsyndrom	Genort (Region)	Mittelwert der AVG-Beta Werte [%]
Transienter Neonataler Diabetes Mellitus	<i>PLAGL1</i> (6q24)	11
Silver-Russell Syndrom	ICR1 (11p15)	39
Beckwith-Wiedemann Syndrom	KvDMR (11p15)	23
Temple Syndrom	<i>MEG3</i> (14q32)	19
	<i>MEG8</i> (14q32)	85
Angelman Syndrom	Chr. 15 imp. Region (15q11)	29
Prader-Willi Syndrom		75

Neben diesen Veränderungen die mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind, zeigten vier der sechs Positivkontrollen auch weitere Genorte, bei denen die Mittelwerte der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB lagen (siehe Tabelle 25). Dabei waren insgesamt sechs der insgesamt 34 somatisch geprägten Genorte betroffen. Der Genort *PPIEL* war in einem Patienten hypermethyliert (1 % oberhalb des NMB), die restlichen betroffenen Genorte (*KvDMR*, *ZNF331*, *MCTS2/HM13*, *WRB* und *NHP2L1*) waren hypomethyliert (1 % bis 12 % unter dem NMB). Bis auf einen dieser zusätzlich aberrant methylierten Genorte (*KvDMR*) sind die des Weiteren aberrant methylierten Genorte in den Positivkontrollen nicht mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert.

**Tabelle 25:** Außerhalb des NMB lokalisierte Mittelwerte der AVG-Beta Werte von Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen, die nicht für den Phänotyp des Syndroms ausschlaggebend sind.

Patient mit klassischem Imprintingsyndrom	Genort	Mittelwert der AVG-Beta Werte [%]
Silver-Russell Syndrom	<i>ZNF331</i>	38
	<i>MCTS2/HM13</i>	40
	<i>NHP2L1</i>	39
Beckwith-Wiedemann Syndrom	<i>PPIEL</i>	74
Temple Syndrom	KvDMR	29
	<i>ZNF331</i>	40
	<i>WRB</i>	34
	<i>NHP2L1</i>	40
Prader-Willi Syndrom	<i>ZNF331</i>	40

Als nächstes wurde überprüft, welche Mittelwerte der AVG-Beta Werte je Genort in den 96 SGA-geborenen Kindern außerhalb des NMB liegen (siehe Tabelle A9). Insgesamt zeigten 44/96 (46 %) SGA-geborene Kinder Auffälligkeiten an mindestens einem analysierten somatisch geprägten Genort. Per Definition zeigten 33 der aberrant methylierten Genorte eine Hypomethylierung im Vergleich zum NMB und 33 Genorte waren aberrant hypermethyliert. Nach den gewählten Kriterien zeigten 29/44 SGA-geborene Kinder nur einen Genort aberrant methyliert (66 %), zwei aberrant methylierte Genorte zeigten neun der 44 (20 %) SGA-geborenen Kinder, drei Genorte waren bei fünf der 44 (11 %) SGA-geborenen Kinder aberrant methyliert und ein SGA-geborenes Kind zeigte vier aberrant methylierte Genorte (3 %) (siehe Abbildung 41).

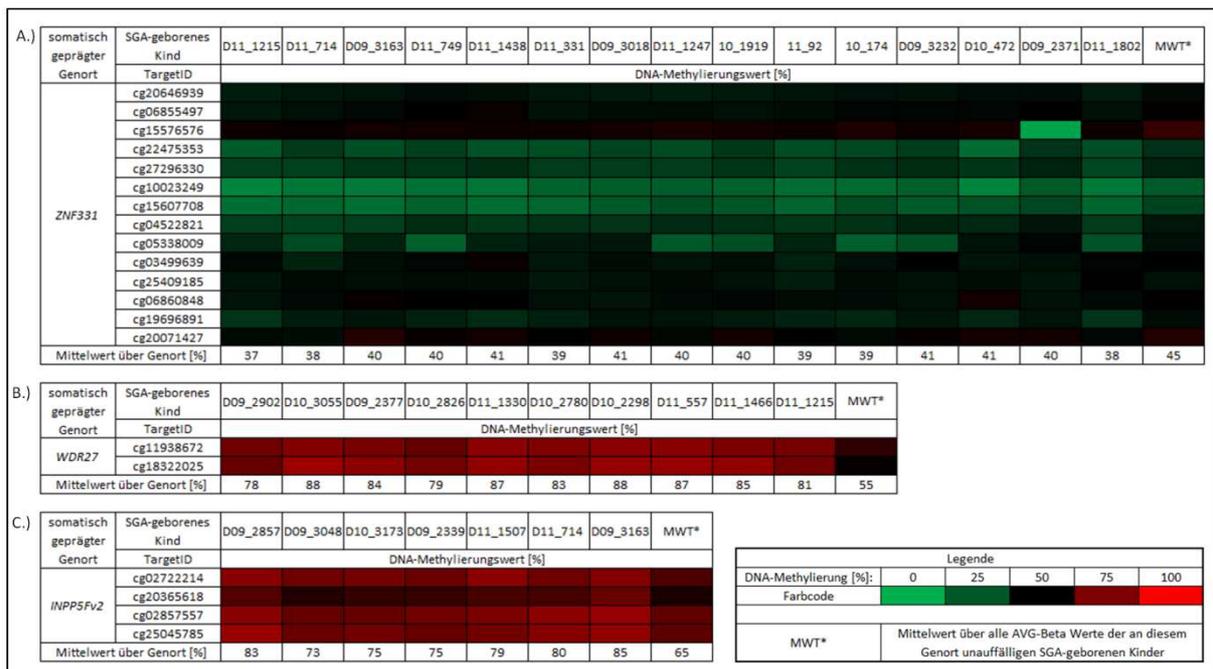
Nur zwei der Genorte, die mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind, waren bei einem SGA-geborenen Kind aberrant methyliert. Das besagte Kind zeigte für den Genort *MEG3* einen Mittelwert der AVG-Beta Werte von 18 % und für den Genort *MEG8* einen Mittelwert der AVG-Beta Werte von 87 %. Die für das Temple Syndrom hybridisierte Positivkontrolle zeigte an diesen Genorten einen Mittelwert der AVG-Beta Werte von 19 % (*MEG3*) bzw. 85 % (*MEG8*). In einer vorhergehenden Bisulfit-Pyrosequenzierung des Kollektivs SGA-geborener Kinder, wurde die Hypomethylierung der *MEG3* DMR für dieses SGA-geborene Kind bereits gezeigt [169]. In weiterführenden Analysen, zur Aufklärung der Ursache dieser Hypomethylierung, konnten Bens et al. mittels methylierungsspezifischer PCR die Hypomethylierung verifizieren und des Weiteren zeigen, dass die IG-DMR dieses SGA-geborenen Kindes auch hypomethyliert vorlag [169]. Außerdem wurden mittels Mikrosatelliten- und SNP-Array Analyse die biparentale Herkunft der chromosomalen Region 14q32 gezeigt sowie chromosomale Imbalancen innerhalb dieser Region ausgeschlossen [169]. Aufgrund dieser an anderer Stelle durchgeführten und bereits publizierten Ergebnisse wurde bei diesem SGA-geborenen Kind ein Temple Syndrom, bedingt durch eine Epimutation, diagnostiziert [169].

## Ergebnisse



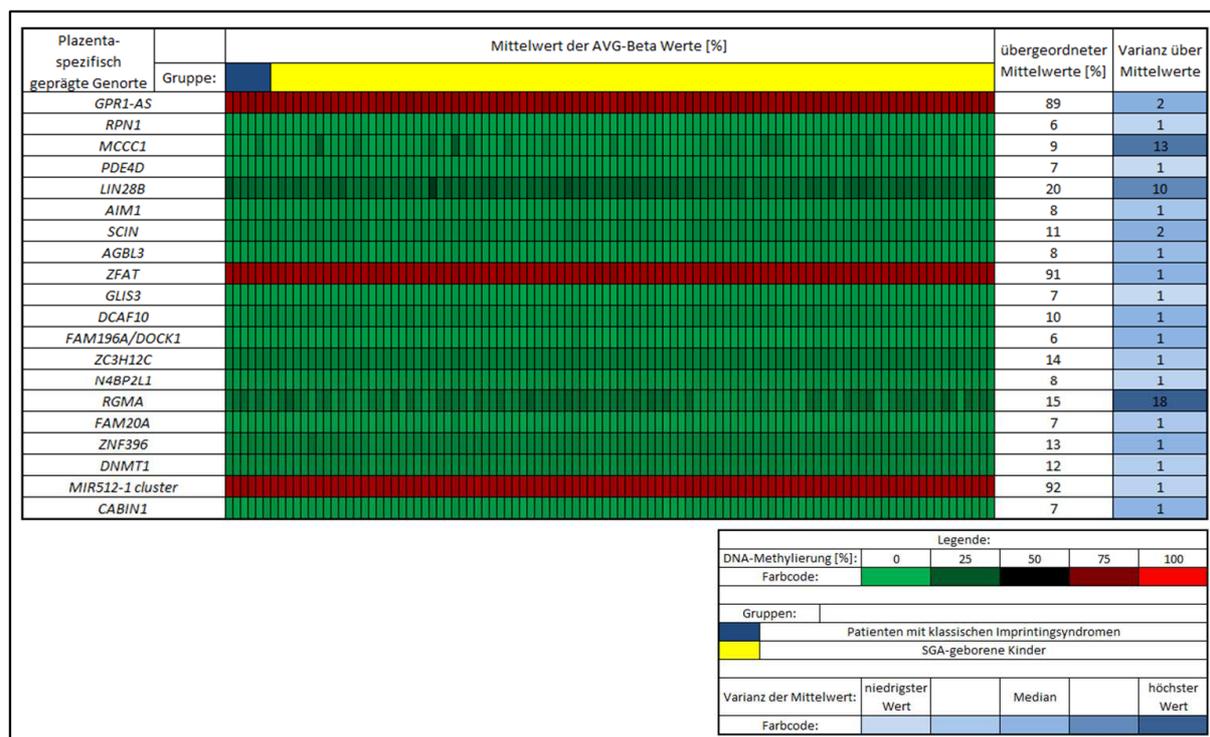
**Abbildung 41:** Darstellung der DNA-Methylierungsergebnisse der von einer aberranten DNA-Methylierung somatisch geprägter Genorte betroffenen SGA-geborenen Kinder. Gezeigt sind 16 Genorte (Spalten mit Farbcode zeigen Mittelwerte der AVG-Beta Werte: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot.) die im Kollektiv SGA-geborener Kinder eine aberrante DNA-Methylierung entsprechend der gesetzten Grenzen (Auswertung siehe Spalte "Mittelwert der AVG-Beta Werte ist:") zeigten. Jede Zeile stellt die Analyse eines SGA-geborenen Kindes dar. Ein SGA-geborenes Kind (mit \* markiert) zeigt ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster (Hypomethylierung in MEG3 und Hyper-methylierung in MEG8), welches für das Temple Syndrom typisch ist.

Der am häufigsten von einer aberranten DNA-Methylierung betroffene Genort, *ZNF331*, war bei 15 SGA-geborenen Kindern hypomethyliert. Dieser Genort erschien auch schon bei drei der sechs Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom betroffen. Am zweit- und dritthäufigsten aberrant methyliert im Kollektiv SGA-geborener Kinder waren die Genorte *WDR27* und *INPP5Fv2*. An diesen Genorten zeigten je 10 bzw. sieben SGA-geborene Kinder aberrante DNA-Methylierungsmuster. Alle von der aberranten DNA-Methylierung betroffenen Kinder zeigten in beiden Genorten eine Hypermethylierung. Die AVG-Beta Werte der SGA-geborenen Kinder mit einer aberranten DNA-Methylierung an *ZNF331*, *WDR27* und *INPP5Fv2* sind in Abbildung 42 gezeigt.



**Abbildung 42:** AVG-Beta Werte für die SGA-geborenen Kinder die an den somatisch geprägten Genorten *ZNF331* (A.), *WDR27* (B) und *INPP5Fv2* (C) eine aberrante DNA-Methylierung zeigen. Die AVG-Beta Werte, bestimmt mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChips, sind für diese drei Genorte, für jedes analysierte CpG je Genort angegeben. Neben den DNA-Methylierungswerten der SGA-geborenen Kinder, die an diesen Genorten eine aberrante DNA-Methylierung aufweisen, ist der Mittelwerte über alle AVG-Beta Werte je CpG und über den gesamten Genort für die an diesem Genort unauffälligen SGA-geborenen Kinder (MWT\*) angegeben. Die AVG-Beta Werte sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Es ist zu erkennen, dass alle CpGs der Genorte *WDR27* (B) und *INPP5Fv2* (C) aberrant methyliert vorliegen. Beim Genort *ZNF331* (A) zeigen dagegen nicht alle CpGs niedrige AVG-Beta Werte.

Die Auswertung der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte erfolgte über den Vergleich aller Mittelwerte der AVG-Beta Werte je Genort im gesamten Kollektiv und zeigte ein homogenes Muster der Mittelwerte in den analysierten Genorten (siehe Abbildung 43).



**Abbildung 43:** DNA-Methylierungsanalyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte bei 96 SGA-geborenen Kindern und der sechs Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom. Dargestellt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die Plazenta-spezifische geprägten Genorte von insgesamt 112 DNA-Proben (inklusive mehrfach hybridisierter DNA-Proben). Außerdem ist der übergeordnete Mittelwert (Mittelwert über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte) sowie die Varianz über alle Mittelwerte der AVG-Beta Werte angegeben. Die Hybridisierung der DNA-Proben 96 SGA-geborener Kinder (gelb markiert) und sechs Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen (blau markiert) erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für jeden Genort sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau gezeigt, je größer die Werte, umso dunkler die Blaufärbung. Das DNA-Methylierungsmuster ist bei den SGA-geborenen Kindern und den Patienten mit klassischen Imprintingstörungen weitestgehend homogen.

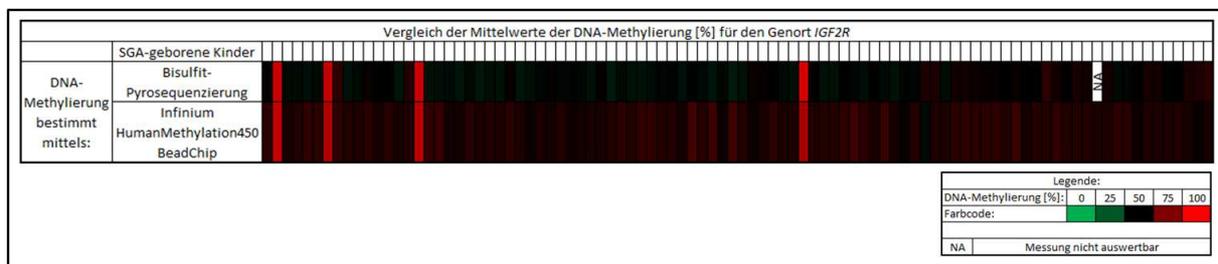
Die Analyse der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte in dem Datensatz SGA-geborener Kinder und Positivkontrollen ergab, wie schon in den zuvor gezeigten Analysen anderer Gewebe, für die Genorte *GPR1AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* vergleichsweise hohe übergeordnete Mittelwerte von 89 %, 91 % und 92 %, mit sehr geringen Varianzen (2, 1 und 1). Mit Ausnahme des Genorts *LIN28B* wiesen die anderen Plazenta-spezifisch geprägten Genorte niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte auf (übergeordneter Mittelwert 6 % bis 15 %). Insbesondere in den Genorten *MCCC1* und *RGMA* waren leichte Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte zwischen allen Patienten erkennbar. Die übergeordneten Mittelwerte für diese beiden Genorte lag bei 9 % für *MCCC1* (Varianz: 13) und 15 % für *RGMA* (Varianz: 18). Der übergeordnete Mittelwert für den Genort *LIN28B* zeigte erneut eine intermediäre DNA-Methylierung (20 %).

### 3.5.1.1 Verifizierung einzelner DNA-Methylierungsergebnisse SGA-geborener Kinder

Bei 94 SGA-geborenen Kindern, deren DNA-Methylierung geprägter Gene mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip analysiert wurden, wurde zuvor die DNA-Methylierung an 10

geprägten Genorten mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert. Bei den analysierten Genorten handelt es sich um folgende geprägte Gene: *PLAGL1*, *IGF2R*, *GRB10*, *H19*, *IGF2*, *MEG3*, *NDN*, *SNRPN*, *NESP* und *NESPAS*. Die Ergebnisse dieser Bisulfit-Pyrosequenzieranalysen wurden publiziert, wobei das Mitwirken an diesen Analysen zur Co-Autorenschaft der Verfasserin der vorliegenden Arbeit in der erwähnten Veröffentlichung führte [169]. Auf Details der veröffentlichten Analysen soll hier nicht weiter eingegangen werden. Der Leser sei auf die Originalpublikation verwiesen.

Zum Vergleich beider Technologien wurde der Mittelwert der DNA-Methylierung aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung je Genort und Patient gebildet und mit dem Mittelwert der AVG-Beta Werte des entsprechenden Genorts der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Auswertung verglichen. Abbildung 44 zeigt einen Ausschnitt aus dem durchgeführten Vergleich für die *IGF2R* Analyse.



**Abbildung 44:** Verifizierung der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Ergebnisse für den Genort *IGF2R* in dem Kollektiv SGA-geborener Kinder. Dargestellt sind die Mittelwerte der DNA-Methylierung von 94 SGA-geborenen Kindern. Die Rohwerte der DNA-Methylierungsanalyse wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung und Infinium HumanMethylation450 BeadChips bestimmt. Der Mittelwert der DNA-Methylierungswerte wurde über alle analysierten CpG Loci des Genorts *IGF2R* gebildet und ist hier farbcodiert angegeben: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Für ein SGA-geborenes Kind war die DNA-Methylierungsbestimmung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung nicht auswertbar. Dies ist durch das weiße Feld mit der Abkürzung “NA” dargestellt. Für 93 SGA-geborene Kinder wurde die DNA-Methylierung des Genorts mithilfe beider Techniken analysiert. Die bestimmten Mittelwerte der DNA-Methylierung zeigen konkordante Ergebnisse für beide Techniken.

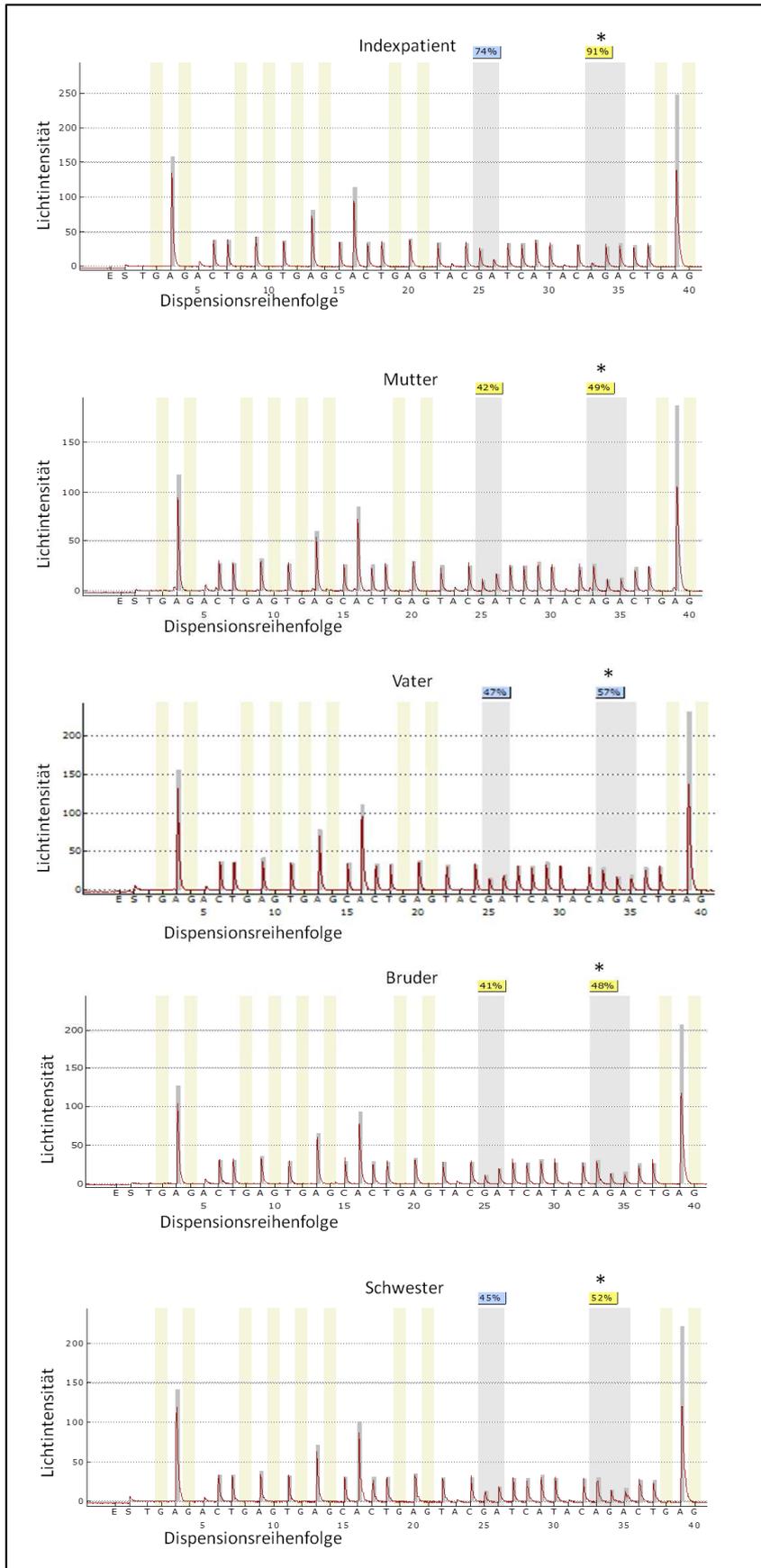
Obwohl die durchgeführten Bisulfit-Pyrosequenzierassays nicht dieselben CpG Loci abdeckten wie die Analyse der Infinium HumanMethylation450 BeadChips, konnten die hohen Mittelwerte der DNA-Methylierung im Genort *IGF2R* für vier SGA-geborene Kinder sowohl mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse als auch mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung detektiert werden. Damit konnte eine gute Korrelation der DNA-Methylierungswerte von Infinium HumanMethylation450 BeadChips und Bisulfit-Pyrosequenzierung nahegelegt werden.

### 3.5.1.2 ZDBF2: Analyse eines SGA-geborenen Kindes und seiner Familie

In dem zuvor beschriebenen Kollektiv SGA-geborener Kinder fiel u.a. der Genort *ZDBF2* auf, der bei einem SGA-geborenen Kind einen deutlich höheren Mittelwert der AVG-Beta Werte aufwies (84 %) als der bestimmte normale DNA-Methylierungsbereich (41 % - 73 %) für die somatisch geprägten Genorte. Diesem Befund wurde, wie im Folgenden dargestellt, weiter nachgegangen.

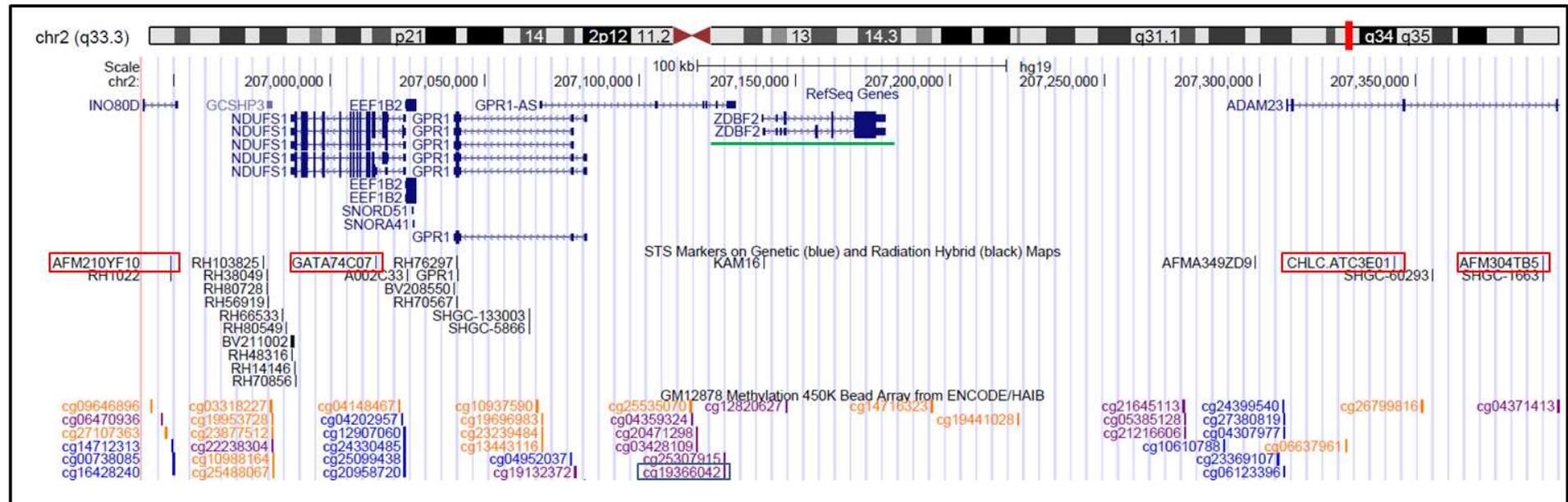
Zunächst erfolgte eine Verifizierung des Infinium HumanMethylation450 BeadChip basierten DNA-Methylierungswerts mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung. Dazu wurde ein Bisulfit-Pyrosequenzierassay erstellt, der den CpG Locus cg19366042 abdeckte, der auch mittels HumanMethylation450 BeadChip analysiert wurde. Der DNA-Methylierungsstatus des SGA-geborenen Kindes (im Folgenden als Indexpatient bezeichnet) sowie seiner Eltern und Geschwister wurde mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung für das CpG cg19366042 analysiert. Nur der Indexpatient zeigte an dem untersuchten CpG hohe DNA-Methylierungswerte (91 % bestimmt mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung, 87 % bei der Messung mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip). Sowohl die Eltern, als auch die Geschwister zeigten DNA-Methylierungswerte im mittleren DNA-Methylierungsbereich (Spanne: 48 % bis 57 %) (siehe Abbildung 45). Somit konnte die aberrante DNA-Methylierung am *ZDBF2* Genort für den Indexpatienten verifiziert werden.

Das *ZDBF2* Gen liegt auf Chromosom 2 in der chromosomalen Region 2q33.3. Differenzialdiagnostisch könnte die aberrante DNA-Methylierung in der geprägten DMR des *ZDBF2* Gens bei dem Indexpatienten durch einen DNA-Methylierungsdefekt, eine chromosomale Imbalance oder eine (partielle) uniparentale Disomie des Chromosoms 2 bedingt sein. Daher wurde des Weiteren eine Mikrosatellitenanalyse für vier Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 2 in der Nähe des *ZDBF2* Gens durchgeführt (Lage der Mikrosatelliten siehe Abbildung 46).



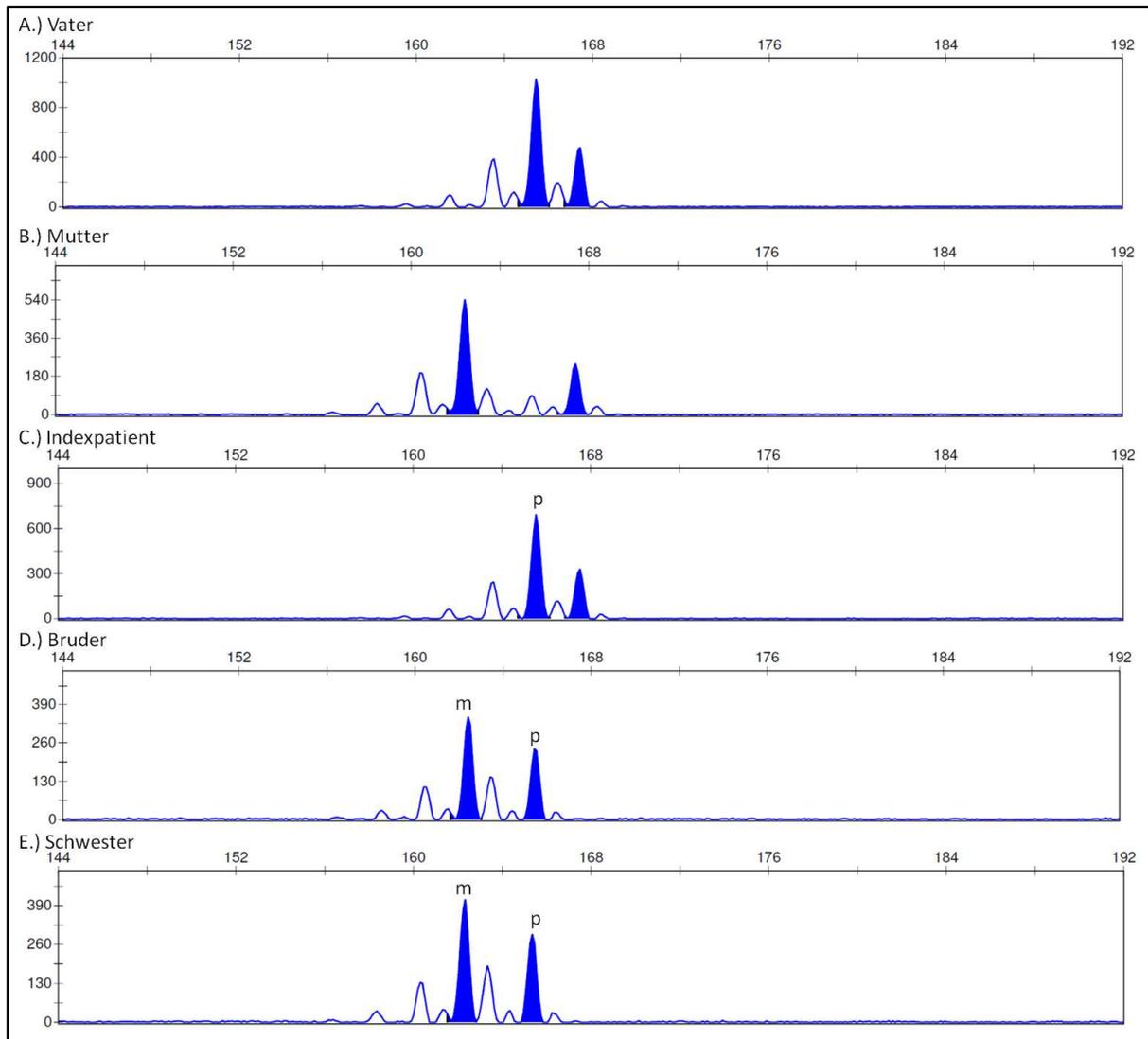
**Abbildung 45: Pyrogramme der Bisulfit-Pyrosequenzierung des CpG cg19366042 im ZDF2 Gen.** Gezeigt sind die Pyrogramme für die DNA-Methylierungsanalyse des cg19366042 (mit \* markiert) für den Indexpatienten aus dem Kollektiv SGA-geborener Kinder und seine Familienangehörigen. Auf der Y-Achse ist jeweils die Lichtintensität aufgetragen (unterschiedliche Skalierung), auf der X-Achse ist die Dispensionsreihenfolge gezeigt. Grau unterlegte Bereiche mit darüber angegebenen Methylierungswerten zeigen die zu untersuchende CpG Position an. In gelb sind Positionen gezeigt, an denen die Natriumbisulfit-Konversionseffizienz kontrolliert wurde. Diese Positionen dürfen keine Peaks aufweisen (Details vergl. Kapitel 2.2.9.3). Nur der Indexpatient zeigt einen DNA-Methylierungswert von 91 % am fraglichen CpG (\*). Seine Familienangehörigen zeigen DNA-Methylierungswerte zwischen 48 % und 57 %. Auch der benachbarte CpG Locus zeigt in dem Indexpatienten deutlich höhere DNA-Methylierungswerte (74 %) als in den anderen Familienangehörigen (Spanne: 41 % bis 47 %).

## Ergebnisse



**Abbildung 46:** Chromosomale Lage der analysierten vier Mikrosatellitenmarker und des analysierten CpGs. Zwei der Marker (AFM210YF10 entspricht D2S155, GATA74C07 entspricht D2S1782) liegen in Richtung des Zentromers die anderen zwei (AFM304TB5 entspricht D2S369, CHLC.ATC3E01 entspricht D2S422) in Richtung des Telomers ausgehend vom *ZDBF2* Gen (grün unterstrichen). Die entsprechenden Marker sind mit einem roten Kasten markiert. Das mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip und Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierte CpG ist durch einen blauen Kasten gekennzeichnet. (Abbildung modifiziert aus dem UCSC Genome Browser, Stand 10.04.2015, hg19)

In der Abbildung 47 ist die Auswertung des Mikrosatellitenmarkers D2S155 für die untersuchten Familienmitglieder exemplarisch gezeigt.



**Abbildung 47:** Auswertung des Mikrosatellitenmarkers D2S155. Dargestellt sind die zwei Allele (blau ausgefüllte Peaks) je Individuum für den untersuchten Mikrosatellitenmarker. Je weiter rechts der Peak ist, umso größer ist das untersuchte spezifische PCR-Amplifikat und damit der Mikrosatellitenmarker. Zu erkennen ist, dass die Eltern ein identisches Allel (je rechter Peak) tragen. Dieses Allel findet sich bei den Kindern nur in dem Indexpatienten wieder. Die Geschwister zeigen je einen Peak identisch mit dem Vater (gekennzeichnet mit p) und einen Peak identisch mit der Mutter (gekennzeichnet mit m). Sie haben somit je ein Allel von Mutter und eines vom Vater geerbt. Für den Indexpatienten kann nur ein Allel sicher dem Vater zugeordnet werden (gekennzeichnet mit p). Da das zweite Allel bei den Eltern identisch ist, kann nicht endgültig geklärt werden, ob es von der Mutter oder dem Vater stammt. Weiße Peaks sind Stotterbanden, die X-Achse stellt die Allelgröße in Basenpaaren dar, die Y-Achse gibt die Signalintensität wider.

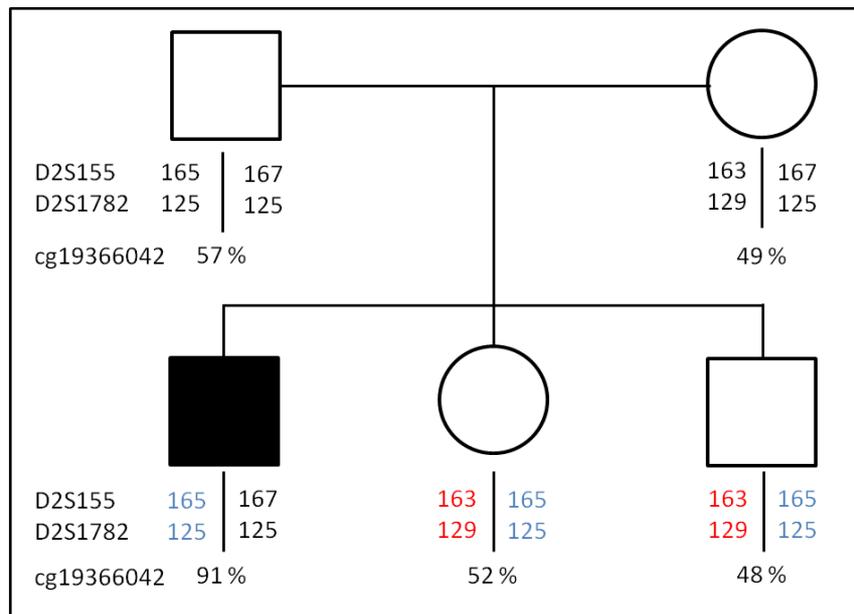
In Tabelle 26 sind die aus der Mikrosatellitenanalyse abgeleiteten Allele der untersuchten Marker für alle Familienmitglieder angegeben.

**Tabelle 26:** Angegeben sind die abgeleiteten Allele für die analysierten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 2 bei Indexpatient, seinen Eltern und Geschwistern.

Individuum Marker	Vater	Mutter	Indexpatient	Bruder	Schwester
D2S155 (2q33.3)	165	163	165	163	163
	167	167	167	165	165
D2S1782 (2q33.3)	125	125	125	125	125
	125	129	125	129	129
D2S369 (2q33.3)	159	159	159	159	159
	163	163	163	163	163
D2S422 (2q33.3)	147	147	147	147	147

Allelbezeichnung entspricht nur näherungsweise der physikalischen Größe in Basenpaaren.

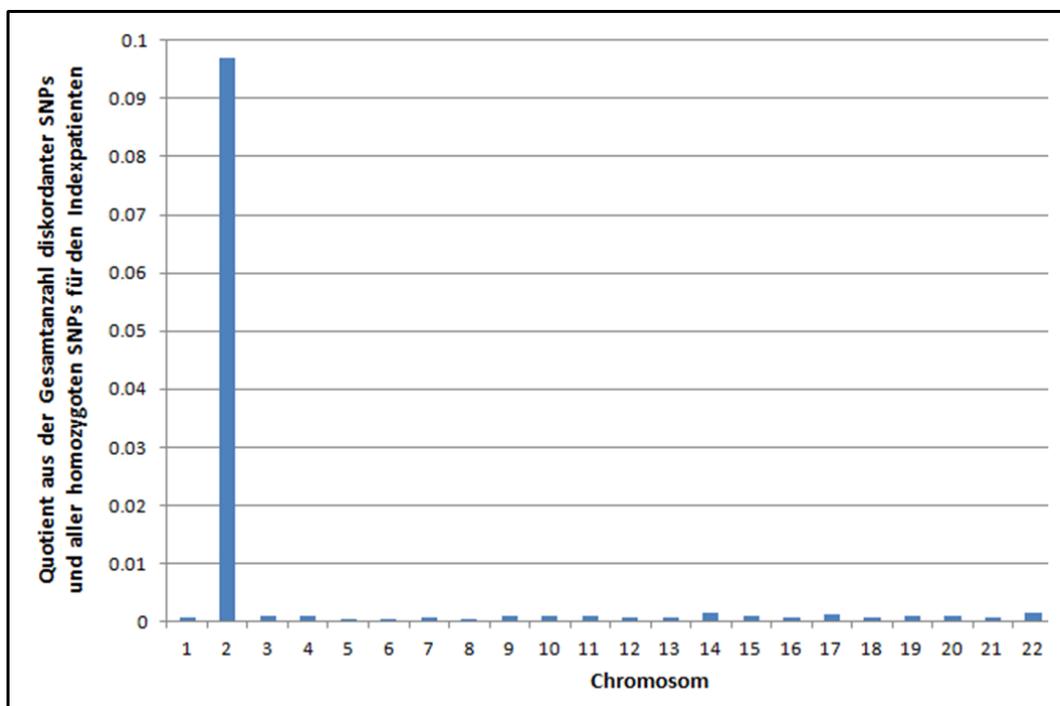
Nur zwei der Marker waren hinsichtlich der Frage einer uniparentalen Disomie informativ, nämlich D2S155 und D2S1782. Mit diesen konnte eine (partielle) Isodisomie 2 bei dem Indexpatienten ausgeschlossen werden, da dieser zwei unterschiedliche Allele trägt. Ebenfalls konnte eine maternale Isodisomie ausgeschlossen werden, nicht aber eine paternale Heterodisomie. In Abbildung 48 sind die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung und der zwei informativen Marker aus der Mikrosatellitenanalyse zusammengefasst.



**Abbildung 48:** Stammbaum der Familie mit den informativen Mikrosatelliten und dem Ergebnis der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Gezeigt sind die DNA-Methylierungswerte für das analysierte CpG cg19366042. Außerdem sind die ermittelten Allele für die zwei informativen Marker (D2S155 und D2S1782) gezeigt. In rot sind die Allele, welche die Kinder von der Mutter geerbt haben (Kreis, oben) und in blau diejenigen welche sie vom Vater (Quadrat, oben) geerbt haben gezeigt. Wenn die Zuordnung nicht möglich war, sind die Allele in schwarz gekennzeichnet. Die Mikrosatellitenanalyse zeigt, dass ein Allel des Indexpatienten (ausgefülltes schwarzes Quadrat, unten) nicht sicher zugeordnet werden kann hinsichtlich der elterlichen Herkunft. Eine Isodisomie kann ausgeschlossen werden, da zwei unterschiedliche Allele detektierbar sind.

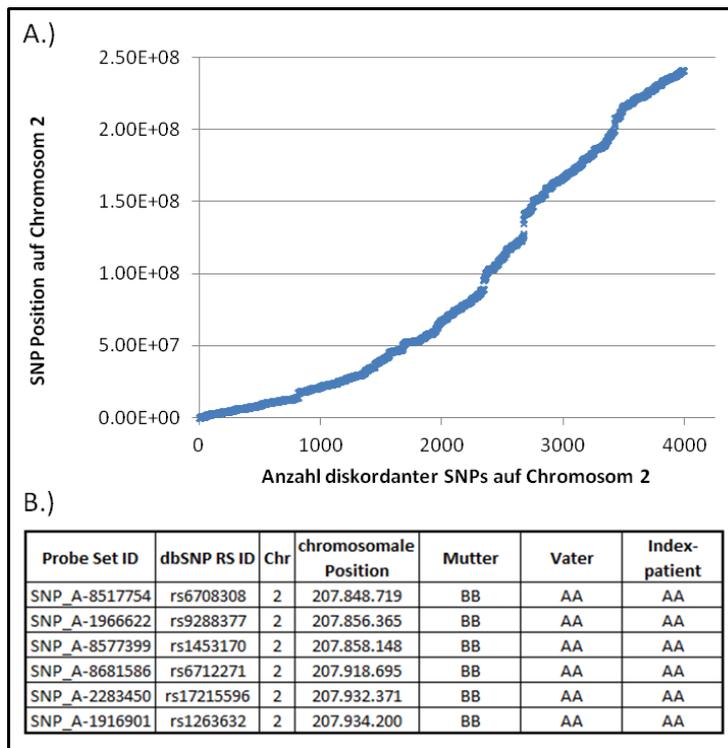
Da die Mikrosatellitenanalyse letztendlich keine eindeutige Interpretation zuließ, wurde zur weiteren Abklärung eine Array-basierte SNP-Analyse durchgeführt. Diese Analyse ermöglicht die parallele Untersuchung von mehr als 900.000 SNPs. Außerdem kann auch eine Aussage zu möglichen genomischen Verlusten oder Zugewinnen der chromosomalen Region, die das *ZDBF2* Gen enthält, getroffen werden.

Zunächst wurde die Verteilung der homozygoten SNPs bei Mutter und Kind für alle Chromosomen analysiert. Wenn die Mutter von einem beliebigen SNP ein homozygoten Allel trägt (z.B. homozygot ist für das A Allel, d.h. AA) muss, wenn der SNP nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wurde, das Kind mindestens einmal dasselbe Allel (z.B. AA oder AB) tragen. Ist die Mutter homozygote AA Trägerin und zeigt das Kind zwei B Allele (homozygot BB), widerspricht das dem Mendelschen Vererbungsprinzip. Mutter und Kind sind dann diskordant für diesen SNP (im Folgenden als "diskordante SNPs" bezeichnet). Die Analyse der homozygoten SNPs bei Mutter und Kinder für Chromosom 2 ergab, dass insgesamt 4.027 SNPs bei Mutter und Kind nicht mit einer Vererbung nach den Mendelschen Gesetzen im Einklang stehen. In Abbildung 49 sind diese diskordanten SNPs des Indexpatienten gegen die Anzahl aller homozygoten SNPs aufgetragen. Zum Vergleich wurde die Analyse auch für die anderen Autosomen durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass auf Chromosom 2 deutlich mehr diskordante SNPs lokalisiert sind als auf den anderen Chromosomen.



**Abbildung 49:** Verhältnis diskordanter zu homozygoter SNPs im Indexpatienten. Mittels SNP-Array 6.0 Analyse wurden die homozygoten SNPs des Indexpatienten bestimmt. Anschließend wurde ermittelt welche der homozygoten SNPs nicht nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wurden (diskordante SNPs). Die Anzahl diskordanter SNPs ist gegen die Anzahl aller homozygoten SNPs des Indexpatienten bestimmt und auf der Y-Achse aufgetragen. Auf der X-Achse sind die einzelnen analysierten Chromosomen dargestellt. Die meisten diskordanten SNPs befinden sich auf dem Chromosom 2.

Anschließend erfolgte die SNP-Analyse für Indexpatient, Mutter und Vater. Die Analyse ergab, dass 3.995 SNPs des Indexpatienten von insgesamt 72.619 auswertbaren SNPs auf dem Chromosom 2 nicht mit einer Vererbung nach den Mendelschen Gesetzen übereinstimmend vererbt wurden. Für diese 3.995 SNPs zeigte der Indexpatient mindestens ein Allel, das zwar beim Vater nicht aber bei der Mutter nachzuweisen war. Diese diskordanten SNPs verteilen sich dabei gleichmäßig über das gesamte Chromosom 2 (siehe Abbildung 50 A). Die restlichen 32 diskordanten SNPs, entsprechen dem technischen Fehler, wie er auch für die anderen Chromosomen (siehe Abbildung 49) beobachtet wurde.



**Abbildung 50:** Auswertung der SNP-Array 6.0 Analyse. A.) Dargestellt ist die Verteilung aller SNPs auf dem Chromosom 2 des Indexpatienten, dessen Allelverteilung nicht anhand der SNP-Sequenz der Eltern zu erwarten gewesen wäre (diskordante SNPs). Diese diskordanten SNPs zeigen eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Chromosom 2. B.) Für sechs in der Nähe zum *ZDBF2* Gen gelegene diskordante SNPs ist der Genotyp des Indexpatienten und seiner Eltern aufgeführt. In allen gezeigten SNPs zeigt der Indexpatient kein Allel, das auch die Mutter trägt. Die SNP-Array Analyse ergab somit für den Indexpatienten eine paternale uniparentale Disomie als Ursache der DNA-Methylierungsstörung im *ZDBF2* Genort.

Diese Befunde zeigten zusammengenommen, dass bei dem Indexpatienten eine paternale uniparentale Disomie des gesamten Chromosoms 2 im Sinne einer Heterodisomie vorliegt. Sie ist wahrscheinlich die Ursache für die beobachtete Hypermethylierung des *ZDBF2* Genorts. Darüberhinaus konnten chromosomale Imbalancen ausgeschlossen werden.

### 3.5.2 DNA-Methylierung geprägter Gene bei Patienten mit Blasenekstrophie

Das zweite zu analysierende Kollektiv mit einer Entwicklungsstörung bestand aus Patienten, die verschiedene Ausprägungsstadien aus dem Blasenekstrophie-Eispadie-Komplex aufwiesen.

Es wurde das DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene bei 23 Patienten analysiert (vergl. Kapitel 2.1.1.6). Das Kontrollkollektiv bildeten 10 alters- und geschlechtsgematchte SGA-geborene Kinder

ohne Bauchwanddefekte. Außerdem wiesen diese SGA-geborenen Kinder in einer zuvor durchgeführten Bisulfit-Pyrosequenzierung für die geprägten Gene *PLAGL1*, *IGF2R*, *GRB10*, *H19*, *IGF2*, *NDN*, *SNRPN*, *NESP* und *NESPAS* keine Auffälligkeiten der DNA-Methylierung dieser Genorte auf, erhielten keine Wachstumshormontherapie und zeigten keine Dysmorphiezeichen. Diese hier als Kontrollkollektiv analysierten SGA-geborenen Kinder sind ein Teil des im Kapitel 3.5.1 beschriebenen Kollektivs SGA-geborener Kinder. Wie bereits im Kapitel 3.5.1 erwähnt, wurden DNA-Methylierungsdaten dieses Kollektiv betreffend bereits publiziert ([169], [181]).

In diesem hier vorgestellten Teilprojekt wurden Kontrollkollektiv (n=10) und Patientenkollektiv (n=23) zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Die für den gesamten Datensatz ermittelte LDR lag bei allen Hybridisierungen oberhalb 98 %. Insgesamt wurden die DNA-Methylierungsdaten von 483.405 qualitätskontrollierten Loci aus der GenomeStudio Software exportiert. Sowohl die SNP- als auch die Gesamtkorrelationsanalyse durchgeführt mit den entsprechenden AVG-Beta Werten hatten keinen Probenausschluss zur Folge (siehe Anhang Abbildung A7).

Nach Filterung der geprägten CpG Loci wurden die AVG-Beta Werte von 890 geprägten CpG Loci aus der GenomeStudio Software exportiert (siehe Anhang Tabelle A10). Für die Auswertung wurde hier die Strategie von Court et al. (2013) angewandt [112]. Dazu wurde für jede Hybridisierung (Kontrollen und Patienten) pro Genort der Mittelwert der AVG-Beta Werte ermittelt. Über alle Mittelwerte der Kontrollen wurde je Genort der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD) bestimmt. Der NMB wurde für diese Analyse als Mittelwert der Kontrollen plus/minus der dreifachen SD definiert. Anschließend wurde überprüft, ob der Mittelwert der AVG-Beta Werte jedes Patienten pro Genort innerhalb oder außerhalb des NMB lag. Bei Patienten, die einen Mittelwert der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB aufzeigten, wurde im zweiten Schritt die Differenz zwischen dem Mittelwert der DNA-Methylierung des Patienten und dem Mittelwert der DNA-Methylierung aller Kontrollen bestimmt. So ermittelte Differenzen  $\geq 10\%$  wurden als biologisch relevant definiert. Eine Differenz  $\leq -10\%$  bezeichnet eine Hypomethylierung und eine Differenz  $\geq 10\%$  eine Hypermethylierung bei dem jeweiligen Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Die durchgeführte Genort-spezifische DNA-Methylierungsanalyse ergab für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte keine aberranten DNA-Methylierungsmuster. Dagegen zeigten neun der 23 Patienten aberrante Mittelwerte der AVG-Beta Werte in 10/34 analysierten somatisch geprägten Genorten (siehe Abbildung 51).

## Ergebnisse

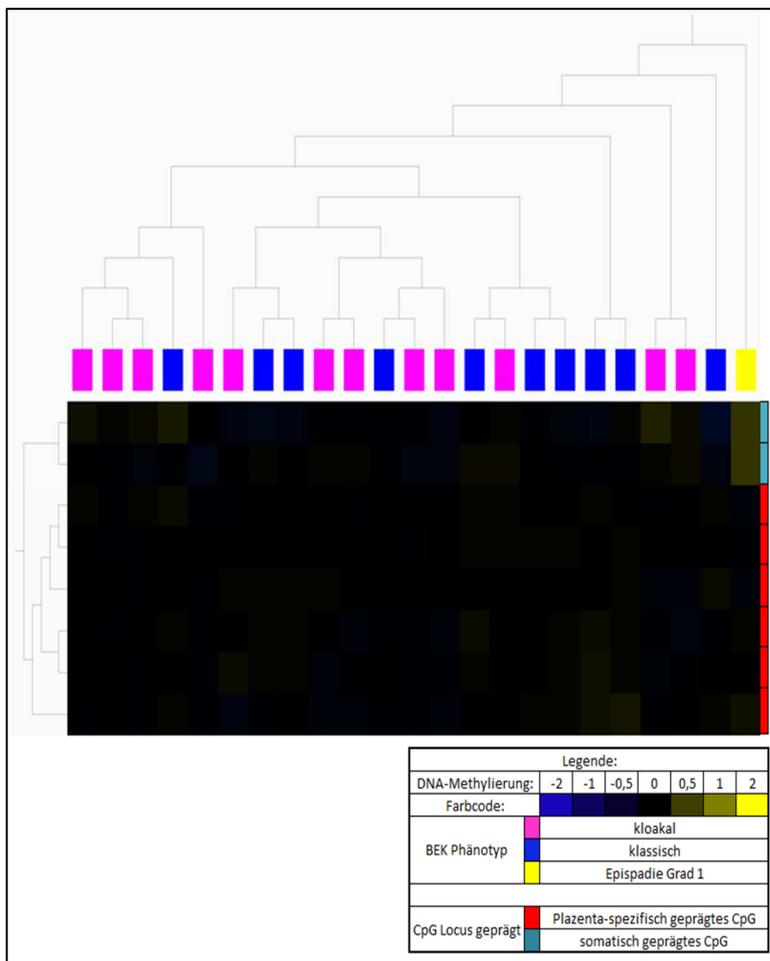
somatisch geprägte Genorte (Anzahl betroffener Individuen)	Patienten Nr.:	Differenz zwischen Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten und Mittelwert der AVG-Beta Werte aller Kontrollen [%], angegeben wenn $\geq 10$ %!								
		1000_501	247_501	39_501	3_501	815_501	14_501	265_501	862_501	407_501
PPIEL (0)										
DIRAS3 (0)										
ZDBF2 (0)										
NAP1L5 (0)										
FAM50B (0)										
PLAGL1 (1)					-16					
IGF2R (1)		-13								
WDR27 (0)										
GRB10 (2)		-12					-10			
PEG10 (0)										
MEST (0)										
HTR5A (0)										
CXORF56 pseudogene/ERLIN2 (1)			-17							
TRAPP9 (0)										
INPP5Fv2 (0)										
ICR1 (0)										
KvDMR1 (0)										
RB1 (0)										
MEG3 (0)										
MEG8 (1)				-11						
Chr. 15 imp. Region (0)										
IGF1R (3)			-20		14		-16			
ZNF597 (4)		-13		-15		-11				-12
ZNF597/NAA60 (0)										
ZNF331 (1)								-11		
PEG3 (0)										
MCTS2/HM13 (0)										
BLCAP/NNAT (0)										
L3MBTL (0)										
GNAS (0)										
NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL (0)										
GNAS Ex1A (0)										
WRB (2)		-11	-13							
NHP2L1 (1)						-10				

Legende:					
Methylierungsdifferenz [%]:	-100	-50	0	50	100
Farbcode:					

**Abbildung 51:** Ausschnitt aus der Analyse der Mittelwerte der AVG-Beta Werte an somatisch geprägten Genorten für neun Patienten aus dem Patientenkollektiv mit Ekstrophie. Mithilfe der AVG-Beta Werte der 10 Kontrollen wurde der normale DNA-Methylierungsbereich (NMB) für alle geprägten Genorte bestimmt (Mittelwert der AVG-Beta Werte aller Kontrollen  $\pm$  dreifache Standardabweichung). Gezeigt sind Individuen, deren Mittelwert der AVG-Beta Werte an mindestens einem Genort außerhalb dieses NMB liegen und deren Abweichung zwischen dem Mittelwert des Patienten und dem Mittelwert der Kontrollen mindestens  $\geq 10$  % beträgt. Angegeben ist die jeweils ermittelte Differenz. Negative Differenzen (blau markiert) stehen für eine Hypomethylierung der Patienten DNA-Probe an diesem Genort. Positive Differenzen (rot markiert) zeigen eine Hypermethylierung der Patienten DNA-Probe an. Die Analyse ergab, dass 10 der 34 somatisch geprägten Genorte in neun der 23 Patienten aberrante DNA-Methylierungswerte aufweisen. Dabei zeigten mit einer Ausnahme alle Patienten eine Hypomethylierung.

Bei vier Patienten war jeweils ein Genort aberrant hypomethyliert (*GRB10* (Patienten Nr. 14\_501), *IGF1R* (Patienten Nr. 265\_501), *ZNF597* (Patienten Nr. 407\_501), *ZNF331* (Patienten Nr. 862\_501)). Bei drei Patienten waren jeweils zwei Genorte (*MEG8*, *ZNF597* (Patienten Nr. 39\_501) und *PLAGL1*, *IGF1R* (Patienten Nr. 3\_501) und *ZNF597*, *NHP2L1* (Patienten Nr. 815\_501)) aberrant methyliert. Je ein Patient zeigte eine Hypomethylierung in drei Genorten (*CXORF56 pseudogene/ERLIN2*, *IGF1R*, *WRB* (Patienten Nr. 247\_501)) bzw. in vier Genorten (*IGF2R*, *GRB10*, *ZNF597*, *WRB* (Patienten Nr. 1000\_501)). Am häufigsten war der Genort *ZNF597* in dem Patientenkollektiv aberrant verändert. Bis auf *IGF1R* waren die betroffenen Genorte hypomethyliert (Tabelle A11 im Anhang für die Gesamtdarstellung der Auswertung).

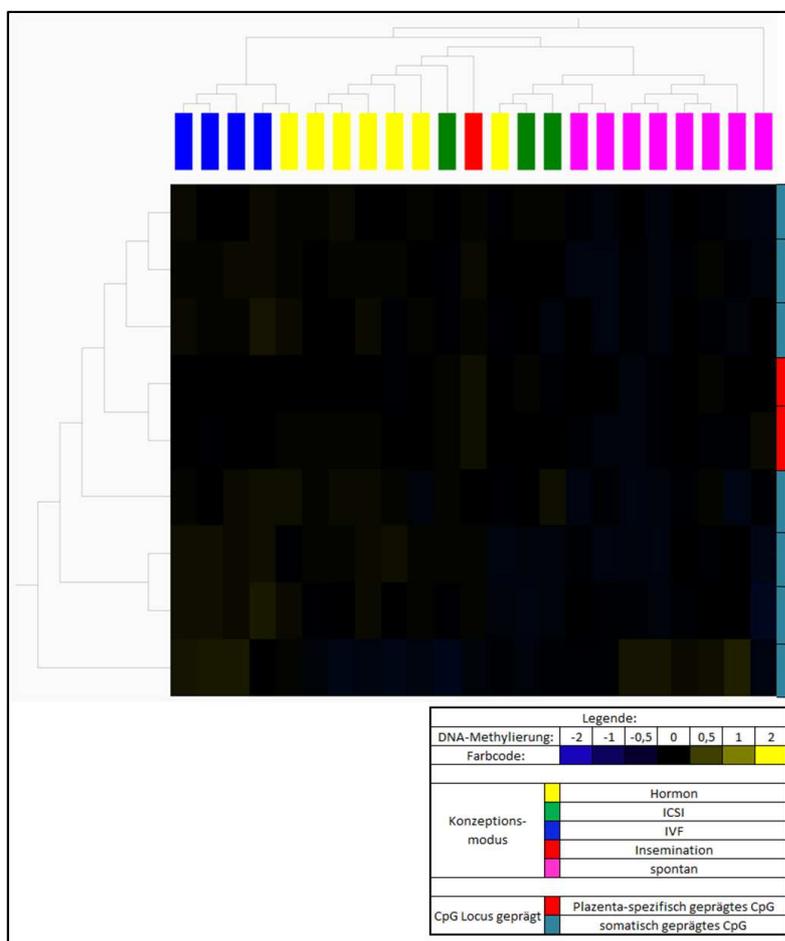
Des Weiteren sollte überprüft werden, ob sich der Datensatz der Blasenektrophiopatien nach dem Phänotyp der Patienten auftrennt. Eine supervidierte hierarchische Clusteranalyse, entsprechend der Phänotypgruppen, in die alle 890 AVG-Beta Werte der geprägten CpG Loci eingingen, ergab bei einer FDR  $q \leq 0,05$  nur ein differenziell methyliertes CpG (cg25780543) und keine Separierung entsprechend des Phänotyps. Nach Relaxierung der Parameter auf  $p \leq 0,01$  ergab diese Analyse acht differenziell methylierte CpGs, deren AVG-Beta Werte jedoch den Datensatz nicht entsprechend des Phänotyps der Patienten auftrennten (siehe Abbildung 52). Diese acht differenziell methylierten CpGs enthalten zwei somatisch geprägte und sechs Plazenta-spezifisch geprägte CpGs und waren dem somatisch geprägten Genort *HTR5A* und den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten *MCCC1*, *AIM1*, *GLIS3*, *ZC3H12C*, *RGMA* und *ZNF395* zuzuordnen. Die absolute Differenz der AVG-Beta Werte dieser acht CpGs innerhalb der drei Phänotypgruppen lag zwischen 1 % und 12 %.



**Abbildung 52:** Supervidierte hierarchische Clusteranalyse der AVG-Beta Werte der CpGs in DMRs geprägter Gene für die Patienten aus dem Teilprojekt "Ekstropie Analyse". Es sollte die Frage geklärt werden, ob eine Auftrennung nach dem BEK Phänotyp erfolgt. DNA-Proben von insgesamt 23 peripheren Blutproben von Patienten mit verschiedenen Phänotypen aus dem Blasenektrophi-Epispadie Komplex (BEK) wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Gezeigt ist die Clusteranalyse bei einem p-Wert  $p \leq 0,01$ . Bei dieser Analyse zeigen die AVG-Beta Werte von 8/890 CpGs signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Epispadie Grad 1 (n=1, gelb), klassische Blasenektrophi (n=10, blau), kloakale Ekstropie (n=12, pink)). Jede Zeile stellt dabei die AVG-Beta Werte eines CpGs dar. Blau dargestellte CpG Loci entsprechen einem niedrigen AVG-Beta Wert, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Rechts außen ist die Gruppenzugehörigkeit dargestellt: petrol blau: somatisch geprägte CpG Loci, rot: Plazenta-spezifisch geprägte CpG Loci. Es erfolgt keine Auftrennung entsprechend des BEK Phänotyps. (Darstellungsform: Mean=0)

Für die Analyse zum Konzeptionsmodus (ART Status) wurden die 23 Patienten in folgende Untergruppen eingeteilt: Insemination (n=1), Hormonbehandlung (n=7), IVF (n=4), ICSI (n=3) und keine ART Behandlung (n=8). Eine supervidierte hierarchische Clusteranalyse bei einer FDR  $q \leq 0,05$

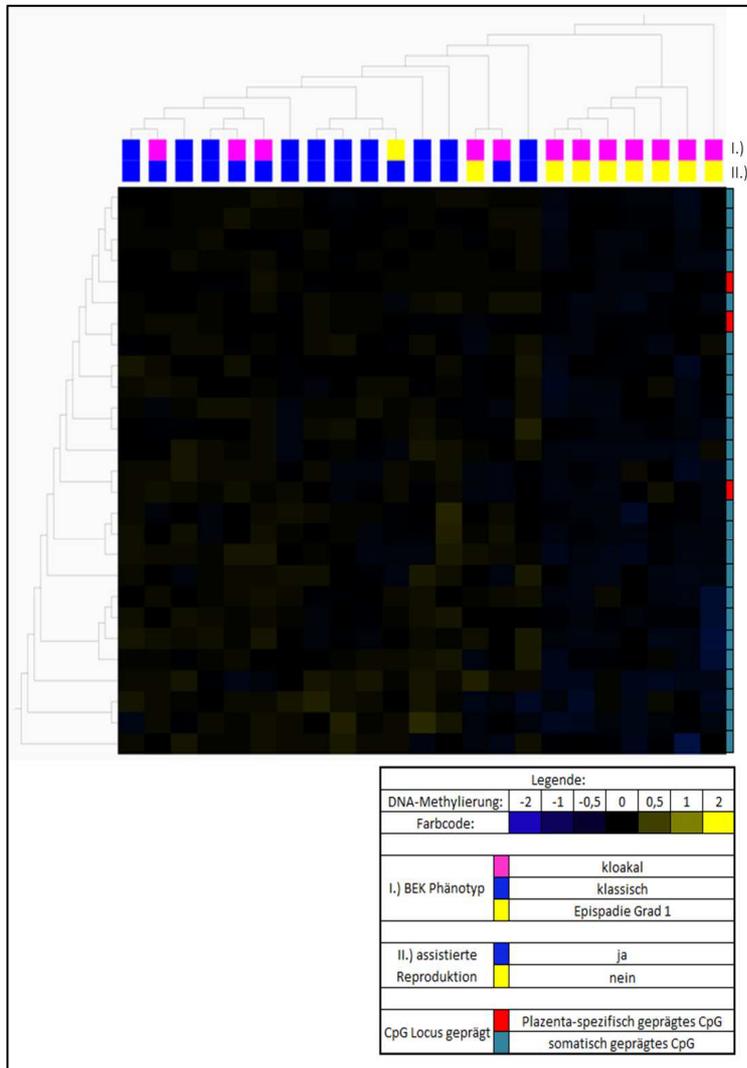
ergab kein signifikant differenziell methyliertes CpG und damit keine Auftrennung des Patientendatensatzes entsprechend der ART Gruppen. Nach Relaxierung der Parameter auf  $p \leq 0,01$  wurde der Datensatz durch neun differenziell methylierte CpGs in die beiden Gruppen "ART ja" und "ART nein" aufgetrennt, nicht jedoch in die Subgruppen der ART Behandlung selbst (siehe Abbildung 53). Die absolute Differenz der AVG-Beta Werte dieser neun CpGs innerhalb der verschiedenen Gruppen der ART Behandlung lag lediglich zwischen 3 % und 6 %. Insgesamt zwei von neun CpGs waren dem Plazenta-spezifisch geprägten Genort *AIM1* zuzuordnen, die restlichen den somatisch geprägten Genorten *GRB10* (n=1), *PEG10* (n=2), *INPP5Fv2* (n=1), *GNAS* (n=1), *NESP-AS1/GNAS-AS1* (n=1) und *NAP1L5* (n=1).



**Abbildung 53:** Supervidierte hierarchische Clusteranalyse der AVG-Beta Werte der CpGs in DMRs geprägter Gene für die Patienten aus dem Ekstrophie Teilprojekt zur Auftrennung nach dem Konzeptionsmodus. Gezeigt ist die Clusteranalyse bei einem p-Wert  $p \leq 0,01$ , bei der 9/890 CpGs unterschiedliche AVG-Beta Werte zwischen den verschiedenen Konzeptionsmodus-Gruppen (Hormon (n=7, gelb), ICSI (n=3, grün), IVF (n=4, blau), Insemination (n=1, rot), spontan (n=8, pink)) aufweisen. Jede Zeile stellt dabei die AVG-Beta Werte eines CpG Locus dar, die mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip ermittelt wurden. Blau dargestellte CpG Loci entsprechen einem niedrigen AVG-Beta Wert, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Rechts außen ist die Gruppenzugehörigkeit dargestellt: petrol blau: somatisch geprägte CpG Loci, rot: Plazenta-spezifisch geprägte CpG Loci. Es erfolgt eine Auftrennung entsprechend der beiden übergeordneten Gruppen "ART ja" und "ART nein". (Darstellungsform: Mean=0)

Noch deutlicher wurde die Auftrennung des gesamten Datensatzes entsprechend der beiden Subgruppen "ART ja" und "ART nein" bei der supervidierten PC-Analyse mit  $p \leq 0,01$ . Dort zeigte sich, dass die AVG-Beta Werte von 27/890 CpGs die Patientengruppe gut separierten (siehe Abbildung 54). Die absolute Differenz der AVG-Beta Werte dieser 27 CpGs innerhalb der zwei Gruppen "ART ja" und "ART nein" lag zwischen 1 % und 4 %. Insgesamt 24/27 CpGs waren dabei den folgenden somatisch

geprägten Genorten zuzuordnen: *FAM50B* (n=3), *PEG10* (n=4), *MEST* (n=3), KvDMR (n=3), Chr. 15 imp. Region (n=2), *PEG3* (n=1), *GNAS* (n=3), *NESP-AS1/GNAS-AS1* (n=2), *GNAS Ex1A* (n=2) und *NAP1L5* (n=1). Drei CpGs gehörten zu den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten *N4BP2L1* (n=2) und *ZNF396* (n=1).

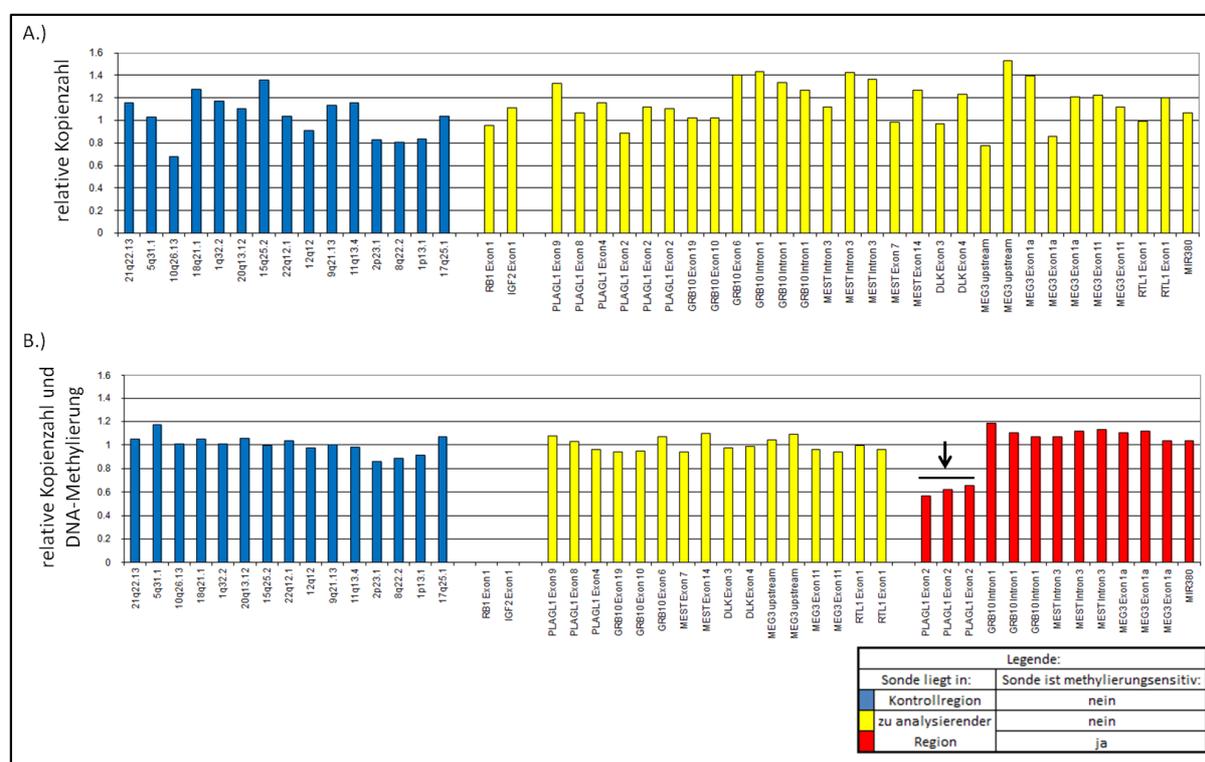


**Abbildung 54:** Supervidierte hierarchische Clusteranalyse der AVG-Beta Werte der CpGs geprägter Gene für die Patienten aus dem Ekstrophie Teilprojekt zur Auftrennung nach den Gruppen "ART ja" und "ART nein". Gezeigt ist die Clusteranalyse bei einem p-Wert von  $p \leq 0,01$ , bei dem 27/890 CpGs signifikant unterschiedliche AVG-Beta Werte zwischen den analysierten Gruppen "ART ja" (n=15, blau) und "ART nein" (n=8, gelb) aufzeigen. Zuordnung zur ART Subgruppen gezeigt in der mit II.) bezeichnete Reihe. In der mit I.) bezeichneten Reihe sind die BEK Phänotypen angegeben (Epispadie Grad 1 (n=1, gelb) klassische Blasenekstrophie (n=10, blau), kloakale Ekstrophie (n=12, pink). Jede Zeile stellt dabei die AVG-Beta Werte eines CpG Locus dar. Blau dargestellte CpG Loci entsprechen einem niedrigen AVG-Beta Wert, gelb markierte Loci einem hohen AVG-Beta Wert. Rechts außen ist die Gruppenzugehörigkeit dargestellt: petrol blau: somatisch geprägte CpG Loci, rot: Plazenta-spezifisch geprägte CpG Loci. Der Datensatz wird, wenn auch nicht komplett, in die beiden Subgruppen "ART ja" und "ART nein" aufgetrennt. (Darstellungsform: Mean=0)

Die hier gezeigten Clusteranalysen, durchgeführt mit den AVG-Beta Werten der Patienten des Blasenekstrophiekollektivs, ergaben für die auf das multiple Testen korrigierten Analyse keine signifikant differenziell methylierte CpGs bzw. es konnte nur ein einzelnes signifikant differenziell methyliertes CpG ermittelt werden. Nach Relaxierung der Parameter auf  $p \leq 0,01$  wurden differenziell methylierte CpGs ermittelt. Die absoluten Differenzen der AVG-Beta Werte dieser CpGs waren jedoch sehr gering, sodass eine biologische Relevanz eher nicht anzunehmen ist.

### 3.5.2.1 Verifizierung einzelner DNA-Methylierungsergebnisse bei Patienten mit Blasenekstrophie

Einer der Patienten mit Blasenekstrophie zeigte als Ergebnis der hier durchgeführten Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analysen eine Hypomethylierung der DMR des *PLAGL1* Gens (vergl. Abbildung 51, Rohwerte siehe Anhang Tabelle A10). Eine Hypomethylierung dieses Genorts ist mit einem klassischen Imprintingsyndrom, dem Transienten Neonatalen Diabetes Mellitus, assoziiert. Zur Verifizierung wurde eine MS-MLPA (ME032-A1) für die betroffene Region in 6q24.2 durchgeführt, welche weitere Proben für die ebenfalls geprägten Genorte in 7p12.1, 7q32.2, 14q32.2 und 14q32.21 enthält. Diese MS-MLPA bestätigte den Befund der Hypomethylierung im *PLAGL1* Gen und damit die Diagnose eines TNDM (siehe Abbildung 55).



**Abbildung 55:** MS-MLPA bei dem Patienten mit Blasenekstrophie mit einer Hypomethylierung im *PLAGL1* Genort. A.) Auswertung des unverdauten Reaktionsansatzes. In blau sind Werte für die Kontrollregionen und in gelb Werte der Analyseregionen gezeigt. Werte zwischen 0,65 und 1,34 sind als normal anzusehen. Das Ergebnis des unverdauten Reaktionsansatzes zeigt, dass chromosomale Imbalancen als Ursache für das reduzierte DNA-Methylierungssignal in der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse ausgeschlossen werden können. B.) Resultat des verdauten Reaktionsansatzes. Auch hier sind Werte zwischen 0,65 und 1,34 für die Kontrollregionen (blaue Balken) und die nicht methylierungssensitiven Sonden der Analyseregion (gelbe Balken) als normal anzusehen. Die rot markierten Balken stellen die Auswertung der methylierungssensitiven Sonden dar. Werte kleiner 1 deuten auf ein Hypomethylierung der jeweiligen Region hin. Für alle drei methylierungssensitive Sonden im *PLAGL1* Gen wurde eine Hypomethylierung detektiert. Da wie in A.) dargestellt eine Imbalance ausgeschlossen werden kann, ist Ursache dafür ein Imprintingdefekt oder eine UPD.

Im unverdauten Ansatz der MS-MLPA ergab sich kein Hinweis auf eine chromosomale Imbalance der analysierten Regionen. Im Methylierungs-spezifischen Reaktionsansatz hingegen zeigte sich ein reduziertes Signal für alle drei Sonden im *PLAGL1* Gen, was auf eine Hypomethylierung der Region weist. Diese Hypomethylierung kann durch einen Imprintingfehler oder durch eine UPD bedingt sein. Da kein elterliches Material zur Verfügung stand, konnte die Ursache der Hypomethylierung nicht ermittelt werden.

Bei zwei weiteren Patienten ergab die Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse eine Hypomethylierung im *GRB10* Genort (siehe Abbildung 51, Rohwerte siehe Anhang Tabelle A10). Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für diesen Genort lagen bei diesen Patienten allerdings bei 49 % und 50 %, sodass die Rohwerte eher nicht für eine Hypomethylierung sprachen. Dies bestätigte sich auch dadurch, dass die durchgeführte MS-MLPA (ME032-A1, untersuchte Regionen: 6q24.2, 7p12.1, 7q32.2, 14q32.2 und 14q32.21) keine Auffälligkeiten aufwies (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte unter den Patienten mit einem Blasenektrophie-Epispadie Komplex ein Patient mit einer DNA-Methylierungsstörung im Bereich des *PLAGL1* Gens identifiziert werden. Dieser Befund ist mit einem klassischen Imprintingsyndrom, dem Transienten Neonatalen Diabetes Mellitus, assoziiert. Darüber hinaus wurden in diesem Kollektiv Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen an weiteren geprägten Genorten, die bisher noch mit keinem der acht klassischen Imprintingsyndrome assoziiert sind, identifiziert.

### ***3.5.3 DNA-Methylierung geprägter Gene bei Patienten mit mentaler Retardierung***

Das dritte zu analysierende Kollektiv mit einer Entwicklungsstörung beinhaltete Patienten mit mentaler Retardierung (MR). Das Untersuchungskollektiv bestand aus 82 Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung, bei denen eine chromosomale Aberration als Ursache ausgeschlossen werden konnte (vergl. Kapitel 2.1.1.7). Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 19 Patienten zusammen, die aus anderen Gründen als einer mentalen Retardierung molekulargenetisch untersucht wurden. Insgesamt wurden 101 Proben auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip hybridisiert, wobei eine Probe (P56) aus technischen Gründen nicht gemessen werden konnte.

Die Arbeiten zu diesem Datensatz führten zu einer geteilten Erstautorenschaft in einem Manuskript, das die hier beschriebenen Ergebnisse und weitere Analyseergebnisse aufzeigt (Kolarova et al., *EJMG*, 2015).

Die LDR des Gesamtdatensatzes (n=100) befand sich bei allen Hybridisierungen oberhalb des Grenzwertes von 98 %. Den Qualitätskriterien entsprachen 482.207 Loci. Die durchgeführten SNP-

und Gesamtkorrelationsanalysen der AVG-Beta Werte hatten keinen Probenausschluss zur Folge (siehe Anhang, Abbildung A8).

Nach Filterung für die geprägten CpG Loci wurden die AVG-Beta Werte von 889 CpG Loci aus der GenomeStudio Software exportiert (siehe Anhang Tabelle A12). Analog zu dem Analyseansatz in der Kohorte der Patienten mit Blasenektrophie wurde gemäß dem von Court et al. (2013) publizierten Vorgehen anhand der Kontrollen für jeden geprägten Genort der normale DNA-Methylierungsbereich (NMB) bestimmt [112]. Anschließend wurde überprüft, ob der Mittelwert der DNA-Methylierung jedes Patienten pro Genort außerhalb oder innerhalb dieses Bereichs liegt. Bei Patienten, die einen Mittelwert der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB aufzeigten, wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten und dem Mittelwert der AVG-Beta Werte aller Kontrollen bestimmt. Differenzen  $\geq 10\%$  wurden als biologisch relevant definiert. Eine Differenz  $\leq -10\%$  bezeichnet eine Hypomethylierung und eine Differenz  $\geq 10\%$  eine Hypermethylierung an diesem Genort für den Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Mit diesem Ansatz zeigten insgesamt 11/81 Patienten aberrante DNA-Methylierungsmuster in acht der 54 untersuchten somatisch und Plazenta-spezifisch geprägten Genorten (siehe Abbildung 56 und Gesamtdarstellung im Anhang Tabelle A13).

Die durchgeführte DNA-Methylierungsanalyse ergab für den Plazenta-spezifisch geprägten Genort *MCCC1* bei einem Patienten ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster. Der somatisch geprägte Genort *BLCAP/NNAT* war mit vier betroffenen Patienten der am häufigsten aberrant methylierte Genort im Untersuchungskollektiv und zeigte durchweg eine Hypermethylierung. Die anderen betroffenen Genorte zeigten bei je einem Patienten ein auffälliges DNA-Methylierungsmuster. Dabei zeigten die betroffenen Patienten, bis auf in den beiden Genorten *FAM50B* und *MEG3*, im Vergleich zu den Kontrollen eine Hypermethylierung. Der Patient mit einer Hypermethylierung im *MEG8* Genort zeigte parallel eine Hypomethylierung im *MEG3* Genort. Eine Hypomethylierung des *MEG3* Gens und die Hypermethylierung des *MEG8* Gens sind, wie zuvor bereits beschrieben, mit dem Temple Syndrom assoziiert.

somatisch geprägte Genorte (Anzahl betroffener Individuen)	Patienten Nr.:	Differenz zwischen Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten und Mittelwert der AVG-Beta Werte aller Kontrollen [%], angegeben wenn $\geq 10$ %										
		P4	P59	P47	P15	P64	P12	P22	P28	P38	P45	P75
PIEL (3)		23	12								17	
DIRAS3 (0)												
ZDBF2 (0)												
NAP1L5 (0)												
FAM50B (1)				-36								
PLAGL1 (0)												
IGF2R (1)					33							
WDR27 (0)												
GRB10 (0)												
PEG10 (0)												
MEST (0)												
HTRSA (0)												
CXORF56 pseudogene/ERLIN2 (0)												
TRAPPC9 (0)												
INPP5Fv2 (0)												
ICR1 (0)												
KvDMR1 (0)												
PBI (0)												
MEG3 (1)						-32						
MEG8 (1)						41						
Chr. 15 imp. Region (0)												
IGF1R (0)												
ZNF597 (0)												
ZNF957/NAT15 (0)												
ZNF331 (0)												
PEG3 (0)												
MCTS2/HM13 (1)							11					
BLCAP/NNAT (4)								11	10	10	12	
L3MBTL (0)												
GNAS (0)												
NESP-AS/GNAS-AS1/GNAS XL (0)												
GNAS Ex1A (0)												
WRB (0)												
NHP2L1 (0)												
Plazenta-spezifisch geprägter Genort												
MCCC1 (1)												10

Legende:

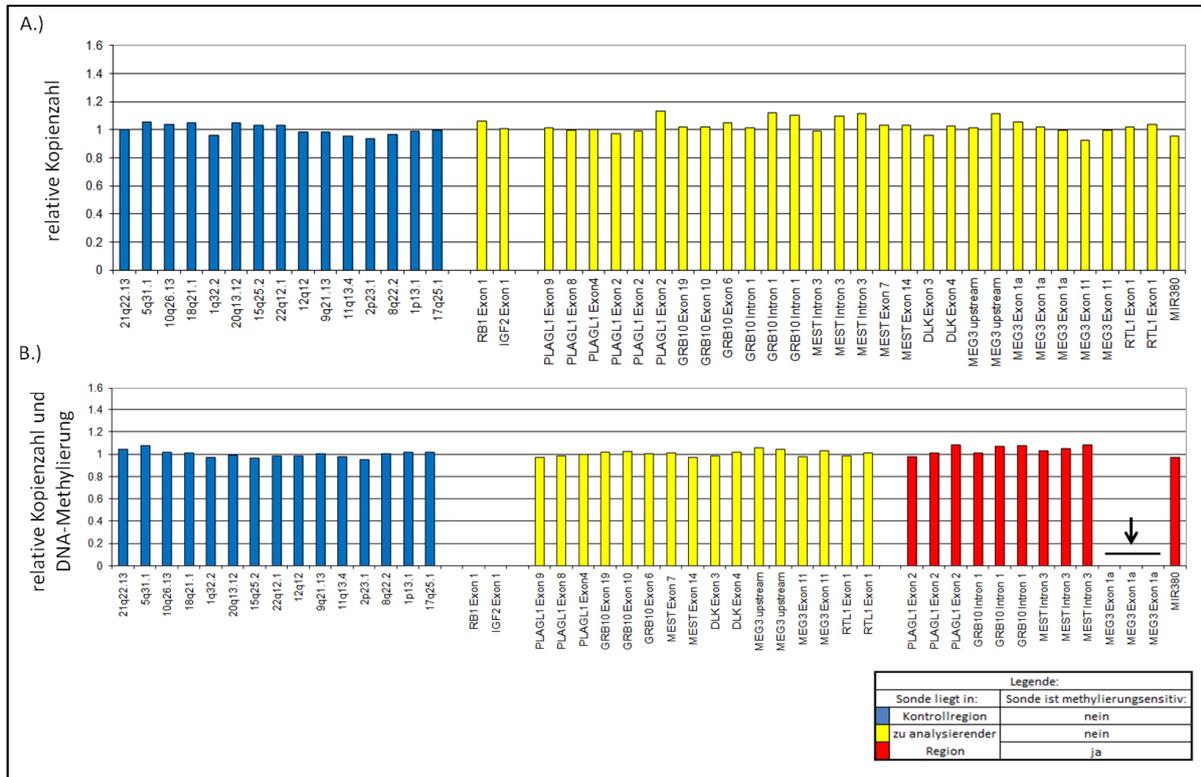
Methylierungsdifferenz [%]:	-100	-50	0	50	100
Farbcode:					

**Abbildung 56:** Ausschnitt aus der Analyse der Mittelwerte der AVG-Beta Werte an geprägten Genorten der Patienten mit mentaler Retardierung, die aberrante DNA-Methylierungsmuster aufweisen. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte aller geprägten Genorte in 19 Kontrollen wurden verwendet, um den normalen DNA-Methylierungsbereich (NMB) jedes geprägten Genorts zu bestimmen (Mittelwert der AVG-Beta Werte pro Genort in allen Kontrollen  $\pm$  dreifache Standardabweichung). In der Abbildung gezeigt sind nur die Patienten mit mentaler Retardierung, die in mindestens einem der Genorte Mittelwerte der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB für den Genort aufweisen und bei denen die ermittelte Differenz mindestens  $\geq 10$  % beträgt. Angegeben sind jeweils die Differenzen. Negative Differenzen (blau markiert Werte) stehen für eine Hypomethylierung des Genorts in den Patienten DNA-Proben. Positive Differenzen (rot markierte Werte) zeigen einen hypermethylierten Genort an. Die Analyse ergab, dass 11 Patienten mit mentaler Retardierung in acht geprägten Genorten aberrante DNA-Methylierungswerte aufweisen. In zwei Genorten, *FAM50B* und *MEG3*, zeigen die betroffenen Patienten eine Hypomethylierung, in allen anderen betroffenen Genorten zeigen die Patienten eine Hypermethylierung im Vergleich zu den Kontrollen.

### 3.5.3.1 Verifizierung einzelner DNA-Methylierungsergebnisse von Patienten mit mentaler Retardierung

Die im vorherigen Kapitel beschriebene Verdachtsdiagnose eines Temple Syndroms bei dem Patienten P64 wurde im Folgenden verifiziert. Verwendet wurde hierfür die MS-MLPA (ME032-A1, untersuchte Regionen: 6q24.2, 7p12.1, 7q32.2, 14q32.2 und 14q32.21) (siehe Abbildung 57). Die MS-MLPA Analyse bestätigte die Hypomethylierung des *MEG3* Gens bei diesem Patienten. Gleichzeitig fand sich kein Anhalt für eine chromosomale Imbalance dieses Genorts. Nach dem Ergebnis der MS-

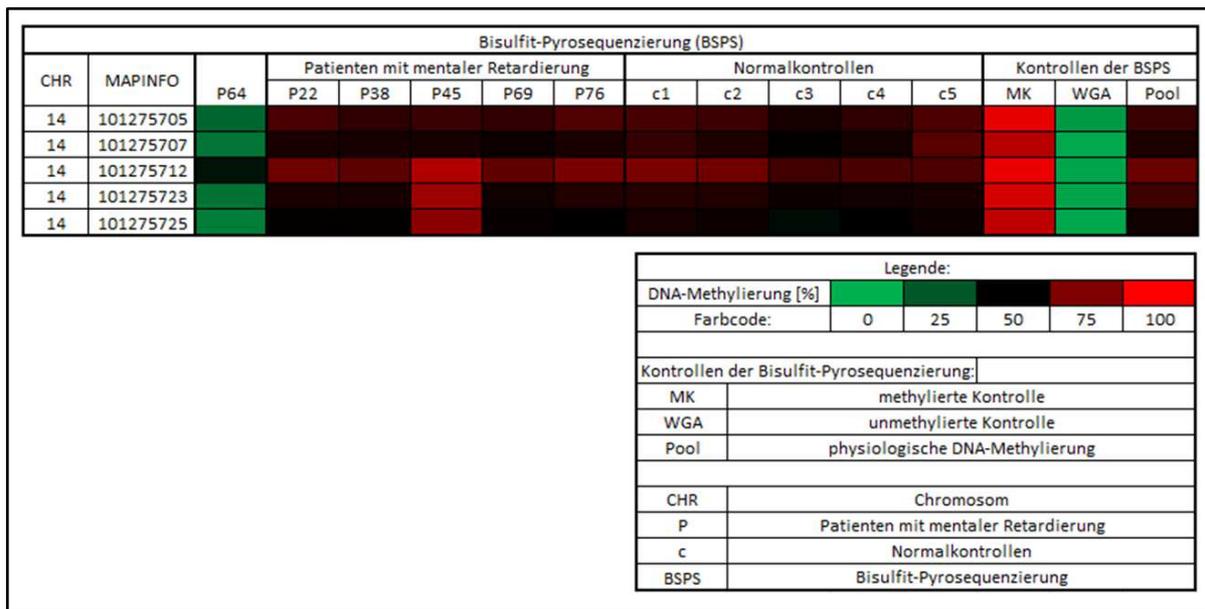
MLPA kann somit eine Kopienzahlveränderung der fraglichen Region als Ursache der Hypomethylierung am *MEG3* Genort bei dem Patienten P64 ausgeschlossen werden. Somit kann der *MEG3* Hypomethylierung ein Imprintingdefekt auf Chromosom 14 oder eine (partielle) UPD des Chromosoms 14 zugrunde liegen.



**Abbildung 57: MS-MLPA Auswertung bei dem Patienten P64 aus dem Patientenkollektiv mit mentaler Retardierung mit einer Hypomethylierung im *MEG3* Genort.** In A.) ist der unverdaute Reaktionsansatz gezeigt. Werte für die Kontrollregion (blaue Balken) und zu analysierende Region (gelbe Balken) zwischen 0,65 und 1,34 sind als normal anzusehen. In B.) sind die Ergebnisse des verdauten Reaktionsansatzes gezeigt. Werte für die Kontrollregion (blaue Balken) und zu analysierende Region (gelbe Balken) zwischen 0,65 und 1,34 sind erneut als normal anzusehen. Die rot markierten Balken stellen die Auswertung der methylierungssensitiven Sonden dar. Werte kleiner 1 deuten auf eine Hypomethylierung der jeweiligen Region hin. Das Ergebnis des unverdauten Reaktionsansatzes zeigt, dass eine chromosomale Imbalance als Ursache für die Hypomethylierung von *MEG3* ausgeschlossen werden kann. Im verdauten Ansatz ist ein Verlust in allen methylierungssensitiven Sonden im *MEG3* Exon 1a zu sehen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Methylierungsanalyse, die eine Hypomethylierung in *MEG3* zeigte. Ursächlich kann ein Imprintingdefekt oder eine UPD14 sein.

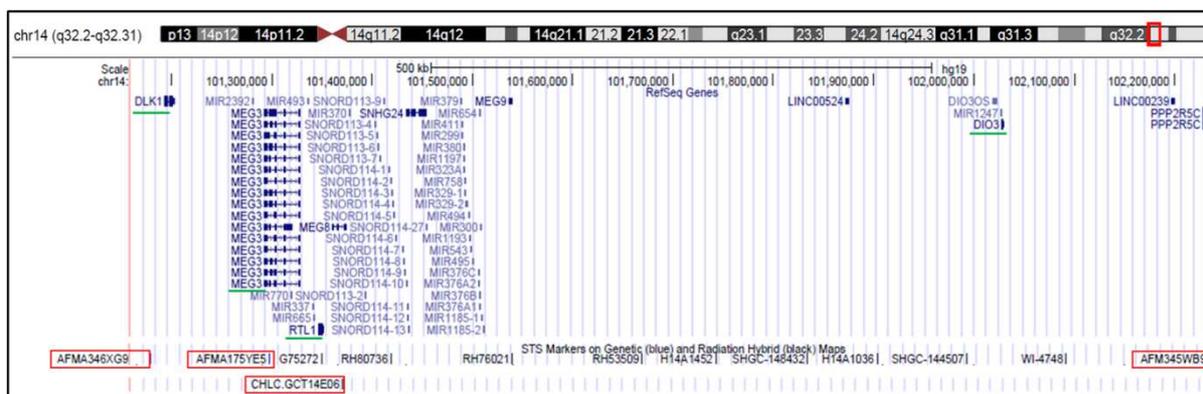
Da sowohl das verwendete MS-MLPA Kit als auch der Infinium HumanMethylation450 BeadChip nicht die IG-DMR abdecken, diese beim Temple Syndrom jedoch hypomethyliert vorliegt, wurde ein Bisulfit-Pyrosequenzierassay erstellt, um auch diese Region zu analysieren. Die IG-DMR ist die Imprintingkontrollregion des Imprintingclusters auf Chromosom 14q32 und reguliert die Expression der maternal (*MEG3*, *MEG8*, *RTL1as*) und paternal (*RTL1*, *DLK1*) monoallelisch exprimierten Gene des Clusters. Die DNA-Methylierungsanalyse für die IG-DMR wurde für den Patienten mit TS aus dem MR Kollektiv durchgeführt. Als Kontrollen dienen jeweils DNA-Proben von Patienten aus dem Kollektiv

von Patienten mit mentaler Retardierung, welche in der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse normale DNA-Methylierungswerte gezeigt hatten. Dieses experimentelle Design wurde gewählt, da das DNA-Material der 19 Kontrollen, die auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips analysiert wurden, nicht mehr zur Verfügung stand. Die Analyse bestätigte die vermutete Hypomethylierung der IG-DMR für den Patienten mit TS und zeigte überwiegend mittlere DNA-Methylierungswerte für die anderen analysierten Patienten mit MR und Kontrollen im Einklang mit der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse (siehe Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Bisulfit-Pyrosequenzierung der IG-DMR auf Chromosom 14q32. Es wurde die DNA-Methylierung von fünf CpG Loci in der IG-DMR mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert. Das Untersuchungskollektiv setzte sich zusammen aus dem Patienten mit TS (P64), fünf weiteren Patienten des MR Kollektives (P22 – P76), fünf Normalkontrollen (c1 – c5) und den drei Kontrollen der Bisulfit-Pyrosequenzierung (MK: methylierte Kontroll-DNA, WGA: unmethylierte Kontroll-DNA, Pool: DNA-Gemisch aus peripherem Blut von 10 männlichen und 10 weiblichen Normalkontrollen). Die DNA-Methylierungswerte sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Die Kontrollen der Bisulfit-Pyrosequenzierung zeigen die erwarteten DNA-Methylierungswerte für die MK- und WGA-Kontrollen. Der Patient mit TS zeigt die Hypomethylierung der analysierten Region, wogegen die anderen DNA-Proben eine mittlere DNA-Methylierung aufweisen (vergleichbar mit Pool Kontrolle).

Zur Evaluierung einer UPD, die Ursache der im Patienten P64 beobachteten *MEG3* Hypomethylierung sein kann, wurde eine Mikrosatellitenanalyse von sechs Markern auf Chromosom 14 durchgeführt. Die Lage der vier im Bereich des Imprintingclusters 14q32 lokalisierten Mikrosatellitenmarker (D14S1006, D14S985, CHLC.GCT14E06, D14S1051) ist in Abbildung 59 gezeigt. Die ermittelten Allele für die analysierten Mikrosatelliten sind in Tabelle 27 angegeben.



**Abbildung 59:** Chromosomale Lage der analysierten vier Mikrosatellitenmarker im Imprintingcluster 14q32. Die Lage der vier im Imprintingcluster lokalisierten Mikrosatellitenmarker ist als Ausschnitt vom UCSC Genome Browser gezeigt. Die analysierten Marker sind durch rote Kästen markiert (AFMA346XG9 entspricht D14S1006, AFMA175YE5 entspricht D14S985, AFM345WB9 entspricht D14S1051). In grün unterstrichen sind die den Markern zugeordneten Gene. (Abbildung modifiziert aus dem UCSC Genome Browser, Stand 10.04.2015, hg19)

**Tabelle 27:** Allele der sechs analysierten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14 bei dem Patienten mit Hypomethylierung in *MEG3* und Hypermethylierung in *MEG8*.

Marker (Gen, Bande)	Allel A	Allel B
D14S1006 ( <i>DLK1</i> , 14q32.2)	136	138
D14S985 ( <i>MEG3</i> , 14q32.2)	130	132
CHLC.GCT14E06 ( <i>RTL1</i> , 14q32.31)	139	141
D14S1051 ( <i>DIO3</i> , 14q32.31)	180	182
D14S1009 ( <i>MDGA2</i> , 14q21.3)	252	256
D14S1433 ( <i>TMED10</i> , 14q24.3)	162	170

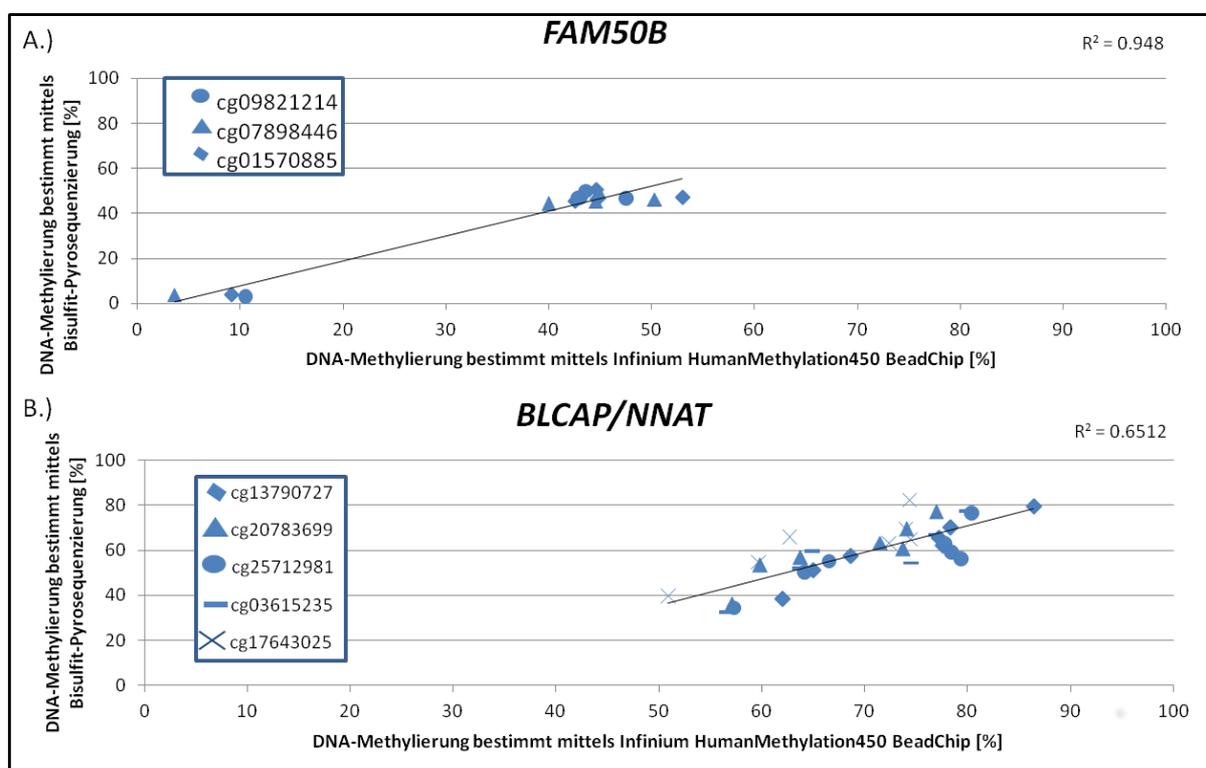
Die Mikrosatellitenanalyse zeigte zwei unterschiedliche Allele für alle untersuchten Marker. Somit konnte eine Isodisomie der Region 14q21.3q32.3, welche die Genorte *MEG3* und *MEG8* enthält, ausgeschlossen werden. Eine Heterodisomie konnte, aufgrund des nicht vorhandenen elterlichen DNA-Materials im Rahmen dieser anonymisierten Studie, nicht ausgeschlossen werden.

Neben der *MEG3* Hypomethylierung wurden die DNA-Methylierungsveränderungen in drei weiteren Genorten verifiziert. Hierfür wurden drei Bisulfit-Pyrosequenzierassays für die Genorte *PPIEL*, *FAM50B* und *BLCAP/NNAT* etabliert. In Tabelle 28 ist die Anzahl analysierter Patienten und Kontrollen, sowie die Anzahl analysierter CpG Loci je Bisulfit-Pyrosequenzierassay zusammen mit der zu verifizierenden DNA-Methylierungsveränderung angegeben.

Aus dem bereits genannten Grund dienten auch hier DNA-Proben von Patienten aus dem Kollektiv von Patienten mit mentaler Retardierung, welche in der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse normale DNA-Methylierungswerte gezeigt hatten, als Kontrollen. Die Korrelation der Ergebnisse beider Methoden zur Bestimmung der DNA-Methylierung ist in Abbildung 60 dargestellt.

**Tabelle 28:** Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierte Patienten und Kontrollen des Kollektivs mental retardierter Patienten.

Genort	Infinium Human Methylation450 BeadChip CpG Locus	analysierte Patienten und DNA Methylierungswert bzw. -bereich aus der BeadChip Analyse [%]		Anzahl analysierter Kontrollen und DNA-Methylierungsbereich aus der BeadChip Analyse [%]	
<i>PPIEL</i>	cg11704876	2	76 – 81	3	58 – 65
<i>FAM50B</i>	cg01570885	1	9	4	43 – 53
	cg09821214	1	10	4	43 – 47
	cg07898446	1	4	4	40 – 50
<i>BLCAP/ NNAT</i>	cg13790727	4	77 – 86	3	62 – 69
	cg20783699	4	72 – 77	3	57 – 64
	cg25712981	4	78 – 80	3	57 – 67
	cg03615235	4	75 – 80	3	57 – 65
	cg17643025	4	72 – 74	3	51 – 63



**Abbildung 60:** Verifizierung der mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip erhobenen AVG-Beta Werte. Mithilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde die DNA-Methylierung von insgesamt acht CpG Loci in den zwei Genorten *FAM50B* (A.) und *BLCAP/NNAT* (B.) bestimmt. In jedem Graphen sind auf der X-Achse die mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip bestimmten DNA-Methylierungswerte aufgetragen und auf der Y-Achse die mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung erhobenen DNA-Methylierungswerte. Die einzelnen analysierten CpG Loci sind in jedem Graphen mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) zeigt für die beiden Genorte *FAM50B* und *BLCAP/NNAT* eine gute Korrelation beider Messmethoden.

Es zeigte sich jeweils eine gute Korrelation zwischen Infinium HumanMethylation450 BeadChip und Bisulfit-Pyrosequenzierung für die Bisulfit-Pyrosequenzierassay der Genorte *FAM50B* ( $R^2(FAM50B)=0,95$ ) und *BLCAP/NNAT* ( $R^2(BLCAP/NNAT)=0,65$ ). Damit konnten für diese beiden Genorte die erhobenen AVG-Beta Werte verifiziert werden. Für die Messungen im Genort *PPIEL* wurde, aufgrund der geringen Anzahl an Messungen, kein Bestimmtheitsmaß ermittelt. Die Analyse

der DNA-Methylierungswerte erfolgte mittels Heatmap und ergab für die DNA-Probe des Patienten P45 eine Abweichung der DNA-Methylierung für beide Meßmethoden von 28 % und für die DNA-Probe des Patienten P59 eine Abweichung der DNA-Methylierung für beide Meßmethoden von 8 % (siehe Abbildung 61). Aufgrund der relativ geringen Abweichung von 8 % kann das DNA-Methylierungsergebnis für den Genort *PPIEL* des Patienten P59 als verifiziert betrachtet werden. Die relativ große Abweichung zwischen beiden Meßmethoden von 28 % bei dem Patienten P45 für den Genort *PPIEL* ergab nicht die Verifizierung des mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse ermittelten aberranten DNA-Methylierungswerts.

Patient:		P45*	P59*	P24	P62	P69
DNA-Methylierung [%] am cg11704876	Bisulfit-Pyrosequenzierung					
	Infinium HumanMethylation450 BeadChip					
Differenz [%] Infinium HumanMethylation450 BeadChip - Bisulfit-Pyrosequenzierung		28	8	7	12	1

Legende:						
DNA-Methylierung [%]:		0	25	50	75	100
Farbcode:						
P	Patient mit mentaler Retardierung					
*	Patient hat nach Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse einen Mittelwert der AVG-Beta Werte für den Genort <i>PPIEL</i> oberhalb des normalen DNA-Methylierungsbereichs					
cg11704876	CpG Bezeichnung entsprechend des Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays					

**Abbildung 61:** DNA-Methylierungsergebnisse für das CpG cg11704876 im *PPIEL* Genort für ausgewählte Patienten des MR Kollektivs. Gezeigt sind die DNA-Methylierungswerte bestimmt mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung und Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array für zwei Patienten mit mentaler Retardierung die in der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse eine Hypermethylierung für den Genort *PPIEL* im Vergleich zum normalen DNA-Methylierungsbereich aufwiesen. Außerdem sind drei weitere Patienten aus dem MR Kollektiv als Kontrollen analysiert. Die untersuchten Patienten-Proben zeigen für beide Methoden DNA-Methylierungswerte im überwiegend mittleren Bereich der DNA-Methylierung.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen in den beiden vorausgegangenen Teilprojekten zu DNA-Methylierungsstörungen geprägter Genorte bei Patienten mit Entwicklungsstörungen konnte auch in der Kohorte von Patienten mit mentaler Retardierung ein Patient mit einem klassischen Imprintingsyndrom, hier einem Temple Syndrom, identifiziert werden. Wiederum wurden wie in den beiden Kohorte zuvor vereinzelt Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen geprägter Genorte identifiziert, die bisher noch nicht mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind.

### **3.6 Multiple DNA-Methylierungsstörung**

In den vorangegangenen Teilprojekten, der DNA-Methylierungsanalyse geprägter Genorte bei Patienten mit verschiedenen Entwicklungsstörungen, wurde die Frequenz von klassischen Imprintingsyndromen jenseits der klassischen Indikation für eine DNA-Methylierungsanalyse bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die phänotypische Breite von Imprintingstörungen groß ist und klassische Imprintingsyndrome, insbesondere das Temple Syndrom, unterdiagnostiziert sind. Darüber hinaus wurden Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen an mehr als einem Genort identifiziert (vergl. z.B. Abbildung 51). Diesem Befund, einem Multi-Locus Methylierungsdefekt (MLMD), wurde im Folgenden in einer Kohorte von Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom weiter nachgegangen, um das Spektrum der DNA-Methylierungsstörung bei Patienten mit MLMD zu charakterisieren. Hierzu wurde die DNA-Methylierung geprägter Genorte in einem Patientenkollektiv analysiert, das aus drei Subgruppen aufgebaut war: i.) Patienten, bei denen in Voranalysen MLMD diagnostiziert wurde (20 Patienten, 28 Hybridisierungen), ii.) Patienten, bei denen Voranalysen den Verdacht auf einen Multi-Locus Methylierungsdefekt ergaben (11 Patienten, 13 Hybridisierungen) und iii.) Patienten mit klassischen Imprintingsyndromen (sechs Patienten, sieben Hybridisierungen) (siehe Kapitel 2.1.1.8). Als Kontrollkollektiv wurde die DNA-Methylierung geprägter Genorte bei 39 SGA-geborenen Kindern (47 Hybridisierungen) analysiert. Diese SGA-geborenen Kinder, die hier als Kontrollen dienten, waren erneut Teil des zuvor beschriebenen Kollektivs SGA-geborener Kinder (vergl. Kapitel 3.5.1). Die SGA-geborenen Kinder, die im MLMD Teilprojekte als Kontrollkollektiv verwendet wurden, zeigten keine DNA-Methylierungsveränderung an 10 geprägten Genorten (Genorte: *PLAGL1*, *IGF2R*, *GRB10*, *H19*, *IGF2*, *MEG3*, *NDN*, *SNRPN*, *NESP* und *NESPAS*) (Bisulfit-Pyrosequenzierungsergebnisse bereits publiziert [169]). Des Weiteren wiesen die SGA-geborenen Kinder keine Dysmorphiezeichen auf, waren nicht entwicklungsverzögert (außerhalb der SGA-Geburtlichkeit) und erhielten keine Wachstumshormontherapie.

Es wurden die DNA-Methylierungsdaten von insgesamt 95 Hybridisierungen, die auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips erfolgten, analysiert. Die Bestimmung der LDR führte nicht zum Ausschluss einzelner Hybridisierungen. Es wurden AVG-Beta Werte von 480.112 qualitätskontrollierten Loci aus der GenomeStudio Software exportiert und mit diesen AVG-Beta Werten sowohl eine SNP- als auch eine Gesamtkorrelationsanalyse durchgeführt. Mittels SNP-Korrelationsanalyse wurde die Identität der mehrfach hybridisierten DNA-Proben sichergestellt (siehe Anhang Abbildung A9). Aufgrund der Gesamtkorrelationsanalyse wurden zwei Hybridisierungen aus den weiteren Analysen ausgeschlossen (siehe Anhang Abbildung A9).

Nach Filterung der geprägten CpG Loci wurden die AVG-Beta Werte von 887 CpG Loci aus der GenomeStudio Software exportiert (siehe Anhang Tabelle A14). Für die mehrfach hybridisierten DNA-Proben wurde zunächst der Mittelwert aus den AVG-Beta Werten je CpG Locus gebildet. Analog zu den vorangegangenen Analysen wurde, gemäß des Vorgehens von Court et al. (2013), mithilfe der Kontrollen für jeden Genort der NMB bestimmt und anschließend überprüft ob der Mittelwert der AVG-Beta Werte der Patienten außerhalb oder innerhalb dieses Bereichs liegt. Bei Proben mit einem Mittelwert der AVG-Beta Werte außerhalb des NMB wurde für den betroffenen Genort die Differenz zwischen dem Mittelwert der AVG-Beta Werte des Patienten und dem Mittelwert der AVG-Beta Werte aller Kontrollen gebildet. Differenzen  $\geq 10\%$  wurden als biologisch relevant definiert. Eine Differenz  $\leq -10\%$  bezeichnet eine Hypomethylierung und eine Differenz  $\geq 10\%$  eine Hypermethylierung im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind für die betroffenen Genorte in der Abbildung 62 gezeigt. Die gesamte Auswertung ist in der Tabelle A15 im Anhang zusammengestellt.

Die Analyse ergab für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte keine Auffälligkeiten im analysierten Kollektiv. Einer der sechs Patienten aus der Subgruppe mit klassischem Imprintingsyndrom (D10\_1559, SRS) zeigte DNA-Methylierungsveränderungen an zwei der 34 somatisch geprägten Genorte. Neben der für das Silver-Russell Syndrom klassisch betroffenen ICR1 auf Chromosom 11p15 zeigte sich eine Hypomethylierung in dem Genort *NHP2L1*. Die anderen Patienten aus dieser Subgruppe wiesen nur Syndrom-spezifische DNA-Methylierungsveränderungen an einem Genort auf. Drei der insgesamt 11 Patienten mit Verdacht auf eine Multi-Locus Methylierungsstörung zeigten DNA-Methylierungsveränderungen an mehreren Genorten. Diese drei Patienten wurden mit der Eingangsdiagnose BWS analysiert und zeigten im Einklang mit der Diagnose eine Hypomethylierung in der KvDMR1 des Chromosoms 11p15. In einer Hybridisierung konnte zusätzlich eine Hypermethylierung im *IGF1R* Genort festgestellt werden (D12\_204). Die beiden anderen Patienten waren an jeweils zwei weiteren Genorten aberrant methyliert. Ein Patient (D11\_115) zeigte neben der Hypomethylierung in der KvDMR in 11p15 eine Hypomethylierung in *ZNF597* und *BLCAP/NNAT*. Der dritte Patient (D12\_247) zeigte neben der Hypomethylierung der *KvDMR* in 11p15 auch eine Hypomethylierung in den Genorten *GRB10* und *ZNF331*.

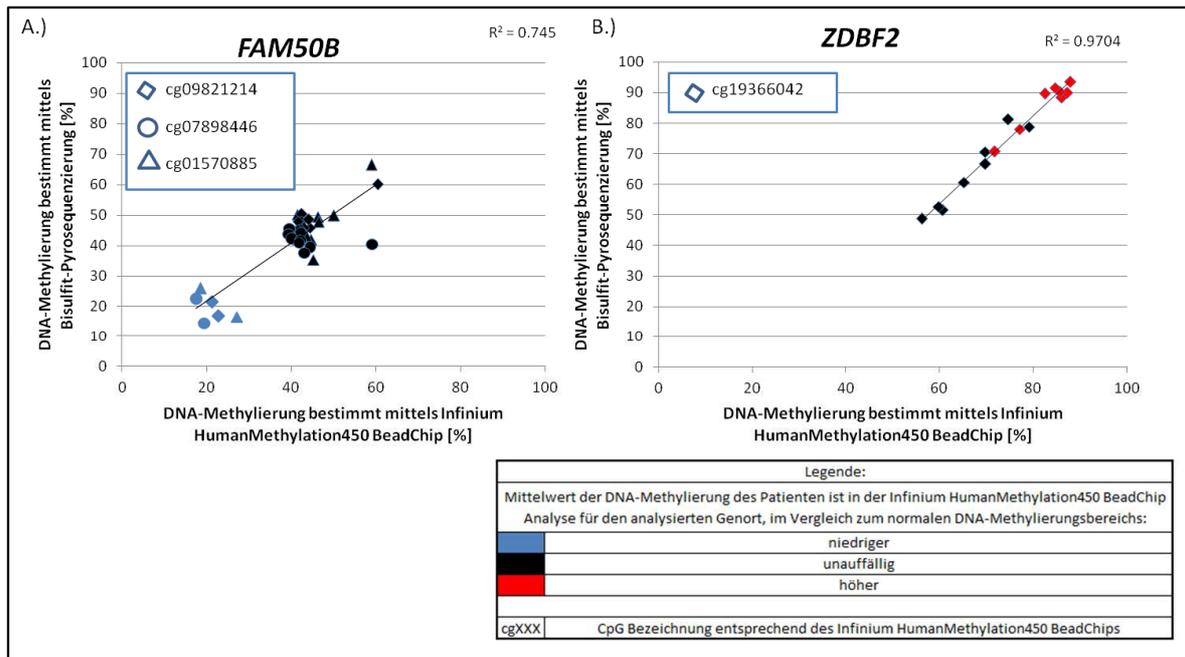


Von den 20 mit MLMD diagnostizierten Patienten konnte eine mehrfach aberrante DNA-Methylierung in Hybridisierungen von 17 Patienten auch nach der hier beschriebenen Analyseverfahren festgestellt werden. Dabei reichte die Anzahl betroffener Genorte bei diesen 17 Patienten von drei bis 28. Die am häufigsten betroffenen Genorte bei den 17 Patienten mit MLMD waren die KvDMR1 auf Chromosom 11p15 (14/17) sowie *NHP2L1* (13/17), die jeweils eine Hypomethylierung zeigten. Insgesamt wurde sowohl eine Hypomethylierung als auch eine Hypermethylierung der analysierten Genorte beobachtet. Der am häufigsten hypermethylierte Genort war *ZDBF2*, der in neun von 17 MLMD Fällen betroffen war. Neben der KvDMR und *NHP2L1* zählte dieser Genort auch zu den insgesamt gehäuft aberrant methylierten Genorten in dieser Kohorte, die bisher nicht mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind.

### ***3.6.1 Verifizierung der Befunde der DNA-Methylierungsanalyse des Patientenkollektivs mit DNA-Methylierungsstörungen an mehreren Genorten***

Die DNA-Methylierungsergebnisse für die Genorte *FAM50B* und *ZDBF2* wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung verifiziert. Die Verifizierung des cg19366042 im *ZDBF2* Gen erfolgte für 16 der 20 Patienten, die vor der hier beschriebenen DNA-Methylierungsanalyse als Patienten mit MLMD diagnostiziert wurden. Von den verbliebenen vier Fällen stand nicht mehr ausreichend DNA für diese Analysen zur Verfügung. Mithilfe des *FAM50B* Bisulfit-Pyrosequenzierassays wurde die DNA-Methylierung an drei CpG Loci analysiert. Die DNA-Methylierungsanalyse erfolgte auch hier für 16 der zuvor mit MLMD diagnostizierten Patienten, wobei die Bisulfit-Pyrosequenzierung in vier Fällen aus technischen Gründen (z.B. aufgrund der Fehlermeldung: failed reference sequence pattern, overall) nicht auswertbar war. In der Abbildung 63 sind die durch beide Messmethoden bestimmten DNA-Methylierungswerte für die analysierten Genorte gegeneinander aufgetragen.

Das Bestimmtheitsmaß zeigte für beide Genorte eine gute Korrelation zwischen beiden Messmethoden, sodass die DNA-Methylierungsergebnisse der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung für diese beiden Genorte verifiziert wurden.



**Abbildung 63:** Verifizierung der mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip erhobenen DNA-Methylierungswerte. Die Verifizierung der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Daten erfolgte für insgesamt vier CpG Loci in den zwei Genorten *FAM50B* (A) und *ZDBF2* (B). Aufgetragen sind die DNA-Methylierungswerte des jeweiligen CpG Locus gemessen mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung (Y-Achse) und Infinium HumanMethylation450 BeadChip (X-Achse). Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ist angegeben. A.) Gezeigt sind die Messwerte von 12 Patienten für drei CpG Loci (dargestellt durch drei verschiedene Symbole) im *FAM50B* Genort. Blau gefüllte Symbole gehören zu zwei Patienten (D13\_1139, D13\_1381), die nach der Infinium HumanMethylation450 DNA-Methylierungsanalyse an diesem Genort eine Hypomethylierung, aufweisen. B.) Dargestellt sind die Messwerte von 16 Patienten für das cg19366042 im *ZDBF2* Gen. Die rot ausgefüllten Symbole sind Messungen der Patienten (D13\_1139, D13\_1618, D11\_1626, D10\_1678, D13\_1140, D14\_74, D13\_1381, D14\_77), die nach der HumanMethylation450 DNA-Methylierungsanalyse an diesem Genort eine Hypermethylierung zeigen. Beide Messmethoden weisen eine gute Korrelation auf.

Als weitere Form der Verifizierung erfolgte der Vergleich der mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip generierten DNA-Methylierungsdaten mit den Ergebnissen anderer DNA-Methylierungsanalysen, die durch Kooperationspartner des Imprinting Netzwerks durchgeführt wurden (siehe Anhang Tabelle A16). Hierbei stehen die Ergebnisse der sowohl intern als auch extern durchgeführten Analysen im Einklang. Bei 38 Patienten aus dem MLMD Kollektiv zeigten die DNA-Methylierungsanalysen an zehn geprägten Genorten, die durch verschiedene Techniken sowohl intern als auch extern analysiert wurden, ein aberrantes DNA-Methylierungsverhalten vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse.

Zusammenfassend konnte die Diagnose MLMD mit dem hier entwickelten Vorgehen für insgesamt 17 von 20 Patienten bestätigt werden. Des Weiteren wurde ein Patient mit MLMD in der Subgruppe der Patienten mit klassischem Imprintingsyndrom identifiziert. Bei drei der Patienten mit dem Verdacht auf MLMD konnte der Verdacht bestätigt werden. Durch die Erweiterung des Untersuchungspanels über die bei den acht klassischen Imprintingsyndromen auffälligen Genorte hinaus konnte eine umfassende Charakterisierung der betroffenen geprägten Genorte durchgeführt

werden. Mit Ausnahme des Genorts KvDMR waren die Genorte, die bei klassischen Imprintingyndromen betroffen sind, nicht häufig aberrant methyliert. Der Genort KvDMR war am häufigsten aberrant methyliert (14/21), da die meisten MLMD Patienten als BWS oder BWS/MLMD in die vorliegende Analyse eingeschlossen wurden. Am häufigsten hypermethyliert war der Genort *ZDBF2* (9/21) und am häufigsten hypomethyliert, nach der KvDMR, war der Genort *NAP2L1* (14/21).

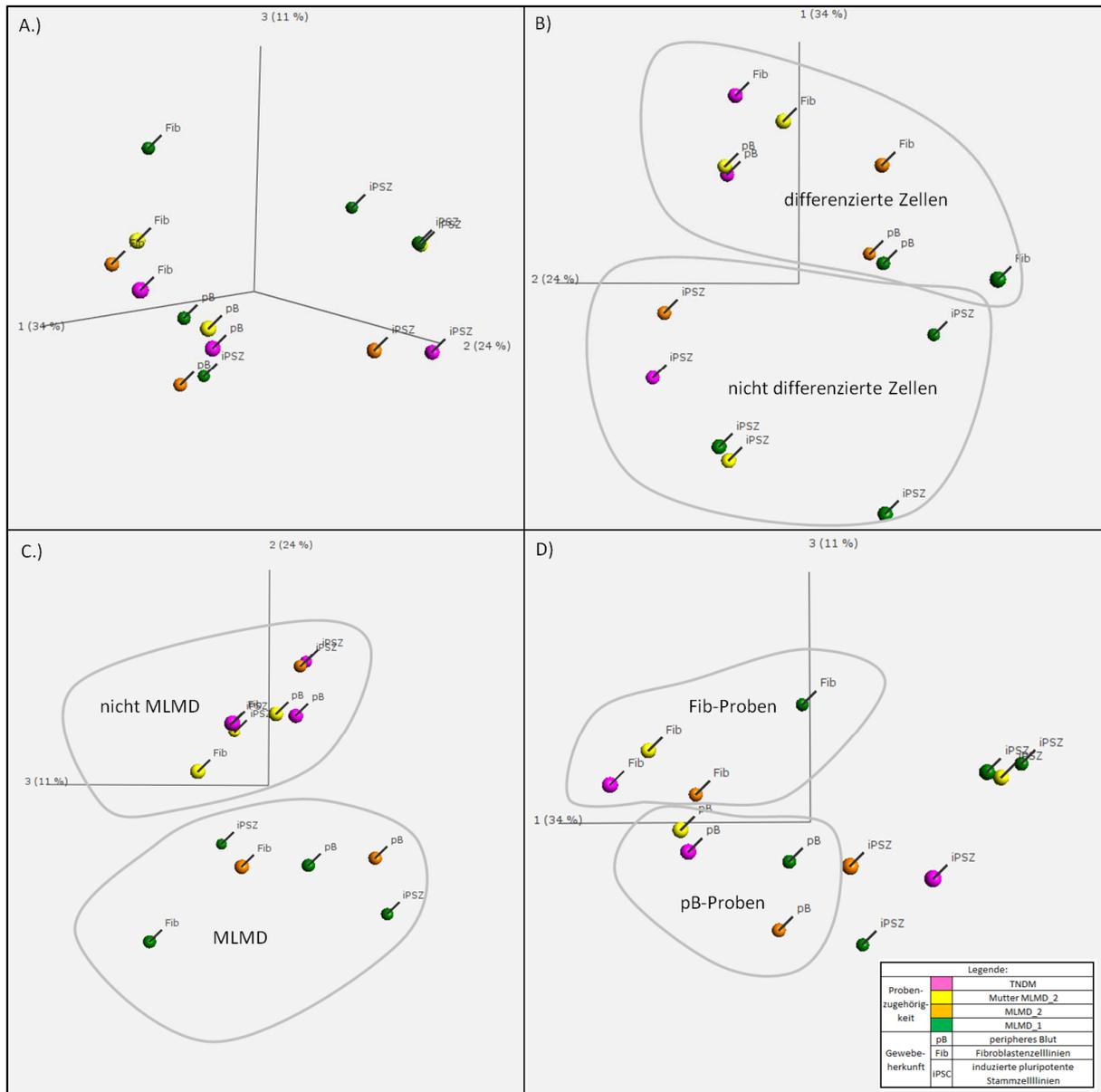
### ***3.7 DNA-Methylierung geprägter Gene bei induzierten pluripotenten Stammzellen und deren Ursprungszellen***

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde das DNA-Methylierungsmuster von geprägten Genorten in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) von Patienten mit Imprintingstörungen analysiert. Insbesondere sollte das DNA-Methylierungsmuster dieser Zellen mit dem DNA-Methylierungsmuster der Ursprungszellen verglichen werden. Die zu analysierenden iPSZ Klone wurden aus Fibroblasten von Patienten mit Imprintingstörungen (TNDM und MLMD) bzw. der Mutter eines solchen Patienten generiert. Neben der DNA-Methylierung der iPSZ Klone wurde die DNA-Methylierung in Fibroblastenzelllinien, die Ausgangsmaterial für die Reprogrammierung waren, und Zellen des peripheren Blutes derselben Person analysiert (vergl. Kapitel 2.1.1.9).

Die LDR aller Hybridisierungen war >98 %, so dass keine Hybridisierungen aus Qualitätsgründen ausgeschlossen wurden. Es wurden die AVG-Beta Werte von 482.751 qualitätskontrollierten Loci aus der GenomeStudio Software exportiert und diese anschließend zur Korrelationsanalyse verwendet. Die SNP-Korrelationsanalyse bestätigte, dass die verschiedenen DNA-Proben eines Individuums von demselben Individuum stammten. Für die SNP Loci zeigte die Korrelation zwischen den Hybridisierungen eines Individuums die höchsten Werte (siehe Anhang Abbildung A10 A). In der Gesamtkorrelation wurde die Gewebe-spezifische DNA-Methylierung deutlich. Unabhängig von analysierten Individuen zeigten DNA-Proben eines Gewebes die höchsten Korrelationskoeffizienten (siehe Anhang Abbildung A10 B). Die Korrelationsanalysen hatten keinen Probenausschluss zu Folge.

Nach Filterung für geprägte Loci wurden die AVG-Beta Werte von 888 geprägten CpG Loci aus der GenomeStudio Software exportiert (siehe Anhang Tabelle A17). Zwei DNA-Proben aus peripherem Blut und zwei DNA-Proben aus Fibroblastenzelllinien wurden als Duplikate hybridisiert. Für die weiteren Analysen wurde von den AVG-Beta Werten der Duplikate zunächst der Mittelwert jedes CpG Locus ermittelt, sodass für diese Proben jeweils der Mittelwert aus beiden Hybridisierungen in die finale Analyse einging.

Die AVG-Beta Werte wurden zunächst für eine unsupervidierte PC-Analyse herangezogen (siehe Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Unsupervidierte PC-Analyse des gesamten Datensatzes induzierter pluripotenter Stammzell-Proben und Ursprungsgewebe. Für diese Analyse wurden die AVG-Beta Werte aller qualitätskontrollierten 888 geprägten CpG Loci verwendet. Der Datensatz ist aufgebaut aus DNA-Proben von vier verschiedenen Personen, die hier mit vier verschiedenen Farben markiert sind ("TNDM": pink, Mutter "MLMD\_2": gelb, "MLMD\_2": orange und "MLMD\_1": grün). Von jeder Person gibt es mindestens drei DNA-Proben mit verschiedener Gewebeherkunft: peripheres Blut (pB), Fibroblastenzelllinie (Fib), induzierte pluripotente Stammzelllinie (iPSZ). Alle Abbildungen stellen dieselbe Analyse nur mit einer unterschiedlichen Sichtweise auf die Hauptkomponenten dar. In der Teilabbildung A.) sind alle drei Vektoren der PCA erkennbar. Diese Darstellung zeigt, dass die DNA-Proben in unterschiedliche Gruppen separieren. In den Teilabbildungen B.) bis D.) ist diese Auftrennung in verschiedene Gruppen deutlicher. In B.) erfolgt die Auftrennung entlang der Hauptkomponente 1 in differenzierte (pB und Fib) und nicht differenzierte (iPSZ) DNA-Proben. In C.) erfolgt die Auftrennung entlang der Hauptkomponente 2 in Proben von Personen ohne MLMD (rosa und gelb) und Proben von Patienten mit MLMD (orange und grün). In der letzten Teilabbildung D.) ist die Auftrennung entlang der Hauptkomponente 3 dargestellt. Die Auftrennung erfolgt gemäß der beiden Ursprungsgewebe in peripheres Blutproben (pB) und Fibroblastenzelllinien-Proben (Fib). (Darstellungsform: Mean=0)

Diese Analyse zeigte die Auftrennung des gesamten Datensatzes in verschiedene Gruppen gemäß der drei Hauptkomponenten (Abbildung 64 A), wobei diese die verschiedenen biologischen Variablen der DNA-Proben erkennen ließen. Hauptkomponente 1 separierte DNA-Proben differenzierter Gewebe (pB und Fib) von den DNA-Proben undifferenzierter induzierter pluripotenter Stammzellen (Abbildung 64 B). Hauptkomponente 2 separierte mit einer Ausnahme die DNA-Proben der Probanden ohne MLMD ("TNDM" und "Mutter MLMD\_2") von den DNA-Proben der Probanden mit MLMD ("MLMD\_1" und "MLMD\_2") (Abbildung 64 C). Die Hauptkomponente 3 schließlich trennte die DNA-Proben aus den differenzierten Geweben komplett in die peripheren Blutproben und Fibroblastenzelllinien auf (Abbildung 64 D). Von dem Probanden "MLMD\_1" wurden drei induzierte pluripotente Stammzellklone analysiert. Bemerkenswert ist, dass diese drei Klone in der PC-Analyse deutlich separieren.

Des Weiteren wurde in einer individuellen Analyse die DNA-Methylierung der somatisch und Plazenta-spezifisch geprägten Genorte analysiert. Die Analyse der somatisch geprägten Genorte verdeutlichte, dass innerhalb der verschiedenen Gewebe eines Individuums mitunter große Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte auftraten (siehe Abbildung 65). Die DNA-Proben des Patienten mit einem TNDM zeigten im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Individuen die geringste Variation in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte über alle somatisch geprägten Genorte. Wie, aufgrund der Voruntersuchungen, erwartet zeigte die Hybridisierung der DNA-Probe aus peripherem Blut allerdings einen niedrigen Mittelwert der AVG-Beta Werte für den Genort *PLAGL1* (9 %). Dies konnte auch in den anderen beiden Geweben beobachtet werden (pB-Probe: 6 %, iPSZ-Probe: 7 %), was zeigte, dass die zugrunde liegende Imprintingstörung in den untersuchten Geweben konserviert ist. Bei zwei der Gewebe der Mutter des "MLMD\_2" Patienten, die phänotypisch normal ist, fiel ein hoher Mittelwert der AVG-Beta Werte für den Genort *WDR27* auf. In der DNA-Probe aus peripherem Blut lag der Mittelwert der AVG-Beta Werte für *WDR27* bei 80 %, in der DNA-Probe aus Fibroblastenzelllinien bei 86 %. Die verschiedenen Hybridisierungen der beiden Patienten mit MLMD zeigten, wie aufgrund des MLMD erwartet, viele Mittelwerte der AVG-Beta Werte unterhalb oder oberhalb des mittleren DNA-Methylierungsbereichs. Allen Proben aus Fibroblastenzelllinien-DNA war gemeinsam, dass der Genort *BLCAP/NNAT* einen hohen Mittelwert der AVG-Beta Werte aufwies (Spanne der Mittelwerte der AVG-Beta Werte: 76 % - 87 %). Eine weitere Gemeinsamkeit waren die vielen niedrigen Mittelwerte der AVG-Beta Werte in den DNA-Proben aus induzierten, pluripotenten Stammzelllinien. Die drei induzierten pluripotenten Stammzellklone des Probanden "MLMD\_1" zeigten zudem deutliche Unterschiede in den

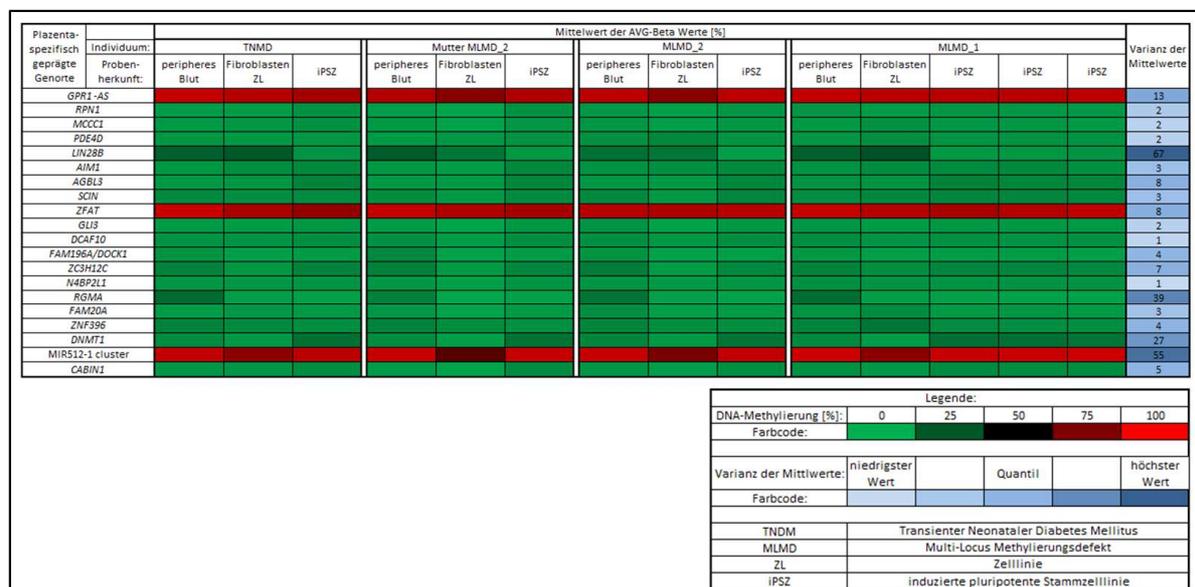
Mittelwerten der AVG-Beta Werte. Dies weist auf eine Variabilität der DNA-Methylierungswerte, in den verschiedenen reprogrammierten Klonen, hin.



**Abbildung 65:** Auswertung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die somatisch geprägten Genorte in DNA-Proben von peripherem Blut, Fibroblastenzelllinien und induzierten pluripotenten Stammzelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der DMRs der 34 somatisch geprägten Genorte für insgesamt 16 DNA-Proben, die auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array hybridisiert wurden. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte sind durch einen Farbcode dargestellt: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Alle Hybridisierungen von DNA-Proben aus induzierten pluripotenten Stammzellen zeigen große Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte. Die beiden MLMD Patienten ("MLMD\_1" und "MLMD\_2") zeigen dieses Verhalten auch in den anderen Gewebeprobe. Die DNA-Proben des Patienten mit TNDM und der "Mutter MLMD\_2" zeigen in den DNA-Proben aus peripherem Blut und Fibroblastenzelllinien viele Mittelwerte der AVG-Beta Werte, die im mittleren Bereich der DNA-Methylierung der geprägten Genorte liegen. Wie erwartet sind die Mittelwerte für den *PLAGL1* Genort in dem Patienten mit TNDM niedrig.

Die Analyse der Plazenta-spezifische geprägten Genorte ergab im Gegensatz zu den somatisch geprägten Genorten geringe Variationen der Mittelwerte der AVG-Beta Wert für die verschiedenen Gewebeprobe (siehe Abbildung 66). Wie in den Voranalysen postnataler Gewebe, zeigten auch hier die drei Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte (Spanne der Mittelwerte der AVG-Beta Werte über die drei Genorte: 67 % - 91 %). Die anderen Genorte zeigten, mit Ausnahme des Genorts *LIN28B*, auch hier wieder niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte (Spanne der Mittelwerte der AVG-Beta Werte: 3 % - 20 %). Der Genort *LIN28B* zeigte, außer in den DNA-Proben aus iPSZ, erneut das intermediäre DNA-Methylierungsmuster (Spanne der Mittelwerte der AVG-Beta Werte (iPSZ): 5 % - 8 %, Spanne der Mittelwerte der AVG-Beta Werte (pB und Fib): 16 % - 27 %). Im Vergleich zu den somatisch geprägten Genorten ergaben sich

jedoch in den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben.



**Abbildung 66:** Auswertung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte in DNA-Proben aus peripherem Blut, Fibroblastenzelllinien und induzierten pluripotenten Stammzelllinien. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der AVG-Beta Werte der DMRs der 20 Plazenta-spezifisch geprägten Genorte und die ermittelte Varianz pro Genort in den analysierten DNA-Proben. Die AVG-Beta Werte stammen von der Hybridisierung der DNA-Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte sind durch einen Farbcode angegeben: 0 % Methylierung: grün; 50 % Methylierung: schwarz; 100 % Methylierung: rot. Niedrige Werte der Varianz sind in hellblau dargestellt, je größer die Werte werden umso dunkler die Blaufärbung.

Zusammenfassend ergaben diese Untersuchungen im Teilprojekt "iPSZ Analyse", dass die AVG-Beta Werte der verschiedenen Gewebeproben aller hier analysierten Individuen zur Auftrennung dieser DNA-Proben entsprechend der Gewebe, nicht entsprechend der einzelnen Individuen, führte. Die Analyse der somatisch geprägten Genorte zeigte bei dem Patienten mit einem TNDM, dass alle drei Gewebe-Proben die Hypomethylierung des *PLAGL1* Gens aufwiesen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung des *WDR27* Genorts bei der Probandin "Mutter MLMD\_2" in den induzierten pluripotenten Stammzellen nicht erhalten blieb. Die DNA-Methylierungsanalyse zeigte für die drei induzierten pluripotenten Stammzellklone des "MLMD\_1" Probanden vor allem Variationen in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte in den somatisch geprägten Genorten. Im Allgemeinen zeigten die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte kaum Unterschiede in der DNA-Methylierung der analysierte geprägten DMRs in den verschiedenen Geweben.

### ***3.8 Zusammenfassung der vorgestellten Ergebnisse***

In dieser Arbeit wurde die DNA-Methylierung differenziell methylierter Regionen für 34 somatisch geprägte und 20 Plazenta-spezifisch geprägte Genorte untersucht. Dazu wurden insgesamt 517 Hybridisierungen auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays prozessiert. Weiterhin wurden verfügbare Daten von 171 bereits vorhandenen Hybridisierungen auf Infinium HumanMethylation27 bzw. Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays für die Analysen herangezogen.

Im ersten Teil der Auswertung konnte gezeigt werden, dass die Gewebefixierung Einfluss auf die DNA-Methylierung geprägter Genorte haben kann. Die Auswertung der DNA-Methylierungsdaten für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte aller Teilprojekte und in allen untersuchten Geweben ergab, mit Ausnahme der DNA-Proben aus Chorionzotten, ein außergewöhnlich homogenes DNA-Methylierungsmuster. Die drei Plazenta-spezifisch geprägten Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* zeigten immer hohe Mittelwerte der AVG-Beta Werte. Der Genort *LIN28B* zeigte innerhalb der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte als einziger Genort ein intermediäres DNA-Methylierungsmuster. Die anderen Plazenta-spezifisch geprägten Genorte zeigten immer niedrige Mittelwerte der AVG-Beta Werte. Innerhalb und übergreifend über die einzelnen Teilprojekte wiesen diese niedrig methylierten Genorte eine geringe Variation in den Mittelwerten der AVG-Beta Werte auf. Eine Veränderung des sonst beobachteten DNA-Methylierungsmusters der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte konnte nur in den DNA-Proben aus Dickdarmgewebe, insbesondere bei den kolorektalen Karzinomen, beobachtet werden. Hier zeigten die Genorte *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1* deutliche Veränderungen zwischen Normalgewebe- und Tumorgewebeproben. Dabei war die DNA-Methylierung dieser Genorte in Tumorgewebe signifikant erhöht. So zeigte der Genort *FAM20A* in DNA-Proben aus Normalgewebe von Dickdarmbiopsaten einen Mittelwert der AVG-Beta Werte von 8 %, in DNA-Proben aus CRC-Gewebe lag der Mittelwert der AVG-Beta Werte bei 22 %. Damit zeigte sich für diese Genorte eine Annäherung der DNA-Methylierung in Tumoren hin zur DNA-Methylierung bestimmt in Chorionzotten, bei denen ein Mittelwert der AVG-Beta Werte von 77 % detektiert wurden. Der direkte Vergleich der DNA-Methylierung der anderen drei genannten Genorte in Tumor- und Plazenta-Proben konnte nicht durchgeführt werden, da diese Genorte nicht auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip, mit dem die Chorionzotten analysiert wurden, abgedeckt sind. Bei den konstitutionellen Störungen wurde nur ein einziges mal, für den Genort *MCCC1*, eine aberrante DNA-Methylierung eines Plazenta-spezifisch geprägten Genorts detektiert. Sogar nach dem Prozess der Reprogrammierung zeigte das DNA-Methylierungsmuster der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte kaum Variationen im Vergleich zum Muster der postnatal entnommenen Gewebe. Somit kann gezeigt werden, dass die DNA-

Methylierung Plazenta-spezifisch geprägter Gene in den untersuchten Geweben vergleichsweise stabil ist, und sich nur in Tumoren und nur in einem Teil dieser DMRs, verändert.

Die Analysen der somatisch geprägten Genorte zeigten deutlich mehr Variationen innerhalb der verschiedenen analysierten Gewebe im Vergleich zu den Plazenta-spezifisch geprägten Genorten. Sowohl bei den somatischen Erkrankungen (CRC und NAFLD) als auch bei den konstitutionellen Störungen konnten Veränderungen der DNA-Methylierung innerhalb der somatisch geprägten Genorte detektiert werden. Auffällig war dabei, dass sehr viel häufiger somatisch geprägte Genorte verändert waren, die bis jetzt keinem klassischen Imprintingsyndrom zugeordnet sind, als Genorte, die einem klassischen Imprintingsyndrom zugeordnet werden können. So sind in den drei Kollektiven mit verschiedenen Entwicklungsstörungen (96 SGA-geborene Kinder, 23 Patienten mit BEK und 81 Patienten mit MR) die am häufigsten veränderten Genorte *ZNF331* (16/200) *WDR27* (10/200) und *BLCAP/NNAT* (8/200). Im Vergleich dazu waren nur drei Genorte die mit klassischen Imprintingsyndromen assoziiert sind, bei insgesamt 3/200 Patienten betroffen, nämlich bei zwei Patienten mit TS (*MEG3* und *MEG8*) und einem Patienten mit TNDM (*PLAGL1*). Bei insgesamt 200 analysierten DNA-Proben von Patienten mit einer Entwicklungsstörung liegt damit die Inzidenz für ein klassisches, zuvor nicht diagnostiziertes Imprintingsyndrom bei 1,5 %. In denselben drei Kohorten konnten außerdem insgesamt 21 Patienten (15 SGA-geborene Kinder, 5 Patienten mit BEK, 1 Patient mit mentaler Retardierung) mit einem aberranten DNA-Methylierungsmuster an mehr als einem Genort detektiert werden. Das entspricht einer Inzidenz von 10,5 %. Zwei Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom, der Patient mit einem TNDM aus dem Kollektiv von Patienten mit einer Blasenektrophie sowie das SGA-geborene Kind mit einem TS, zeigten neben der Syndrom-spezifischen Veränderung jeweils einen weiteren Genort aberrant methyliert. Insgesamt waren in den vier Teilprojekten zu konstitutionellen Störungen der DNA-Methylierung geprägter Genorte ("SGA Analyse", "Ekstrophie Analyse", "MR Analyse", "MLMD Analyse") die beiden Genorte *IGF2R* und *MEG8* in allen Analysen mindestens bei einem Individuum aberrant methyliert. In drei der Teilprojekte waren u.a. die Genorte *NHP2L1*, *MCTS2/HM13*, *IGF1R* und *MEG3* betroffen. Die somatisch geprägten Genorte zeigten außerdem eine deutliche Veränderung der DNA-Methylierung nach Reprogrammierung dahingehend, dass viele dieser Genorte in iPSZ hypomethyliert vorlagen. Somit wiesen die übergeordneten Analysen deutliche Unterschiede im DNA-Methylierungsverhalten somatisch und Plazenta-spezifisch geprägter Gene nach.

## ***4 Diskussion***

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die DNA-Methylierung aller aktuell bekannten geprägten Gene des Menschen systematisch in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sowie in benignen und malignen Erkrankungen zu charakterisieren. Die Charakterisierung der DNA-Methylierung erfolgte dabei in 10 Teilprojekten, deren Ergebnisse im vorhergehenden Kapitel vorgestellt wurden. Im folgenden Teil der Arbeit sollen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse in den gegenwärtigen Wissenstand eingeordnet werden. Zunächst wird auf die technischen Aspekte und anschließend auf die inhaltlichen Aspekte eingegangen.

### ***4.1 Technische Aspekte***

Die zuvor dargestellten Ergebnisse wurden hauptsächlich durch die Verwendung des Infinium HumanMethylation450 BeadChips generiert. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden zwei Techniken, die Bisulfit-Pyrosequenzierung und die MS-MLPA, verwendet. Bis zum Erhalt des DNA-Methylierungswerts muss die zu analysierende Probe über mehrere Teilschritte prozessiert werden, die im Kapitel Material und Methoden (vergl. Kapitel 2) detailliert dargestellt wurden. Der potenzielle Einfluss der einzelnen Teilschritte auf das erzielte Ergebnis soll in dem folgenden Kapitel dargestellt werden.

Als erste zu bearbeitende Frage wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Gewebefixierung einen Einfluss auf die Bestimmung der DNA-Methylierung mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChips haben kann. Die zusätzlich diskutierten Einflussgrößen wurden nicht explizit als Fragen in der Arbeit behandelt, deren potenzieller Einfluss ist jedoch aus anderen Studien bekannt. Da durch das Studiendesign auch diese Einflussgrößen berücksichtigt wurden, sollen diese Einflussgrößen im Folgenden ebenfalls diskutiert werden.

#### ***4.1.1 Gewebefixierung***

Bevor entnommenes Gewebe analysiert werden kann, wird es in der Regel fixiert. Üblicherweise werden Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet [182]. Man spricht dann von FFPE- (formalin fixed, paraffin-embedded) Proben. Auch wenn in einer Studie aus dem Jahre 2000 gezeigt werden konnte, dass die FFPE-Fixierung nicht direkt die Methylierung des Cytosins verändert [183], haben andere Studien nachgewiesen, dass die Formalinfixierung u.a. zur Fragmentierung der DNA führt [184]. Fragmentierte DNA eignet sich weniger gut für die gesamtgenomische Amplifikation [185]. Die gesamtgenomische Amplifikation ist jedoch ein wichtiger Schritt bei der Prozessierung von

DNA-Proben zur Bestimmung der DNA-Methylierung mittels BeadChip Technologie, sodass diese Art der Fixierung eher als ungeeignet für solche Proben erscheint [185]. Um trotzdem Standard-Formalin fixierte Gewebe zur DNA-Methylierungsanalyse mittels BeadChip Technologie verwenden zu können, wurden verschiedene Protokolle zur Vorbehandlung der DNA-Proben entwickelt. Diese Vorbehandlungen werden als *restore* (wiederherstellen) oder *repair* (reparieren) Protokolle bezeichnet. Sie haben die Aufgabe, durch z.B. Ligation der DNA-Stücke die fragmentierte DNA für die gesamtgenomische Amplifikation zugänglich zu machen.

Die erste Frage, die es in der vorliegenden Arbeit zu beantworten galt, war, ob die Art der Gewebefixierung zu einer Änderung des DNA-Methylierungsmusters geprägter Gene führt (Teilprojekt "HOPE"). Zur Beantwortung dieser Frage wurde die DNA-Methylierung geprägter Gene in FFPE-Proben sowie in kryo- und HOPE fixierten Gewebeproben untersucht. Um den tatsächlichen Einfluss der Standard-Formalin Fixierung auf die DNA-Methylierungsbestimmung zu analysieren, wurden die Standard-Formalin fixierten Proben nicht mittels *restore* Kit vorbehandelt. Die durchgeführten Analysen ergaben Unterschiede in der DNA-Methylierung geprägter Genorte in verschieden fixierten Gewebeproben. So konnte z.B. mittels unsupervidierter hierarchischer Clusteranalyse gezeigt werden, dass die AVG-Beta Werte von 115/889 geprägten CpGs den gesamten Datensatz der unterschiedlich fixierten Lungenproben in zwei Cluster auftrennen. Ein Cluster wurde durch die Gruppe der Standard-Formalin fixierten Proben und das zweite Cluster durch die Gruppe der kryokonservierten und HOPE fixierten Proben gebildet. Des Weiteren konnte in der individuellen Analyse der somatisch geprägten Genorte gezeigt werden, dass die Standard-Formalin fixierten Gewebeproben in den zwei Genorten *KvDMR* und *MEG8* niedrigere Mittelwerte der AVG-Beta Werte aufwiesen als die kryokonservierten und HOPE fixierten Gewebeproben desselben Patienten. Das Ergebnis der Analysen war, dass sich die DNA-Methylierungsergebnisse der DNA-Proben aus HOPE fixiertem Lungengewebe und kryokonservierter Lungengewebeproben mehr ähneln, als es die Ergebnisse der beiden so asservierten Proben im Vergleich zu den Standard-Formalin fixierten Gewebeproben taten.

Analysen zum Einfluss der Gewebefixierung und damit zur Verwendbarkeit von FFPE-Material zur DNA-Methylierungsanalyse mittels BeadChip Technologie sind auch bereits veröffentlicht. So analysierten z.B. Jasmine et al. die Verwendbarkeit von FFPE-Material für die DNA-Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation27 BeadChips [186]. Die Autoren untersuchten die DNA-Methylierung in Tumor- und Normalgewebe von 12 FFPE-Proben und 12 kryokonservierten (fresh-frozen, FF) Proben, wobei pro Individuum je eine Probe mittels beider Techniken fixiert wurde [186]. Nachdem DNA aus FFPE-Material extrahiert wurde, erfolgte der *restore* Prozess entsprechend eines Protokolls von Thirlwell et al. [187]. Die Autoren zeigten u.a.,

dass der größte Anteil der Varianz zwischen den DNA-Proben des gesamten Datensatzes (FFPE und FF, Normal- und Tumorgewebeproben) auf die Fixierung und nicht auf den Gewebetyp zurückzuführen war [186]. In einer weiteren Studie zum Thema Gewebefixierung und DNA-Methylierungsanalyse untersuchten Moran et al. acht verschiedene Tumorentitäten, wobei von jedem Patienten zwei Gewebeproben entnommen und unterschiedlich fixiert wurden [188]. Die Autoren analysierten u.a. die Hybridisierungsqualität, indem sie die Anzahl der Loci mit einem  $\text{DetPval} < 0,01$  für beide Fixierungsgruppen ermittelten [188]. Sie erhielten für die FF-Proben eine mittlere Detektionsrate von 99,93 % und für die FFPE-Proben eine mittlere Detektionsrate von 99,65 %. Diese beiden vorgestellten Studien von Jasmine et al. und Moran et al. zeigen, dass DNA-Proben aus FFPE-Material nach einer Vorbehandlung durch ein restore Protokoll für die DNA-Methylierungsbestimmung mittels BeadChip Technologie verwendet werden können. Dabei ist zu bedenken, dass trotz restore Protokoll artifizielle DNA-Methylierungsunterschiede zwischen DNA-Proben aus FFPE- und FF-Material auftreten können. Daher sollten die Ergebnisse von DNA-Proben aus FFPE-Material mittels einer zweiten Methode verifiziert werden.

Da restore Methoden zeitintensiv und kostenintensiv sind [189], wurden weitere Methoden zur Probenfixierung entwickelt. Andersen et al. verglichen hierzu die DNA-Methylierung von DNA-Proben aus FFPE- und FF-Material sowie PAXgene fixierte Gewebeproben. Die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) zeigten zwischen PAXgene und FF-Proben ähnlichere Ergebnisse als zwischen den FFPE- und FF-Proben [189]. Als weitere Alternative zur FFPE-Fixierung wird die HOPE-Fixierung diskutiert [166]. Dabei zeigten erste genannte Analysen unter Mitwirkung der Verfasserin, dass die DNA-Methylierung in DNA-Proben aus HOPE fixiertem Gewebe der DNA-Methylierung in DNA-Proben aus FF-Gewebe ähnlicher ist als der DNA-Methylierung in DNA-Proben aus FFPE-Gewebe [167]. Im Gegensatz zu den genannten Analysen, bei denen ein großer Teil der CpGs extreme DNA-Methylierungswerte aufwies (vollmethyliert oder unmethyliert), wurden in der vorliegenden Arbeit gezielt geprägte Gene analysiert (hemi-methyliert). In diesem Bereich sind die Meßungenaugigkeiten des verwendeten Arrays höher als für die extremen Werte der DNA-Methylierung [69]. Trotzdem ergaben die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen ähnliche Befunde wie die gesamtgenomischen Analysen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Frage 1 ergaben, dass die Gewebefixierung einen Einfluss auf die mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip bestimmten DNA-Methylierungswerte geprägter Gene haben kann. Die publizierten Analysen befassten sich nie explizit mit dem Einfluss der Gewebefixierung auf die DNA-Methylierung geprägter Genorte. Generell zeigen die publizierten Analyseergebnisse, dass die BeadChip Technologie für die

Analyse von DNA-Proben aus FFPE-Material prinzipiell einsetzbar ist aber auch, dass es zu Veränderungen der DNA-Methylierungswerte führen kann. Aufgrund der Ergebnisse aus der eigenen Analyse und aus publizierten DNA-Methylierungsanalysen wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nur kryokonservierte oder nicht konservierte Gewebe für die durchgeführten Analysen verwendet.

#### **4.1.2 DNA-Extraktion**

Der Einfluss der DNA-Extraktionsmethode auf die Bestimmung der DNA-Methylierung geprägter Gene mittels BeadChip Technologie war zwar nicht eine direkt Fragestellung der vorliegenden Arbeit, beeinflusste jedoch das Studiendesign. Aus der Literatur ist bekannt, dass die DNA-Extraktion einen Einfluss auf die DNA-Methylierung haben kann. So wurde in einer Studie von Soriano-Tárraga et al. die genomweite DNA-Methylierung mithilfe der luminometric methylation assay (LUMA) Technologie in DNA-Proben, die durch die drei verschiedenen Methoden Autopure LS (Qiagen), Puregen TM (Gentra Systems) und Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) extrahiert wurden, analysiert [190]. Die Autoren konnten zeigen, dass die Ergebnisse der DNA-Methylierung abhängig von der Extraktionsmethode sind [190]. Die Autoren vermuten, dass während der DNA-Extraktion oxidative Prozesse zum Verlust der Cytosinmethylierung beitragen könnten [190]. Dabei scheinen einige DNA-Extraktionsmethoden anfälliger für oxidative Prozesse als andere zu sein [190]. Diese Prozesse könnten prinzipiell auch DNA-Methylierungsergebnisse anderer Techniken, z.B. der hier verwendeten Bisulfit-Pyrosequenzierung und BeadChip Technologie, beeinflussen.

Neben der erwähnten gibt es kaum vergleichende Studien zur DNA-Methylierungsanalyse und dem Einsatz verschiedener DNA-Extraktionsmethoden. Studien zu einer möglichen Abhängigkeit der DNA-Methylierung geprägter Gene von der DNA-Extraktionsmethode wurden, soweit bekannt, bisher nicht veröffentlicht.

Zusammenfassend lässt sich die Abhängigkeit der DNA-Methylierung von der Extraktionsmethode nicht ausschließen, sodass, wenn möglich, nur identisch extrahierte DNA-Proben gemeinsam ausgewertet werden sollten. Das war in der vorliegenden Arbeit nur für das Teilprojekt "Ekstrophie Analyse" nicht möglich. Innerhalb dieser Analyse sollten mittels MS-MLPA drei aberrante DNA-Methylierungsergebnisse verifiziert werden. Lediglich eines der drei aberranten DNA-Methylierungsergebnisse konnte verifiziert werden. Eine mögliche Ursache der zwei Falsch-Positiven Ergebnisse könnte darin liegen, dass die jeweils verwendeten Kontroll-DNA-Proben durch zwei unterschiedliche Kits extrahiert wurden.

### **4.1.3 Natriumbisulfit-Konvertierung**

Sowohl für die Analyse mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip, als auch für die Bisulfit-Pyrosequenzierung muss die einzusetzende DNA-Probe zunächst Natriumbisulfit-konvertiert werden. Die Behandlung mit Natriumbisulfit dient dabei der Umwandlung unmethylierter Cytosinbasen in der einzelsträngigen DNA-Sequenz zu Uracil, welches in der folgenden Amplifikationsreaktion durch Thymin ersetzt wird. Methylierte Cytosine gehen aus dieser Reaktion unter den gewählten Bedingungen als Cytosine hervor [191]. Für die anschließende Bestimmung der DNA-Methylierung wird das Verhältnis von T/C bzw. A/G zugrunde gelegt. Die vollständige Umwandlung aller unmethylierten Cytosine in Uracil ist daher für die korrekte Bestimmung der DNA-Methylierung essenziell. Der Schritt der Natriumbisulfit-Konvertierung ist für die daran anschließenden Methoden der DNA-Methylierungsbestimmung wesentlich und kann großen Einfluss auf die DNA-Methylierungsdaten haben. Auch wenn dies keine explizit zu beantwortende Frage in der vorliegenden Arbeit war, sollte dieser Einfluss und die damit einhergehenden Konsequenzen für das Studiendesign der vorliegenden Arbeit erläutert werden.

- Eine unvollständige Konvertierung der gDNA-Proben kann durch die nicht vollständige Denaturierung der doppelsträngigen DNA oder durch Renaturierung der DNA-Stränge verursacht werden. Beide Szenarien führen zu einer unvollständig ablaufenden Natriumbisulfit-Konversion und in der Folge zu falsch positiven Ergebnissen in der DNA-Methylierungsanalyse [192], [173]. Um die vollständige Konvertierung der gDNA zu kontrollieren, wurden bei der Bisulfit-Pyrosequenzierung zusätzliche Konversionskontrollen eingebaut (vergl. Kapitel 2.2.9.3). Diese Kontrollen ergaben in den hier durchgeführten Analysen für alle DNA-Proben eine vollständige Konversion der zu analysierenden DNA-Sequenz.
- Die chemische Reaktion der Konvertierung erfolgt unter Bedingungen, die zur Fragmentierung der DNA und nachfolgend zu einer unvollständigen oder ausbleibenden Amplifikation führen können [193]. Die Amplifikation der zu analysierenden DNA-Sequenz wurde für die Bisulfit-Pyrosequenzierung mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Nur DNA-Proben, die auf dem Agarosegel eine ausreichend starke Bande aufwiesen und damit eine gute Amplifikationseffizienz zeigten, wurden anschließend zur Bisulfit-Pyrosequenzierung eingesetzt (vergl. Kapitel 2.2.9.1).
- Es gibt verschiedene Kits zur Natriumbisulfit-Konvertierung genomischer DNA. Für einige Methoden der DNA-Methylierungsbestimmung werden vom Hersteller eigens optimierte Konversionskits, mit Angaben zur Konversionseffizienz, empfohlen. In einer Studie aus dem Jahre 2014 verglichen Holmes et al. neun verschiedene Konversionskits [194]. Dabei wurden u.a. die Ausbeute und Effizienz der Konversionskits analysiert. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass alle

untersuchten Parameter abhängig vom Kit variieren können [194]. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit abhängig von der Methode zur Bestimmung der DNA-Methylierung das Konversionskit gewählt (vergl. Kapitel 2.2.8). Für die hier durchgeführten Analysen wurden folglich alle DNA-Proben, die mittels BeadChip Technologie analysiert wurden, mit dem gleichen Kit konvertiert (EZ DNA Methylation Kit, Konversionseffizienz laut Hersteller: >99 %). Das gleiche galt auch für die mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierten DNA-Proben (EpiTect Bisulfite Kit, Konversionseffizienz laut Hersteller: 99,4 % - 99,8 %). Somit wurde der Einfluss des Konversionskits auf die ermittelten Ergebnisse minimiert. Darüber hinaus wurden an einigen Stellen der vorliegenden Arbeit DNA-Proben sowohl mittels BeadChip, als auch mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert und die DNA-Methylierungswerte anschließend verglichen. Diese Analysen zeigten vergleichbare Ergebnisse der DNA-Methylierung, sodass der Einfluss des Konversionskits auf die hier erhobenen DNA-Methylierungsdaten, wenn vorhanden, minimal sein muss.

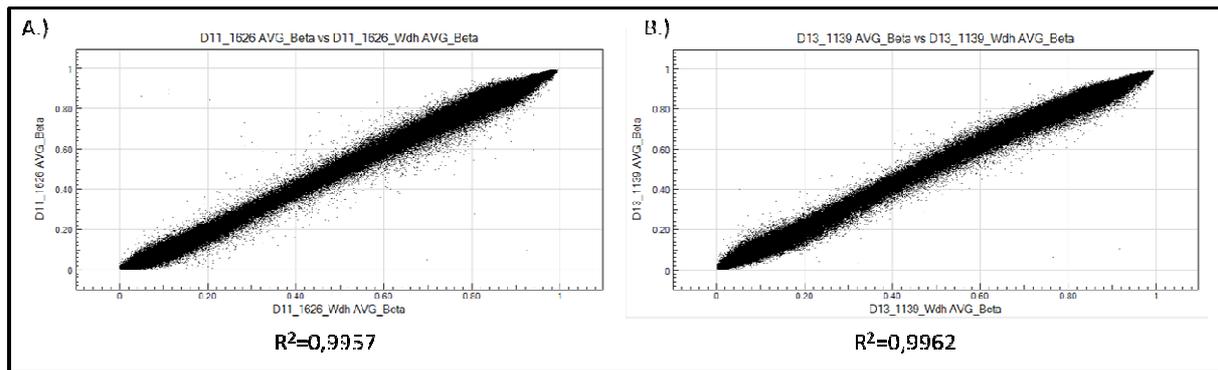
- Des Weiteren führt die Reduktion des Vier-Basencodes auf einen Drei-Basencode zu einer reduzierten Komplexität der konvertierten DNA-Sequenz. Zum einen ist daher die Auswahl optimaler Primer für die PCR-Reaktion erschwert, zum anderen können längere Sequenzabschnitte entstehen, die aus der gleichen Base (sogenannte A oder T-Stretches) aufgebaut sind. Diese Abschnitte können dazu führen, dass die DNA-Polymerase vermehrt Fehler bei der Synthese des komplementären DNA-Strangs macht [195]. Damit derartig Stretches in der Bisulfit-Pyrosequenzierreaktion möglichst wenig negative Auswirkungen haben, wurden nach solchen Stretches zusätzliche Nukleotide in die Dispersionsreihenfolge eingebaut, die dazu dienten, in den neu-synthetisierten DNA-Strängen alle Stretches mit dem entsprechenden Nukleotid aufzufüllen (vergl. Kapitel 2.2.9.3)

#### ***4.1.4 BeadChip Technologie***

Für die Analyse der DNA-Methylierung wurden alle DNA-Proben zunächst auf Infinium HumanMethylation27 BeadChip Arrays bzw. auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays hybridisiert. Die BeadChip Technologie, insbesondere der Infinium HumanMethylation450 BeadChip, ist eine kosteneffiziente, dabei gleichzeitig hochauflösende und daher häufig eingesetzte Methode zur Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung [174]. Im Folgenden sollen die Vor- und Nachteile der BeadChip Technologie diskutiert werden. Wie im Kapitel der Bisulfit-Konvertierung zuvor waren die Vor- und Nachteil dieser Methode keine inhaltlich zu beantwortende Frage der vorliegenden Arbeit. Das Wissen darum hatte jedoch Konsequenzen für die gewählte Vorgehensweise in Durchführung und Auswertung der Daten, sodass die Vor- und Nachteile und die Konsequenzen daraus im Folgenden verdeutlicht werden sollen. Der Fokus dieses Abschnitts liegt dabei auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip, weil dieser im Rahmen der vorliegenden

Arbeit für die meisten Analysen verwendet wurde. Zunächst werden die Vorteile dieser Technologie dargestellt.

- Ein Vorteil der Infinium HumanMethylation450 BeadChips liegt darin, dass pro BeadChip 12 DNA-Proben parallel hybridisiert werden können [196]. Werden mehrere BeadChips parallel prozessiert, können in der manuellen Durchführung bis zu acht BeadChips (96 DNA-Proben) parallel bearbeitet werden. Durch die Bearbeitung von DNA-Proben in großen Ansätzen, kann das Auftreten Batcheffekt verursachender Faktoren, z.B. unterschiedliche Laborbedingungen, reduziert werden. Dieser Vorteil in der Prozessierung von BeadChips wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt indem, wenn möglich, alle DNA-Proben eines Projekts parallel prozessiert wurden.
- Die 65 rs Loci des Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays können genutzt werden, um als Replikate hybridisierte und annotierte DNA-Proben zu überprüfen [197]. Die Replikate müssen für diese 65 rs Loci identische AVG-Beta Werte aufweisen. Dabei ist zu beachten, dass eine Diskrepanz der AVG-Beta Werte der 65 rs Loci bei Replikaten eindeutig auf eine Vertauschung hinweist, wohingegen dieselben AVG-Beta Werte eine Vertauschung nicht ausschließen können, da die Anzahl der 65 rs Loci nicht ausreicht, um zwei Individuen sicher zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden die 65 rs Loci verwendet, um dieselbe Herkunft von mehrfach hybridisierten DNA-Proben mittels SNP-Korrelation zu kontrollieren.
- Durch die Nutzung der GenomeStudio Software können schnell und bedienerfreundlich Qualitätsparameter, z.B. LDR für p-Wert 0,01 oder LDR für p-Wert 0,05 sowie DetPVal-Einstellungen, überprüft und neue Einstellungen vorgenommen werden [174]. Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Qualitätsparameter wurden in Anlehnung zu bereits publizierten Datensätzen gewählt [198].
- Durch die Hybridisierung von technischen Replikaten auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips wurde gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit von Duplikaten mittels dieser Technik sehr gut ist [174]. Bibikova et al. veröffentlichten für technische Replikate ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,992$  [174]. In einer in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analyse von technischen Replikaten konnten Bestimmtheitsmaße von  $R^2=0,996$  ermittelt werden (siehe Abbildung 67). Neben der sehr guten Reproduzierbarkeit von DNA-Methylierungswerten mittels BeadChip Technologie spricht auch die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit unabhängigen, zur Verifizierung eingesetzten Methoden für technisch valide Messungen (vergl. Kapitel 4.1.5).
- Der größte Vorteil der genutzten Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays im Zusammenhang mit der hier durchgeführten Studie ist, dass durch die Veröffentlichung von Court et al. positionsgenau CpGs in DMRs geprägter Gene analysiert werden konnten, die von den Autoren bereits umfangreich charakterisiert wurden [70].



**Abbildung 67:** Korrelationsanalyse von technischen Replikaten. Anhand zweier mehrfach hybridisierter DNA-Proben wurde die Reproduzierbarkeit der DNA-Methylierungswerte, bestimmt mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip, analysiert. Das Bestimmtheitsmaß für die Replikate der DNA Probe D11\_1626 (A) sowie das Bestimmtheitsmaß der Replikate für die DNA-Probe D13\_1339 (B) zeigen, dass die DNA-Methylierungswerte gut reproduzierbar sind.

Folgende Limitationen sind für die Infinium HumanMethylation450 BeadChip Technologie bekannt.

- In einer Publikation von Chen et al. wurde beschrieben, dass einige Sondensequenzen der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Beads nicht immer spezifisch eine bestimmte DNA-Sequenz binden, sondern auch kreuzhybridisieren können [199]. Die Autoren beschrieben u.a. autosomale Sondensequenzen, die eine bis zu 94%ige Sequenzhomologie zu gonosomalen Sonden aufweisen [199]. Von den hier analysierten 891 CpG Loci zeigen die Sonden von 17 CpG Loci (1,9 %, sechs somatisch geprägte Genorte und zwei Plazenta-spezifisch geprägte Genorte), Sequenzhomologien zu anderen autosomalen Bereichen. Um den potenziellen Einfluss dieser kreuzhybridisierenden Sonden zu ermitteln, wurde die Varianz der DNA-Methylierungswerte (AVG-Beta\*100) dieser potenziell von der Kreuzhybridisierung betroffenen 17 Sonden in den vier Normalgewebedatensätzen aus Kapitel 3.3.2 ermittelt. Die höchste Varianz wurde für das CpG cg08449389 (Chr. 15 imp. Region) mit einem Varianzwert von 2,3 ermittelt. Die zweithöchste Varianz wurde für das CpG cg00374016 (Chr. 15 imp. Region) mit einem Wert von 1,8 und die dritthöchste Varianz für das CpG cg11044575 (*LIN28B*) mit einem Wert von 1,6 ermittelt. Die restlichen 14 CpGs zeigten eine Varianz <0,9. Bei den drei CpGs mit einem hohen Wert der Varianz war auffällig, dass die Hybridisierungen des Kolongewebes deutlich höhere DNA-Methylierungswerte aufwiesen als die drei anderen Gewebe, sodass vermutlich die relativ hohe Varianz in der DNA-Methylierung durch die verschiedenen Gewebe bedingt ist und nicht durch kreuzhybridisierende Sonden. Außerdem wurden alle betroffenen Genorte von mehr als einer Sonde abgedeckt und der Mittelwert der AVG-Beta Werte je Genort analysiert, daher sollte der Einfluss der kreuzhybridisierenden Sonden sehr gering sein.
- Es ist des Weiteren bekannt, dass SNPs innerhalb der Sondensequenz Einfluss auf die Hybridisierung der DNA-Fragmente haben und damit zu einer Verzerrung der DNA-Methylierungswerte beitragen können [196]. Chen et al. veröffentlichten neben

kreuzhybridisierenden Sonden auch Sonden, die innerhalb des zu analysierenden CpGs SNPs beinhalten können, Sonden, die SNPs an der Position der Einzelbasenverlängerung aufweisen können, und Sonden, die innerhalb der gesamten Sondensequenz SNPs enthalten können [199]. Der Abgleich dieser SNPs beinhaltenden Sonden ergab, dass 43 % der Sonden der hier analysierten CpGs mindestens einen SNP innerhalb der Sondensequenz aufweisen. Ein SNP in der Sondensequenz wäre insbesondere für die Auswertung der Genorte von Bedeutung, die durch wenige CpGs abgedeckt sind. Dazu zählen die drei Genorte *IGF2R*, *WDR27* und *ZNF597*, die jeweils nur durch zwei CpGs je Genort repräsentiert werden und der Genort *MEG8*, der durch nur ein CpG repräsentiert wird. Für diese vier Genorte beschreiben Chen et al. für eine der zwei Sonden des Genorts *ZNF597* zwei potenziell auftretende SNPs [199]. Die DNA-Proben die eine aberrante DNA-Methylierung in dem Genort *ZNF597* aufwiesen, zeigten für beide CpGs des Genorts ähnliche AVG-Beta Werte, sodass ein potenzieller Einfluss eines SNPs unwahrscheinlich ist.

Die Analyse zur SNP Abfrage direkt am zu analysierenden CpG bzw. direkt an der Position der Einzelbasenverlängerung ergab, dass 7 % der hier analysierten Sondensequenzen einen SNP beinhalten können. Besonders stark würden SNPs in der Sondensequenz die DNA-Methylierung von Genorten beeinflussen, die nur von wenigen CpGs repräsentiert sind. In der vorliegenden Analyse zeigen die Genorte, die von weniger als drei CpGs repräsentiert werden, keine SNPs in dem CpG bzw. an der Position der Einzelbasenverlängerung. Wie bei den kreuzhybridisierenden Sonden auch, wird der potenzielle Einfluss eines SNPs auf die Bestimmung eines aberranten DNA-Methylierungsmusters durch die Auswertung der AVG-Beta Werte als Mittelwerte über einen Genort minimiert.

- Eine weitere potenzielle Problemquelle des Infinium HumanMethylation450 BeadChips ist, dass auf diesem Array zwei verschiedene Technologien zur Bestimmung der DNA-Methylierung verwendet werden. Es wird die DNA-Methylierung sowohl mittels "Infinium I Methylation Assay", als auch mittels "Infinium II Methylation Assay" (vergl. Kapitel 2.2.10.1) bestimmt. Es ist bekannt, dass die Spanne der möglichen DNA-Methylierungswerte für den "Infinium II Methylation Assay" kleiner ist als für den "Infinium I Methylation Assay" (80 % vs. 100 %) [174]. Daraus ergibt sich, dass der "Infinium II Methylation Assay" weniger sensitiv für maximale Werte ist [196]. 348/891 (39 %) der hier analysierten CpG Loci sind durch den Assay Bead Typ I und 543/891 (61 %) durch den Assay Bead Typ II abgedeckt. Von den insgesamt 54 hier analysierten Genorten werden 45 von beiden Assay Bead Typen abgedeckt, ein Genort (*MEG8*) wird nur vom Assay Bead Typ I und acht Genorte nur vom Assay Bead Typ II abgedeckt (*ZDBF2*, *IGF2R*, *WDR27*, *CXORF56 pseudogene/ERLIN2*, *RB1*, *ZNF597*, *NHP2L1*, *ZFAT*). Ob ein Unterschied in den AVG-Beta Werten zwischen Bead Typ I und Bead Typ II innerhalb der als aberrant methyliert detektierten Genorte erkennbar ist, wurde beispielhaft an zwei in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Teilprojektanalysen ("MR Analyse", "SGA Analyse")

untersucht. Diese Analysen ergaben, dass bei aberrant methylierten Genorten kein Unterschied in den mittels Bead Typ I und Bead Typ II bestimmten AVG-Beta Werten festgestellt werden konnten. Von den als aberrant methyliert ermittelten Genorten in der "MR Analyse" war 1/8 Genorte durch den Bead Typ I (MEG8), 1/8 Genorte durch den Bead Typ II (*IGF2R*) und die restlichen sechs Genorte durch beide Bead Typen abgedeckt. In der "SGA Analyse" waren neun Genorte bei SGA-geborenen Kindern hypomethyliert, davon wurden vier Genorte von nur einem Bead Typ (ein Genort durch den Bead Typ I, drei durch den Bead Typ II) und fünf von beiden Bead Typen repräsentiert. Von den im selben Kollektiv als hypermethyliert ermittelten 10 Genorten wurden fünf Genorte von beiden Bead Typen und weitere fünf Genorte von nur einem Bead Typ (ein Genort durch den Bead Typ I, vier durch den Bead Typ II) abgedeckt. Diese Analysen lassen vermuten, dass die unterschiedliche Spanne der maximalen DNA-Methylierungswerte, die mittels beider Bead Typen bestimmt werden können, keinen Effekt auf die als aberrant methyliert detektierten Genorte hat. Außerdem wurde ein Genort als aberrant methyliert definiert, wenn er außerhalb des normalen DNA-Methylierungsbereichs (NMB) lag. Der NMB wiederum wurde durch die AVG-Beta Werte von Kontrollen gebildet, die auch auf einem BeadChip hybridisiert wurden. Daher wird sich eine unterschiedliche Messung der DNA-Methylierung durch die verschiedenen Assay Bead Typen gleichermaßen auf den NMB und die AVG-Beta Werte der Patienten auswirken. Darüber hinaus wurden aberrante DNA-Methylierungsergebnisse mit unabhängigen Techniken verifiziert.

- Es ist bekannt, dass die BeadChip Technologie stark von Batcheffekten abhängig ist [200], [201]. Dabei können Laborbedingungen, Reagenzienchargen und durchführende Individuen eine Einflussgröße darstellen [200]. Neben diesen technisch bedingten Batcheffekten hat sich in den letzten Jahren herauskristallisiert, dass die Position der hybridisierten DNA-Proben auf dem BeadChip selbst auch einen Effekt auf die AVG-Beta Werte haben kann [202]. Den technisch bedingten Batcheffekten wurde in der vorliegenden Arbeit versucht vorzubeugen, indem wenn möglich alle DNA-Proben eines zu analysierenden Datensatzes von derselben Person parallel hybridisiert wurden.
- Um Batcheffekten und DNA-Methylierungsunterschieden bedingt durch die verschiedenen Assay Bead Typen zu begegnen, wurden für die Auswertung der AVG-Beta Werte verschiedene Methoden zur zusätzlichen Normalisierung der Daten publiziert [203]. Dabei zeigte sich jedoch, dass Methoden der Normalisierung Batcheffekte nicht komplett neutralisieren können [201]. Darüber hinaus ergaben nicht veröffentlichte Analysen des Instituts für Humangenetik Kiel, dass normalisierte AVG-Beta Werte einer Verifizierung der Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode schlechter zugänglich sind. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der in der GenomeStudio Software implementierten Normalisierungsmethode keine zusätzliche Normalisierung der Daten durchgeführt.

#### **4.1.5 Verifizierung einzelner Infinium HumanMethylation450 BeadChip Ergebnisse**

Wie zuvor erwähnt, wurden aberrante DNA-Methylierungsergebnisse exemplarisch mithilfe weiterer Methoden verifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür zwei Methoden, die Bisulfit-Pyrosequenzierung und die MS-MLPA, verwendet. Im Folgenden sollen die Vor- und Nachteile der beiden Methoden dargestellt werden und darüber die Wahl dieser Methoden als Verifizierungstechniken für die hier erhobenen Daten verdeutlicht werden.

In der vorliegenden Arbeit diente in erster Linie die Bisulfit-Pyrosequenzierung der Verifizierung von DNA-Methylierungswerten. Viele Autoren verwenden diese Methode zur Verifizierung ihrer Infinium HumanMethylation450 BeadChip Daten [69], [204]. Dabei wird von einigen Autoren vorgeschlagen, DNA-Methylierungsergebnisse generiert durch Assay Typ I und Assay Typ II Beads separat voneinander zu verifizieren [204]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei dem Assaydesign für die Bisulfit-Pyrosequenzierung keine Rücksicht auf den Bead Typ genommen. Sowohl in dem *BLCAP/NNAT* Assay als auch in dem *FAM50B* Assay, die jeweils zur parallelen Analyse mehrerer CpGs dienen, wurden CpGs analysiert, deren DNA-Methylierung auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip sowohl mittels Assay Bead Typ I (*BLCAP/NNAT*: n=4, *FAM50B*: n=1) als auch mittels Assay Bead Typ II (*BLCAP/NNAT*: n=1, *FAM50B*: n=2) bestimmt wurden. Die mithilfe beider Techniken erhobenen DNA-Methylierungswerte innerhalb der Teilprojekt "MLMD Analyse" und "MR Analyse" zeigten dabei eine gute Übereinstimmung ( $R^2(\text{BLCAP/NNAT\_MLMD})$ : 0,75;  $R^2(\text{BLCAP/NNAT\_MR})$ : 0,65;  $R^2(\text{FAM50B})$ : 0,95), sodass auf eine Bead Typ separierte Verifizierung verzichtet wurde.

In einer Publikation von Roessler et al. wurde gezeigt, dass die Übereinstimmung der ermittelten DNA-Methylierungswerte beider Methoden größer ist, wenn dasselbe CpG analysiert wird [69]. So ergab die von den Autoren beschriebene Korrelation zwischen DNA-Methylierungswerten bestimmt mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip und Bisulfit-Pyrosequenzierung für dasselbe CpG ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,88$  [69]. Verwendeten sie dagegen ein benachbartes CpG in derselben CpG-Insel für die Korrelationsanalyse, wurde ein niedrigerer Wert des Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,83$  als bei der Analyse desselben CpGs erzielt [69]. Als Resultat dieser Ergebnisse wurde in den hier vorgestellten Verifizierungsexperimenten bei dem Design der Bisulfit-Pyrosequenzierassays darauf geachtet, dass in beiden Bestimmungsmethoden dasselbe CpG analysiert wird. In derselben Publikation von Roessler et al. wurde gezeigt, dass die Übereinstimmung beider Methoden vor allem in dem DNA-Methylierungsbereich zwischen 25 % - 75 % reduziert ist [69]. Die in der vorliegenden Arbeit zu verifizierenden Werte liegen in geprägten Genorten, d.h. es wurde eine physiologische DNA-Methylierung genau in diesem mittleren Bereich der DNA-Methylierung erwartet. Obwohl nach Roessler et al. der reduzierte Übereinstimmungsbereich zwischen 25 % und 75 % liegt, konnten

dieselben Autoren weiterhin zeigen, dass bei der Analyse von vier geprägten Genorten (*GNAS*, *KvDMR*, *RB1* und *DIRAS3*) die Übereinstimmung beider Methoden sehr gut war [69]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierungswerte beider Methoden gut korrelieren (vergl. Bestimmtheitsmaße für *BLCAP/NNAT* und *FAM50B* Assays).

Als zweite Methode zur Verifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit die MS-MLPA verwendet. Diese Methode ist der Goldstandard in der Diagnostik von Imprintingstörungen, da sowohl DNA-Methylierungsstörungen als auch chromosomale Imbalancen parallel analysiert werden können. Diese Methode wird in der Literatur ebenso wie die Bisulfit-Pyrosequenzierung zur Verifizierung von DNA-Methylierungsergebnissen verwendet [205], [206]. Vorteil der MS-MLPA gegenüber der Bisulfit-Pyrosequenzierung ist, dass die DNA-Proben nicht natriumbisulfit-konvertiert eingesetzt werden und dass neben dem DNA-Methylierungsstatus auch eine Dosisanalyse erfolgen kann. Nachteil ist, dass bei den kommerziell erhältlichen Kits nie dieselben CpG Loci wie in der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analyse analysiert werden können.

Die hier gewählten Methoden zur Verifizierung der mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Technologie erhobenen DNA-Methylierungsdaten haben jeweils Vor- und Nachteile. Die Kombination beider Analysemethoden optimierten die Vorteile und minimierten die jeweiligen spezifischen technischen Limitationen der einzelnen Methoden. So konnten mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung genau die CpGs analysiert werden, die zuvor auch mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip analysiert wurden. Um DNA-Methylierungsergebnisse unabhängig von der Natriumbisulfit-Konvertierung und den damit einhergehenden Nachteilen zu analysieren, wurde die MS-MLPA verwendet. Auch wenn mithilfe dieser Methode andere CpGs analysiert wurde als mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip, so konnten über den DNA-Methylierungsstatus hinaus auch Information zu chromosomalen Imbalancen gewonnen werden.

#### ***4.1.6 Veränderung der physiologischen DNA-Methylierung somatisch geprägter Gene mit steigendem Alter***

Die Tatsache, dass sich mit dem Alter eines Individuums die DNA-Methylierungsmuster verändern, steht im Einklang mit dem in der Einleitung dargestellten Zusammenhang zwischen Umwelt und DNA-Methylierung (vergl. Kapitel 1.2). Je länger ein Individuum Umwelteinflüssen ausgesetzt ist, umso größer die Wahrscheinlichkeit, dass äußere Einflüsse eine Auswirkung auf die DNA-Methylierung haben. Aufgrund dieser mit dem Alter akkumulierenden Veränderungen der DNA-Methylierung, ist es heutzutage möglich, das epigenetische Alter eines Individuums zu ermitteln [207]. Doch wie ist der Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung geprägter Gene? Dazu wurde

u.a. eine Studie mit monozygoten Zwillingen von Talens et al. veröffentlicht [208]. Diese Studie zeigte, dass die interindividuellen Variationen der DNA-Methylierung für verschiedene geprägte Gene, u.a. *IGF2* und *GNASAS*, in den Gruppen älterer Individuen größer sind, als in den Gruppen jüngerer Individuen [208]. Außerdem wird eine Veränderung der DNA-Methylierung im Alter mit dem Auftreten von alterungsbedingten Erkrankungen, darunter insbesondere Krebserkrankungen, in Zusammenhang gebracht [209]. Vor allem eine Veränderung der DNA-Methylierung der *IGF2 DMR* wurde z.B. beim Prostatakarzinom mit steigendem Alter der Patienten beobachtet [210].

Die bereits bekannte DNA-Methylierungsveränderung mit steigendem Alter betrifft also auch geprägte DMRs. Daher wurden in den hier vorgestellten Analysen, wenn möglich, nur altersgematchte Kontrollen für die Analysen aberrant methyliert geprägter Genorte in Patientenkollektiven verwendet.

## **4.2. Gewebespezifität geprägter Gene**

Durch die Analysen zu den Teilprojekten "Pränatale Gewebeanalyse" und "Normalgewebe Analyse" sollte die zweite Frage der vorliegenden Arbeit beantwortet werden. Es sollte geklärt werden, ob die analysierten DMRs Gewebe-spezifisch das typische hemi-methylierte DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene aufweisen. Im Folgenden werden zunächst die wenigen bekannten Fakten zur Gewebe-spezifischen DNA-Methylierung geprägter Gene zusammengefasst. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden die Ergebnisse zu den Teilprojekten 2 ("Pränatale Gewebeanalyse") und 3 ("Normalgewebe Analyse"), die sich direkt mit der Frage nach der Gewebespezifität der DMRs geprägter Gene befassten, mit bereits publizierten Daten in Zusammenhang gebracht.

### **4.2.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in humanen Keimzellen**

Wie in der Einleitung erwähnt, sind die primären DMRs in den Keimzellen gemäß des Geschlechts des Trägers methyliert. Die maternal methylierten primären DMRs werden in den Oozyten methyliert und die paternal methylierten primären DMRs erhalten die DNA-Methylierung in der Spermatogenese. Die unterschiedliche Geschlechts-spezifische DNA-Methylierung der geprägten DMRs ist daher im Vergleich zwischen Oozyten und Spermien am deutlichsten erkennbar. Nur ein kleiner Anteil der bekannten primären DMRs erhält die Geschlechts-spezifische DNA-Methylierung in den Spermien [42]. Beim Menschen kennt man nur zwei DMRs, die während der Spermatogenese methyliert werden. Das ist die ICR1 auf Chromosom 11p15 und die IG-DMR auf Chromosom 14q32. Kerjean et al. analysierten das Setzen der DNA-Methylierung in verschiedenen Stadien der Spermatogenese für *H19* (ICR1 DMR) im Vergleich zur maternal methylierten *MEST* DMR [211]. Sie

konnten zeigen, dass in den fetalen Spermatogonien beide DMRs unmethyliert vorliegen [211]. Die *MEST* DMR bleibt, als Beispiel einer maternal methylierten DMR, während aller Stadien der Spermatogenese unmethyliert [211]. Die DNA-Methylierung der *H19* DMR erfolgt den Autoren nach in der Phase der Spermatogoniendifferenzierung im Erwachsenen Alter [211]. Die zweite beim Menschen paternal methylierte DMR ist die IG-DMR [212]. Geuns et al. analysierten das DNA-Methylierungsmuster der IG-DMR in Oozyten, Spermien und verschiedenen somatischen Geweben [212]. Sie konnten eine vollständige DNA-Methylierung der IG-DMR in Spermien und eine vollständig fehlende DNA-Methylierung der IG-DMR in Oozyten nachweisen [212]. Sie konnten weiterhin zeigen, dass bis zur zweiten Zellteilung nur vollständig methylierte oder vollständig unmethylierte Allele vorlagen, wohingegen in späteren Stadien der Entwicklung zusätzlich Allele mit einem breiten Spektrum an intermediärer DNA-Methylierung (26 % - 74 %) nachweisbar waren [212]. Die Autoren vermuten hinter dieser Verteilung der DNA-Methylierung, dass im frühen Embryo zunächst die strikt parentale DNA-Methylierung der IG-DMR benötigt wird (z.B. zur Etablierung weiterer DMR DNA-Methylierungsmuster) und anschließend ein variables DNA-Methylierungsmuster toleriert wird [212]. Die IG-DMR ist durch die in der vorliegenden Arbeit analysierten 891 geprägten CpG Loci nicht abgedeckt, sodass nicht überprüft werden konnte, ob die von Geuns et al. beschriebene Variabilität der physiologischen DNA-Methylierung auch in den hier analysierten Gewebeproben zu detektieren ist. Trotzdem lassen sich aus diesen Beobachtungen zwei allgemein gültige Fakten ableiten. Zum einen ist die Bedeutung von DMRs abhängig vom Entwicklungsstadium. Vor allem während der frühen Embryogenese kommt ihnen offensichtlich eine entscheidende Bedeutung zu. Zum anderen ist die physiologische DNA-Methylierung der IG-DMR in der späten Entwicklungsphase und mutmaßlich auch postnatal sehr variabel. Hieraus lässt sich darüber hinaus ableiten, dass ein postnatal im Normalbereich liegender DNA-Methylierungswert der IG-DMR keine Aussage über den DNA-Methylierungszustand während der kritischen Phase der frühen Embryonalentwicklung zulässt. Neben diesen zwei beim Menschen paternal methylierten primären DMRs sind mehrere maternal methylierte primäre DMRs bekannt. Dazu zählen u.a. die hier analysierten DMRs *NAP1L5* (Chromosom 4), *PLAGL1* (Chromosom 6), KvDMR (Chromosom 11) oder auch das AS-IC (Chromosom 15) [213]. Das AS-IC wurde in der vorliegenden Arbeit als Teil des Genorts "Chromosome 15 imprinted Region" analysiert. Es reguliert zusammen mit dem PWS-IC die Expression verschiedener geprägter Gene des Imprintingclusters 15q11q13 [214]. Diese zweiteilige Imprintingkontrollregion wird zu unterschiedlichen Zeiten der menschlichen Entwicklung Geschlechts-spezifisch methyliert [214]. Dabei erhält das AS-IC die Geschlecht-spezifische DNA-Methylierung in den Oozyten [214]. Analog zu den paternal methylierten DMRs werden also auch die maternal methylierten DMRs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung gesetzt.

Aus dem vorangegangenen Abschnitt geht hervor, dass DMRs zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen etabliert werden und das ihnen offensichtlich z.T. in den frühen Phasen der Embryonalentwicklung eine besondere Rolle zukommt. In diesem Zusammenhang wurden von Tomizawa et al. interessante Ergebnisse aus Mausexperimenten publiziert. Die Autoren analysierten die DNA-Methylierung von 21 bekannten maternal methylierten primären DMRs und drei paternal methylierten primären DMRs in Keimzellen der Maus [215]. Interessanterweise beobachteten die Autoren eine Veränderung der Größe der DMRs zwischen Keimzellen und Embryo [215]. Sie konnten z.B. zeigen, dass die Mest DMR-Sequenz im Embryo größer ist als in den Gameten [215]. Das entgegengesetzte Verhalten beobachteten sie u.a. für die Grb10 DMR, die im Embryo kleiner als in den Gameten ist [215]. Die Bedeutung dieser Beobachtung bleibt bisher unklar. Wenn dieses Phänomen auch beim Menschen eine Rolle spielt, sollte es bei der DNA-Methylierungsanalyse von DMRs berücksichtigt werden. Rein technisch gesehen, könnte es bei DNA-Methylierungsanalysen in Proben verschiedener Entwicklungsstadien zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.

Zusammenfassend gilt für geprägte DMRs in Keimzellen, dass sie zu verschiedenen Zeitpunkten etabliert werden, abhängig vom Entwicklungsstadium für die Embryonalentwicklung unterschiedlich relevant sind und zumindest in der Maus im Laufe der Entwicklung eine ungleiche Größe aufweisen. In der hier durchgeführten DNA-Methylierungsanalyse wurden zuvor publizierte CpG Loci in DMRs geprägter Gene analysiert, von denen die Autoren die zu erwartende DNA-Methylierung in Keimzellen gezeigt haben [70]. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die DMRs in somatischen Geweben monoallelisch methyliert vorliegen sowie, wenn möglich, die Herkunft der allelischen DNA-Methylierung [70]. Aufgrund dieser Vorarbeiten waren bezüglich der hier vorgestellten Variablen bereits wesentliche Grundlagen zur Charakterisierung der analysierten CpG Loci vorhanden.

#### ***4.2.2 Plazenta-spezifisch geprägte DMRs***

Durch Court et al. wurden viele zuvor noch nicht publizierte Plazenta-spezifisch geprägte DMRs beschrieben [70]. Nach ihren Ergebnissen zeigen diese Genorte in somatischen Geweben extreme Werte der DNA-Methylierung und in Plazentaprobe ein hemi-methyliertes DNA-Methylierungsmuster, welches für geprägte DMRs charakteristisch ist [70]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese DMR sowohl in pränatal als auch in postnatal entnommenen Normalgeweben analysiert.

- Plazenta-spezifisch geprägte Gene in pränatalem Gewebe:

In der vorliegenden Arbeit konnte für die Plazenta-spezifisch geprägten DMRs in pränatal entnommenem Gewebe, das hemi-methylierte DNA-Methylierungsmuster nur für DNA-Proben aus Chorionzotten gezeigt werden. Das steht im Einklang mit dem von Court et al. beschriebenen hemi-methylierten DNA-Methylierungsmuster der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte in Plazentaprobe[n] [70].

In dem entsprechenden Teilprojekt ("Pränatale Gewebeanalyse") wurde der Infinium HumanMethylation27 BeadChip Array genutzt, auf dem nur ein Bruchteil (10/177 (6 %)) der durch Court et al. identifizierten Plazenta-spezifisch geprägten CpGs abgedeckt ist und somit nur diese für die Analyse zur Verfügung standen. Es wäre interessant, zu analysieren, wie sich die hier nicht untersuchten Plazenta-spezifisch geprägten CpGs im Plazentagewebe verhalten. Besonders hilfreich wären diese DNA-Methylierungsdaten, um die DNA-Methylierungsergebnisse der CRC-Proben besser einordnen zu können.

- Plazenta-spezifisch geprägte Gene in somatischem Gewebe:

In verschiedenen Normalgewebeprobe[n] konnten für diese Loci zumeist extreme DNA-Methylierungswerte nachgewiesen werden. Dabei waren drei Genorte bei allen Fragestellungen hoch methyliert (*GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster*), der Genort *LIN28B* intermediär methyliert und die übrigen Genorte niedrig methyliert. Nur in den DNA-Proben aus Darmgewebe scheint sich dieses sonst homogene DNA-Methylierungsmuster zu verändern. Diese Beobachtung wird im Kapitel 4.3.1.2 gesondert diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit lag die *GPR1-AS* DMR in somatischen Gewebeprobe[n] hypermethyliert vor. Kobayashi et al. beobachteten eine ähnliche Hypermethylierung für die *GPR1-AS* DMR [216]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hypermethylierung des Genorts *MIR512-1 cluster* für somatische Gewebeprobe[n] wurde sowohl von Court et al. als auch von Noguier-Dance et al. für somatische Gewebe (Leukozyten, Muskel, Lunge, Gehirn) beschrieben [70], [217]. In der vorliegenden Arbeit war die *ZFAT* DMR in analysiertem somatischem Gewebe immer hochmethyliert. Diese von Court et al. veröffentlichte *ZFAT* DMR zählt zu den von den Autoren neu definierten Plazenta-spezifisch geprägten DMRs [70]. Die restlichen Plazenta-spezifisch geprägten DMRs zeigten in verschiedenen somatischen Geweben, sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch bei Court et al. sehr niedrige DNA-Methylierungswerte [70].

Eine interessante Frage für weiterführende DNA-Methylierungsanalysen ist, ob sich diese DNA-Methylierungsergebnisse auch für andere somatische Gewebe reproduzieren lassen. Insbesondere da die Mehrzahl der hier analysierten Plazenta-spezifisch geprägten DMRs erst mit der

Veröffentlichung von Court et al. (2014) bekannt wurden, sind Daten zum Abgleich der ermittelten Ergebnisse und vor allem zur Bedeutung dieses sehr homogenen DNA-Methylierungsmusters in somatischem Normalgewebe kaum vorhanden.

### ***4.2.3 Somatisch geprägte DMRs***

Die zweite Gruppe der hier analysierten elterlich geprägten Genorte ist die Gruppe der somatisch geprägten Genorte, die sowohl in pränatal als auch postnatal entnommenen Geweben analysiert wurden. Diese Genorte zeigen per Definition ein hemi-methyliertes DNA-Methylierungsmuster in somatischem Gewebe.

- Somatisch geprägte Gene in pränatalem Gewebe:

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese DMRs somatisch geprägter Gene neben den verschiedenen somatischen Geweben (Leber, Lunge und peripheres Blut) auch in plazentarem Gewebe (Chorionzotten) ein hemi-methyliertes DNA-Methylierungsmuster aufweisen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von Court et al. veröffentlichten DNA-Methylierungsanalysen geprägter Gene in Plazentagewebe und peripherem Blut [70]. Es ist bekannt, dass viele der somatisch geprägten Gene für die Entwicklung der Plazenta wichtig sind [218]. Dazu zählen u.a. *GRB10* [219] und *PLAGL1* [220]. Unter anderem zeigten diese beiden Genorte in der hier durchgeführten vergleichenden Analyse zwischen Amnionzellen und Chorionzotten (vergl. Kapitel 3.3.1) eine signifikant differenzielle DNA-Methylierung. Analog zu den Ergebnissen in den Keimzellen, scheint der DNA-Methylierungsstatus geprägter DMRs also vom pränatalen Entwicklungsstadium abhängig zu sein. Ob dieser signifikante DNA-Methylierungsunterschied zwischen beiden Geweben mit einer unterschiedlichen Expression der Gene assoziiert ist, ist eine Frage, der nachzugehen bleibt. In einer weiteren Publikation, die sich mit der DNA-Methylierung geprägter Gene in pränatalem Gewebe befasste, konnten ebenfalls Unterschiede in der DNA-Methylierung abhängig vom untersuchten Gewebe nachgewiesen werden [40]. Die Autoren analysierten dafür die DNA-Methylierung der DMRs der geprägten Gene *IGF2/H19*, *DLK1/MEG3*, *MEST*, *NNAT* und *SGCE/PEG10* [40]. Sie konnten einerseits für die DMRs *H19*, *MEST* und *SGCE/PEG10* keine Unterschiede der DNA-Methylierung innerhalb verschiedener analysierter Abortgewebe detektieren. Andererseits zeigten sie, dass z.B. die DNA-Methylierung der *IGF2* DMR in Gehirn-, Leber- und Nierenproben von verschiedenen abortierten Feten variiert [40]. Somit zeigten die Autoren auch für pränatale Gewebe eine Gewebespezifische DNA-Methylierung somatisch geprägter Gene.

- Gewebe-spezifische monoallelische Expression:

Von einigen somatisch geprägten Genen ist bekannt, dass sie abhängig vom Gewebe monoallelisch oder biallelisch exprimiert werden. Kishino beschrieb in Zelliniensystemen eine Gewebe-spezifische Expression von *Ube3a* und *Igf2r* [221]. *Ube3a* wird hiernach im Gehirn monoallelisch und sonst biallelisch exprimiert, wohingegen *Igf2r* im Gehirn biallelisch und sonst monoallelisch exprimiert wird [221]. Von *Grb10* ist bekannt, dass es in den meisten adulten Geweben maternal und in bestimmten Neuronen paternal exprimiert wird [222]. Beim Menschen hingegen scheint die Expression in den meisten Geweben biallelisch zu sein [150]. Im Gehirn kann allerdings eine selektive Expression vom paternalen Allel und in Teilen der Plazenta eine selektive Expression des maternalen Allels beobachtet werden [150], [223]. Diese Expressionsdaten legen einen besonderen Stellenwert des Imprintings für das Hirngewebe nahe. Ob die differenzielle Expression auch mit einer differenziellen DNA-Methylierung korreliert, konnte hier nicht untersucht werden, da Gehirngewebe als Normalgewebe nicht zur Verfügung stand. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass von dem DNA-Methylierungsstatus einer DMR nicht immer auf der Expression des assoziierten Gens geschlossen werden kann. Als Beispiel soll hier die monoallelische Expression von *Gs $\alpha$*  aus dem *GNAS* Locus auf Chromosom 20 erwähnt werden. *Gs $\alpha$*  wird in den meisten Geweben biallelisch exprimiert [224]. In einigen Geweben, u.a. in der Schilddrüse und in den Nierentubuli, wird es nur vom maternalen Allel exprimiert [224]. Die Gewebe-spezifische Expression scheint dabei nur teilweise durch eine differenzielle DNA-Methylierung reguliert zu sein. Stattdessen wurde gezeigt, dass für die monoallelische Expression von *Gs $\alpha$*  neben der hemi-methylierten DMR vermutlich ein Gewebe-spezifisch exprimierter Regulator notwendig ist, der in den entsprechenden Geweben an die unmethylierte Exon 1A DMR bindet und so die *Gs $\alpha$*  Expression von dem unmethylierten Allel verhindert [225]. Fehlt dieser Regulator, erfolgt die *Gs $\alpha$*  Expression sowohl vom methylierten als auch vom unmethylierten Allel [225].

- Gewebe-spezifische DNA-Methylierung geprägter Genorte in der vorliegenden Arbeit:

In den Analysen der vorliegenden Arbeit mit Fokus auf die somatisch geprägten Genorte zeigte nur der Genort *BLCAP/NNAT* eine eindeutige Gewebe-spezifische DNA-Methylierung in postnatal entnommenem Normalgewebe. Im Einklang mit den Ergebnissen von Court et al., konnte in der vorliegenden Analyse für *BLCAP/NNAT* eine Hemi-Methylierung in peripherem Blut detektiert werden [70]. In den anderen somatischen Normalgeweben (Leber, Lunge und Kolon) zeigte sich allerdings eine hohe DNA-Methylierung. Die DMR dieses Genorts reguliert die Expression des *NNAT* Gens [226]. Dabei ist eine höhere DNA-Methylierung der Promotorregion zumeist mit einer reduzierten Expression des *NNAT* Gens assoziiert [227]. *NNAT* wird in Geweben des Zentralnervensystems während der Gehirnentwicklung exprimiert und zeigt nur sehr geringe

Expressionslevel in adulten Geweben. [228], [226]. Kuerbitz et al. untersuchten das DNA-Methylierungsmuster des *NNAT* Promotors und die *NNAT* Expression u.a. in DNA-Proben aus hypophysärem Gewebe und peripherem Blut [229]. Die Autoren zeigten ein hemi-methyliertes DNA-Methylierungsmuster in beiden Geweben, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu peripheren Blutproben steht. Während dieses DNA-Methylierungsmuster in hypophysärem Gewebe mit einer Expression des Gens einhergeht, wurde in den pB-Proben in RT-PCR Experimenten keine Expression nachgewiesen [229]. Auch diese Ergebnisse machen deutlich, dass analog zum *GNAS* Locus aus den DNA-Methylierungsdaten nicht direkt auf die Expression geschlossen werden kann. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass in Leber- und Nierengewebe (gezeigt in adultem Mausegewebe) keine *NNAT* Expression detektierbar ist [228]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier ermittelten hohen DNA-Methylierungswerte in Lebergewebe.

- Individuelle Unterschiede in der DNA-Methylierung:

Neben einer Gewebe-spezifischen differenziellen DNA-Methylierung bzw. Gewebe-spezifischen monoallelischen Expression geprägter Gene kann die physiologische DNA-Methylierung geprägter DMRs auch zwischen Individuen variieren. So wurde in einer Studie von Coolen et al. die DNA-Methylierung der ICRs von *IGF2*, *H19*, *KCNQ1* und *GNAS* in monozygoten Zwillingspaaren hinsichtlich der Konkordanz der DNA-Methylierungswerte untersucht [230]. Es wurde insbesondere für die DNA-Methylierung am *IGF2/H19* Locus eine deutliche Variation der ermittelten DNA-Methylierungswerte festgestellt [230]. Diese Studie zeigt, dass es Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen Individuen geben kann. Dabei müssen nicht alle ermittelten Unterschiede in der DNA-Methylierung pathologischer Natur sein (polymorphes Imprinting).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Frage 2 ergaben, dass es ein Gewebe-spezifisches DNA-Methylierungsmuster in den hier analysierten Geweben gibt. Die in der Arbeit ermittelten DNA-Methylierungsergebnisse für die somatisch geprägten Genorte stimmen, soweit bereits DNA-Methylierungsdaten vorhanden sind, mit den publizierten Daten überein. Aus der Literatur ist bekannt, dass geprägte Gene Gewebe-spezifisch exprimiert werden können. Der Regulationsmechanismus erfolgt dabei nicht ausschließlich durch die differenzielle DNA-Methylierung, sondern auch durch Antisensetranskripte und Co-Faktoren [221]. Aus den genannten Gründen ist aus dem DNA-Methylierungsprofil geprägter DMRs nicht unmittelbar auf die Expression der assoziierten Gene in dem jeweiligen Gewebe zu schließen. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass einige geprägte DMRs eine Variabilität in der physiologischen DNA-Methylierung aufweisen, sodass diese bei der Beurteilung der pathologischen Relevanz der Ergebnisse bedacht werden muss.

### ***4.3 Krankheits-spezifische Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene***

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die physiologische DNA-Methylierung der geprägten Gene bestimmt wurde, sollte im zweiten Teil analysiert werden, inwieweit sich die DNA-Methylierung der DMRs geprägter Gene bei verschiedenen pathologischen Prozessen verändert (Fragen 2 bis 5 der Arbeit). Die Ergebnisse dieser DNA-Methylierungsanalysen werden im Folgenden in den Kontext des derzeitigen Wissenstands eingeordnet.

#### ***4.3.1 Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene beispielhaft analysiert an zwei somatischen Erkrankungen***

Zur Beantwortung der Frage 3 nach einer möglichen Veränderung der DNA-Methylierung bei somatischen Erkrankungen wurden Analysen zum Status der DNA-Methylierung geprägter Gene exemplarisch bei einer benignen (Teilprojekt 4) und einer malignen (Teilprojekt 5) somatischen Erkrankungen durchgeführt. Dabei zeigten sich Veränderungen der DNA-Methylierung sowohl in der benignen als auch in der malignen analysierten somatischen Erkrankung. Insbesondere die somatisch geprägten Genorte waren von einem aberranten DNA-Methylierungsmuster betroffen. Vereinzelt Plazenta-spezifisch geprägte Genorte zeigten eine veränderte DNA-Methylierung in der Analyse der maligne veränderten DNA-Proben.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse bei Patienten mit verschiedenen Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) mit bereits dazu publizierten DNA-Methylierungsdaten in Zusammenhang gebracht werden. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob eine chirurgische Therapie der NAFLD zu einer Veränderung der DNA-Methylierung geprägter Gene beitragen kann (Teilaspekt der Frage 3).

##### ***4.3.1.1 Einfluss geprägter Gene auf den Lipidstoffwechsel***

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der DNA-Methylierung geprägter Gene bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) analysiert. NAFLD entsteht, wenn zu viele Fettsäuren in der Leber gespeichert werden, also z.B., wenn zu viele Fettsäuren synthetisiert werden [231]. Abbau und Synthese von Fettsäuren wiederum werden durch neuroendokrine Faktoren, darunter auch Wachstumshormone (GH), reguliert [231]. Die Signalwege, die durch GH in der Leber angeregt werden, können somit mit der Entstehung von NAFLD assoziiert sein [231].

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Methylierungsveränderungen für geprägte Gene ermittelt. Die AVG-Beta Werte der geprägten CpGs konnten jedoch den Datensatz nicht in die Leberphänotyp-Gruppen auftrennen. Die Daten zur gesamtgenomischen DNA-Methylierungsanalyse des in der

vorliegenden Arbeit analysierten Leberdatensatzes ergaben, dass die AVG-Beta Werte von 74 CpG Loci den Datensatz entsprechend der vier Leberphänotyp-Gruppen auftrennen ( $q=0,004$ ) [179]. Somit konnte in dem gesamtgenomischen Datensatz eine mit der Krankheitsentstehung einhergehende Änderung des DNA-Methylierungsprofils nachgewiesen werden [179]. Die Veränderung der DNA-Methylierung in geprägten Genen spielt für die Krankheitsentstehung nach den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen jedoch eher eine untergeordnete Rolle. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass beim Krankheitsverlauf epigenetische Faktoren eine Rolle spielen können [232]. Dabei scheint dem geprägte Gen *DLK1* (*Delta-like homolog 1*) aus dem Imprintingcluster 14q32 eine wichtige Rolle zu zukommen [231]. Charalambous und Mitarbeiter zeigten in Mausexperimenten, dass eine gesteigerte *DLK1* Expression die Entwicklung von Adipositas und Hepatosteatosis verhindert [231]. Sie konnten in ihren Experimenten zeigen, dass in Leberzellen durch die gesteigerte *DLK1* Expression die Expression von Genen reduziert wird, die verantwortlich für Lipidimport und Lipidsynthese sind [231]. Gleichzeitig zeigten sie, dass in Muskelzellen Gene, die für den Fettsäureabbau benötigt werden, vermehrt exprimiert werden [231]. Diese Genexpressionsveränderungen erfolgen bedingt durch eine *DLK1* vermittelte gesteigerte GH Expression in der Hypophyse [231]. Einen weiteren Hinweis darauf, dass geprägte Gene einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel des Menschen haben können, ergab eine Studie von Huang et al. [233]. Die Autoren analysierten in 315 Proben von 17-jährigen Probanden den Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung an der ICR1 in 11p15 und u.a. der Lipideinlagerung der Probanden [233]. Die Autoren zeigten eine positive Korrelation zwischen einer DNA-Methylierung an der ICR1 und einer subkutanen Adipositas [233]. Je höher die DNA-Methylierung an der ICR1 war, umso größer war die subkutane Lipideinlagerung [233]. Sie konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung an der ICR1 und der viszeralen oder zentralen Adipositas herstellen [233]. Aufgrund der Hinweise aus der Literatur wurde das DNA-Methylierungsmuster des in der vorliegenden Arbeit analysierten Genorts ICR1 detailliert analysiert. Eine detaillierte Analyse für die *DLK1* DMR in 14q32 war nicht möglich, da in der vorliegenden Arbeit für das Imprintingcluster 14q32 nur die *MEG3* DMR und *MEG8* DMR analysiert wurden. Die Analysen der ICR1 und des Imprintingcluturs in 14q32 ergaben keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Leberphänotyp-Gruppen.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob nach einer bariatrischen (BARI) Operation eine DNA-Methylierungsveränderung geprägter Loci nachzuweisen ist. Eine dahingehend durchgeführte Analyse geprägter Loci ergab nur bei einigen Patienten einen DNA-Methylierungsunterschied in Lebergewebeproben vor und nach BARI Operation. Dabei waren bei den meisten Patienten nur einzelne Genorte betroffen. Bei einem Patienten konnten jedoch

DNA-Methylierungsveränderungen an bis zu 25 geprägten Genorten detektiert werden. Schon im publizierten gesamtgenomischen Ansatz wurde eine Veränderung der DNA-Methylierung nach BARI Operation beobachtet, auch wenn dabei keine geprägten Gene in der Gruppe differenziell methylierter Gene ermittelt wurden [179]. Weitere Analysen zum Einfluss der bariatrischen Operation auf die DNA-Methylierung geprägter Gene sind nicht veröffentlicht.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Beantwortung der Frage 3 ergaben, DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Patienten aus verschiedenen Leberphänotyp-Gruppen und den Normalkontrollen des NAFLD Datensatzes. Damit konnte gezeigt werden, dass bei einer benignen somatischen Erkrankung Veränderungen in der DNA-Methylierung geprägter Gene auftreten können. Aus publizierten Ergebnissen, die vor allem aus Mausexperimenten stammen, ist bekannt, dass geprägte Gene einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel des Menschen haben können und somit auch bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung beteiligt sein könnten. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten allerdings daraufhin, dass die DNA-Methylierung geprägter Gene eher sekundär betroffen ist und vermutlich keinen primären Einfluss auf die Entstehung von NAFLD hat. Zum Teilaspekt der Frage 3, ob sich die DNA-Methylierung geprägter Gene durch einen therapeutischen Ansatz verändert, ergab die durchgeführte DNA-Methylierungsanalyse in Leberproben vor und nach bariatrischer Operation bei einigen Patienten Unterschiede in der DNA-Methylierung. Die Effekte sind allerdings vergleichsweise gering und individuell unterschiedlich.

#### ***4.3.1.2 Einfluss geprägter Gene beim kolorektalen Karzinom***

Als Frage 3 der vorliegenden Arbeit sollten neben Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene bei einer benignen somatischen Erkrankung auch die Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene bei einer malignen somatischen Erkrankung analysiert werden. Als Beispiel dafür wurden Gewebeproben von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (CRC) analysiert. Schon in der Einleitung der vorliegenden Arbeit wurde darauf hingewiesen, dass die gestörte parentale Expression geprägter Gene (LOI) bei der Entstehung von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (vergl. Kapitel 1.4.6). In der vorliegenden Arbeit wurden deutliche Unterschiede in der DNA-Methylierung der untersuchten geprägten Genorte zwischen Normal- und Tumorgewebeproben beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen zu LOI an somatisch geprägten Genen. So untersuchten Nakano et al. u.a. die DNA-Methylierung der KvDMR und die Expression von *KCNQ1OT1* in CRC-Proben und CRC Zelllinien [148]. Sie konnten für 53 % der informativen CRC-Proben eine biallelische Expression von *KCNQ1OT1* nachweisen und in allen informativen Normalgewebeproben eine normale monoallelische Expression [148]. Außerdem

konnten sie in Zelllinien eine direkte Verbindung zwischen Hypermethylierung der KvDMR und einer reduzierten *KCNQ1OT1* Expression zeigen [148]. Umfangreichere Analysen geprägter Gene wurden von Nishihara et al. durchgeführt [149]. Die Autoren untersuchten, ob LOI für *IGF2*, *H19*, *MEST*, *NDN* und/oder *SNRPN* in CRC-Proben nachzuweisen ist [149]. Alle untersuchten Proben zeigten eine monoallelische Expression von *NDN* und *SNRPN* [149]. 24 % der informativen CRC-Proben zeigten keine *H19* Expression und 42 % bzw. 35 % der informativen CRC-Proben zeigten LOI für *IGF2* bzw. *MEST* [149]. Diese Analysen waren hauptsächlich auf eine Veränderung der Expression geprägter Gene fokussiert, untersuchten jedoch nicht immer parallel die DNA-Methylierung der entsprechenden DMRs. Da LOI für die somatisch geprägten Gene bereits so vielfältig beobachtet wurde, fokussierte sich die Analyse in der vorliegenden Arbeit auf die Plazenta-spezifisch geprägten Gene, von denen Daten zu Veränderungen der DNA-Methylierung noch nicht beschrieben wurden.

### ***Plazenta-spezifisch geprägte Genorte bei kolorektalem Karzinom***

Die DNA-Methylierungsergebnisse dieser Genorte waren insbesondere aus zwei Gründen interessant. Zum einen konnte nur in den Kolonproben (teilweise in Normal- hauptsächlich jedoch in den Tumorgewebeproben) ein DNA-Methylierungsmuster nachgewiesen werden, das von den DNA-Methylierungsmustern der anderen analysierten postnatalen Gewebe abwich. Zweitens zeigten die aberrant methylierten Genorte in den Kolonproben ein DNA-Methylierungsmuster, das in Richtung 50 % zeigte und sich somit dem physiologischen DNA-Methylierungsmuster dieser Genorte in plazentarem Gewebe annäherte. In einigen Publikationen, die sich mit verschiedenen Fragestellungen zur Plazenta befassen, wurden Parallelen zwischen dem Verhalten von Plazentazellen und Tumorzellen gezeigt [234]. Ähnlich wie Tumorzellen müssen Plazentazellen proliferieren, migrieren und in die Uteruswand eindringen, um eine regelrechte Schwangerschaft zu ermöglichen [234]. In Lungentumoren wurde bereits nachgewiesen, dass die Tumore u.a. Plazenta-spezifische Gene aberrant exprimieren [235]. Schroeder et al. verglichen das Methylom von Plazentazellen und Tumorzellen und beschrieben epigenetische Ähnlichkeiten zwischen Plazenta- und Tumorzellen, wie z.B. eine globale Hypomethylierung in Kombination mit einer Hypermethylierung von Promotorregionen [236].

- *FAM20A*:

Der direkte DNA-Methylierungsvergleich zwischen Plazenta- und Kolongewebe konnte in der vorliegenden Arbeit nur für den Genort *FAM20A* durchgeführt werden, da die anderen vier in CRC verändert vorliegenden Plazenta-spezifisch geprägten Genorte auf dem Infinium HumanMethylation27 BeadChip nicht abgedeckt sind. Der Genort *FAM20A* zeigte in den DNA-Proben aus Chorionzotten einen übergeordneten Mittelwert über alle AVG-Beta Werte von 77 %, in den

Tumorproben aus Kolongewebe lag dieser übergeordneten Mittelwert bei 22 % und in den Normalgewebeproben nur bei 8 %. Diese Veränderung der DNA-Methylierung in Tumorgewebe in Richtung der physiologischen DNA-Methylierung von DNA-Proben aus Chorionzotten konnte in keinem der anderen bearbeiteten Teilprojekte beobachtet werden.

- Bereits bekannter Zusammenhang zwischen aberrant methyliertem Gen und einer Tumorerkrankung:

Für drei der fünf Plazenta-spezifisch geprägten Genorte, die in der vorliegenden Analyse deutlich ausgeprägte Variationen innerhalb des CRC-Datensatzes aufwiesen, ist aus der Literatur ein Zusammenhang zwischen Kolontumoren und dem aberrant methyliertem Genort bekannt. Die DNA-Methylierungsergebnisse dieser Genorte werden im Folgenden im Kontext mit bereits publizierten Daten diskutiert.

- CABIN1:

Die in der vorliegenden Arbeit auffällig gewordenen CRC-Proben zeigten eine Zunahme der DNA-Methylierung in der *CABIN1* DMR. In einer Studie von Watanabe et al. wurde die Rolle von *CABIN1* (calcineurin binding protein 1) bei Kolontumoren analysiert [237]. Die Autoren untersuchten Expressionsprofile von Patienten mit CRC, aus denen sich ergab, dass Patienten die einen *CABIN1* Genverlust im Tumorgewebe aufwiesen, ein höheres Risiko für Rezidive hatten [237]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hypermethylierung in der *CABIN1* DMR könnte mit einer verminderten Expression des Gens einhergehen. Somit könnte eine *CABIN1* DMR Hypermethylierung auf ein erhöhtes Rezidivrisiko hinweisen.

- RGMA:

Der Genort *RGMA* fiel in der hier durchgeführten DNA-Methylierungsanalyse durch höhere AVG-Beta Werte in den Tumorgewebeproben im Vergleich zu den Normalgewebeproben auf. Sowohl Li et al. als auch Zhao et al. untersuchten die Promotor-DNA-Methylierung und Expression von *RGMA* (repulsive guidance molecule family member a) u.a. in Gewebeproben von Patienten mit CRC [238], [239]. In beiden Studien konnte in CRC-Proben eine verminderte *RGMA* Expression nachgewiesen werden, die durch eine Hypermethylierung des *RGMA* Promotors reguliert wurde [238], [239]. Die DNA-Methylierungsergebnisse zu den zwei Plazenta-spezifisch geprägten Genorten *CABIN1* und *RGMA* stehen somit im Einklang zu bereits publizierten Daten bei Patienten mit CRC.

- LIN28B:

Die deutlichste Veränderung des DNA-Methylierungsmusters der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte konnte im Vergleich zwischen Kolonproben und allen anderen analysierten Gewebe-Proben für den Genort *LIN28B* beobachtet werden. Für diesen Genort

zeigten sowohl die Tumorgewebe- als auch die Normalgewebeproben im Vergleich zu den anderen analysierten Normalgeweben (Lunge, Leber, peripheres Blut) einen Anstieg der DNA-Methylierung. Der übergeordnete Mittelwert der AVG-Beta Werte in Kolon-Normalgewebe betrug 47 % und in CRC-Proben 59 %. In den Normalgeweben zeigte *LIN28B* einen Mittelwert der AVG-Beta Wert zwischen 18 % und 29 %. *LIN28B* spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese von Kolontumoren. King et al. zeigten eine Überexpression von *LIN28B* in Kolontumoren, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven korreliert und mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patienten [240]. Um den Einfluss der *LIN28B* Expression auf die Tumorgenese zu untersuchen, führten die Autoren Analysen an Xenograft Tumoren durch [240]. Hierfür infizierten sie Mäuse mit *LIN28B* exprimierenden Zellen [240]. Sie stellten u.a. fest, dass 17 % der Mäuse mit einer konstitutiven *LIN28B* Expression Metastasen in verschiedenen Organen aufwiesen [240]. Genexpressionsanalysen ergaben, dass die *LIN28B* Expression sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer veränderten Expression von 184 Transkripten, darunter auch Kolonstammzellmarkern (*LGR5* und *PROM1*), führte [240]. Von einer weiteren Gruppe wurden Zelllinienexperimente durchgeführte die dafür sprechen, dass eine gesteigerte *LIN28B* Expression u.a. zu einer gesteigerten Zellmigration führen kann [241]. Darüber hinaus ergaben deren Analysen, dass eine *LIN28B* Expression die microRNA let-7 inhibiert [241]. Die let-7 microRNA ist als Tumorsuppressor beschrieben, da sie zusammen mit dem RNA induced silencing complex (RISC) den Abbau von mRNA fördert [241]. Einige der let-7 Ziel mRNA Moleküle haben tumorfördernde Eigenschaften [241]. Die Reduktion von let-7 kann somit zu einer Anreicherung dieser tumorfördernden mRNAs führen und damit die Tumorprogression begünstigen. Weitere Evidenz für eine *LIN28B* Beteiligung an der Tumorentstehung geben Analysen von *LIN28A*, einem Homolog von *LIN28B* [242]. *LIN28A* wird in embryonalen Stammzellen und in einigen Tumoren hoch und in somatischen Zellen niedrig exprimiert [243]. Passend hierzu ist die DNA der *LIN28A* Promotorregion in somatischen Zellen teilweise methyliert und sowohl in mesenchymalen Stammzellen als auch in verschiedenen Tumorzellen unmethyliert [244]. In der vorliegenden Arbeit ist der Genort *LIN28B* durch den Anstieg der DNA-Methylierung in Darmgewebeproben aufgefallen. Die analysierten CpG Loci liegen in direkter Nähe zum kanonischen Promotor des *LIN28B* Gens. Die Frage ist, in wieweit die DNA-Methylierung dieser CpGs die *LIN28B* Expression beeinflusst. Hierzu führten Hovestadt et al. Analysen in verschiedenen Untergruppen des Medulloblastoms durch [245]. Das Medulloblastom ist ein kindlicher Gehirntumor, der abhängig vom genetischen Profil in vier verschiedene

Untergruppen eingeteilt wird [245]. In Medulloblastom-Untergruppen mit schlechter Prognose konnten die Autoren fast für alle untersuchten DNA-Proben eine hohe DNA-Methylierung des kanonischen *LIN28B* Promotors detektieren [245]. In Cerebellumproben (als Normalkontrollen genutzt) sowie in den Untergruppen mit besserer Prognose lag der kanonische Promotor hingegen überwiegend unmethyliert vor [245]. Die Hypermethylierung des kanonischen Promotors in den Proben mit schlechterer Prognose war mit einer gesteigerten *LIN28B* Expression assoziiert. Darüber hinaus wurden in diesen Proben niedrige LET-7 mRNA Level detektiert [245]. Die Autoren postulieren, dass die gesteigerte *LIN28B* Expression von einem alternativen Promotor reguliert wird, der in den DNA-Proben aus der Untergruppe mit schlechterer Prognose niedrige und in den DNA-Proben aus den Untergruppen mit besserer Prognose und den Cerebellumproben höhere DNA-Methylierungswerte aufwies [245]. Somit spricht die hier detektierte Hypermethylierung der kanonischen *LIN28B* Promotorregion in CRC-Proben nicht gegen eine gesteigerte Expression von *LIN28B* und wurde in ähnlicher Weise bereits von anderen Gruppen beschrieben. Im Gegensatz zu Hovestadt et al. zeigte das angrenzende Normalgewebe der in der vorliegenden Arbeit analysierten Darmgewebeproben auch einen Anstieg in der DNA-Methylierung. Allerdings analysierten Hovestadt et al. als Normalgewebe Cerebellum und nicht Darmgewebe, sodass hier kein direkter Vergleich möglich ist. Hu et al. untersuchten dagegen im Rahmen einer Studie zum Magenkarzinom ebenfalls Gewebe des Gastrointestinaltrakts. Das den Tumor umgebende Normalgewebe zeigte dabei eine sehr niedrige *LIN28B* Expression [246]. DNA-Methylierungsergebnisse zu *LIN28B* in normalen Kolonzellen zum direkten Vergleich der hier erhobenen Ergebnisse wurden, soweit bekannt, bisher nicht veröffentlicht. Dabei wäre besonders die DNA-Methylierung des alternativen Promotors, der nach Hovestadt et al. zur Expression von *LIN28B* beiträgt, sowohl in Kolonnormalgewebe als auch in CRC-Proben interessant.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Beantwortung der Frage 3 nach DNA-Methylierungsveränderungen bei einer benignen somatischen Erkrankung ergaben deutliche Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene zwischen Normal- und Tumorgewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine systematische DNA-Methylierungsanalyse Plazenta-spezifisch geprägter Genorte durchgeführt. Es wurde eine aberrante DNA-Methylierung in den fünf Plazenta-spezifisch geprägten Genorten *LIN28B*, *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1* beobachtet. Davon wurden die drei Genorte *LIN28B*, *RGMA* und *CABIN1* bereits mit CRC assoziiert. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die biologische Ähnlichkeit von Plazenta- und

Tumorgewebe interessant, die sich in den hier vorgestellten Analysen zum Teil in der DNA-Methylierung widerspiegelt.

### ***4.3.2 Veränderungen der DNA-Methylierung geprägter Gene bei konstitutionellen Erkrankungen***

DNA-Methylierungsveränderungen treten bei somatischen Erkrankungen sekundär auf. Als primäre DNA-Methylierungsveränderung sind sie mit Imprintingstörungen assoziiert. Unter der Frage 4 sollte in der vorliegenden Arbeit die phänotypische Breite der klassischen Imprintingsyndrome analysiert werden. Dafür wurde in peripheren Blutproben von drei Patientenkollektiven mit verschiedenen Teilaspekten der klassischen Imprintingstörungen die DNA-Methylierung elterlich geprägter DMRs analysiert. Darüber hinaus wurde als Erweiterung der DNA-Methylierungsanalyse von Patienten mit einem Single-Locus DNA-Methylierungsdefekt unter der Frage 5 die Frequenz von DNA-Methylierungsveränderungen an mehreren elterlich geprägten DMRs analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sollen im Folgenden auf Basis der Informationen aus der Literatur diskutiert werden.

#### ***4.3.2.1 Aberrante DNA-Methylierung geprägter Gene bei Kollektiven mit Entwicklungsstörungen***

Zur Beantwortung der Frage 4 der vorliegenden Arbeit, der Frage nach der phänotypischen Breite der klassischen Imprintingsyndrome, wurden drei Patientenkollektive mit verschiedenen Entwicklungsstörungen analysiert. In diesen drei Kollektiven wurden zusammengenommen 200 Patienten analysiert. Die Analysen führten zur Diagnose von zwei klassischen Imprintingsyndromen für insgesamt drei Patienten. Unterschiedliche Studien zu der Inzidenz der acht klassischen Imprintingsyndrome kommen übereinstimmend zu dem Schluss, dass diese häufig unterdiagnostiziert sind [247]. Als Ursache dafür wurden vor allem ein überlappendes Phänotyp und ein breites Spektrum der phänotypischen Ausprägung identifiziert [247]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum phänotypischen Spektrum von Imprintingsyndromen stehen somit im Einklang zu den publizierten Daten in anderen Kollektiven mit Entwicklungsstörungen [102], [126].

#### ***DNA-Methylierungsstörungen, die mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind***

- Temple Syndrom:

DNA-Proben von je einem Patienten aus den Teilprojekten "SGA Analyse" und "MR Analyse" zeigten eine DNA-Hypomethylierung in dem Genort *MEG3*. Diese aberrante DNA-Methylierung ist mit dem Temple Syndrom assoziiert. Die hier analysierten CpG Loci überlappen mit der *MEG3*-DMR [103]. Das geprägte Cluster auf Chromosom 14q32 beinhaltet allerdings zwei DMRs, die intergenische IG-DMR

und die *MEG3*-DMR, die im Promotorbereich des *MEG3* Gens liegt [103]. Die IG-DMR wird während der Spermatogenese methyliert und gehört damit zu einer von zwei humanen paternal methylierten primären DMRs [212]. Die *MEG3*-DMR ist eine sekundäre DMR und ist somit dem DNA-Methylierungsstatus der IG-DMR nachgeordnet [248]. Physiologisch liegen beide DMRs in 14q32 auf dem paternalen Allel methyliert und auf dem maternalen Allel unmethyliert vor [249]. Wie genau die Expressionskontrolle der in dem geprägten Cluster liegenden Gene durch beide DMRs erfolgt, ist noch unklar [250]. Bekannt ist jedoch, dass das Eltern-spezifische DNA-Methylierungsmuster der IG-DMR schlussendlich dazu führt, dass die Gene *MEG3*, *MEG8* und *RTL1as* vom maternalen Allel und die Gene *DLK1* und *RTL1* vom paternalen Allel exprimiert werden [103], [250]. Die in den DNA-Proben der beiden Patienten ermittelte DNA-Hypomethylierung des *MEG3* Promotors wurde mithilfe weiterer Analysen verifiziert. Für das SGA-geborene Kind wurde die Verifizierung mittels methylierungsspezifischer PCR durchgeführt, mithilfe der das Fehlen des methylierten Allels gezeigt werden konnte [169]. Mittels einer Mikrosatellitenanalyse wurde eine biparentale Vererbung der betroffenen Region festgestellt [169]. Des Weiteren konnten mittels SNP-Array Analyse chromosomale Imbalancen der betroffenen Region ausgeschlossen werden [169]. Somit konnte die Diagnose eines Temple Syndroms auf Basis einer primären Epimutation gestellt werden. Für den Patienten mit mentaler Retardierung konnte die Hypomethylierung in *MEG3* mittels MS-MLPA verifiziert werden (vergl. Kapitel 3.5.3). Mittels Mikrosatellitenanalyse konnte eine Isodisomie ausgeschlossen werden, eine Heterodisomie konnte, aufgrund des fehlenden elterlichen Vergleichsmaterials, nicht ausgeschlossen werden (vergl. Kapitel 3.5.3). Aufgrund der hierarchischen Kontrolle der DNA-Methylierung der *MEG3* DMR durch die IG-DMR lag nahe, dass beide Patienten auch eine aberrante DNA-Methylierung der IG-DMR haben. Für den Patienten mit TS aus dem Kollektiv mental retardierter Patienten konnte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung eine Hypomethylierung der IG-DMR gezeigt werden (vergl. Kapitel 3.5.3). Für den Patienten mit TS aus dem Kollektiv SGA-geborener Kinder wurde über die methylierungsspezifische PCR hinaus keine weitere DNA-Methylierungsanalyse durchgeführt [169].

Interessanterweise zeigte die in den Infinium HumanMethylation450 BeadChip Analysen mitgeführte Positivkontrolle für das Temple Syndrom neben einer *MEG3* Hypomethylierung auch eine Hypermethylierung des *MEG8* Genorts (85 %). Dieser Genort wird auf dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array nur durch ein CpG abgedeckt und gehört zu den neu beschriebenen elterlich geprägten DMRs [70]. Auch in den DNA-Proben, beider in dieser Arbeit identifizierten Patienten mit einer *MEG3* Hypomethylierung wurde eine *MEG8* Hypermethylierung detektiert (87 % (SGA-geborenes Kind), 94 % (Patient mit MR)). In der DNA-Probe eines weiteren SGA-geborenen Kindes und in einer DNA-Probe eines Patienten aus dem Teilprojekt "Ekstrophie

Analyse“ konnte eine isolierte *MEG8* Hypomethylierung detektiert werden. Dabei lagen die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für *MEG8* bei 32 % (SGA-geborenes Kind) und 50 % (Patient mit Blasenektrophie), sodass nur die isolierte Hypomethylierung des SGA-geborenen Kindes auch in den Rohwerten zu sehen war. Das Ergebnis einer Hypomethylierung für den Patienten mit einer Blasenektrophie ist durch die relativ hohen Werte des NMB (57 % - 68 %) des Datensatzes verursacht und damit möglicherweise ein technisches Artefakt.

Das hier analysierte CpG cg06804177 des *MEG8* Genorts liegt isoliert im gene body des *MEG8* Gens, sodass ein Beitrag zur Expressionskontrolle von *MEG8* möglich ist. *MEG8* liegt in dem größten beim Menschen bekannten microRNA (miRNA) Cluster [251]. Ähnlich zu der geprägten Region in 11p15 wäre also gut denkbar, dass die DNA-Methylierung an dieser Position die Expression einer miRNA reguliert, die wiederum in Analogie zu z.B. *KCNQ1OT1* an der Regulation der Expression der in 14q32 liegenden elterlich geprägten Gene beteiligt ist.

- Transienter Neonataler Diabetes Mellitus:

Das zweite klassische Imprintingsyndrom, das in den in dieser Arbeit analysierten Kohorten mit Entwicklungsstörung diagnostiziert wurde, war der Transiente Neonatale Diabetes Mellitus, der mit einer Hypomethylierung in *PLAGL1* assoziiert ist [252]. Die *PLAGL1* DMR in der chromosomalen Region 6q24 liegt physiologisch auf dem maternalen Allel methyliert und auf dem paternalen Allel unmethyliert vor [253]. Diese differenzielle DNA-Methylierung hat die Expression von *PLAGL1* und *HYMAI* vom paternalen Allel und die Expression von *ZAC-AS* vom maternalen Allel zur Folge [253].

Der hier bestimmte Mittelwert der AVG-Beta Werte für den *PLAGL1* Genort bei dem Patienten mit einer Hypomethylierung des *PLAGL1* Locus aus dem Teilprojekt “Ekstrophie Analyse“ lag bei 43 %. Im Vergleich dazu lag der Mittelwert der AVG-Beta Werte bei der Positivkontrolle für das TNDM Syndrom bei 11 %. Auch die MS-MLPA Analyse des hier identifizierten Patienten zeigte eine zwar signifikante aber nicht vollständige Hypomethylierung in *PLAGL1*. Dieser Befund spricht für ein somatisches Mosaik aus Zellen mit einer *PLAGL1* Hypomethylierung, die bei dem Patienten neben Zellen mit einem normalen DNA-Methylierungsmuster der *PLAGL1* DMR vorliegen. Somatische Mosaik, welche die DNA-Methylierung betreffen, wurden bereits für klassische Imprintingsyndrome beschrieben und sind oftmals ursächlich für das breite phänotypische Spektrum, das bei Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom beobachtet wird [254], [255]. Die Frequenz von Mosaiken variiert jedoch je nach zugrundeliegender Diagnose. Bei Patienten mit einem Prader-Willi Syndrom werden sie selten beobachtet, wohingegen beim Angelman Syndrom mehr als 40 % der Betroffenen ein somatisches Mosaik aufweisen [99]. Auch für Patienten mit einem Beckwith-Wiedemann Syndrom und Silver-Russell Syndrom wurden somatische Mosaik beschrieben [61], [101]. Insbesondere die ICR1 Hypomethylierung des Silver-Russell Syndroms liegt bei fast allen betroffenen

Patienten als somatisches Mosaik vor [101]. Für den isolierten Transienten Neonatalen Diabetes Mellitus liegen keine Daten zur Frequenz somatischer Mosaik vor. Allerdings zählt das TNDM im Vergleich zu BWS, SRS, PWS und AS auch zu den selteneren klassischen Imprintingsyndromen. Somatische Mosaik bei Patienten mit einem TNDM wurden allerdings im Zusammenhang mit DNA-Methylierungsstörungen an mehreren Genorten, im Sinne eines MLMD, beschrieben [110]. Diese betrafen jedoch nicht die *PLAGL1* DMR, die immer komplett hypomethyliert vorlag. [110] In DNA-Proben von 12 Patienten mit einem TNDM und kompletter Hypomethylierung der *PLAGL1* DMR wurde für sechs Patienten eine komplette oder teilweise Hypomethylierung anderer untersuchter Genorte beobachtet [110]. Die in dieser Kohorte untersuchten Genorte wurden auch in der hier gezeigten DNA-Methylierungsanalyse untersucht und zeigten kein aberrantes DNA-Methylierungsmuster. Der Genort *IGF1R*, der bisher keinem klassischen Imprintingsyndrom zugeordnet wurde, zeigte allerdings bei dem Patienten mit TNDM aus dem Kollektiv mit Blasenektrophie eine Hypermethylierung. Die Diskussion zu diesem Genort erfolgt im Kapitel 4.3.2.3.

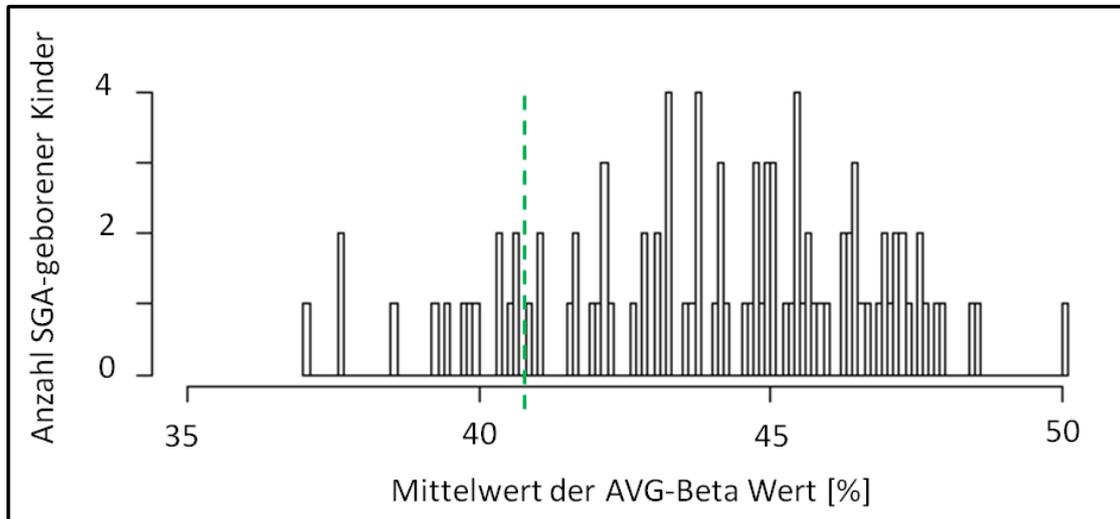
***DNA-Methylierungsstörungen, die nicht mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind***

Neben diesen aberranten DNA-Methylierungsbefunden, die mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind, waren in den drei untersuchten Kollektiven mit einer Entwicklungsstörung sehr viel mehr Genorte aberrant methyliert, die noch mit keinem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind. Im Kollektiv SGA-geborener Kinder waren hier insbesondere die drei Genorte *ZNF331*, *WDR27* und *INPP5Fv2* besonders häufig betroffen. Die ermittelten DNA-Methylierungsergebnisse dieser drei Genorte werden im Folgenden diskutiert.

- *ZNF331*:

Im Kollektiv SGA-geborener Kinder lagen die ermittelten Mittelwerte der AVG-Beta Werte für den Genort *ZNF331* mit einer Ausnahme in allen analysierten 96 DNA-Proben leicht unterhalb von 50 % (übergeordneter Mittelwert der AVG-Beta Wert: 44 %). Ähnliche Verteilungen konnten auch in den Analysen der Normalgewebeproben festgestellt werden. In Abbildung 68 sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der analysierten CpG Loci (n=14) der *ZNF331* DMR für aller SGA-geborenen Kinder als Histogramm dargestellt. In dem Kollektiv SGA-geborener Kinder war die DNA-Methylierung der analysierten CpG Loci kontinuierlich verteilt (vergl. Abbildung 41, Kapitel 3.5.1) Nach den definierten Grenzen zeigten DNA-Proben von 15 Kindern eine Hypomethylierung (Mittelwert der AVG-Beta Werte <41 %). Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte lagen jeweils nur knapp unterhalb des bestimmten NMB. Das Verteilungsmuster mit einer deutlichen "Linksverschiebung" sowie die geringe

Abweichung der Werte in den als "aberrant" definierten Proben läßt nicht ausschließen, dass es sich bei den so definierten Veränderungen um statistische "Artefakte" handelt, die keine biologische Bedeutung besitzen.



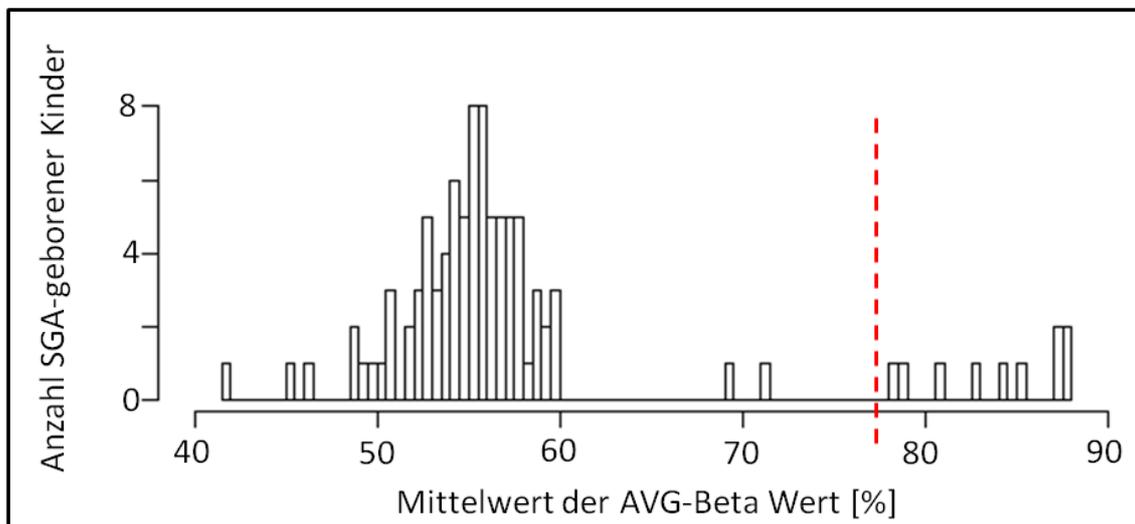
**Abbildung 68:** Verteilung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für 96 SGA-geborene Kinder im Genort *ZNF331*. Gezeigt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte über 14 CpGs des Genorts *ZNF331* für 96 SGA-geborene Kinder. Es wird deutlich, dass bis auf einen aller SGA-geborenen Kinder Mittelwerte der AVG-Beta Werte < 50 % aufweisen. Der grüne Trennstrich gibt die in der Studie angewandte diagnostische Grenze für eine Hypomethylierung an. Danach weisen 15 SGA-geborene Kinder in diesem Genort eine Hypomethylierung auf (links von der Markierung). Zu beachten ist aber der kontinuierliche Verlauf der Meßwerte und die Linksverschiebung der Verteilung. (bins=100)

Zink-Finger Proteine, wie z.B. *ZNF331* (*Zinc Finger Protein 331*), haben diverse Funktionen. Unter anderem spielen sie eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle [256]. Dabei wird vermutet, dass *ZNF331* als Transkriptionsrepressor fungiert [257]. Es sind verschiedene Transkriptvarianten von *ZNF331* bekannt, die vermutlich alle die gleichen Funktionen ausüben [256]. Für *ZNF331* wird in der Literatur eine Rolle als Tumorsuppressorgen diskutiert [256]. So konnten sowohl Yu et al. als auch Vedeld et al. zeigen, dass *ZNF331* in Tumorgewebe weniger stark exprimiert wird als in Normalgewebe [256], [258]. Sie konnten darüber hinaus nachweisen, dass diese verringerte Expression durch eine DNA-Hypermethylierung der Promotorregion von *ZNF331* reguliert wird [256], [258]. In den beiden erwähnten Publikationen wurde die Promotormethylierung der Transkriptvariante 1 analysiert. In der vorliegenden Arbeit liegen die analysierten CpGs dagegen in den CpG-Inseln 100 und 33 und regulieren damit etwas kürzere Transkriptvarianten. Nach Court et al. zeigen die analysierten CpGs in diesen CpG-Inseln in somatischem Gewebe ein hemi-methyliertes DNA-Methylierungsmuster [70]. Am ehesten ist die hohe Zahl an Hypomethylierungen für diesen Genort im Kollektiv SGA-geborener Kinder durch die Linksverschiebung der Kurve bedingt und nicht durch individuelle DNA-Methylierungsstörungen. Diese beobachtete Linksverschiebung kann durch

eine unvollständige Messung der Hemi-Methylierung verursacht sein. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die Expression von *ZNF331* und für den Phänotyp "SGA" bleibt unklar.

- WDR27:

Im dem Kollektiv SGA-geborener Kinder wurden 10 Kinder mit einer Hypermethylierung der *WDR27* DMR detektiert. In Abbildung 69 sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der beiden CpGs für alle SGA-geborenen Kinder dargestellt. Es wird deutlich, dass die Mehrzahl der SGA-geborenen Kinder Mittelwerte der AVG-Beta Werte zwischen 50 % und 60 % aufweisen und, dass sich dieser Bereich der Meßwerte homogen verteilt. Die 10 mit einer aberranten DNA-Methylierung detektierten Kinder bilden eine separate Subgruppe in der Darstellung, wodurch die deutlichen DNA-Methylierungsunterschiede zwischen nicht betroffenen und von der aberranten DNA-Methylierung betroffen SGA-geborenen Kinder erneut deutlich werden.



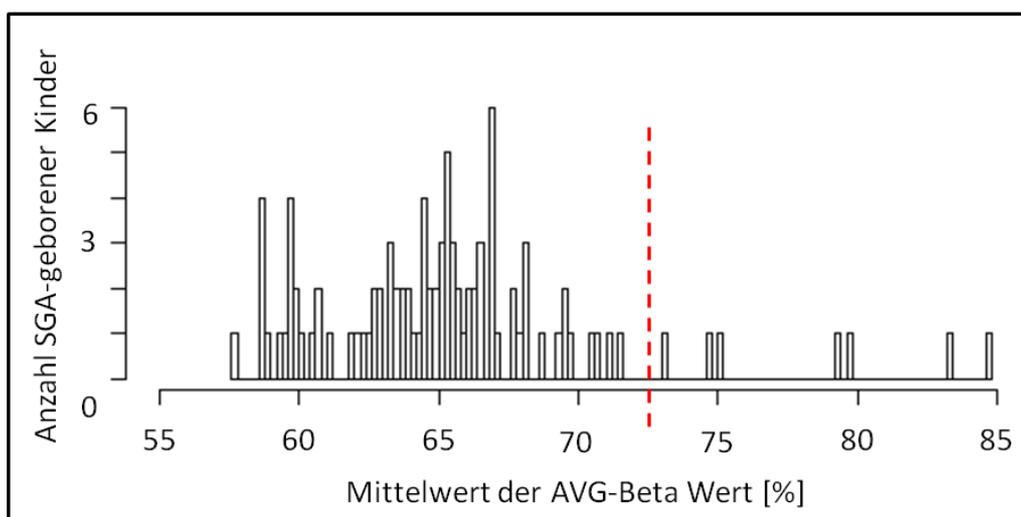
**Abbildung 69:** Verteilung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für 96 SGA-geborene Kinder im Genort *WDR27*. Gezeigt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte über zwei CpGs des Genorts *WDR27* für 96 SGA-geborene Kinder. Durch den roten Trennstrich sind die 10 SGA-geborenen Kinder, die in diesem Genort nach den festgelegten Nachweisgrenzen eine Hypermethylierung aufweisen (rechts von der Markierung) von den unauffälligen SGA-geborenen Kindern getrennt. Die Darstellung macht deutlich, dass die Mehrzahl SGA-geborener Kinder Mittelwerte der AVG-Beta Werte homogen zwischen 50 % und 60 % aufweisen, wogegen eine Subgruppe deutlich höhere Mittelwerte der AVG-Beta Werte zeigt. (bins=100)

*WDR27* gehört zu den in der Publikation von Court et al. neu beschriebenen geprägten DMRs. Die DMR liegt physiologisch maternal methyliert vor [70]. Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass diese DMR die Allel-spezifische Expression der Isoform 2 reguliert [70]. Die Isoform 1 dagegen wird von beiden elterlichen Allelen exprimiert [70]. *WDR27* kodiert für das *WD repeat domain 27* Protein, dessen Funktion bisher unbekannt ist. Charakteristisch für diese Proteinfamilie, die nur in Eukaryoten vorkommt, ist die sogenannte WD Domäne [259]. Diese Domäne wiederholt sich vier- bis achtmal je Polypeptid und endet meist mit den Aminosäuren Tryptophan und Asparaginsäure (W und D sind dabei die Einbuchstabenabkürzungen für die beiden Aminosäuren) [259]. Proteine mit WD Domänen

spielen bei der Protein-Protein Interaktion eine wichtige Rolle [259]. Darüber hinaus ist aber wenig über das *WDR27* Gen und Protein bekannt, sodass über eine mögliche Auswirkung der DNA-Methylierung bei den 10 betroffenen SGA-geborenen Kindern nur spekuliert werden kann. Da die detektierte Hypermethylierung die DMR von *WDR27* betrifft, könnte dies mit einer Inaktivierung des Gens einhergehen. Interessanterweise waren beide CpGs des Genorts bei den durch die aberrante DNA-Methylierung betroffenen SGA-geborenen Kindern homogen und deutlich aberrant methyliert (vergl. Abbildung 41, Kapitel 3.5.1). Dies deutet darauf hin, dass es sich eher nicht um einen Meßfehler eines einzigen CpGs sondern um ein biologisches Phänomen handelt. Es liegen somit wahrscheinlich echte "Ausreißer" aus der Verteilung vor, was auf eine biologisch relevante DNA-Methylierungsveränderung hindeutet. Die Ursache hierfür und die Konsequenz davon bleiben aber derzeit unklar.

- *INPP5Fv2*:

Der Genort *INPP5Fv2* wurde durch die beobachtete Hypermethylierung bei sieben SGA-geborenen Kindern auffällig. In dem hier vorgestellten Datensatz liegen die Mittelwerte der DNA-Methylierung in allen SGA-geborenen Kindern leicht höher als die erwarteten 50 %. In der Abbildung 70 sind erneut die Mittelwerte der AVG-Beta Werte der CpGs (n=4) aller analysierte SGA-geborenen Kinder dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Mittelwerte der AVG-Beta Werte breit streuen wobei eventuell zwei Peaks nachzuweisen sind. Beide Peaks liegen oberhalb der für geprägte Genorte erwarteten theoretischen DNA-Methylierung von 50 %.



**Abbildung 70:** Verteilung der Mittelwerte der AVG-Beta Werte für 96 SGA-geborene Kinder im Genort *INPP5Fv2*. Gezeigt sind die Mittelwerte der AVG-Beta Werte über vier CpGs des Genorts *INPP5Fv2* für 96 SGA-geborene Kinder. Durch den roten Trennstrich sind die sieben SGA-geborenen Kinder, die in diesem Genort nach der festgelegten Nachweisgrenze eine Hypermethylierung aufweisen (rechts von der Markierung) von den unauffälligen SGA-geborenen Kindern getrennt. Die Verteilung zeigt, dass die Mittelwerte der AVG-Beta Werte breit streuen. (bins=100)

*INPP5Fv2* kodiert für die Isoform 2 der Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase F. Von dieser Isoform wurde gezeigt, dass sie in menschlichem Gewebe nur vom paternalen Allel exprimiert wird [260], [261]. Diese selektive Expression wird durch die DNA-Methylierung in der Promotorregion kontrolliert, die auf dem maternalen Allel methyliert und auf dem paternalen Allel unmethyliert vorliegt [262]. Die hier analysierten vier CpG Loci des Genorts *INPP5Fv2* liegen in der von Choi et al. beschriebenen DMR, sodass die detektierte Hypermethylierung die Expression der Isoform 2 vermutlich verhindert [262]. Über die Funktion des Proteins ist noch nichts bekannt, man hat jedoch auch in Hepatoblastomen eine Hypermethylierung der DMR beobachten können [263]. In der Publikation von Rumbajan et al. wurde u.a. die DNA-Methylierung der *INPP5Fv2* DMR in Leberproben gesunder Individuen analysiert. Diese DNA-Proben zeigten auch DNA-Methylierungswerte, die an einigen analysierten CpG Einheiten (analysierten DNA-Methylierung mittels MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight) Massenspektroskopie) höhere Werte als 50 % aufwiesen [263]. Dies konnte auch für alle anderen in der vorliegenden Arbeit analysierten postnatalen Normalgewebeproben beobachtet werden. Diese Beobachtung hat somit voraussichtlich keine pathologische Bedeutung.

Die durchgeführten Analysen zur Beantwortung der Frage 4 nach der phänotypischen Breite von Imprintingstörungen ergaben, dass klassische Imprintingsyndrome ein breites phänotypisches Spektrum haben und vermutlich häufig nicht diagnostiziert werden. Weiterhin fiel auf, dass einige Patienten ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster an mehreren elterlich geprägten Genorten zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde MLMD so definiert, dass mindestens zwei Genorte, die nicht gemeinsam mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziiert sind, von einem aberranten DNA-Methylierungsmuster betroffen sein mussten. Diese Konstellation traf für insgesamt 21/200 Patienten aus den drei Patientenkollektiven mit einer Entwicklungsstörung zu. Damit scheint MLMD in den hier durchgeführten Analysen relativ häufig aufzutreten. Im Unterschied zu den publizierten Daten zum klassischen MLMD waren bei diesen 21 Patienten jedoch hauptsächlich nicht die mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziierten Genorte betroffen. Vielmehr ist in den meisten Fällen die funktionelle Bedeutung der betroffenen Loci bisher nicht entschlüsselt. Somit bleibt auch die klinische Relevanz dieser Beobachtung unklar.

#### ***4.3.2.2 Aberrante DNA-Methylierung geprägter Gene bei Patienten mit einem Multi-Locus Methylierungsdefekt***

Neben den klassischen Imprintingsyndromen mit einem Single-Locus Methylierungsdefekt können DNA-Methylierungsstörungen auch mehrere Genorte betreffen (MLMD). Um das Spektrum der DNA-

Methylierungsstörung von Patienten mit MLMD genauer zu analysieren (Frage 5 der vorliegenden Arbeit), wurden 20 Patientenproben mit bekannter DNA-Methylierungsstörung hinsichtlich Frequenz und Ausprägung der DNA-Methylierungsstörung an mehreren Genorten analysiert. Ähnliche Analysen wurden bereits mehrfach publiziert. Allerdings wurden in der Regel nur Kollektive mit einem klassischen Imprintingsyndrom und MLMD untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse mit Fokus auf DNA-Methylierungsstörungen an mehreren Genorten werden im Folgenden mit bereits publizierten Studienergebnissen vergliche und gemeinsam interpretiert.

- BWS/MLMD:

Eine relativ große Gruppe von MLMD Patienten wurde von Maeda et al. analysiert [213]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen DNA-Methylierungsdaten zu dem hier analysierten Teilkollektiv BWS/MLMD sollen im Folgenden mit den Daten von Maeda et al. verglichen werden. Da in der vorliegenden Arbeit nur Patienten mit einem BWS/MLMD auf Basis einer KvDMR Hypomethylierung untersucht wurden (n=12), sollen sich die ersten hier dargestellten vergleichenden Analysen auch nur auf dieses Teilkollektiv von Maeda et al. beziehen. In der Studie von Maeda et al. wurde das DNA-Methylierungsmuster in 29 Regionen für 54 Patienten mit einem BWS/MLMD analysiert [213]. Die Autoren unterteilten ihr Kollektiv an BWS/MLMD Patienten in 15 BWS Patienten mit einer Hypomethylierung der KvDMR und 10 Patienten mit einem BWS auf Basis einer Hypermethylierung der ICR1 [213]. Die Autoren zeigten, dass für die Patienten mit einem BWS/MLMD auf Basis einer KvDMR Hypomethylierung (n=15) der am häufigsten zusätzlich von einer aberranten DNA-Methylierung betroffene Genort *ARHI* war [213]. Dieser Genort ist bei Maeda et al. in drei separate Regionen unterteilt und entspricht, wenn diese drei Regionen von Maeda et al. zusammen ausgewertet werden, dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Genort *DIRAS*. Bei gemeinsamer Auswertung der drei mit *ARHI* bezeichneten Regionen in der Publikation von Maeda et al., waren 12/15 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) von einer aberranten DNA-Methylierung in der Region *ARHI* betroffen (80 %) [213]. Von diesen in der vorliegenden Arbeit analysierten Patienten mit BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) (n=12) zeigten vier (33 %) Patienten außerdem eine Hypomethylierung in *DIRAS*.

In der vorliegenden Arbeit zu BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) war der Genort *NHP2L1* am häufigsten (7/12) von einer aberranten DNA-Methylierung betroffen. Dieser Genort wurde bei Maeda et al. nicht analysiert.

In der eigenen Analyse zeigten 4/12 der Patienten mit BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) eine Hypermethylierung in *ZDBF2*. Bei Maeda et al. waren 6/15 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) von einer *ZDBF2* Hypermethylierung betroffen [213].

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der Genort *MCTS2* in 3/12 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) aberrant hypomethyliert vorlag. Neben den drei Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) war auch ein Patient mit einem SRS/MLMD von einer Hypomethylierung dieses Genorts betroffen. Bei Maeda et al. fiel dieser Genort allerdings bei einem der 15 BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) Patienten mit einer Hypermethylierung des Genorts auf [213]. Anders als im MLMD Kollektiv konnten in der vorliegenden Arbeit in den Teilprojekten "SGA Analyse" (n=1) und "MR Analyse" (n=4) allerdings auch eine Hypermethylierung des Genorts beobachtet werden.

In der hier vorgestellten Analyse konnte für drei DNA-Proben der 12 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) eine Hypomethylierung der DNA-Methylierung in *NAP1L5* detektiert werden. Drei der 12 Patienten mit BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) hatten eine aberrante DNA-Methylierung in *PLAGL1* und 5/12 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) zeigten eine aberrante DNA-Methylierung in *MEST*. In der Studie von Maeda et al. waren zwei dieser drei Genorte (*PLAGL1* und *MEST*) bei jeweils 1/15 BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) Patienten von einer aberranten DNA-Methylierung betroffen [213]. Der Genort *NAP1L5* zeigte in dem Kollektiv von Maeda et al. keine aberrante DNA-Methylierung [213]. Court et al. veröffentlichten als Teil einer Analyse zu MLMD aberrante DNA-Methylierungswerte ermittelt in DNA-Proben von insgesamt 14 BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) Patienten für die Genorte *NAP1L5* (2/14), *PLAGL1* (4/14) und *MEST* (4/14) [112]. Azzi et al. analysierten in einem anderen Kollektiv von Patienten mit BWS die Frequenz von MLMD [111]. Sie beobachteten in ihrem BWS/MLMD Kollektiv eine Hypomethylierung bei 6/16 (38 %) Patienten in *MEST* und bei 6/16 (38 %) Patienten in *PLAGL1* [111]. Der Genort *NAP1L5* wurde bei Azzi et al. nicht analysiert [111].

Bei einem Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) aus der vorliegenden Arbeit konnte neben der KvDMR Hypomethylierung außerdem eine Hypomethylierung an der ICR1 beobachtet werden. Bei Azzi et al. wurde auch von einem Patienten mit einer solchen Konstellation berichtet [111]. In der Arbeit von Court et al. wurde diese Konstellation bei 2/14 Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) beobachtet [112].

Die hier vorgestellten Analysen am Kollektiv von BWS/MLMD Patienten (KvDMR Hypomethylierung) ergaben übergeordnet betrachtet, dass mehr Genorte hypo- als hypermethyliert vorlagen. Diese Beobachtung traf auch für die Ergebnisse der Patienten mit einem BWS/MLMD auf Basis einer KvDMR Hypomethylierung aus der Publikation von Maeda et al. und Court et al. zu [213], [112].

Die aus der eigenen Analyse und den soeben erwähnten Publikationen zusammengetragenen DNA-Methylierungsergebnisse zu Patienten mit einem BWS/MLMD (KvDMR Hypomethylierung) sind in der Tabelle 29 übersichtshalber zusammengefasst.

**Tabelle 29:** Übersicht über zusätzlich aberrant methylierte geprägte Genorte bei Patienten mit einem BWS auf Basis einer KvDMR Hypomethylierung aus den Analysen der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu publizierten Arbeiten.

Genort (aberrante DNA-Methylierung)	eigene Analyse [n=12]	Maeda et al. [n=15]	Court et al. [n=14]	Azzi et al. [n=16]	
<i>DIRAS</i> (hypomethyliert)	4/12	12/15	1/14	Genort nicht analysiert	
<i>ZDBF2</i> (hypermethyliert)	4/12	6/15	Genort nicht analysiert	Genort nicht analysiert	
<i>NAP1L5</i> (hypomethyliert)	3/12	0/15	2/14	Genort nicht analysiert	
<i>PLAGL1</i> (hypomethyliert)	3/12	1/15	4/14	6/16	
<i>MEST</i> (hypomethyliert)	5/12	1/15	4/14	6/16	
ICR1 (hypomethyliert)	1/12	0/15	2/14	1/16	
<i>MCTS2</i>	hypomethyliert	3/12	0/15	1/14	Genort nicht analysiert
	hypermethyliert	0/12	1/15	0/14	

Maeda et al. [213], Court et al. [112], Azzi [111]et al.

- SRS/MLMD:

Die Arbeit von Azzi et al. befasste sich auch mit der DNA-Methylierung bei SRS/MLMD Patienten [111]. Einige dieser Ergebnisse sollen mit den eigenen Ergebnissen zu SRS/MLMD verglichen werden. In dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Patientenkollektiv mit einem SRS/MLMD hatten 2/6 (33 %) Patienten eine Hypomethylierung in *MEST*. Aberrante DNA-Methylierungswerte in *PLAGL1* wurden nicht detektiert. Die Patienten mit einem SRS/MLMD in dem Kollektiv von Azzi et al. zeigten eine Hypomethylierung für *MEST* in 3/7 (43 %) DNA-Proben [111]. Eine Veränderung in *PLAGL1* konnte auch für keinen der Patienten mit einem SRS/MLMD detektiert werden [111].

Für zwei der in der vorliegenden Arbeit analysierten Patienten mit einem SRS/MLMD konnte die zuvor extern ermittelte Hypomethylierung der ICR1 nicht verifiziert werden. Möglicherweise liegt ein somatisches Mosaik vor, das durch die angewandte Auswertestrategie nicht erfasst wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Frequenz und Ausprägung von MLMD für BWS und SRS stimmen sehr gut mit den bereits publizierten Daten, vor allem mit den Ergebnissen von Azzi et al., überein.

- Aberrante Hypo- bzw. Hypermethylierung:

Wie bereits erwähnt, war eine Hypermethylierung der analysierten Genorte seltener zu beobachten als eine Hypomethylierung. Nur die vier Genorte *ZDBF2*, *MEG8*, *ZNF597/NAA60* und *GNAS* zeigten, wenn sie aberrant methylierte waren, einen Anstieg der DNA-Methylierung in der MLMD Analyse. Drei weitere Genorte ICR1, Chr.15 imp. Region und *IGF1R* zeigten in dem gesamten MLMD Kollektiv

sowohl eine aberrante Hypo- als auch Hypermethylierung. Die Genorte *ZDBF2* und *GNAS* zeigten auch in der zuvor erwähnten Studie von Maeda et al. einen Anstieg der DNA-Methylierung [213]. *GNAS* und *ZNF597* wurden in der Studie von Court et al. als aberrant hypermethyliert in einem Kollektiv von Patienten mit einem MLMD beschrieben [112]. Bei Court et al. wurde des Weiteren berichtet, dass in ihrem Kollektiv von Patienten mit einem MLMD nur paternal geprägte Genorte Anstiege der DNA-Methylierung aufwiesen [112]. In dem hier analysierten Untersuchungskollektiv zu MLMD wurde eine Hypermethylierung in drei paternal geprägten Genorten und in einem maternal geprägten Genort (*MEG8*) detektiert.

Die restlichen 27 somatisch geprägten Genorte zeigten, wenn sie aberrant methyliert waren, eine Hypomethylierung. Die hohe Anzahl hypomethylierter Genorte lässt verstehen, warum bei der DNA-Methylierungsstörung an multiplen Genorten anfänglich von einem maternalen Hypomethylierungssyndrom gesprochen wurde [110]. Zunächst wurden die Genorte analysiert, die mit den klassischen Imprintingsyndromen assoziiert sind. Diese zeigen, bis auf *GNAS*, nur eine Abnahme der DNA-Methylierung. Erst im Laufe der Zeit wurden mehr geprägte Genorte identifiziert die nun zeigen, dass auch Anstiege der DNA-Methylierung vorkommen können [264]. Eine aberrante DNA-Methylierung kann darüber hinaus sowohl maternal als auch paternal geprägte Genorte betreffen, sodass sich der Begriff Multi-Locus Methylierungsdefekt durchgesetzt hat.

- Anzahl maximal aberrant methylierter Genorte in verschiedenen MLMD Kollektiven:

Zur maximalen Anzahl betroffener Genorte bei MLMD ist festzustellen, dass die in der vorliegenden Arbeit analysierten Patienten mit MLMD an mehr der analysierten Genorte, nämlich 28/34 (82%), aberrant methyliert waren, als bei Maeda et al. (13/29 bzw. 45 %) und Court et al. (17/27 bzw. 63 %) [213] [112]. Maeda et al. kamen zu dem Schluss, dass je größer die Anzahl der analysierten Genorte ist, desto größer die Wahrscheinlichkeit, einen Patienten mit MLMD zu detektieren [213]. Diese Aussage kann wahrscheinlich dahingehend variiert werden, dass mit steigender Anzahl analysierter Genorte auch die Anzahl der als aberrant methyliert ermittelten Genorte ansteigt.

- Sind wiederkehrende Kombinationen betroffener Genorte zu beobachten?

Die hier durchgeführte DNA-Methylierungsanalyse ergab, dass alle analysierten Genorte mindestens bei zwei Patienten mit MLMD aberrant methyliert vorlagen. Ein Muster konnte allerdings weder in dem gesamten Kollektiv von Patienten mit MLMD, noch in dem größten Subkollektiv, BWS/MLMD, beobachtet werden. Auch Court et al. konnten in ihrem Kollektiv von Patienten mit MLMD keine spezifische Kombination der aberrant methylierten DMRs erkennen [112].

- Somatische Mosaik:

Bei der Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit erhobenen AVG-Beta Werte konnte festgestellt werden, dass nicht alle CpG Loci der aberrant methylierten Genorte sehr niedrige bzw. sehr hohe

AVG-Beta Werte aufwiesen. An einigen aufeinanderfolgenden CpGs der als aberrant detektierten Genorte konnten AVG-Beta Werte bestimmt werden, die erstens abweichend von der physiologischen DNA-Methylierung waren und zweitens nicht einen Extremwert der DNA-Methylierung aufwiesen. Diese AVG-Beta Werte sprechen am ehesten für eine DNA-Methylierungsstörung im Mosaik. Von Court et al. wurde gezeigt, dass bei vielen Patienten mit MLMD in den als hypomethyliert bezeichneten Genorten einige DNA-Stränge methyliert vorlagen [112]. Die DNA-Methylierungsveränderung lag also im Mosaik vor.

Von dem hier am stärksten betroffenen Patienten mit MLMD (D13\_1381) sind neben den peripheren Blutproben u.a. auch DNA-Proben aus Fibroblastenzelllinien analysiert worden (siehe Teilprojekt "iPSZ Analyse", Kapitel 3.7). Die DNA-Methylierungsveränderung im Mosaik war bei diesem Patienten in den peripheren Blutproben und den DNA-Proben aus Fibroblasten z.B. für den Genort *ZDBF2*, gut zu erkennen. In der DNA-Probe aus Fibroblastenzelllinien erschien der Mittelwert der AVG-Beta Werte normal (57 %), dagegen war er in der DNA-Probe aus peripherem Blut erhöht (82 %). In einer Publikation von Mackay et al. wurde berichtet, dass die aberrante DNA-Methylierung bei Patienten mit einem MLMD in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann [110]. Somit deuten die hier erhobenen Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen daraufhin, dass eine aberrante DNA-Methylierung im Mosaik auftreten kann. Zellen eines Gewebes als auch Zellen verschiedener Gewebe können dabei unterschiedlich stark betroffen sein können.

Die Analysen zur Beantwortung der Frage 5 der vorliegenden Arbeit ergaben ein breites Spektrum an DNA-Methylierungsveränderungen bei Patienten mit MLMD. Die ermittelten Ergebnisse überlappten an vielen Stellen mit Angaben aus der Literatur. Die meisten aberrant methylierten Genorte lagen hypomethyliert vor. Es konnten jedoch auch aberrant hypermethylierte Genorte detektiert werden. Es zeigte sich, dass das Spektrum der DNA-Methylierungsvariation eines Patienten von wenigen betroffenen Genorten hin bis zu fast allen analysierten somatisch geprägten Genorten reichen kann. Alle analysierten somatisch geprägten Genorte waren mindestens in zwei Patienten aberrant methyliert. Es konnte jedoch daraus kein Muster einer spezifischen Kombination aberrant methylierter DMRs abgeleitet werden. Die AVG-Beta Werte der aberrant methylierten Genorte zeigen, dass MLMD häufig als somatisches Mosaik auftritt.

### 4.3.2.3 Diskussion zu einigen Teilprojekt übergreifenden gegensätzlich aberrant methylierten Genorten

Einige der in der vorliegenden Arbeit analysierten Genorte zeigten in den verschiedenen Teilprojekten oder im Vergleich zu Publikationen sowohl eine Hypo- als auch eine Hypermethylierung. Eine Auswahl dieser Genorte soll im Folgenden näher betrachtet werden.

- IGF1R:

Dieser Genort zeigte in den Untersuchungskollektiven “MLMD Analyse“, “SGA Analyse“ und “Ekstrophie Analyse“ sowohl hypomethylierte als auch hypermethylierte DNA-Methylierungsergebnisse für insgesamt 16 untersuchte Individuen. In Tabelle 30 sind die bestimmten Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die als aberrant detektierten Genorte der jeweiligen Analysen angegeben.

**Tabelle 30:** Als aberrant detektierte Mittelwerte der AVG-Beta Werte für den Genort *IGF1R* in drei Teilprojektanalysen der vorliegenden Arbeit.

Teilprojekt-Analyse	MLMD	SGA	Ekstrophie
Genort ist:	Mittelwert der AVG-Beta Werte bei Individuen mit aberranter DNA-Methylierung		
hypomethyliert	9 % - 38 %	37 %, 38 %	34 %, 38 %
hypermethyliert	78 %	78 %, 89 %	68 %

Der hier als *IGF1R* bezeichnete Genort analysiert sieben CpG Loci, die im *IGF1R* gene body liegen. Diese DMR reguliert die Allel-spezifische Expression der nicht kodierenden RNA *IRAIN* [265]. Sun et al. zeigten, dass *IRAIN* nur vom paternalen Allel exprimiert wird und, dass das maternale Allel durch eine DNA-Methylierung der Promotorregion stillgelegt ist [265]. Die Autoren konnten für Leukämiezelllinien und auch in Knochenmarkproben von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie zeigen, dass die Expression von *IRAIN* im Verhältnis zur Expression von *IGF1R* verringert ist [265]. Sie postulierten aufgrund von Interaktionsstudien zwischen *IRAIN* und *IGF1R*, dass durch eine reduzierte *IRAIN* Expression *IGF1R* vermehrt exprimiert wird [265]. Von *IGF1R* ist wiederum bekannt, dass es eine tragende Rolle bei verschiedenen Tumorerkrankungen spielt [266]. In Gewebeproben von Mammakarzinomen konnte z.B. eine gesteigert *IGF1R* Expression gezeigt werden [267]. Sun et al. vermuten, dass die verminderte *IRAIN* Expression zu einer gesteigerten *IGF1R* Expression führt [265]. *IGF1R* wird allerdings biallelisch exprimiert [268], [269]. Der genau Mechanismus der zur biallelischen Expression von *IGF1R* und zur monoallelischen Expression von *IRAIN* führt ist zur Zeit noch ungeklärt [265]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten aberranten DNA-Methylierungsmuster könnten einen Einfluss auf die *IRAIN* Expression und darüber eventuell auch auf die *IGF1R* Expression haben.

- MEG8:

Der Genort *MEG8* zeigte in den Analysen der verschiedenen Teilprojekte sowohl eine gesteigerte DNA-Methylierung (vergl. Teilprojekte "SGA Analyse", "MR Analyse", "MLMD Analyse"), als auch eine verringerte DNA-Methylierung ("SGA Analyse") im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Eine Hypermethylierung ist dabei immer zusammen mit einer *MEG3* Hypomethylierung zu beobachten. Eine Diskussion bezüglich des Genorts *MEG8* erfolgte bereits im Kapitel 4.3.2.1.

- IGF2R:

In dem Kollektiv für die "MLMD Analyse" war eine Hypomethylierung für den *IGF2R* Genort festzustellen. Dahingegen konnte in dem Kollektiv für die "SGA Analyse" bei vier SGA-geborenen Kindern und in dem Kollektiv für die "MR Analyse" bei einem Patienten eine Hypermethylierung des *IGF2R* Genorts detektiert werden. Die Mittelwerte der AVG-Beta Werte für die von einer aberranten DNA-Methylierung betroffenen Patienten sind in Tabelle 31 angegeben.

**Tabelle 31:** Als aberrant detektierte Mittelwerte der AVG-Beta Werte für den Genort *IGF2R* in drei Teilprojektanalysen der vorliegenden Arbeit.

Teilprojekt-Analyse	MLMD	SGA	MR
Genort ist:	Mittelwert der AVG-Beta Werte bei Individuen mit aberranter DNA-Methylierung		
hypomethyliert	21 % - 44 %		
hypermethyliert		83 % - 89 %	86 %

Die analysierten CpGs dieser DMR liegen im Intron 2 des *IGF2R* Gens und werden als *IGF2R* DMR2 zusammengefasst. Von der DMR2 konnte in Mausexperimenten gezeigt werden, dass sie die monoallelische Expression von *IGF2R* reguliert [270]. Zur monoallelischen Expression beim Menschen gibt es widersprüchliche Daten. Monk et al. konnten in 3/8 Plazentaprobe eine monoallelische Expression nachweisen [271]. Kalscheuer et al. und auch Killian et al. untersuchten die *IGF2R* Expression u.a. in verschiedenen fetalen Geweben (u.a. Leber-, Nieren- und Hirngewebe) und in Plazentaprobe und detektierten durchgängig eine bialleliche Expression in allen analysierten Geweben [272], [273]. Nur einzelne untersuchte Individuen zeigten eine monoallelische Expression, wie z.B. zwei von 14 analysierten Feten von Xu et al. [274]. Dieses Phänomen wird als polymorphes Imprinting bezeichnet [274].

Neben diesen Expressionsanalysen zeigen publizierte DNA-Methylierungsanalysen zu *IGF2R*, dass die DMR2 sowohl in verschiedenen Patientenkollektiven als auch in den dazugehörigen Kontrollkollektiven hypermethyliert vorliegen kann [275], [169]. In einer Studie von Turner et al. zeigten DNA-Proben aus peripherem Blut von 7/79 Patienten mit einer Wachstumsstörung sowie von 3/267 Kontrollen eine Hypermethylierung der *IGF2R* DMR2 [275]. In einer im Institut für

Humangenetik Kiel durchgeführten DNA-Methylierungsanalyse für u.a. *IGF2R* konnte gezeigt werden, dass sowohl SGA-geborene Kinder (5/98) als auch Eltern SGA-geborener Kinder eine Hypermethylierung der *IGF2R* DMR aufweisen [169]. Vor allem, da keine Korrelation zwischen Hypermethylierung der *IGF2R* DMR2 und dem klinischen Phänotyp der Patienten gefunden wurde, wird diese als epigenetischer Polymorphismus diskutiert [169].

Zusammenfassend ergeben diese Beobachtungen, dass die DMRs einzelner geprägter Gene eine aberrante DNA-Methylierung in beide Richtungen akquirieren können. Die Auswirkungen auf die Expression der assoziierten Gene und die klinische Relevanz bleibt zu prüfen.

#### ***4.4 DNA-Methylierung in Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen***

Die hier durchgeführten DNA-Methylierungsanalysen an induzierten pluripotenten Stammzellen und den dazu gehörigen Ursprungsgeweben sollten als Frage 6 der vorliegenden Arbeit klären, wie sich das DNA-Methylierungsmuster an den geprägten Genorten während des Prozesses der Reprogrammierung ändert. Die durchgeführten Analysen für die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte ergaben ein DNA-Methylierungsmuster ähnlich dem der anderen Teilprojekte. Dabei zeigten die DNA-Methylierungsmuster der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte kaum Unterschiede zwischen iPSZ, Fibroblastenzelllinie und peripherer Blutprobe des untersuchten Individuums. Deutliche Unterschiede zwischen iPSZ und Ausgangsgewebe (Fibroblastenzelllinien) sowie den pB-Proben der Probanden waren allerdings in den DNA-Methylierungsmustern der somatisch geprägten Genorte zu erkennen. Die Analyse der somatisch geprägten Genorte zeigte, dass Patienten-spezifisch aberrante DNA-Methylierungsmuster der Ursprungsgewebe nicht immer in den iPSZ wiederzufinden sind. Die Analyse von drei iPSZ Klonen eines Patienten mit MLMD ergab zudem, dass das DNA-Methylierungsmuster in den verschiedenen iPSZ Klonen variieren kann, was durch ein somatisches Mosaik der DNA-Methylierung in den Fibroblasten oder durch den Vorgang der Reprogrammierung an sich bedingt sein kann.

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten iPSZ stammen von Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen. Die hier charakterisierten iPSZ sind einzigartig dahingehend, dass bis jetzt iPSZ nur von Patienten mit Imprintingstörungen aufgrund von chromosomalen Imbalancen bzw. einer Translokation generiert wurden, aber nicht von Patienten mit einer primären Epimutation (vergl. Kapitel 1.5). Daher kann ein Vergleich mit publizierten Daten zurzeit noch nicht erfolgen.

## **4.5 Fazit**

Die durchgeführten Analysen zur Frage 1 der vorliegenden Arbeit, ob die DNA-Methylierung geprägter Gene von der Gewebefixierung abhängig ist, ergaben, dass eine FFPE-Fixierung die DNA-Methylierung im Vergleich zur HOPE-Fixierung oder Kryokonservierung deutlich beeinflusst.

Hinsichtlich Frage 2 einer möglichen Gewebespezifität der DNA-Methylierung geprägter Gene in pränatalem und postnatalem Normalgewebe konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Gewebespezifität für einige wenige somatisch geprägte Gene relevant ist. Als Resultat der Ergebnisse zu Frage 1 und Frage 2 wurden für weitere in der Arbeit durchgeführte vergleichende Analysen keine fixierten Gewebeproben verwendet und das gleiche Gewebe als Kontrolle genutzt, wie das zu untersuchende Gewebe.

Hinsichtlich Frage 3 der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das physiologische DNA-Methylierungsmuster geprägter Gene im Rahmen der Entwicklung von benignen und malignen Erkrankungen einerseits und durch therapeutische Eingriffe andererseits verändern kann. Dabei spielen für maligne Prozesse offensichtlich die Plazenta-spezifisch geprägten Gene eine besondere Rolle.

Die DNA-Methylierungsanalysen zu Frage 4 der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass Imprintingstörungen ein breites phänotypisches Spektrum besitzen. Sowohl der oft nicht klassische Phänotyp als auch die nachgewiesenen Mosaikformen könnten dazu beitragen, dass Imprintingstörungen häufig unterdiagnostiziert sind, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen.

Hinsichtlich Frage 5 der vorliegenden Arbeit zum Ausmaß und zum Muster der DNA-Methylierungsveränderung geprägter Gene bei Patienten mit MLMD konnte gezeigt werden, dass bei MLMD sowohl aberrant hypomethylierte als auch hypermethylierte Genorte nachweisbar sind. Darunter befanden sich sowohl maternal als auch paternal geprägte Gene, wobei die betroffenen Genorte eine hohe Varianz aufwiesen.

Der Fokus der Frage 6 der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung des DNA-Methylierungsmusters geprägter Gene von Patientenspezifischen iPSZ. Die iPSZ von Patienten mit primären DNA-Methylierungsstörungen zeigten z.T. ähnliche extreme Werte (vollmethyliert bzw. unmethyliert) der DNA-Methylierung somatisch geprägter Gene, wobei aberrante DNA-Methylierungsmuster der Ursprungsgewebe nicht immer in den iPSZ erhalten blieben.

Insgesamt konnten alle Fragestellungen der Arbeit umfassend beantwortet werden. Aus den Befunden leiten sich zu Imprinting eine Reihe neuer Aspekte, vor allem in physiologischen und pathologischen Prozessen, ab, die Gegenstand zukünftiger Analysen sein müssen.

## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Analysen geprägter Gene zeigen, dass diese nicht nur bei den klassischen Imprintingsyndromen eine wichtige Rolle spielen. Über die Veränderung des DNA-Methylierungszustands der differenziell methylierten Regionen können geprägte Gene auch Einfluss auf die Entstehung und Progression von benignen und malignen somatischen Erkrankungen haben. Von einigen der hier analysierten geprägten Genen ist die genaue Funktion nicht bekannt. Das Potenzial, dass sie zur Entstehung/Progression von Krebserkrankungen beitragen, haben viele der geprägten Gene, da sie u.a. Wachstumsprozesse regulieren. Nur wenn die Funktion dieser Gene und die Regulationsmechanismen der Expressionskontrolle vollständig bekannt sind, können fundierte Aussagen über den Effekt der veränderten DNA-Methylierung getroffen werden.

Sehr interessant ist die beobachtete Veränderung der DNA-Methylierung der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte in Darmproben von Patienten mit CRC. Kommt diese Konstellation auch bei anderen malignen Erkrankungen vor? Sind nur die hier gezeigten Genorte von der Veränderung betroffen, oder zeigen sich sogar Tumorentität-spezifische Veränderungen der Plazenta-spezifisch geprägten Gene? Dies sind Fragen, die in weiteren Analysen bearbeitet werden könnten.

Die Spanne der aberrant methylierten Genorte bei Patienten mit einem MLMD scheint sehr groß zu sein. Was unterscheidet die Patienten mit einem MLMD mit vielen aberrant methylierten Genorten von den Patienten mit wenigen aberrant methylierten Genorten? Ist das DNA-Methylierungsmuster auch nicht geprägter Gene bei Patienten mit MLMD verändert? Wenn ja, in welchem Ausmaß ist dies verändert? Liegen den unterschiedlichen Untergruppen von MLMD vielleicht (verschiedene) monogene Ursachen zugrunde? Hier wären weiterführende Exom-/Genomsequenzierungen gegebenenfalls aufschlussreich, um cis oder trans regulatorische DNA-Mutationen zu identifizieren.

Eine weitere Möglichkeit, SLMD und MLMD weiter zu analysieren, bietet sich jetzt durch die Generierung und Charakterisierung von iPSZ. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden solche iPSZ von Patienten mit SLMD und MLMD generiert und charakterisiert, die nun re-differenziert werden müssen. Wie verhalten sich die iPSZ im Prozess der Re-Differenzierung im Vergleich zu iPSZ von Patienten ohne DNA-Methylierungsdefekt? Werden die ursprünglichen Fehler der DNA-Methylierung aufgehoben oder beibehalten? Diese und weiterführende Fragen werden im BMBF geförderten Konsortium „Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“ behandelt werden. Aber auch andere Konsortien, darunter das International Human Epigenome Consortium, arbeiten daran, das Epigenom gesunder und erkrankter Individuen zu charakterisieren, um so einen besseren Einblick in das menschliche Epigenom zu erhalten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können eine Grundlage sein für die Interpretation klinischer Befunde, biologischer Besonderheiten und der zukünftigen Ergebnisse aus iPSZ von Patienten mit Epimutation.

## ***5 Zusammenfassung***

Die Expression von Genen in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft des Allels wird als Imprinting (“Prägung“) bezeichnet. Diese Eltern-spezifische Expression wird u.a. durch die Allel-spezifische DNA-Methylierung differenziell methylierter Regionen (DMRs) reguliert. Dabei liegt eine DMR in der Regel auf einem der beiden elterlichen Allele methyliert und auf dem anderen Allel unmethyliert vor. Da viele geprägte Gene in Wachstums- und Differenzierungsprozesse eingebunden sind, ist die korrekte Regulation der Expression geprägter Gene wichtig für die physiologische Entwicklung. Eine gestörte DNA-Methylierung von DMRs kann die aberrante Expression elterlich geprägter Gene bewirken. Konstitutionelle Störungen der elterlichen Prägung sind sowohl mit klassischen Imprintingsyndromen als auch mit Multi-Locus Methylierungsdefekten (MLMD) assoziiert. DNA-Methylierungsstörungen geprägter Gene werden aber auch bei benignen und malignen somatischen Erkrankungen beschrieben und können zu deren Krankheitsentstehung und Progression beitragen.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren, bis auf die IG-DMR auf Chromosom 14q32.2, sämtliche 34 somatisch und 20 Plazenta-spezifisch geprägten DMRs des Menschen. Da diese DMRs z.T. erst jüngst beschrieben wurden, sind zu vielen keine systematischen DNA-Methylierungsdaten zur physiologischen Entwicklung oder zu pathologischen Prozessen publiziert. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, die physiologische DNA-Methylierung dieser geprägten DMRs in pränatalen und postnatalen Normalgeweben auch unter Berücksichtigung des Einflusses der Gewebefixierung zu charakterisieren. Weiterhin sollte die DNA-Methylierung dieser DMRs im Kontext benigner und maligner somatischer Erkrankungen, konstitutioneller Störungen und in Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) analysiert werden.

Analysiert wurden DNA-Proben von 2 pränatalen Geweben und 4 normalen postnatalen Geweben, von Leberproben von Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) vor und nach Therapie sowie von Normal- und Tumorgewebeproben von Patienten mit Dickdarmkrebs (CRC). Weiterhin wurden DNA-Proben von Patienten mit verschiedenen Arten einer Entwicklungsstörung (zu klein und/oder zu leicht für Geburtsalter und Geschlecht geboren, Blasenektrophie, mentale Retardierung), von Patienten mit MLMD und Patienten-spezifische iPSZ analysiert.

Insgesamt wurden 517 Hybridisierungen auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips prozessiert. Weiterhin wurden Daten von 171 bereits vorhandenen Hybridisierungen auf Infinium HumanMethylation27 bzw. Infinium HumanMethylation450 BeadChips für die Analysen herangezogen. Die Verifizierung ausgewählter Ergebnisse erfolgte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung und Methylierungs-spezifischer multiplex-ligationsabhängiger Probenamplifikation. Zur Abklärung einer aberranten DNA-Methylierung wurden Mikrosatelliten- und SNP-Array Analysen durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass die Standard-Formalin Fixierung von Gewebeproben zu DNA-Methylierungsveränderungen im Vergleich zu kryokonservierten und HOPE fixierten Gewebeproben führt. Die Analysen zur physiologischen DNA-Methylierung Plazenta-spezifisch geprägter DMRs ergab nur in DNA-Proben aus Chorionzotten eine, wie bei geprägten Genen zu erwartende, Hemi-Methylierung (41 % - 77 %). In anderen Geweben waren die drei Genorte *GPR1-AS*, *ZFAT* und *MIR512-1 cluster* immer hoch (87 %, 89 %, 90 %), *LIN28B* immer intermediär (30 %) und die restlichen Genorte immer niedrig methyliert (6 % - 15 %). Die physiologische DNA-Methylierung der somatisch geprägten Genorte zeigte, bis auf den Genort *BLCAP/NNAT*, in allen untersuchten Normalgeweben eine DNA-Methylierung zwischen 40 % und 67 %. Die DNA-Methylierung des Genorts *BLCAP/NNAT* betrug in DNA-Proben aus peripherem Blut 63 %, in den anderen Normalgeweben zwischen 78 % - 84 %. Auch in pathologisch veränderten Geweben zeigten die Plazenta-spezifisch geprägten Genorte ein einheitliches DNA-Methylierungsmuster wie in den Normalgeweben. Die Ausnahme bildeten DNA-Proben von Tumoren, welche für die Genorte *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* und *CABIN1* DNA-Methylierungswerte zwischen 13 % und 31 % aufwiesen (umgebendes Normalgewebe 6 % - 14 %). Der Genort *LIN28B* zeigte in Kolontumor- (59 %) und Normalgewebe (47 %) höhere DNA-Methylierungswerte als in den anderen untersuchten Normalgeweben (30 %). Die Analysen zu pathologischen Veränderungen der somatisch geprägten Genorte ergaben aberrante DNA-Methylierungswerte in DNA-Proben von Patienten mit CRC, NAFLD und konstitutionellen Erkrankungen. Sehr viel häufiger betroffen waren somatisch geprägte Genorte, die bis jetzt keinem klassischen Imprintingsyndrom zugeordnet sind, als Genorte, die einem solchen Syndrom zugeordnet sind. Bei Patienten mit verschiedenen Entwicklungsstörungen war die DNA-Methylierung des Genorts *ZNF331* am häufigsten verändert (16/200). Drei der mit einem klassischen Imprintingsyndrom assoziierten Genorte (*MEG3*, *MEG8*: Temple Syndrom, *PLAGL1*: Transienter Neonataler Diabetes Mellitus) waren bei insgesamt 3/200 Patienten aberrant methyliert. Die iPSZ Analysen ergaben für viele der somatisch geprägten Genorte eine Hypomethylierung.

Insgesamt zeigten die DNA-Methylierungsanalysen der Plazenta-spezifisch geprägten Genorte ein stabiles DNA-Methylierungsmuster, welches nur in Tumorgewebeproben Änderungen zum physiologischen Muster aufwies. Die somatisch geprägten Genorte hingegen wiesen sowohl eine Gewebespezifität als auch Veränderungen der DNA-Methylierung in allen analysierten krankhaft veränderten DNA-Proben auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind einerseits für die Planung von vergleichenden DNA-Methylierungsstudien geprägter Gene an menschlichem Gewebe von Bedeutung. Andererseits können sie als Basis für die Interpretation von physiologischen und pathologischen DNA-Methylierungsbefunden an DMRs geprägter Gene zukünftiger Studien dienen.

## **6 Summary**

The term parental imprinting describes the expression of genes dependent of the parental origin of the alleles. This parental-specific expression is regulated amongst others by allele-specific DNA-methylation of differentially methylated regions (DMRs). In general, the DMR on one of the two parental alleles is methylated while the other is unmethylated. Due to the involvement of imprinted genes in growth and differentiation processes the accurate regulation of imprinted gene expression is important for the physiological development. A disturbed DNA-methylation at a DMR can cause the aberrant expression of parent-specific imprinted genes. Constitutional disturbances of the parental imprinting are associated with classical imprinting disorders as well as with multi locus methylation defects (MLMD). Moreover, aberrant DNA-methylation of imprinted genes has also been described in benign and malignant somatic diseases and may contribute to their development and progression.

All 34 somatic, except for the somatic IG-DMR on chromosome 14q32.2, and 20 placental-specific human imprinted genes were analysed in this study. Since these DMRs have been described just recently DNA-methylation data concerning the physiological development or regarding pathological processes have yet not been published. Therefore, the aim of this study was to characterize the physiological DNA-methylation of these imprinted DMRs in prenatal and postnatal normal tissues. Moreover, the influence of tissue fixation on DNA-methylation should be studied. Furthermore, the DNA-methylation of these DMRs should be analysed in context of benign and malignant somatic diseases, constitutional disorders and in patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSC).

The analyses were performed on DNA samples from two prenatal and four normal postnatal tissues, on liver samples of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) before and after therapy as well as on normal and tumoral tissue of patients with colorectal cancer (CRC). Finally, DNA samples of patients with different developmental disorders (small for gestational age, bladder extrophy, mental retardation), of patients with MLMD and of patient-specific iPSC were analysed.

Overall 517 hybridizations were processed on Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Furthermore, 171 existing hybridization data from Infinium HumanMethylation27 BeadChips and Infinium HumanMethylation450 BeadChips were used for the analyses. Verification of selected results was performed by bisulfite pyrosequencing and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. The reasons for aberrant DNA-methylation were further investigated by microsatellite and SNP-Array analyses.

Analyses of the influence of the tissue fixation revealed that formalin-fixed and paraffin-embedded tissues showed different DNA-methylation levels at imprinted loci as compared to cryo-conserved

and HOPE fixed tissues. Analyses of physiological DNA-methylation of placental-specific imprinted genes revealed only in chorionic villi a hemi-methylation (41 % - 77 %), as expected for imprinted genes. In contrast, the DNA-methylation values in the other analysed normal tissues were high for *GPR1-AS*, *ZFAT* and *MIR512-1 cluster* (87 %, 89 %, 90 %), intermediate for *LIN28B* (30 %) and low for the remaining gene loci (6 % - 15 %). The physiological DNA-methylation of somatic imprinted genes showed DNA-methylation values between 40 % and 67 % in all analysed normal tissues. The exception was the *BLCAP/NNAT* locus which showed in peripheral blood a DNA-methylation of 63 % and in the other normal tissues between 78 % and 84 %. In almost all pathologically altered tissues the DNA-methylation pattern of the placental-specific imprinted genes was consistent with the pattern seen in normal tissue. However, the tumor samples showed DNA-methylation values for the gene loci *FAM196A/DOCK1*, *RGMA*, *FAM20A* and *CABIN1* between 13 % and 31 % (surrounding normal colon tissue 6 % - 14 %). The gene locus *LIN28B* exhibited in colon tumor samples (59 %) and in normal tissue samples (47 %) a higher DNA-methylation than in the other analysed normal tissues (30 %). Analyses of the physiological DNA-methylation of somatic imprinted genes revealed aberrant DNA-methylation in patients with CRC, NAFLD and constitutional disorders. These analyses furthermore revealed that somatic imprinted genes, which have been so far not associated with one of the classical imprinting disorders, are more commonly affected by aberrant methylation than genes associated with such a syndrome. The *ZNF331* locus was most frequently aberrantly methylated in patients with different developmental disorders (16/200). Moreover three loci associated with a classical imprinting disorder (*MEG3*, *MEG8*: Temple syndrome, *PLAGL1*: transient neonatal diabetes mellitus) were aberrantly methylated in a total of 3/200 of these patients. Analyses of DNA-methylation in iPSC revealed many hypomethylated somatic imprinted genes. Altogether the DNA-methylation of placental-specific imprinted genes showed a stable DNA-methylation pattern, showing pathological DNA-methylation changes only in tumor samples. However, the somatic imprinted genes showed tissue specificity as well as DNA-methylation changes in all analysed diseased DNA-samples. On the one hand the results obtained in the present study provide a basis for the planning of future comparative DNA-methylation studies on human tissues. On the other hand they can also help in the interpretation of physiological and pathological DNA-methylation findings on DMRs of imprinted genes in future studies.

## 7 Referenzen

1. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E: **Epigenetics: a landscape takes shape.** *Cell* 2007, **128**:635–638.
2. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes Dev* 2002, **16**:6–21.
3. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA: **Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.** *Nature* 2004, **429**:457–463.
4. Bártoová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S: **Histone modifications and nuclear architecture: a review.** *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2008, **56**:711–721.
5. Avner P, Heard E: **X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:59–67.
6. Chuang JC, Jones PA: **Epigenetics and microRNAs.** *Pediatr Res* 2007, **61**(5 Pt 2):24R–29R.
7. Ammar R, Torti D, Tsui K, Gebbia M, Durbic T, Bader GD, Giaever G, Nislow C: **Chromatin is an ancient innovation conserved between Archaea and Eukarya.** *eLife* 2012, **1**:e00078.
8. Shaytan AK, Landsman D, Panchenko AR: **Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers.** *Curr Opin Struct Biol* 2015, **32C**:48–57.
9. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**:251–260.
10. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A: **Histone modifications dictate specific biological readouts.** *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao* 2009, **36**:75–88.
11. Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR, Grant PA: **Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation.** *Nature* 2005, **433**:434–438.
12. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S: **Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains.** *Genes Dev* 2003, **17**:1870–1881.
13. Cedar H, Bergman Y: **Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**:295–304.
14. Hergersberg M: **Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells.** *Experientia* 1991, **47**:1171–1185.
15. Song C-X, He C: **The hunt for 5-hydroxymethylcytosine: the sixth base.** *Epigenomics* 2011, **3**:521–523.
16. Cadet J, Wagner JR: **TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine.** *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014, **764-765**:18–35.
17. Pinney S: **Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond.** *Biology* 2014, **3**:739–751.

18. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C: **Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.** *Nucleic Acids Res* 1982, **10**:2709–2721.
19. Yan J, Zierath JR, Barrès R: **Evidence for non-CpG methylation in mammals.** *Exp Cell Res* 2011, **317**:2555–2561.
20. Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG: **Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature.** *Mol Genet Metab* 2014, **113**:243–252.
21. Davis CD, Uthus EO: **DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions.** *Exp Biol Med* Maywood NJ 2004, **229**:988–995.
22. Karlson P, Doenecke D, Fuchs G: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* 13., neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 1988.
23. Barnabé A, Aléssio ACM, Bittar LF, de Moraes Mazetto B, Bicudo AM, de Paula EV, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi JM: **Folate, Vitamin B12 and Homocysteine status in the post-folic acid fortification era in different subgroups of the Brazilian population attended to at a public health care center.** *Nutr J* 2015, **14**:19.
24. Lee D-H, Jacobs DR, Porta M: **Hypothesis: a unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation.** *Environ Health Perspect* 2009, **117**:1799–1802.
25. Goll MG, Bestor TH: **Eukaryotic cytosine methyltransferases.** *Annu Rev Biochem* 2005, **74**:481–514.
26. Cervoni N, Bhattacharya S, Szyf M: **DNA demethylase is a processive enzyme.** *J Biol Chem* 1999, **274**:8363–8366.
27. Gardiner-Garden M, Frommer M: **CpG islands in vertebrate genomes.** *J Mol Biol* 1987, **196**:261–282.
28. Deaton AM, Bird A: **CpG islands and the regulation of transcription.** *Genes Dev* 2011, **25**:1010–1022.
29. Tate PH, Bird AP: **Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression.** *Curr Opin Genet Dev* 1993, **3**:226–231.
30. Klose RJ, Bird AP: **Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.** *Trends Biochem Sci* 2006, **31**:89–97.
31. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S: **Epigenetic mechanisms in mammals.** *Cell Mol Life Sci CMLS* 2009, **66**:596–612.
32. Cross SH, Bird AP: **CpG islands and genes.** *Curr Opin Genet Dev* 1995, **5**:309–314.
33. McGrath J, Solter D: **Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes.** *Cell* 1984, **37**:179–183.
34. Barlow DP, Stöger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N: **The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus.** *Nature* 1991, **349**:84–87.

35. Horsthemke B: **In brief: genomic imprinting and imprinting diseases.** *J Pathol* 2014, **232**:485–487.
36. Glaser RL, Ramsay JP, Morison IM: **The imprinted gene and parent-of-origin effect database now includes parental origin of de novo mutations.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Database issue):D29–31.
37. Horsthemke B: **Genomisches Imprinting und Imprintingfehler.** *Med Genet* 2010, **22**:385–391.
38. Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B: **Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15.** *Nat Genet* 1995, **9**:395–400.
39. Stöger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP: **Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal.** *Cell* 1993, **73**:61–71.
40. Murphy SK, Huang Z, Hoyo C: **Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues.** *PLoS One* 2012, **7**:e40924.
41. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S: **Epigenome-wide association studies for common human diseases.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**:529–541.
42. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC: **Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting.** *Genes* 2014, **5**:635–655.
43. 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.** *Dev Camb Engl* 2002, **129**:1983–1993.
44. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H: **Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**:2272–2280.
45. Lopes S, Lewis A, Hajkova P, Dean W, Oswald J, Forné T, Murrell A, Constância M, Bartolomei M, Walter J, Reik W: **Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**:295–305.
46. Sasaki H, Ishihara K, Kato R: **Mechanisms of Igf2/H19 Imprinting: DNA Methylation, Chromatin and Long-Distance Gene Regulation.** *J Biochem (Tokyo)* 2000, **127**:711–715.
47. Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G: **The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99 Suppl 4**:16433–16437.
48. Blackwood EM, Kadonaga JT: **Going the Distance: A Current View of Enhancer Action.** *Science* 1998, **281**:60–63.
49. Plank JL, Dean A: **Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together.** *Mol Cell* 2014, **55**:5–14.
50. Delaval K, Feil R: **Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting.** *Curr Opin Genet Dev* 2004, **14**:188–195.

51. Gabory A, Ripoche M-A, Digarcher AL, Watrin F, Ziyyat A, Forné T, Jammes H, Ainscough JFX, Surani MA, Journot L, Dandolo L: **H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice.** *Development* 2009, **136**:3413–3421.
52. Dey BK, Pfeifer K, Dutta A: **The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration.** *Genes Dev* 2014, **28**:491–501.
53. Feinberg AP: **Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction.** *Cancer Res* 1999, **59**(7 Suppl):1743s–1746s.
54. Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J: **Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression.** *Cancer Lett* 2013, **333**:213–221.
55. Hibi K, Nakamura H, Hirai A, Fujikake Y, Kasai Y, Akiyama S, Ito K, Takagi H: **Loss of H19 imprinting in esophageal cancer.** *Cancer Res* 1996, **56**:480–482.
56. Eggermann T: **Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes: opposite (epi)mutations in 11p15 result in opposite clinical pictures.** *Horm Res* 2009, **71** Suppl 2:30–35.
57. Bell AC, Felsenfeld G: **Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.** *Nature* 2000, **405**:482–485.
58. Phillips JE, Corces VG: **CTCF: master weaver of the genome.** *Cell* 2009, **137**:1194–1211.
59. Wang J, Lunyak VV, Jordan IK: **Genome-wide prediction and analysis of human chromatin boundary elements.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:511–529.
60. Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, Rademacher K, Guala A, Enklaar T, Anichini C, Cirillo Silengo M, Graf N, Prawitt D, Cubellis MV, Horsthemke B, Buiting K, Riccio A: **The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites.** *Hum Mol Genet* 2013, **22**:544–557.
61. Prawitt D, Enklaar T, Zabel B: **Beckwith-Wiedemann-Syndrom.** *Med Genet* 2010, **22**:399–404.
62. Azzi S, Steunou V, Tost J, Rossignol S, Thibaud N, Neves C Das, Le Jule M, Habib WA, Blaise A, Koudou Y, Busato F, Le Bouc Y, Netchine I: **Exhaustive methylation analysis revealed uneven profiles of methylation at IGF2/ICR1/H19 11p15 loci in Russell Silver syndrome.** *J Med Genet* 2015, **52**:53–60.
63. Eggermann T, Binder G, Brioude F, Maher ER, Lapunzina P, Cubellis MV, Bergadá I, Prawitt D, Begemann M: **CDKN1C mutations: two sides of the same coin.** *Trends Mol Med* 2014, **20**:614–622.
64. Liin SI, Barro-Soria R, Larsson HP: **The KCNQ1 channel - remarkable flexibility in gating allows for functional versatility.** *J Physiol* 2015.
65. Higashimoto K, Soejima H, Saito T, Okumura K, Mukai T: **Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer.** *Cytogenet Genome Res* 2006, **113**:306–312.

66. Shmela ME, Gicquel CF: **Human diseases versus mouse models: insights into the regulation of genomic imprinting at the human 11p15/mouse distal chromosome 7 region.** *J Med Genet* 2013, **50**:11–20.
67. Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR, Kanduri M, Göndör A, Grange T, Ohlsson R, Kanduri C: **An Antisense RNA Regulates the Bidirectional Silencing Property of the Kcnq1 Imprinting Control Region.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:7855–7862.
68. Henckel A, Arnaud P: **Genome-wide identification of new imprinted genes.** *Brief Funct Genomics* 2010:elq016.
69. Roessler J, Ammerpohl O, Gutwein J, Hasemeier B, Anwar SL, Kreipe H, Lehmann U: **Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:210.
70. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D: **Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment.** *Genome Res* 2014, **24**:554–569.
71. Eggermann T, Kotzot D: **Uniparentale Disomien: Entstehungsmechanismen und ihre Bedeutung für die klinische Genetik.** *Med Genet* 2010, **22**:439–451.
72. Kajii T, Ohama K: **Androgenetic origin of hydatidiform mole.** *Nature* 1977, **268**:633–634.
73. Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, Kindarova LB, Kuzmichev LN, Janus JD, Pryzhkova MV: **Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts.** *Cloning Stem Cells* 2007, **9**:432–449.
74. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W: **Epigenetic reprogramming in mammals.** *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No 1**:R47–58.
75. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL: **Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo.** *Genes Dev* 1999, **13**:424–436.
76. Szabó PE, Hübner K, Schöler H, Mann JR: **Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells.** *Mech Dev* 2002, **115**:157–160.
77. Lucifero D, Mann MRW, Bartolomei MS, Trasler JM: **Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting.** *Hum Mol Genet* 2004, **13**:839–849.
78. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W: **Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo.** *Dev Biol* 2002, **241**:172–182.
79. Olek A, Walter J: **The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint.** *Nat Genet* 1997, **17**:275–276.
80. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR: **Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene.** *Cell* 2001, **104**:829–838.

81. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W: **Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013, **368**:20110330.
82. Zakhartchenko V, Wolf E, Beier HM, others: **Epigenetische Kontrolle der Genaktivität.** *Reproduktionsmedizin* 2003, **19**:84–92.
83. Otto SP, Goldstein DB: **Recombination and the evolution of diploidy.** *Genetics* 1992, **131**:745–751.
84. Wilkins JF, Haig D: **What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:359–368.
85. Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG: **A census of mammalian imprinting.** *Trends Genet* 2005, **21**:457–465.
86. Hore TA, Rapkins RW, Graves JAM: **Construction and evolution of imprinted loci in mammals.** *Trends Genet TIG* 2007, **23**:440–448.
87. Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, Kanduri C, Lezcano M, Singh Sandhu K, Singh U, Pant V, Tiwari V, Kurukuti S, Ohlsson R: **Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions.** *Nat Genet* 2006, **38**:1341–1347.
88. 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**:711–722.
89. Monnier P, Martinet C, Pontis J, Stancheva I, Ait-Si-Ali S, Dandolo L: **H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:20693–20698.
90. Adhami H Al, Evano B, Le Digarcher A, Gueydan C, Dubois E, Parrinello H, Dantec C, Bouschet T, Varrault A, Journot L: **A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation.** *Genome Res* 2015, **25**:353–367.
91. 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**:2650–2660.
92. Stelzer Y, Sagi I, Yanuka O, Eiges R, Benvenisty N: **The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome.** *Nat Genet* 2014, **46**:551–557.
93. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J: **Imprinting disorders and assisted reproductive technology.** *Fertil Steril* 2009, **91**:305–315.
94. Cui H: **Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer.** *Dis Markers* 2007, **23**:105–112.

95. Mackay DJG, Callaway JLA, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JMD, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK: **Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57.** *Nat Genet* 2008, **40**:949–951.
96. Horsthemke B: **Epimutations in human disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **310**:45–59.
97. Friso S, Choi S-W, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J: **A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:5606–5611.
98. Robertson KD: **DNA methylation and human disease.** *Nat Rev Genet* 2005, **6**:597–610.
99. Albrecht B, Buiting K: **Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom.** *Med Genet* 2010, **22**:392–398.
100. Mackay DJG, Eggermann T, Buiting K, Garin I, Netchine I, Linglart A, de Nanclares GP: **Multilocus methylation defects in imprinting disorders.** *Biomol Concepts* 2015, **6**:47–57.
101. Spengler S, Begemann M, Binder G, Eggermann T: **Genetik und Epigenetik des Silver-Russell-Syndroms.** *Med Genet* 2010, **22**:405–410.
102. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJG, Davies JH, Temple IK: **Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases.** *J Med Genet* 2014, **51**:495–501.
103. 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 AC, Ishino F, Ogata T: **Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes.** *Nat Genet* 2008, **40**:237–242.
104. Thiele S, Hiort O: **Pseudohypoparathyreoidismus und epigenetische Veränderungen des GNAS-Genlocus.** *Med Genet* 2010, **22**:419–423.
105. Haaf T: **Imprintingstörungen in der Reproduktionsmedizin.** *Med Genet* 2010, **22**:424–428.
106. Amor DJ, Halliday J: **A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies.** *Hum Reprod Oxf Engl* 2008, **23**:2826–2834.
107. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor D: **Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study.** *Am J Hum Genet* 2004, **75**:526–528.
108. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B: **Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples.** *J Med Genet* 2005, **42**:289–291.
109. Vermeiden JPW, Bernardus RE: **Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection?** *Fertil Steril* 2013, **99**:642–651.

110. Mackay DJG, Boonen SE, Clayton-Smith J, Goodship J, Hahnemann JMD, Kant SG, Njølstad PR, Robin NH, Robinson DO, Siebert R, Shield JPH, White HE, Temple IK: **A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus.** *Hum Genet* 2006, **120**:262–269.
111. 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.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**:4724–4733.
112. Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, Garin I, Iglesias-Platas I, Salafsky I, Guitart M, Perez de Nanclares G, Lapunzina P, Monk D: **Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes.** *Hum Mutat* 2013, **34**:595–602.
113. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R, Bagga R, Kircheisen R, Ao A, Ratti B, Hanash S, Rouleau GA, Slim R: **Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans.** *Nat Genet* 2006, **38**:300–302.
114. Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, Baglivo I, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A, Trono D: **In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions.** *Mol Cell* 2011, **44**:361–372.
115. Girardot M, Feil R, Llères D: **Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications.** *Epigenomics* 2013, **5**:715–728.
116. Messerschmidt DM, de Vries W, Ito M, Solter D, Ferguson-Smith A, Knowles BB: **Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition.** *Science* 2012, **335**:1499–1502.
117. Duéñez-Guzmán EA, Haig D: **The evolution of reproduction-related NLRP genes.** *J Mol Evol* 2014, **78**:194–201.
118. Meyer E, Lim D, Pasha S, Tee LJ, Rahman F, Yates JRW, Woods CG, Reik W, Maher ER: **Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome).** *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000423.
119. Hayward BE, De Vos M, Talati N, Abdollahi MR, Taylor GR, Meyer E, Williams D, Maher ER, Setna F, Nazir K, Hussaini S, Jafri H, Rashid Y, Sheridan E, Bonthron DT: **Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole.** *Hum Mutat* 2009, **30**:E629–639.
120. Caliebe A, Richter J, Ammerpohl O, Kanber D, Beygo J, Bens S, Haake A, Jüttner E, Korn B, Mackay DJG, Martin-Subero JJ, Nagel I, Sebire NJ, Seidmann L, Vater I, Kaisenberg CS von, Temple IK, Horsthemke B, Buiting K, Siebert R: **A familial disorder of altered DNA-methylation.** *J Med Genet* 2014, **51**:407–412.
121. Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, Diggle C, Carr I, Rittore C, Touitou I, Philibert L, Fisher RA, Fallahian M, Huntriss JD, Picton HM, Malik S, Taylor GR, Johnson CA, Bonthron DT, Sheridan EG: **Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte.** *Am J Hum Genet* 2011, **89**:451–458.

122. Akoury E, Zhang L, Ao A, Slim R: **NLRP7 and KHDC3L, the two maternal-effect proteins responsible for recurrent hydatidiform moles, co-localize to the oocyte cytoskeleton.** *Hum Reprod Oxf Engl* 2015, **30**:159–169.
123. Valverde R, Edwards L, Regan L: **Structure and function of KH domains.** *FEBS J* 2008, **275**:2712–2726.
124. Pierre A, Gautier M, Callebaut I, Bontoux M, Jeanpierre E, Pontarotti P, Monget P: **Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyte- and embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family.** *Genomics* 2007, **90**:583–594.
125. Poole RL, Baple E, Crolla JA, Temple IK, Mackay DJG: **Investigation of 90 patients referred for molecular cytogenetic analysis using aCGH uncovers previously unsuspected anomalies of imprinting.** *Am J Med Genet A* 2010, **152A**:1990–1993.
126. Poole RL, Docherty LE, Sayegh A Al, Caliebe A, Turner C, Baple E, Wakeling E, Harrison L, Lehmann A, Temple IK, Mackay DJG, International Clinical Imprinting Consortium: **Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders.** *Am J Med Genet A* 2013, **161A**:2174–2182.
127. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO: **Small for gestational age: short stature and beyond.** *Endocr Rev* 2007, **28**:219–251.
128. Weemaes CMR, van Tol MJD, Wang J, van Ostaijen-ten Dam MM, van Eggermond MCJA, Thijssen PE, Aytakin C, Brunetti-Pierri N, van der Burg M, Graham Davies E, Ferster A, Furthner D, Gimelli G, Gennery A, Kloeckener-Gruissem B, Meyn S, Powell C, Reisli I, Schuetz C, Schulz A, Shugar A, van den Elsen PJ, van der Maarel SM: **Heterogeneous clinical presentation in ICF syndrome: correlation with underlying gene defects.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2013, **21**:1219–1225.
129. Liyanage VRB, Rastegar M: **Rett syndrome and MeCP2.** *Neuromolecular Med* 2014, **16**:231–264.
130. De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A: **Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance.** *Hum Reprod Oxf Engl* 2002, **17**:2487–2494.
131. Messelink EJ, Aronson DC, Knuist M, Heij HA, Vos A: **Four cases of bladder exstrophy in two families.** *J Med Genet* 1994, **31**:490–492.
132. Markus Draaken: **Molekulargenetische Untersuchungen bei uro-rektalen Fehlbildungen,** Universität Bon, Dissertation, 2014, urn:nbn:de:hbz:5n-34997
133. Shanske AL, Pande S, Aref K, Vega-Rich C, Brion L, Reznik S, Timor-Tritsch IE: **Omphalocele-exstrophy-imperforate anus-spinal defects (OEIS) in triplet pregnancy after IVF and CVS.** *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003, **67**:467–471.
134. Wood HM, Babineau D, Gearhart JP: **In vitro fertilization and the cloacal/bladder exstrophy-epispadias complex: a continuing association.** *J Pediatr Urol* 2007, **3**:305–310.
135. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P: **The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study.** *Gastroenterology* 2005, **129**:113–121.

136. Uchil D, Pipalia D, Chawla M, Patel R, Maniar S, Narayani null, Juneja A: **Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--the hepatic component of metabolic syndrome.** *J Assoc Physicians India* 2009, **57**:201–204.
137. Tian Y, Wong VW-S, Chan HL-Y, Cheng AS-L: **Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease.** *Semin Cancer Biol* 2013, **23**(6 Pt B):471–482.
138. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA: **Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation.** *Mol Genet Metab* 2013, **110**:388–395.
139. Murphy SK, Yang H, Moylan CA, Pang H, Dellinger A, Abdelmalek MF, Garrett ME, Ashley-Koch A, Suzuki A, Tillmann HL, Hauser MA, Diehl AM: **Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2013, **145**:1076–1087.
140. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69–90.
141. Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi J-M, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB: **Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer.** *PLoS Genet* 2007, **3**:1709–1723.
142. Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG: **A census of mammalian imprinting.** *Trends Genet TIG* 2005, **21**:457–465.
143. Jelinic P, Shaw P: **Loss of imprinting and cancer.** *J Pathol* 2007, **211**:261–268.
144. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE: **Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour.** *Nature* 1993, **362**:749–751.
145. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P: **Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development.** *Hum Mol Genet* 2003, **12 Spec No 1**:R61–68.
146. Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomaki P, Plass C, Nakamura Y, La Chapelle A de: **Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:591–596.
147. Tian F, Tang Z, Song G, Pan Y, He B, Bao Q, Wang S: **Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypomethylation of the H19 differentially methylated region in the tumor tissue of colorectal cancer patients.** *Mol Med Rep* 2012, **5**:1536–1540.
148. Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, Kugoh H, Mukai T, Ikeguchi M, Oshimura M: **Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers.** *Cancer Sci* 2006, **97**:1147–1154.
149. Nishihara S, Hayashida T, Mitsuya K, Schulz TC, Ikeguchi M, Kaibara N, Oshimura M: **Multipoint imprinting analysis in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability.** *Int J Oncol* 2000, **17**:317–322.

150. Hikichi T, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F: **Imprinting regulation of the murine Meg1/Grb10 and human GRB10 genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:1398–1406.
151. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: **Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.** *Cell* 2007, **131**:861–872.
152. Hochedlinger K, Plath K: **Epigenetic reprogramming and induced pluripotency.** *Dev Camb Engl* 2009, **136**:509–523.
153. Takahashi K, Yamanaka S: **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** *Cell* 2006, **126**:663–676.
154. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S: **Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells.** *Science* 2008, **321**:699–702.
155. Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K: **Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression.** *Stem Cells Dayt Ohio* 2008, **26**:2467–2474.
156. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K: **Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:2883–2888.
157. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA: **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** *Science* 2007, **318**:1917–1920.
158. Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K: **Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2010, **465**:175–181.
159. Nazor KL, Altun G, Lynch C, Tran H, Harness JV, Slavin I, Garitaonandia I, Müller F-J, Wang Y-C, Boscolo FS, Fakunle E, Dumevska B, Lee S, Park HS, Olee T, Lima DD D', Semechkin R, Parast MM, Galat V, Laslett AL, Schmidt U, Keirstead HS, Loring JF, Laurent LC: **Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives.** *Cell Stem Cell* 2012, **10**:620–634.
160. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T: **Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells.** *BMC Genet* 2013, **14**:32.
161. Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N: **Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells.** *Stem Cells Dayt Ohio* 2009, **27**:2686–2690.
162. Chamberlain SJ, Chen P-F, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M: **Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:17668–17673.

163. Yang J, Cai J, Zhang Y, Wang X, Li W, Xu J, Li F, Guo X, Deng K, Zhong M, Chen Y, Lai L, Pei D, Esteban MA: **Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader-Willi syndrome.** *J Biol Chem* 2010, **285**:40303–40311.
164. Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA: **Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene.** *Am J Hum Genet* 1999, **64**:70–76.
165. Eckmann-Scholz C, Bens S, Kolarova J, Schneppenheim S, Caliebe A, Heidemann S, Kaisenberg C von, Kautza M, Jonat W, Siebert R, Ammerpohl O: **DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples.** *PLoS One* 2012, **7**:e39014.
166. Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kühl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J: **HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues.** *Pathol Res Pract* 2001, **197**:823–826.
167. Marwitz S, Kolarova J, Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Schädlich I, Haake A, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, Ammerpohl O: **The tissue is the issue: improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE technique.** *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2014, **94**:927–933.
168. Niklasson A, Albertsson-Wikland K: **Continuous growth reference from 24th week of gestation to 24 months by gender.** *BMC Pediatr* 2008, **8**:8.
169. Bens S, Haake A, Richter J, Lehold J, Kolarova J, Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillissen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R: **Frequency and characterization of DNA methylation defects in children born SGA.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2013, **21**:838–843.
170. Kolarova J, Tangen I, Bens S, Gillissen-Kaesbach G, Gutwein J, Kautza M, Rydzanicz M, Stephani U, Siebert R, Ammerpohl O, Caliebe A: **Array-based DNA-methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype.** *Eur J Med Genet* .
171. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A: **Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:e128.
172. Carew JA, Feldberg RS: **Recognition of a cytosine base lesion by a human damage-specific DNA binding protein.** *Nucleic Acids Res* 1985, **13**:303–315.
173. Tost J, Gut IG: **DNA methylation analysis by pyrosequencing.** *Nat Protoc* 2007, **2**:2265–2275.
174. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan J-B, Shen R: **High density DNA methylation array with single CpG site resolution.** *Genomics* 2011, **98**:288–295.
175. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan J-B: **High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays.** *Genome Res* 2006, **16**:383–393.
176. Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Lynch AG, Tavaré S, Ritchie ME: **Statistical issues in the analysis of Illumina data.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:85.

177. Kuan PF, Wang S, Zhou X, Chu H: **A statistical framework for Illumina DNA methylation arrays.** *Bioinformatics* 2010, **26**:2849–2855.
178. Weiß C: *Basiswissen medizinische Statistik: mit 9 Übersichten ; [mit Epidemiologie]*. 3., überarb. Aufl. Heidelberg: Springer; 2005. [Springer-Lehrbuch]
179. Ahrens M, Ammerpohl O, Schönfels W von, Kolarova J, Bens S, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Erhart W, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Häslner R, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Siebert R, Schafmayer C, Hampe J: **DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery.** *Cell Metab* 2013, **18**:296–302.
180. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *J R Stat Soc Ser B Methodol* 1995, **57**:289–300.
181. Kolarova J, Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe FG, Eggermann T, Caliebe A, Holterhus P-M, Siebert R, Bens S: **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans.** *PloS One* 2015, **10**:e0120463.
182. Dumenil TD, Wockner LF, Bettington M, McKeone DM, Klein K, Bowdler LM, Montgomery GW, Leggett BA, Whitehall VL: **Genome-wide DNA methylation analysis of formalin-fixed paraffin embedded colorectal cancer tissue.** *Genes Chromosomes Cancer* 2014, **53**:537–548.
183. Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S: **Identification of methylated cytosine from archival formalin-fixed paraffin-embedded specimens.** *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2000, **80**:275–276.
184. Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M: **The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?** *PloS One* 2007, **2**:e537.
185. Bosso M, Mulla F Al-: **Whole genome amplification of DNA extracted from FFPE tissues.** *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011, **724**:161–180.
186. Jasmine F, Rahaman R, Roy S, Raza M, Paul R, Rakibuz-Zaman M, Paul-Brutus R, Dodsworth C, Kamal M, Ahsan H, Kibriya MG: **Interpretation of genome-wide Infinium methylation data from ligated DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded paired tumor and normal tissue.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:117.
187. Thirlwell C, Eymard M, Feber A, Teschendorff A, Pearce K, Lechner M, Widschwendter M, Beck S: **Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip.** *Methods San Diego Calif* 2010, **52**:248–254.
188. Moran S, Vizoso M, Martinez-Cardús A, Gomez A, Matías-Guiu X, Chiavenna SM, Fernandez AG, Esteller M: **Validation of DNA methylation profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples using the Infinium HumanMethylation450 Microarray.** *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 2014, **9**:829–833.
189. Andersen GB, Hager H, Hansen LL, Tost J: **Improved reproducibility in genome-wide DNA methylation analysis for PAXgene-fixed samples compared with restored formalin fixation and paraffin-embedding DNA.** *Anal Biochem* 2014, **468C**:50–58.

190. Soriano-Tárraga C, Jiménez-Conde J, Giralt-Steinhauer E, Ois A, Rodríguez-Campello A, Cuadrado-Godia E, Fernández-Cadenas I, Montaner J, Lucas G, Elosua R, Roquer J, GeneStroke “The Spanish Stroke Genetics Consortium”: **DNA isolation method is a source of global DNA methylation variability measured with LUMA. Experimental analysis and a systematic review.** *PLoS One* 2013, **8**:e60750.
191. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: **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**:1827–1831.
192. Tost J, Gut IG: **Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology.** *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2007, **373**:89–102.
193. Raizis AM, Schmitt F, Jost JP: **A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation.** *Anal Biochem* 1995, **226**:161–166.
194. Holmes EE, Jung M, Meller S, Lisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe L-A, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D: **Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine.** *PLoS One* 2014, **9**:e93933.
195. Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, Boavida MG, Jordan P: **PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences.** *Mol Pathol MP* 2001, **54**:351–353.
196. Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F: **Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology.** *Epigenomics* 2011, **3**:771–784.
197. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC: **A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data.** *BMC Genomics* 2013, **14**:293.
198. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M: **Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome.** *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 2011, **6**:692–702.
199. Chen Y, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R: **Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray.** *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 2013, **8**:203–209.
200. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, Geman D, Baggerly K, Irizarry RA: **Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:733–739.
201. Sun Z, Chai HS, Wu Y, White WM, Donkena KV, Klein CJ, Garovic VD, Therneau TM, Kocher J-PA: **Batch effect correction for genome-wide methylation data with Illumina Infinium platform.** *BMC Med Genomics* 2011, **4**:84.
202. van Eijk KR, de Jong S, Boks MPM, Langeveld T, Colas F, Veldink JH, de Kovel CGF, Janson E, Strengman E, Langfelder P, Kahn RS, van den Berg LH, Horvath S, Ophoff RA: **Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects.** *BMC Genomics* 2012, **13**:636.

203. Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ, Houseman EA, Brown R: **Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data.** *Br J Cancer* 2013, **109**:1394–1402.
204. Touleimat N, Tost J: **Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation.** *Epigenomics* 2012, **4**:325–341.
205. Minning C, Mokhtar NM, Abdullah N, Muhammad R, Emran NA, Ali SAMD, Harun R, Jamal R: **Exploring breast carcinogenesis through integrative genomics and epigenomics analyses.** *Int J Oncol* 2014, **45**:1959–1968.
206. Kannenberg K, Urban C, Binder G: **Increased incidence of aberrant DNA methylation within diverse imprinted gene loci outside of IGF2/H19 in Silver-Russell syndrome.** *Clin Genet* 2012, **81**:366–377.
207. Horvath S: **DNA methylation age of human tissues and cell types.** *Genome Biol* 2013, **14**:R115.
208. Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HED, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT: **Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs.** *Aging Cell* 2012, **11**:694–703.
209. van Otterdijk SD, Mathers JC, Strathdee G: **Do age-related changes in DNA methylation play a role in the development of age-related diseases?** *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:803–807.
210. Damaschke NA, Yang B, Bhusari S, Svaren JP, Jarrard DF: **Epigenetic susceptibility factors for prostate cancer with aging.** *The Prostate* 2013, **73**:1721–1730.
211. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Pàldi A, Jouannet P, Jeanpierre M: **Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis.** *Hum Mol Genet* 2000, **9**:2183–2187.
212. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M: **Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2007, **15**:352–361.
213. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H: **Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations.** *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2014, **16**:903–912.
214. Johnstone KA, DuBose AJ, Futtner CR, Elmore MD, Brannan CI, Resnick JL: **A human imprinting centre demonstrates conserved acquisition but diverged maintenance of imprinting in a mouse model for Angelman syndrome imprinting defects.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**:393–404.
215. Tomizawa S, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H: **Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes.** *Dev Camb Engl* 2011, **138**:811–820.

216. Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T: **Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc.** *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 2013, **8**:635–645.
217. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Khtib M Al-, Lefèvre A, Coullin P, Moore GE, Cavaillé J: **The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**:3566–3582.
218. Moore GE, Ishida M, Demetriou C, Olabi L Al-, Leon LJ, Thomas AC, Abu-Amero S, Frost JM, Stafford JL, Chaoqun Y, Duncan AJ, Baigel R, Brimiouille M, Iglesias-Platas I, Apostolidou S, Aggarwal R, Whittaker JC, Syngelaki A, Nicolaidis KH, Regan L, Monk D, Stanier P: **The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015, **370**:20140074.
219. Turan N, Ghalwash MF, Katari S, Coutifaris C, Obradovic Z, Sapienza C: **DNA methylation differences at growth related genes correlate with birth weight: a molecular signature linked to developmental origins of adult disease?** *BMC Med Genomics* 2012, **5**:10.
220. Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Petazzi P, Guillaumet-Adkins A, Esteller M, Monk D: **Altered expression of the imprinted transcription factor PLAGL1 deregulates a network of genes in the human IUGR placenta.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**:6275–6285.
221. Kishino T: **Imprinting in neurons.** *Cytogenet Genome Res* 2006, **113**:209–214.
222. Plasschaert RN, Bartolomei MS: **Tissue-specific regulation and function of Grb10 during growth and neuronal commitment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.
223. Monk D, Arnaud P, Frost J, Hills FA, Stanier P, Feil R, Moore GE: **Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**:3066–3074.
224. Turan S, Bastepe M: **The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene.** *Horm Res Pædiatrics* 2013, **80**:229–241.
225. Liu J, Chen M, Deng C, Bourc'his D, Nealon JG, Erlichman B, Bestor TH, Weinstein LS: **Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:5513–5518.
226. Evans HK, Wylie AA, Murphy SK, Jirtle RL: **The neuronatin gene resides in a “micro-imprinted” domain on human chromosome 20q11.2.** *Genomics* 2001, **77**:99–104.
227. Hubertus J, Zitzmann F, Trippel F, Müller-Höcker J, Stehr M, Schweinitz D von, Kappler R: **Selective methylation of CpGs at regulatory binding sites controls NNAT expression in Wilms tumors.** *PLoS One* 2013, **8**:e67605.
228. Wijnholds J, Chowdhury K, Wehr R, Gruss P: **Segment-specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development.** *Dev Biol* 1995, **171**:73–84.
229. Kuerbitz SJ, Pahys J, Wilson A, Compitello N, Gray TA: **Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia.** *Carcinogenesis* 2002, **23**:559–564.

230. Coolen MW, Statham AL, Qu W, Campbell MJ, Henders AK, Montgomery GW, Martin NG, Clark SJ: **Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins.** *PLoS One* 2011, **6**:e25590.
231. Charalambous M, Da Rocha ST, Radford EJ, Medina-Gomez G, Curran S, Pinnock SB, Ferrón SR, Vidal-Puig A, Ferguson-Smith AC: **DLK1/PREF1 regulates nutrient metabolism and protects from steatosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:16088–16093.
232. Zimmer V, Lammert F: **Genetics and epigenetics in the fibrogenic evolution of chronic liver diseases.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011, **25**:269–280.
233. Huang R-C, Galati JC, Burrows S, Beilin LJ, Li X, Pennell CE, van Eekelen J, Mori TA, Adams LA, Craig JM: **DNA methylation of the IGF2/H19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults.** *Clin Epigenetics* 2012, **4**:21.
234. Nelissen ECM, van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Evers JLH: **Epigenetics and the placenta.** *Hum Reprod Update* 2011, **17**:397–417.
235. Rousseaux S, Debernardi A, Jacquiau B, Vitte A-L, Vesin A, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brichon P-Y, Lantuejoul S, Hainaut P, Laffaire J, de Reyniès A, Beer DG, Timsit J-F, Brambilla C, Brambilla E, Khochbin S: **Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers.** *Sci Transl Med* 2013, **5**:186ra66.
236. Schroeder DI, Blair JD, Lott P, Yu HOK, Hong D, Crary F, Ashwood P, Walker C, Korf I, Robinson WP, LaSalle JM: **The human placenta methylome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:6037–6042.
237. Watanabe T, Kobunai T, Sakamoto E, Yamamoto Y, Konishi T, Horiuchi A, Shimada R, Oka T, Nagawa H: **Gene expression signature for recurrence in stage III colorectal cancers.** *Cancer* 2009, **115**:283–292.
238. Li VSW, Yuen ST, Chan TL, Yan HHN, Law WL, Yeung BHY, Chan ASY, Tsui WY, So S, Chen X, Leung SY: **Frequent inactivation of axon guidance molecule RGMA in human colon cancer through genetic and epigenetic mechanisms.** *Gastroenterology* 2009, **137**:176–187.
239. Zhao Z-W, Lian W-J, Chen G-Q, Zhou H-Y, Wang G-M, Cao X, Yang H-J, Hou Y-P: **Decreased expression of repulsive guidance molecule member A by DNA methylation in colorectal cancer is related to tumor progression.** *Oncol Rep* 2012, **27**:1653–1659.
240. King CE, Cuatrecasas M, Castells A, Sepulveda AR, Lee J-S, Rustgi AK: **LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis.** *Cancer Res* 2011, **71**:4260–4268.
241. King CE, Wang L, Winograd R, Madison BB, Mongroo PS, Johnstone CN, Rustgi AK: **LIN28B fosters colon cancer migration, invasion and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms.** *Oncogene* 2011, **30**:4185–4193.
242. Hershman MJ, Swift RI, Reilly DT, Logan WA, Sackier JM, Gompertz H, Horner J, Baker NW, Wood CB: **Prospective comparative study of cefotetan with piperacillin for prophylaxis against infection in elective colorectal surgery.** *J R Coll Surg Edinb* 1990, **35**:29–32.
243. Viswanathan SR, Daley GQ: **Lin28: A microRNA regulator with a macro role.** *Cell* 2010, **140**:445–449.

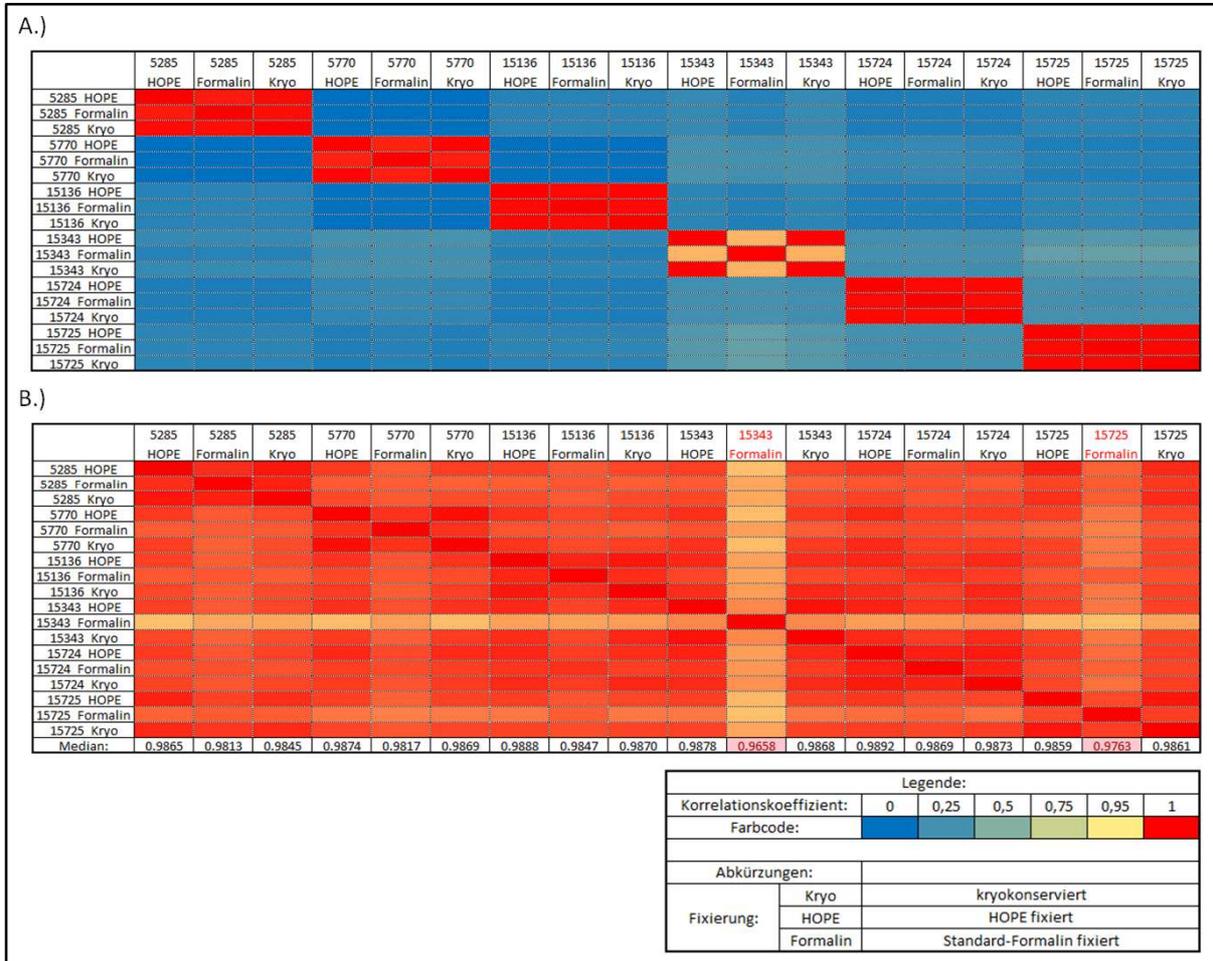
244. Dansranjav T, Krehl S, Mueller T, Mueller LP, Schmoll H-J, Dammann RH: **The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation.** *Cell Cycle Georget Tex* 2009, **8**:916–924.
245. Hovestadt V, Jones DTW, Picelli S, Wang W, Kool M, Northcott PA, Sultan M, Stachurski K, Ryzhova M, Warnatz H-J, Ralser M, Brun S, Bunt J, Jäger N, Kleinheinz K, Erkek S, Weber UD, Bartholomae CC, Kalle C von, Lawerenz C, Eils J, Koster J, Versteeg R, Milde T, Witt O, Schmidt S, Wolf S, Pietsch T, Rutkowski S, Scheurlen W, et al.: **Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing.** *Nature* 2014, **510**:537–541.
246. Hu Q, Peng J, Liu W, He X, Cui L, Chen X, Yang M, Liu H, Liu S, Wang H: **Lin28B is a novel prognostic marker in gastric adenocarcinoma.** *Int J Clin Exp Pathol* 2014, **7**:5083–5092.
247. Eggermann T, Netchine I, Temple IK, Tümer Z, Monk D, Mackay D, Grønskov K, Riccio A, Linglart A, Maher ER: **Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care.** *Clin Epigenetics* 2015, **7**:23.
248. Beygo J, Elbracht M, de Groot K, Begemann M, Kanber D, Platzer K, Gillessen-Kaesbach G, Vierzig A, Green A, Heller R, Buiting K, Eggermann T: **Novel deletions affecting the MEG3-DMR provide further evidence for a hierarchical regulation of imprinting in 14q32.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2015, **23**:180–188.
249. Takada S, Tevendale M, Baker J, Georgiades P, Campbell E, Freeman T, Johnson MH, Paulsen M, Ferguson-Smith AC: **Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12.** *Curr Biol CB* 2000, **10**:1135–1138.
250. Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC: **Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14.** *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 2008, **3**:181–187.
251. Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I, Briasoulis E: **The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis.** *Cell Mol Life Sci CMLS* 2013, **70**:795–814.
252. Mackay D, Bens S, Perez de Nanclares G, Siebert R, Temple IK: **Clinical utility gene card for: Transient Neonatal Diabetes Mellitus, 6q24-related.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2014, **22**.
253. Bens S, Siebert R, Caliebe A: **Transient neonataler Diabetes und Hypomethylierungssyndrome.** *Med Genet* 2010, **22**:411–418.
254. Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A: **Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2005, **13**:273–277.
255. Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B: **Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect.** *Hum Mol Genet* 2004, **13**:2547–2555.
256. Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TCW, Go MYY, Tao Q, Chang Z, Sung JJY: **Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer.** *Oncogene* 2013, **32**:307–317.

257. Meiboom M, Murua Escobar H, Pentimalli F, Fusco A, Belge G, Bullerdiek J: **A 3.4-kbp transcript of ZNF331 is solely expressed in follicular thyroid adenomas.** *Cytogenet Genome Res* 2003, **101**:113–117.
258. Vedeld HM, Andresen K, Eilertsen IA, Nesbakken A, Seruca R, Gladhaug IP, Thiis-Evensen E, Rognum TO, Boberg KM, Lind GE: **The novel colorectal cancer biomarkers CDO1, ZSCAN18 and ZNF331 are frequently methylated across gastrointestinal cancers.** *Int J Cancer J Int Cancer* 2015, **136**:844–853.
259. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF: **The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins.** *Nature* 1994, **371**:297–300.
260. Wood AJ, Roberts RG, Monk D, Moore GE, Schulz R, Oakey RJ: **A screen for retrotransposed imprinted genes reveals an association between X chromosome homology and maternal germ-line methylation.** *PLoS Genet* 2007, **3**:e20.
261. Monk D, Arnaud P, Frost JM, Wood AJ, Cowley M, Martin-Trujillo A, Guillaumet-Adkins A, Iglesias Platas I, Camprubi C, Bourc'his D, Feil R, Moore GE, Oakey RJ: **Human imprinted retrogenes exhibit non-canonical imprint chromatin signatures and reside in non-imprinted host genes.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:4577–4586.
262. Choi JD, Underkoffler LA, Wood AJ, Collins JN, Williams PT, Golden JA, Schuster EF, Loomes KM, Oakey RJ: **A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:5514–5522.
263. Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K: **Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma.** *BMC Cancer* 2013, **13**:608.
264. Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T: **Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2.** *Genomics* 2009, **93**:461–472.
265. Sun J, Li W, Sun Y, Yu D, Wen X, Wang H, Cui J, Wang G, Hoffman AR, Hu J-F: **A novel antisense long noncoding RNA within the IGF1R gene locus is imprinted in hematopoietic malignancies.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:9588–9601.
266. Werner H, Sarfstein R: **Transcriptional and epigenetic control of IGF1R gene expression: Implications in metabolism and cancer.** *Growth Horm IGF Res* 2014, **24**:112–118.
267. Kang L, Sun J, Wen X, Cui J, Wang G, Hoffman AR, Hu J-F, Li W: **Aberrant allele-switch imprinting of a novel IGF1R intragenic antisense non-coding RNA in breast cancers.** *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2015, **51**:260–270.
268. Howard TK, Algar EM, Glatz JA, Reeve AE, Smith PJ: **The insulin-like growth factor 1 receptor gene is normally biallelically expressed in human juvenile tissue and tumours.** *Hum Mol Genet* 1993, **2**:2089–2092.
269. Ogawa O, McNoe LA, Eccles MR, Morison IM, Reeve AE: **Human insulin-like growth factor type I and type II receptors are not imprinted.** *Hum Mol Genet* 1993, **2**:2163–2165.

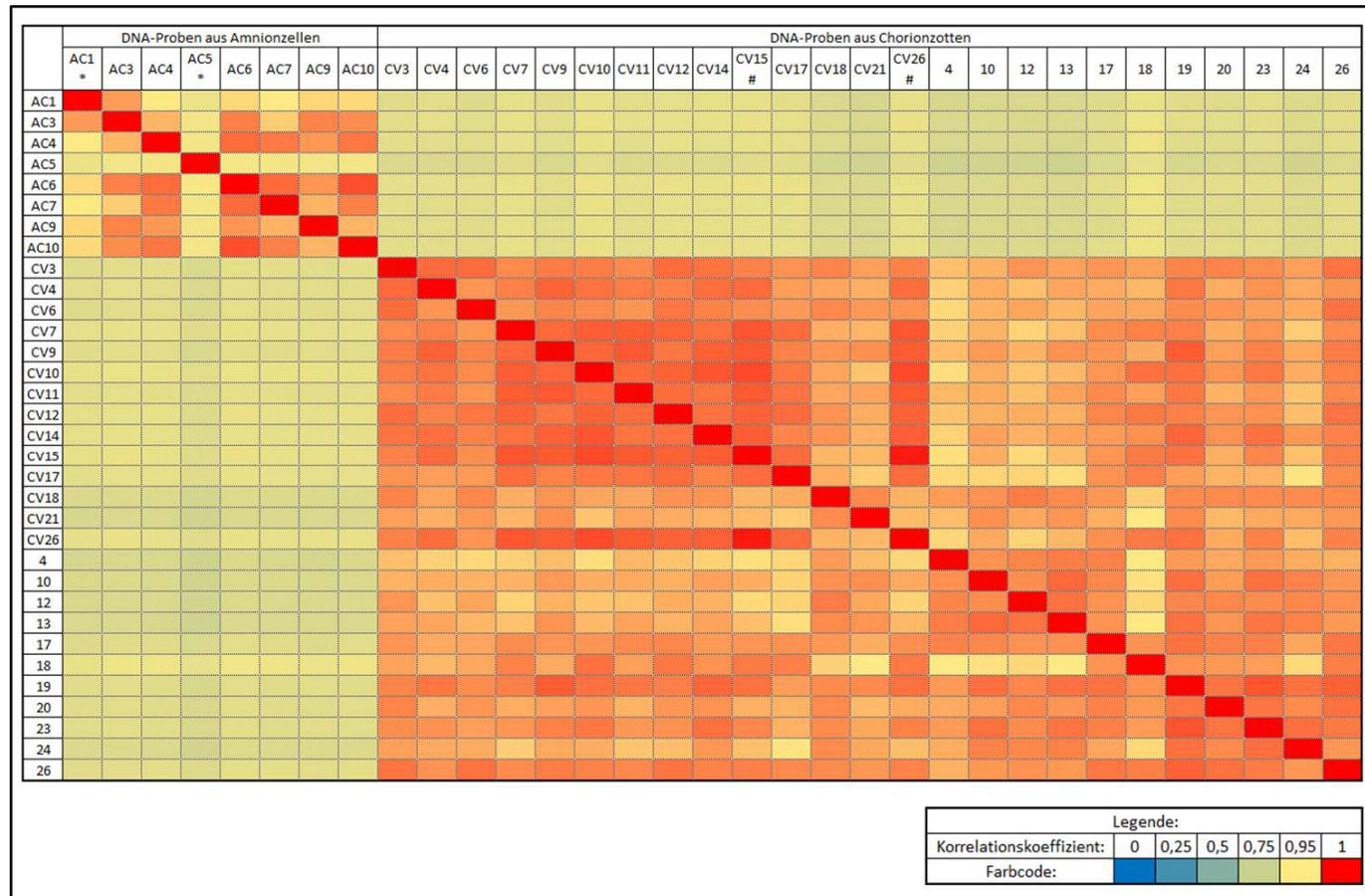
270. Smrzka OW, Faé I, Stöger R, Kurzbauer R, Fischer GF, Henn T, Weith A, Barlow DP: **Conservation of a maternal-specific methylation signal at the human IGF2R locus.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**:1945–1952.
271. Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, Stanier P, Feil R, Moore GE: **Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:6623–6628.
272. Kalscheuer VM, Mariman EC, Schepens MT, Rehder H, Ropers HH: **The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans.** *Nat Genet* 1993, **5**:74–78.
273. Killian JK, Nolan CM, Wylie AA, Li T, Vu TH, Hoffman AR, Jirtle RL: **Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the Quaternary.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**:1721–1728.
274. Xu Y, Goodyer CG, Deal C, Polychronakos C: **Functional polymorphism in the parental imprinting of the human IGF2R gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **197**:747–754.
275. Turner CLS, Mackay DM, Callaway JLA, Docherty LE, Poole RL, Bullman H, Lever M, Castle BM, Kivuva EC, Turnpenny PD, Mehta SG, Mansour S, Wakeling EL, Mathew V, Madden J, Davies JH, Temple IK: **Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci.** *Eur J Hum Genet EJHG* 2010, **18**:648–655.

# 8 Anhang

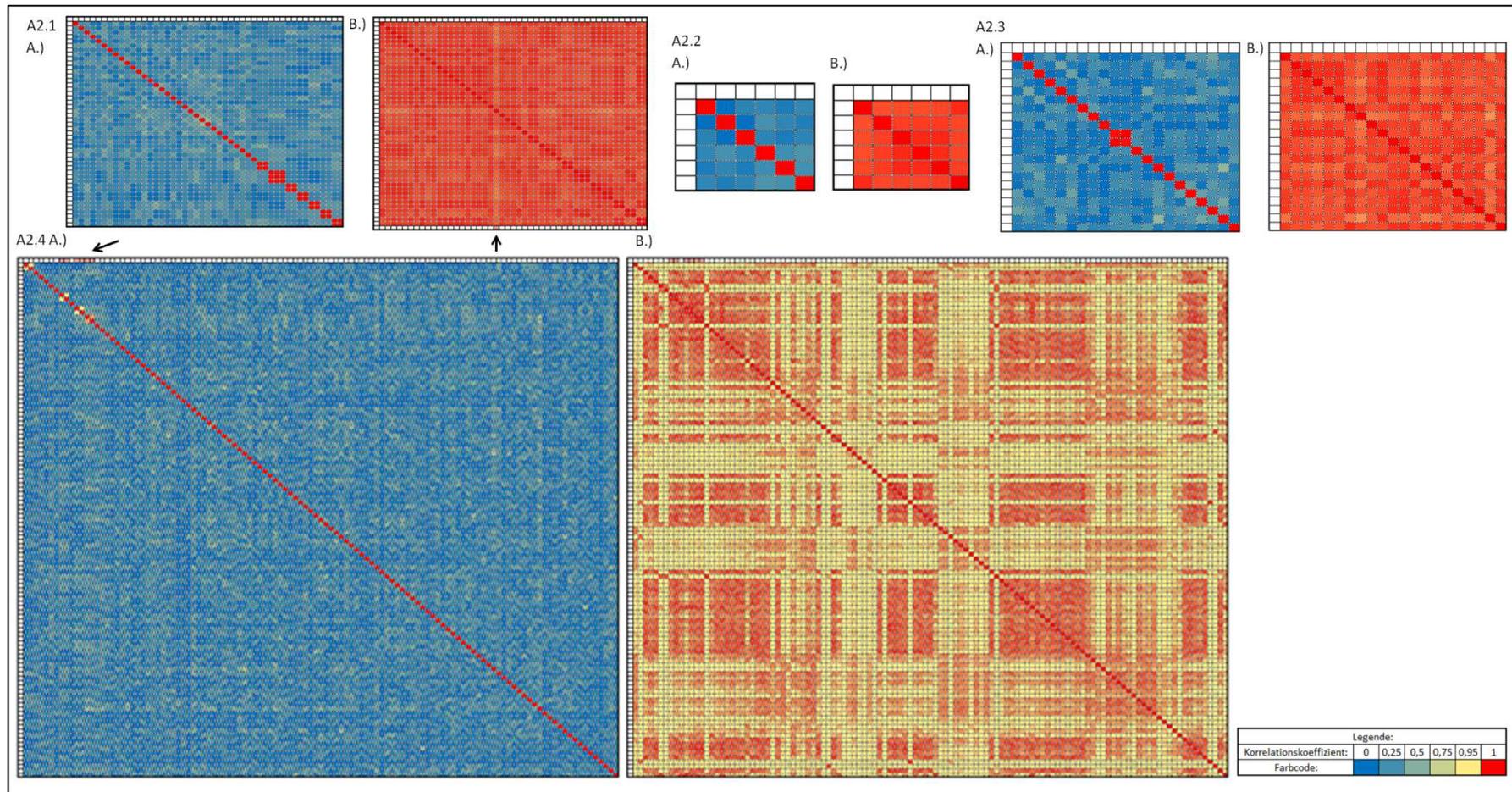
## 8.1 Korrelationsmatrices



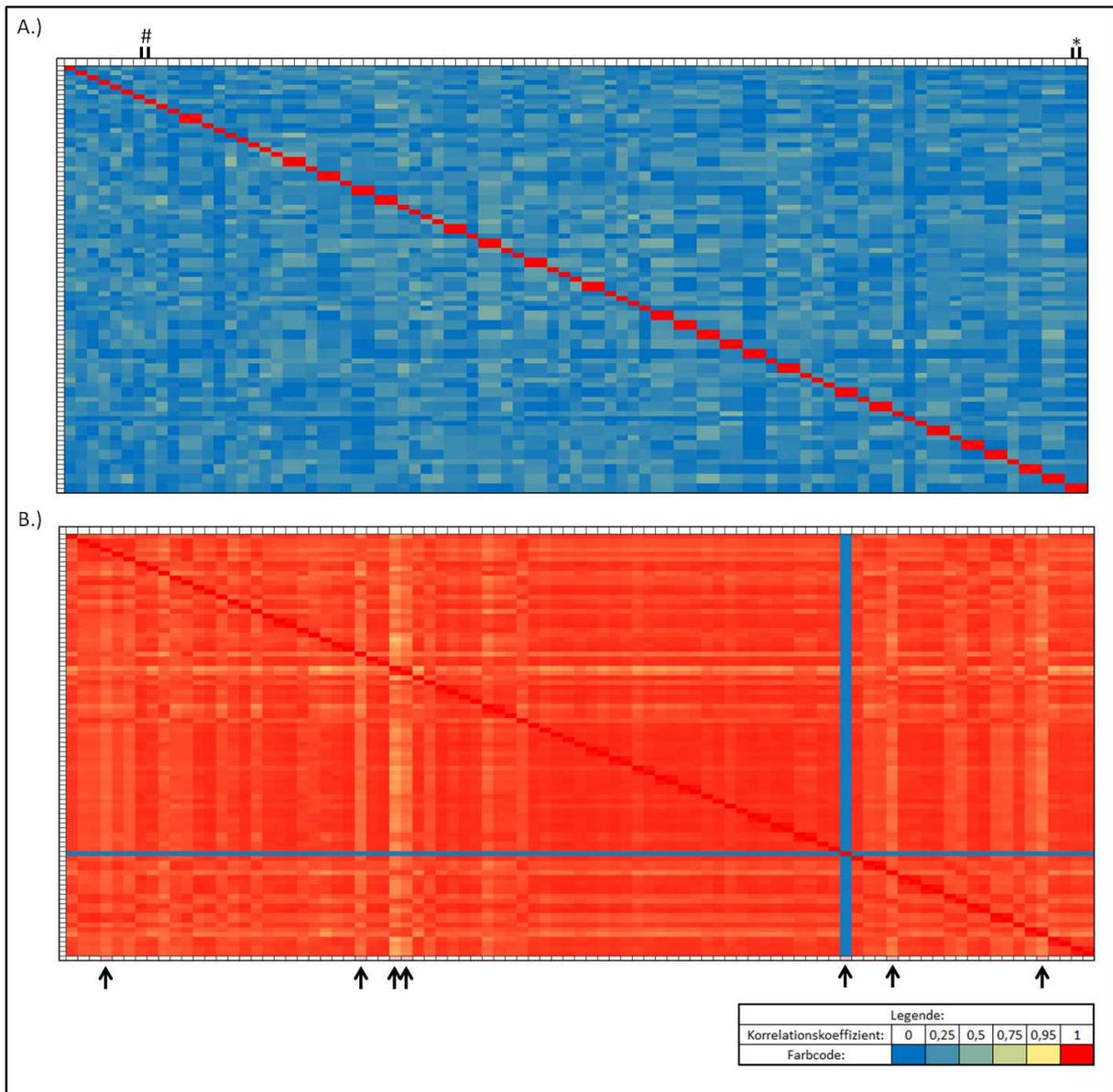
**Abbildung A1:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices von Normalgewebeproben aus Lungengewebe nach Fixierung. Es wurden insgesamt 18 Lungengewebeproben von sechs Patienten, die durch Verwendung verschiedener Techniken fixiert wurden, auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Die drei verschiedenen fixierten Gewebe-Proben eines Patienten sind nebeneinander dargestellt. Die Reihenfolge ist entsprechend der Fixierung: kryokonservierte, HOPE fixierte und Standard-Formalin fixierte Gewebe-Probe des jeweiligen Patienten. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Werte der Korrelationskoeffizienten ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Rot markierte Rechtecke unterhalb der Gesamtkorrelationsmatrix (B) zeigen Hybridisierungen an deren Median(R)-Wert <0,98 ist. Normalerweise würden diese Hybridisierungen aus den weiteren Analysen ausgeschlossen werden. In dieser Analyse werden sie weiter ausgewertet, da die Fragestellung dieser Analyse das erlaubt.



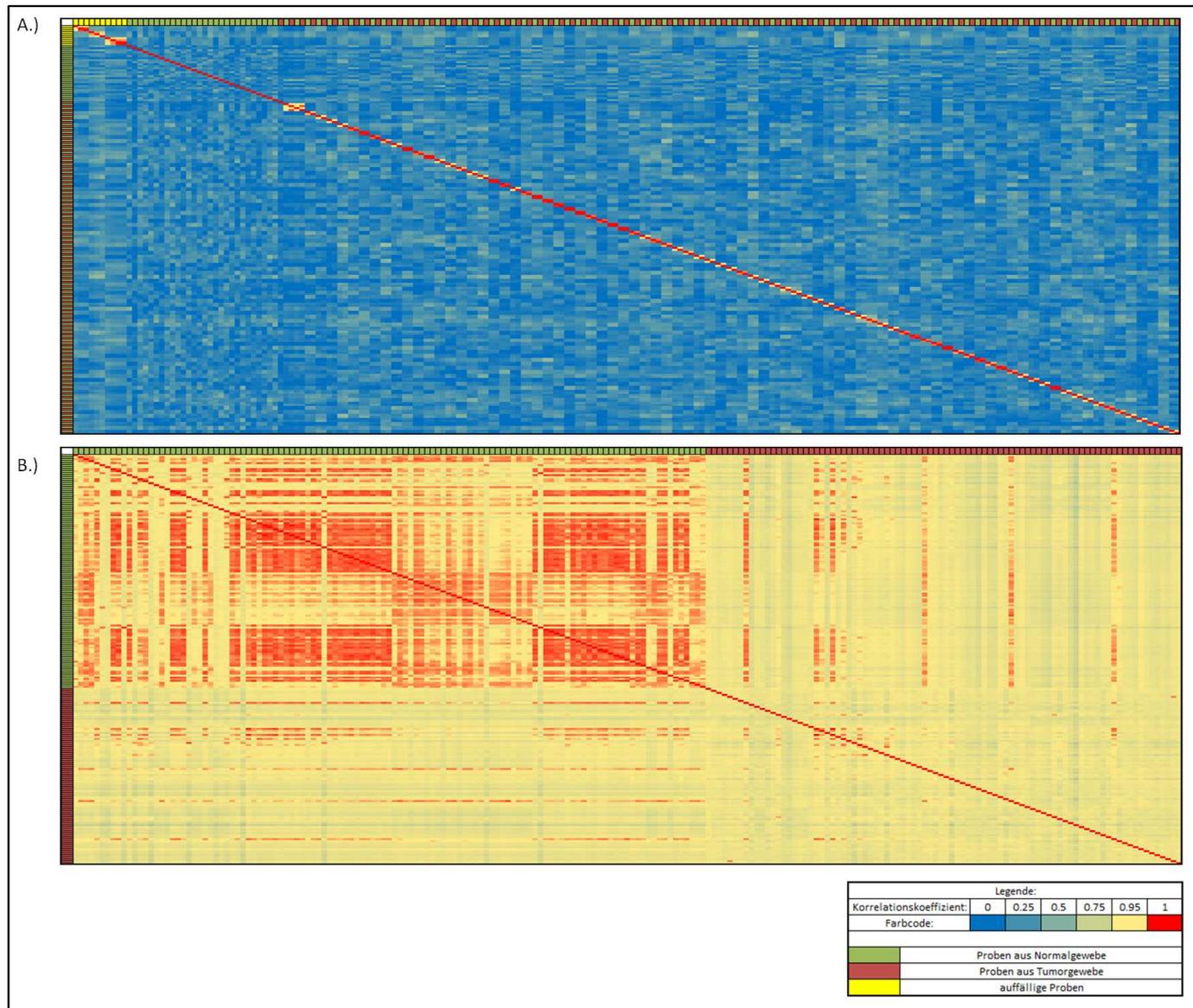
**Abbildung A2:** Gesamtkorrelationsanalyse der pränatal entnommenen Proben, die auf Infinium HumanMethylation27 BeadChip Arrays hybridisiert wurden. Die Hybridisierungen der DNA-Proben aus Amnionzellen (AC1-AC10) befinden sich links in der Korrelationsmatrix, die Hybridisierungen der DNA-Proben aus Chorionzotten (CV3-CV26 und 4-26) rechts in der Korrelationsmatrix. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Korrelationsmatrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Proben wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Werte der Korrelationskoeffizienten ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Die vier Proben AC1, AC5 (gekennzeichnet \*) sowie CV15 und CV26 (gekennzeichnet #) zeigen ein auffälliges Muster in der Korrelationsmatrix. Die beiden AC-Hybridisierungen weisen nur mit sich selbst (AC1) bzw. mit sich selbst und nur einer weiteren AC-Hybridisierung (AC5) hohe Korrelationskoeffizienten auf. Zu erwarten wäre, dass sie sich wie die anderen AC-Hybridisierungen verhalten und in der Gruppe der AC-Hybridisierungen höhere Korrelationskoeffizienten aufzeigten. Die beiden CV-Hybridisierungen zeigen zu sich aber auch zur jeweils anderen Hybridisierung hohe Korrelationskoeffizienten auf. Dieses Verhalten erwartet man für Hybridisierungen desselben Individuums. Dies ist anhand der vorliegenden Daten, soweit diese es zulassen, ausgeschlossen. Die beschriebenen Beobachtungen der auffälligen Proben führten zum Ausschluss der zwei CV-Hybridisierungen.



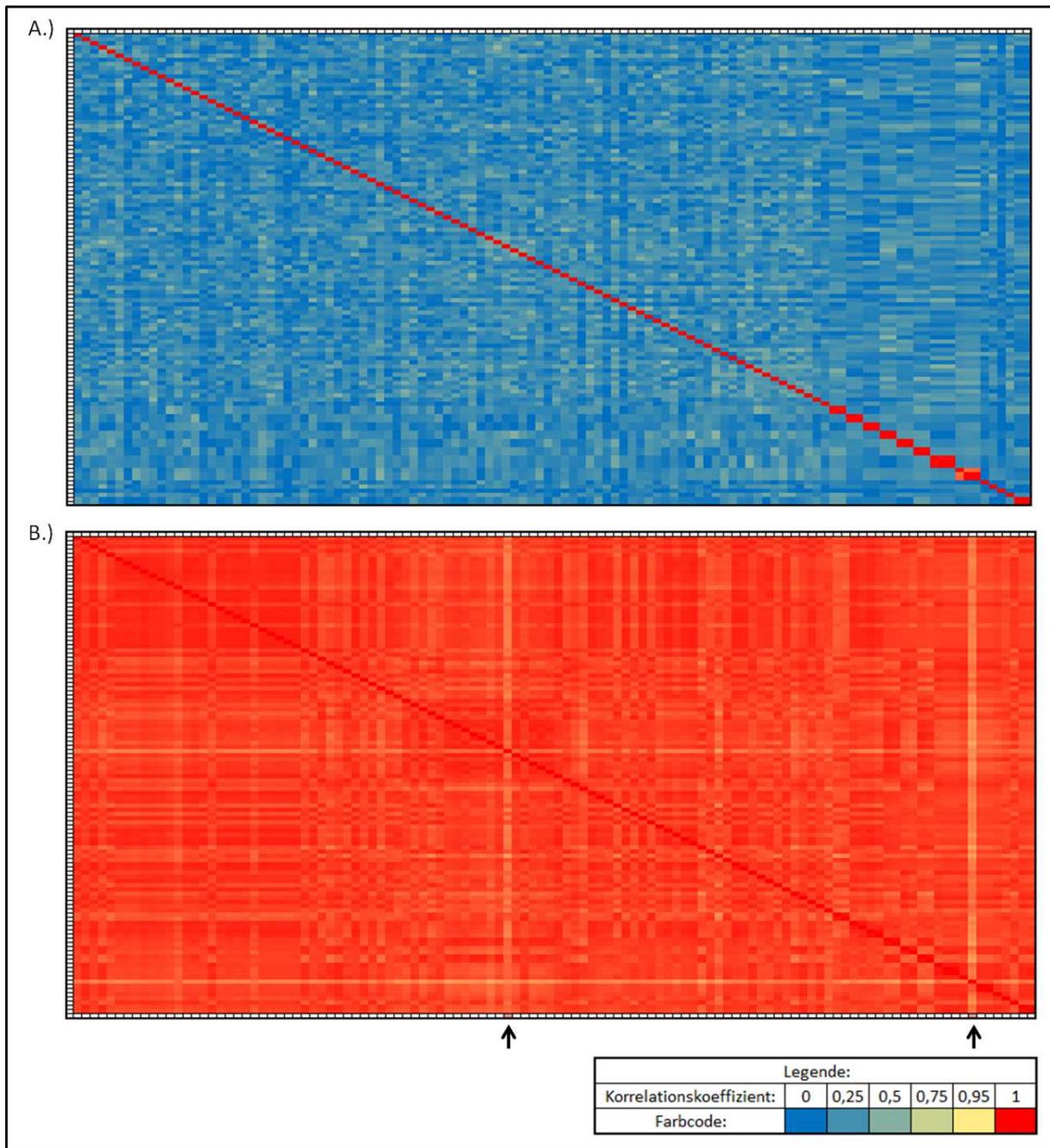
**Abbildung A3:** SNP und Gesamtkorrelationsanalysen der vier verschiedenen Normalgewebedatensätze. Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten der Datensätze peripheres Blut (A2.1), Lunge (A2.2), Leber (A2.3) und Kolon (A2.4) für je eine SNP- (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B) des Datensatzes. Alle DNA-Proben wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Mehrfach hybridisierte DNA-Proben liegen in den Matrices nebeneinander. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcodiertabelle für die Werte der Korrelationskoeffizienten ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Rot markierte Rechtecke unterhalb der Gesamtkorrelationsmatrices (B) zeigen Hybridisierungen an, deren Median(R)-Wert <0,98 ist. Für den Datensatz der peripheren Blutproben (A2.1) führte das zum Ausschluss einer Hybridisierung (durch Pfeil markiert). In den Matrices der Kolonproben (A2.4) wurden die rot markierten Hybridisierungen (durch Pfeil markiert) ausgeschlossen, weil sie in der SNP-Korrelationsanalyse Werte aufzeigten, die Probenpaaren desselben Individuums zuzuschreiben wären, ohne dass es sich bei diesen Proben um bekannte Duplikate der selben Person handelte.



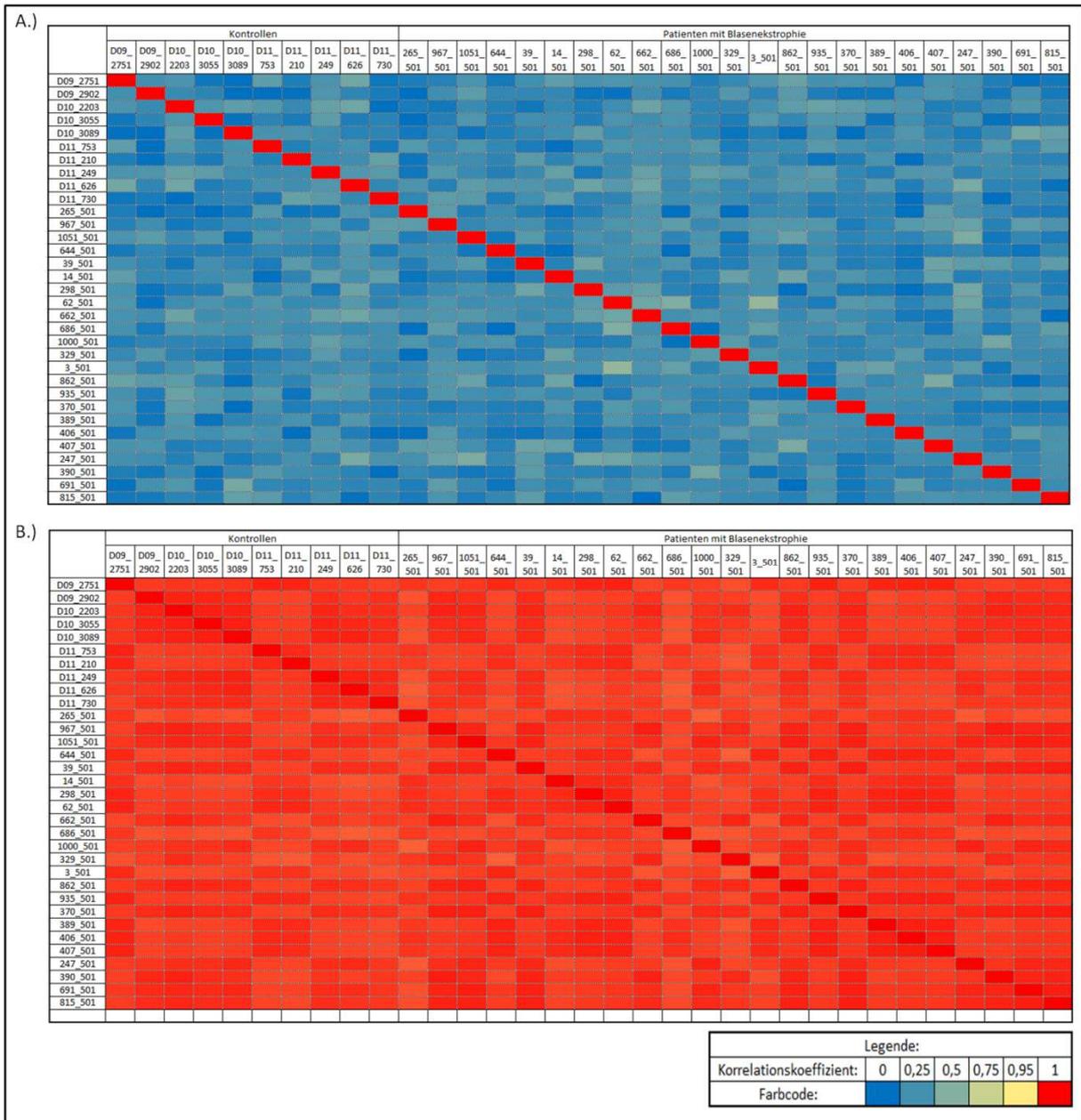
**Abbildung A4:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices von 89 Proben des Leberdatensatzes. Alle Proben wurden auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode der Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Die SNP-Korrelationsanalyse (A) zeigte für zwei Hybridisierungen, die als Verlaufspaltenpaar eines Individuums gekennzeichnet waren (durch # markiert) Korrelationskoeffizienten die mit zwei verschiedenen Individuen nicht aber mit einem Verlaufspaltenpaar zu vergleichen sind. Des Weiteren wurden zwei Hybridisierungen, die mit zwei unterschiedlichen Patientennummern bezeichnet waren, als Hybridisierungen eines Patienten identifiziert (durch \* markiert). Aufgrund der Gesamtkorrelationsanalyse (B) wurden sieben Proben (mit Pfeilen markiert) wegen eines Korrelationskoeffizientenmedians  $< 0,98$  aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.



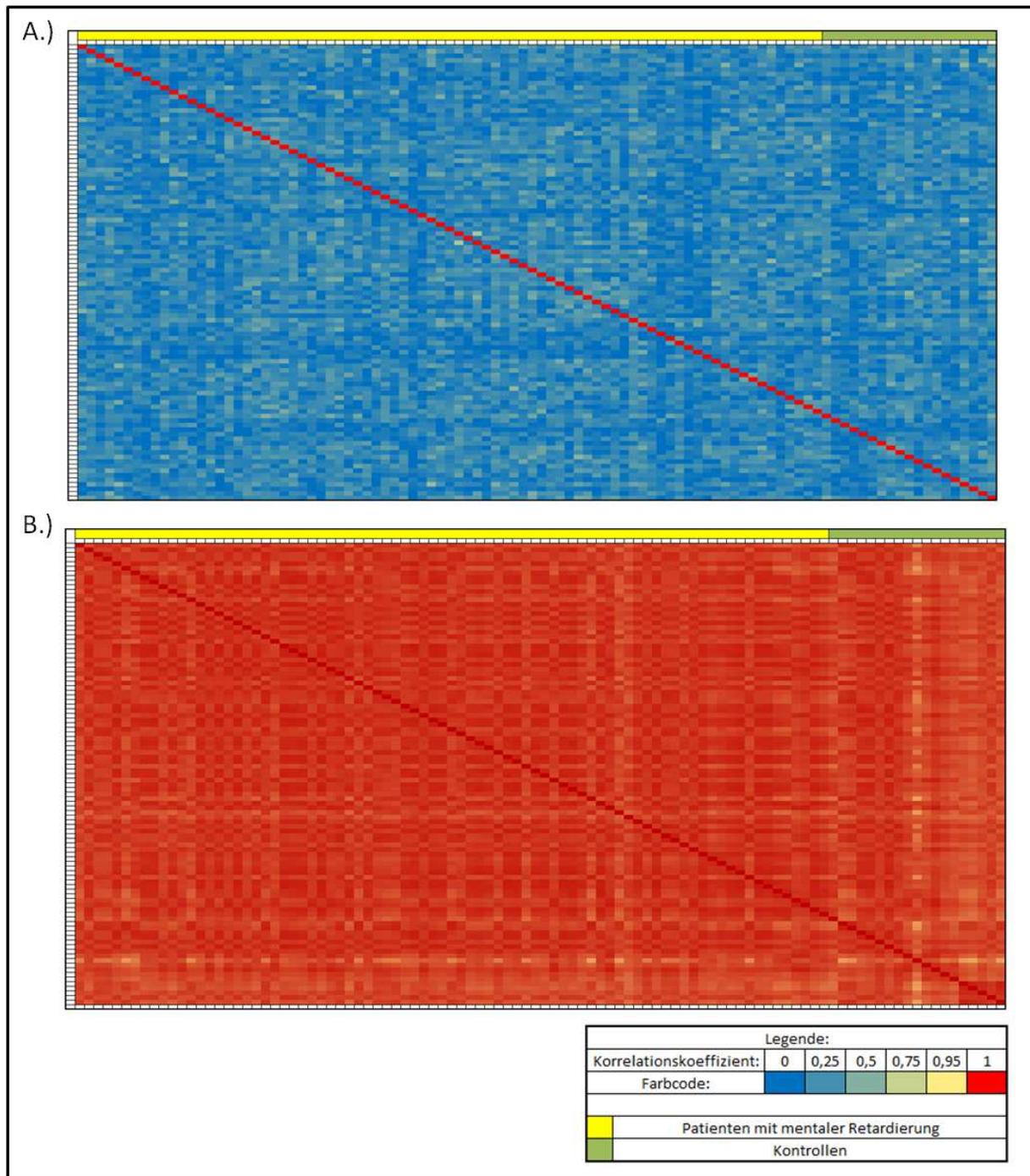
**Abbildung A5: SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices der Kolonproben.** Die AVG-Beta Werte von 117 Normalgewebeproben (grün markiert) und 88 Tumorgewebeproben (rot markiert), die auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert wurden, wurden analysiert. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. In der SNP-Korrelation (A) sind zunächst die Hybridisierungen gezeigt, die aufgrund der SNP-Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurden (gelb markiert), dann folgen einzelne Normalgewebeproben (grün markiert) und schließlich Normalgewebe- und Tumorgewebeprobepaare eines Individuums. In der Gesamtkorrelation (B) sind zunächst alle Normalgewebe- (grün markiert), gefolgt von allen Tumorgewebeproben (rot markiert) gezeigt. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Werte der Korrelationskoeffizienten ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Die SNP-Korrelationsanalyse (A) führte zum Ausschluss von insgesamt 10 Proben (gelb markiert). In der Gesamtkorrelationsanalyse (B) sind innerhalb der Normalgewebe- bzw. der Tumorgewebegruppen zwei Korrelationskoeffizientenmuster zu erkennen. Die Tumorgewebeproben (rot markiert) zeigen dabei meist niedrige und damit gelb markierte Korrelationskoeffizienten. Die Normalgewebe-proben (grün markiert) zeigen hohe Korrelationskoeffizienten und damit rot markierte Werte. Dies deutet darauf, dass die Normalgewebeproben weniger Variationen in den AVG-Beta Werten aufweisen als die Tumorgewebeproben. Einige Hybridisierungen zeigen nicht das ihrer Zuordnung als Normal- bzw. Tumorgewebeprobe zugehörige Korrelationskoeffizientenmuster.



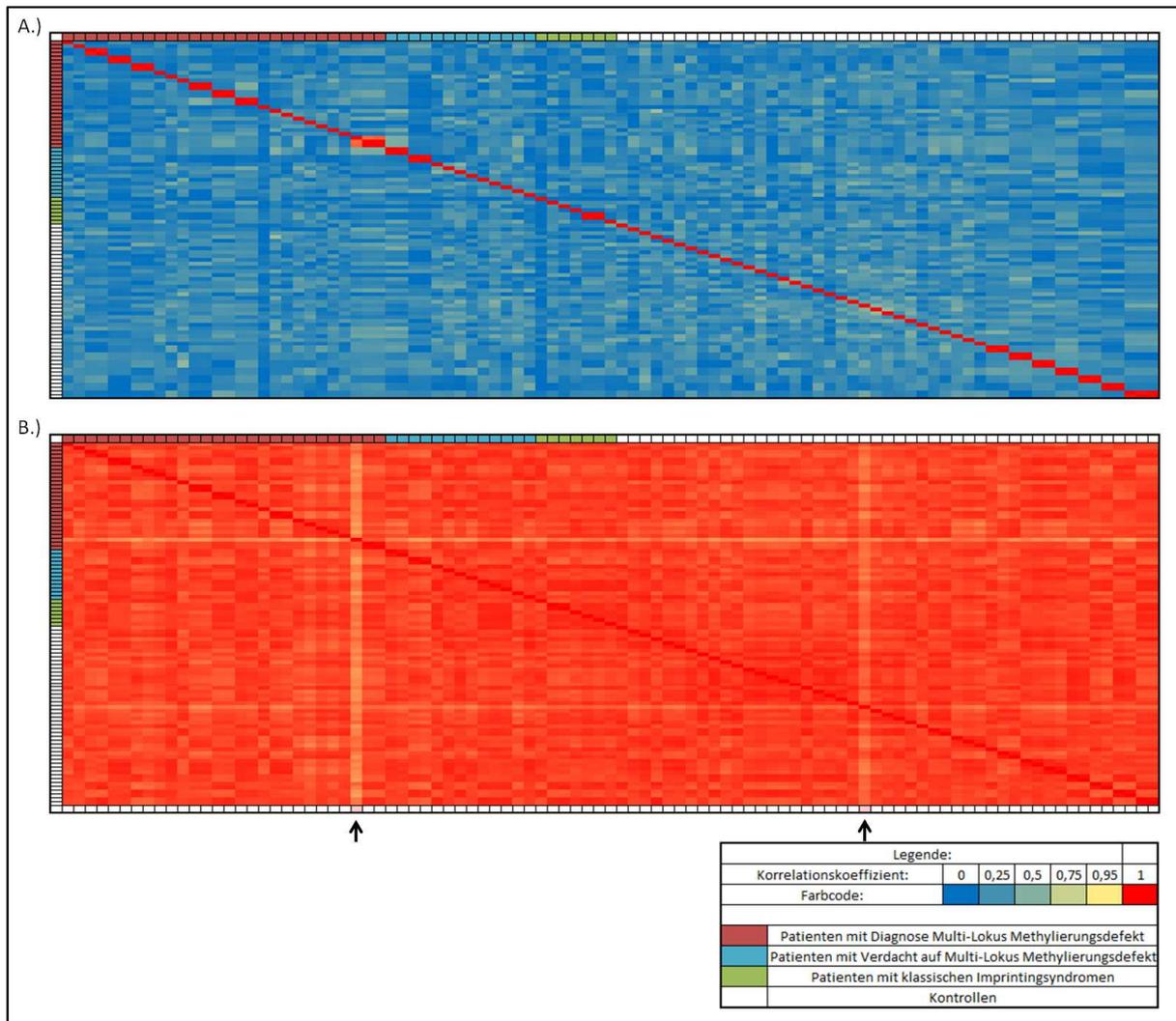
**Abbildung A6:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices des Untersuchungskollektivs zu klein und/oder zu leicht für Geburtsalter und Geschlecht geborene (SGA) Kinder. Das Kollektiv besteht aus insgesamt 114 DNA-Proben, 105 Hybridisierungen SGA-geborener Kinder und neun Hybridisierungen von Patienten mit einer klassischen Imprintingstörung. Die Hybridisierung erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays. Gezeigt sind eine SNP-Korrelationsanalyse (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B). Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Duplikate bzw. Triplikate liegen in der Matrix direkt nebeneinander. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Proben wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Rote Rechtecke (mit Pfeil markiert) unterhalb der Gesamtkorrelationsmatrix (B) zeigen Hybridisierungen an deren Korrelationskoeffizientenmedian  $< 0,98$  ist, und die daher aus den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.



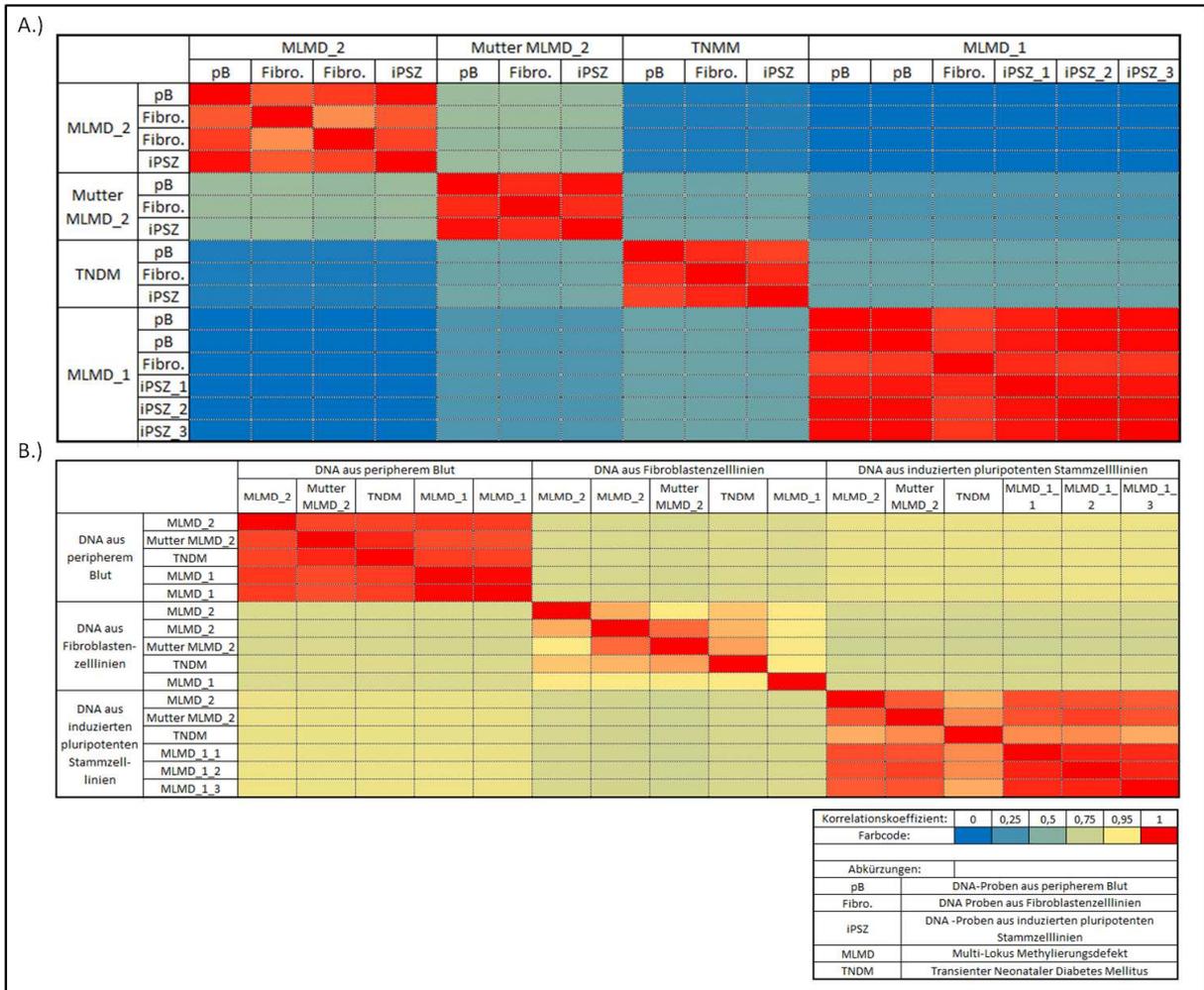
**Abbildung A7:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrixes des Blasenektrophie-Datensatzes. Insgesamt wurden DNA-Proben von 23 Blasenektrophiepatienten und 10 Kontrollen auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Gezeigt sind eine SNP-Korrelationsanalyse (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B) des Datensatzes. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Die Korrelationsanalysen hatten keinen Ausschluss von Hybridisierungen zur Folge.



**Abbildung A8:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices von 81 Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung und 19 Kontrollen. Die Probenhybridisierung erfolgte auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips. Gezeigt sind eine SNP-Korrelationsanalyse (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B) für den Datensatz. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Mit dem gelben Balken sind alle Patienten und mit dem grünen Balken alle Kontrollen zusammengefasst. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode der Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Die Korrelationsanalysen hatten keinen Probenausschluss zur Folge.



**Abbildung A9:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices des Datensatzes zur Analyse von Patienten mit einem Multi-Lokus Methylierungsdefekt. Für die DNA-Methylierungsanalyse wurden insgesamt 95 Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChips hybridisiert. Dargestellt sind eine SNP-Korrelationsanalyse (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B) des Datensatzes. Die Rechtecke oberhalb bzw. links neben der farbigen Matrix repräsentieren jeweils eine Hybridisierung. Die Reihenfolge der Hybridisierungen ist in beiden Richtungen, von links nach rechts und von oben nach unten, gleich. Das Kollektiv setzt sich zusammen aus Patienten mit der Diagnose Multi-Lokus Methylierungsdefekt (rot), Patienten mit Verdacht auf einen Multi-Lokus Methylierungsdefekt (blau), Patienten mit einem klassischen Imprintingsyndrom (grün) und den Kontrollen (weiß). Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der Farbcode der Matrix für die Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. Rot markierte Rechtecke unterhalb der Gesamtkorrelationsmatrix (B) zeigen zwei Hybridisierungen an (mit Pfeilen markiert), deren Korrelationskoeffizientenmedian  $<0,98$  ist, und die daher aus den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.



**Abbildung A10:** SNP- und Gesamtkorrelationsmatrices für die Hybridisierungen zur Charakterisierung induzierter pluripotenter Stammzellen von Patienten mit DNA-Methylierungsstörungen. Es wurden insgesamt 16 DNA-Proben auf Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays hybridisiert. Gezeigt sind eine SNP-Korrelationsanalyse (A) und eine Gesamtkorrelationsanalyse (B) des Datensatzes. Das Untersuchungskollektiv setzte sich aus DNA-Proben von vier Individuen zusammen. Zwei Individuen mit einem Multi-Lokus Methylierungsdefekt ("MLMD\_1", "MLMD\_2"), der Mutter eines dieser Patienten ("Mutter MLMD\_2") und einem Patienten mit Transientem Neonatalem Diabetes Mellitus ("TNDM"). Von jedem Individuum sind mindestens drei verschiedene Gewebe analysiert: DNA-Proben aus peripherem Blut (pB), DNA-Proben aus Fibroblastenzelllinien (Fibro.) und DNA-Proben aus induzierten pluripotenten Stammzelllinien (iPSZ). Jedes farbige Rechteck innerhalb der Matrix spiegelt den Korrelationskoeffizienten zwischen zwei Hybridisierungen wider. Der unsymmetrische Farbcode für die Korrelationskoeffizientenwerte ist: 0: blau; 0,95: gelb; 1: rot. In der SNP-Korrelationsanalyse (A) ist zu erkennen, dass die Hybridisierungen eines Individuums hohe Korrelationskoeffizienten zueinander aufweisen. In der Gesamtkorrelationsanalyse (B) ist zu sehen, dass die Hybridisierungen aus einer Gewebegruppe hohe Korrelationskoeffizienten aufweisen. Beide Korrelationsanalysen hatten keinen Probenausschluss zur Folge.

## 8.2 Elektronischer Anhang

Im elektronischen Anhang sind die qualitätskontrollierten AVG-Beta Werte der geprägten CpGs sämtlicher in der vorliegenden Arbeit analysierten Datensätze enthalten (siehe Tabelle 32).

Des Weiteren sind im elektronischen Anhang die vollständigen Auswertetabellen zu den Teilprojekten "NAFLD Analyse" (Tabelle A5), "SGA Analyse" (Tabelle A9), "Ekstrophie Analyse" (Tabelle A11), "MR Analyse" (Tabelle A13) und "MLMD Analyse" (Tabelle A15) gespeichert.

Außerdem ist dort eine Übersicht über die intern und extern ermittelten DNA-Methylierungsergebnisse zur "MLMD Analyse" (Tabelle A16) zu finden.

**Tabelle 32:** Zuordnung der Tabellen im elektronischen Anhang zu den entsprechenden Teilprojekten.

Projektbezeichnung (Teilprojekt)	Bezeichnung der Tabelle im elektronischen Anhang
HOPE Analyse (TP1)	A1
Pränatale Gewebe Analyse (TP2)	A2
Normalgewebe Analyse (TP3)	A3
NAFLD Analyse (TP4)	A4
NAFLD Analyse (TP4)	A6
CRC Analyse (TP5)	A7
SGA Analyse (TP6)	A8
Ekstrophie Analyse (TP7)	A10
MR Analyse (TP8)	A12
MLMD Analyse (TP9)	A14
iPSZ Analyse (TP10)	A17

## ***9 Danksagung***

Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde ermöglicht durch die unschätzbare Unterstützung vieler Personen. Folgenden Personen möchte ich meinen ganz persönlichen Dank aussprechen:

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar möchte ich mich vor allem für die Übernahme des Hauptreferates und die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für das Interesse an meiner Arbeit und die motivierenden Worte bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert möchte ich vor alle für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas danken, für sein Vertrauen in meine Arbeit und Fähigkeiten, für die hervorragende Betreuung und die konstruktive Kritik.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Humangenetik möchte ich für die tolle gemeinsame Zeit, die netten Gespräche und die Hilfsbereitschaft danken. Besonders hervorheben möchte ich die Zusammenarbeit mit den Kolleginnen Ute Jacobsen, Gabi Riesen, Claudia Becher und Dorit Schuster, ihr wart mir immer eine große Hilfe. Meinen Kolleginnen Rabea Wagener und Kiki Hoff möchte ich für die angenehme, lehrreiche gemeinsame Zeit in unserem Büro und die abwechslungsreichen Güntherbesuche danken. Auch bei den Post-Docs und Ärztinnen möchte ich mich für die Beantwortung unendlich vieler Fragen und für alle unterstützenden Worte bedanken. Herausstellen möchte ich PD Dr. med. Susanne Bens und Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl, die mich mit Geduld und Zuversicht die ganze Zeit über unterstützt haben, sowie Dr. rer. nat. Inga Vater für die Bereitstellung der ausgewerteten SNP-Array Daten. Mein Dank gilt auch den Kolleginnen aus dem Sekretariat. Insbesondere Jana Löbel möchte ich dafür danken, dass sie oft unmöglich erscheinende Terminwünsche realisiert hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Kooperationspartnern, die nicht nur viele der hier analysierten Proben zur Verfügung gestellt haben, sondern auch auf allen Ebenen der Zusammenarbeit mit kritischen, konstruktiven und freundlichen Worten zu einem guten Miteinander beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für eure Geduld, Liebe und den Glauben an mich bedanken.

## 10 Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	<p>Julia Kolarova                  Jeßstraße 17                  24114 Kiel</p> <p>geboren am 11.04.1984 in Sofia                  ledig</p>
<b>Beruflicher Werdegang</b>	
seit Oktober 2011	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Ziel der Promotion
April 2011 - Oktober 2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Deutschen Klinik Bad Münde, Zentrum für IVF und Reproduktionsmedizin
<b>Hochschulstudium</b>	
Oktober 2005 - Januar 2011	<p>Diplomstudium der Molekularen Medizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg</p> <p>Titel der Diplomarbeit:                  Beeinflussung der Allel-spezifischen Expression von geprägten Genen durch Folsäure-Supplementation</p>
<b>Praktika während des Studiums</b>	
September 2009 - Dezember 2009	<p>Bulgarian Academy of Sciences, Institute of Molecular Biology</p> <p>Thema: Search of Interferon gamma antagonists for treatment of graft arteriosclerosis and autoimmune diseases</p>
Juni 2009 – August 2009	<p>Großpraktikum an der Albert-Ludwigs-Universität am Institut für Biochemie und Molekularbiologie</p> <p>Thema: Untersuchung der Wechselwirkungen von Ribosomen und neusynthetisierter Polypeptidkette in verschiedenen Hefemutanten</p>
Juni 2008 – September 2008	<p>Großpraktikum an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in der Abteilung Bioinformatik und Molekulargenetik im Institut für Biologie III</p> <p>Thema: Characterisation of regulatory elements of ceh-16 in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i></p>
<b>Schulische Ausbildung</b>	
August 2004 - Juni 2005	weiterführende Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Elisabeth-Knipping Schule mit Abschluss staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin
August 2000 - Juni 2004	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife an der Elisabeth-Knipping Schule Kassel

## **11 Publikationsliste**

### **11.1 Originalarbeiten**

\*geteilte Erstautorenschaft

Kolarova J\*, Tangen I\*, Bens S, Gillessen-Kaesbach G, Gutwein J, Kautza M, Rydzanicz M, Stephani U, Siebert R, Ammerpohl O, Caliebe A, **Array-based DNA-methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype.** *EJMG* 2015, 10.1016/j.ejmg.2015.05.001

Queirós AC, Villamor N, Clot G, Martinez-Trillos A, Kulis M, Navarro A, Penas EM, Jayne S, Majid A, Richter J, Bergmann AK, Kolarova J, Royo C, Russiñol N, Castellano G, Pinyol M, Bea S, Salaverria I, López-Guerra M, Colomer D, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, González-Díaz M, Puente XS, Siebert R, Dyer MJ, López-Otín C, Rozman C, Campo E, López-Guillermo A, Martín-Subero JI, **A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact.** *Leukemia* 2015 Mar;29(3):598-605

Kolarova J, Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe FG, Eggermann T, Caliebe A, Holterhus PM, Siebert R, Bens S, **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans.** *PLoS One* 2015 Mar 18; 10(3):e0120463

Marwitz S\*, Kolarova J\*, Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Schädlich I, Haake A, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, Ammerpohl O, **The tissue is the issue: Improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE-technique.** *Lab Invest* 2014 Aug; 94(8):927-33

Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Kolarova J, Bens S, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Erhart W, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Häsler R, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Siebert R, Schafmayer C, Hampe J, **DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery.** *Cell Metab* 2013 Aug 6; 18(2):296-302

Bens S, Haake A, Richter J, Lehold J, [Kolarova J](#), Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillissen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R, **Frequency and characterization of DNA-methylation defects in children born SGA.** Eur J Hum Genet 2013 Aug; 21(8):838-43.

Eckmann-Scholz C, Bens S, [Kolarova J](#), Schneppenheim S, Caliebe A, Heidemann S, von Kaisenberg C, Kautza M, Jonat W, Siebert R, Ammerpohl O, **DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples.** PLoS One 2012; 7(6):e39014.

## ***11.2 Veröffentlichte Tagungsbeiträge***

Kautza M, Bens S, [Kolarova J](#), Siebert S, Caliebe A, **Clinical and molecular characterisation of a patient with a deletion in 16q22 involving CTCF,** Medizinische Genetik 1, Band 27, Heft 1, 2015

[Kolarova J](#), Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe F.G., Eggermann T, Caliebe A, Holterhus P-M, Siebert R, Bens S, **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans,** Medizinische Genetik 1, Band 27, Heft 1, 2015

Hoff K, Ammerpohl O, [Kolarova J](#), Arndt A-K, Thiele H, Pfeffer K, Toka O, Nürnberg P, Siebert R, Kramer H-H, **Exome Sequencing and DNA Methylation Analysis of Cardiac Tissue from Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome,** Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2014

Bergmann A K, Ammerpohl O, [Kolarova J](#), Castellano G, Möricke A, Stunnenberg H, Martin-Subero J I, Schrappe M, Siebert R, **DNA methylation profiling of pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL translocations,** Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2014

Ammerpohl O, Marwitz S, [Kolarova J](#), Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, **Analysis of Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer,** Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2014

Wagener R, Ammerpohl O, [Kolarova J](#), Gutwein J, Murga Penas EM, Richter J, Drexler HG, MacLeod RAF, Siebert R, **Significant differences in the DNA-methylation profile between EBV-positive and EBV-negative Burkitt Lymphoma cell lines,** Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Radlwimmer B, Ammerpohl O, Wang W, Richter J, Weniger M, Kolarova J, Küppers R, Lichter P, Siebert R, **Epigenetic profiling of germinal center B-cell lymphomas by whole genome bisulfate sequencing**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Ammerpohl O, Ahrens M, von Schönfels W, Kolarova J, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Schafmayer C, Siebert R, Hampe J, **Obesity-associated alterations in the hepatic DNA methylome are remodeled through bariatric surgery**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Kolarova J, Bens S, Leohold J, Riepe F G, Tangen I, Buiting K, Gillessen-Kaesbach G, Ammerpohl O, Siebert R, Caliebe A, **Array-based determination of DNA methylation in children born small for gestational age**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Bens S, Kolarova J, Haake A, Richter J, Eggermann T, Buiting K, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Siebert R, Caliebe A, **Frequency and Characterization of Multiple Locus Methylation Defects (MLMD) amongst patients with classical Imprinting disorders**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Hoff K, Ammerpohl O, Kolarova J, Arndt A-K, Pfeffer K, Toka O, Siebert R, Kramer H-H, **Determination of DNA-methylation patterns in cardiac tissue from hypoplastic left heart syndrome**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Kolarova J\*, Bens \*, Haake A, Richter J, Leohold J, Riepe FG, Tangen I, Eggermann T, Buiting K, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Caliebe A, Siebert R, **DNA-methylation changes at multiple loci in patients with imprinting disorders due to epimutations and in children born small for gestational age**, Eur J Hum Genet, Band 21, Ergänzungsband 2, 2013

Bens S, Haake A, Richter J, Leohold J, Kolarova J, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Caliebe A, Siebert R, **Frequency of altered DNA-methylation at imprinted loci in children born SGA**, Eur J Hum Genet, Band 20, Ergänzungsband 1, 2012

Kolarova J, Gutwein J, von Kampen O, Schafmayer C, Kalthoff H, Hampe J, Siebert R, Ammerpohl O, **A DNA-methylation survey of 117 tumor samples and corresponding normal controls revealed more than 640 genes aberrantly methylated in colorectal cancer**, Eur J Hum Genet, Band 20, Ergänzungsband 1, 2012

### ***11.3 Nicht veröffentlichte Tagungsbeiträge***

Beygo J, Joksic I, Lüdecke H-L, Kolarova J, Strom T, Horsthemke B, Buiting K, **A familial case of Beckwith-Wiedemann syndrome**, 2st European Imprinting Disorders School, 2015, Frankreich

Kolarova J\*, Bens S\*, Gutwein J, Monk D, Eggermann T, Buiting K, Leohold J, Riepe FG, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Caliebe A, Siebert R, **Array based DNA Methylation analysis in a cohort of patients with multi locus methylation defects**, 1st European Imprinting Disorders School, 2014, Frankreich

Bens S, Kolarova J, Haake A, Richter J, Leohold J, Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillessen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R, **DNA-Methylierungsanalysen bei SGA-geborenen Kindern im Rahmen des BMBF-geförderten Imprintingnetzwerks "Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms"**, Norddeutsches Humangenetiker Treffen 2012, Bremen, Deutschland

## **12 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner akademischen Betreuer angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keine Promotionsversuche unternommen habe.

Folgende Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in Form eines Artikels in einer internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht, sind zur Veröffentlichung angenommen bzw. wurden auf Kongressen präsentiert:

### Artikel in einer internationalen Fachzeitschrift:

\*geteilte Erstautorenschaft

Kolarova J\*, Tangen I\*, Bens S, Gillessen-Kaesbach G, Gutwein J, Kautza M, Rydzanicz M, Stephani U, Siebert R, Ammerpohl O, Caliebe A, **Array-based DNA-methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype**, *EJMG* 2015, 10.1016/j.ejmg.2015.05.001

Kolarova J, Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe FG, Eggermann T, Caliebe A, Holterhus PM, Siebert R, Bens S, **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans**, *PLoS One* 2015 Mar 18; 10(3):e0120463

Marwitz S\*, Kolarova J\*, Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Schädlich I, Haake A, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, Ammerpohl O, **The tissue is the issue: improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE technique**, *Lab Invest* 2014 Aug; 94(8):927-33

Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, [Kolarova J](#), Bens S, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Erhart W, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Häsler R, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Siebert R, Schafmayer C, Hampe J, **DNA-methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery**, Cell Metab 2013 Aug 6; 18(2):296-302

Bens S, Haake A, Richter J, Lehold J, [Kolarova J](#), Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillissen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R, **Frequency and characterization of DNA-methylation defects in children born SGA**, Eur J Hum Genet 2013 Aug; 21(8):838-43.

Eckmann-Scholz C, Bens S, [Kolarova J](#), Schneppenheim S, Caliebe A, Heidemann S, von Kaisenberg C, Kautza M, Jonat W, Siebert R, Ammerpohl O, **DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples**, PLoS One 2012; 7(6):e39014.

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

[Kolarova J](#), Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe F.G., Eggermann T, Caliebe A, Holterhus P-M, Siebert R, Bens S, **In vivo investigations of the effect of short- and long-term recombinant growth hormone treatment on DNA-methylation in humans**, Medizinische Genetik 1, Band 27, Heft 1, 2015

Ammerpohl O, Marwitz S, [Kolarova J](#), Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Zabel P, Vollmer E, Siebert R, Goldmann T, **Analysis of Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2014

Ammerpohl O, Ahrens M, von Schönfels W, [Kolarova J](#), Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Stickel F, Becker T, Krawczak M, Röcken C, Schafmayer C, Siebert R, Hampe J, **Obesity-associated alterations in the hepatic DNA methylome are remodeled through bariatric surgery**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

[Kolarova J](#), Bens S, Lehold J, Riepe FG, Tangen I, Buiting K, Gillissen-Kaesbach G, Ammerpohl O, Siebert R, Caliebe A, **Array-based determination of DNA methylation in children born small for gestational age**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Bens S, Kolarova J, Haake A, Richter J, Eggermann T, Buiting K, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Siebert R, Caliebe A, **Frequency and Characterization of Multiple Locus Methylation Defects (MLMD) amongst patients with classical Imprinting disorders**, Medizinische Genetik, Band, 25, Heft 1, 2013

Kolarova J<sup>\*</sup>, Bens S<sup>\*</sup>, Haake A, Richter J, Leohold J, Riepe FG, Tangen I, Eggermann T, Buiting K, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Caliebe A, Siebert R, **DNA-methylation changes at multiple loci in patients with imprinting disorders due to epimutations and in children born small for gestational age**, Eur J Hum Genet, Band 21, Ergänzungsband 2, 2013

Bens S, Haake A, Richter J, Leohold J, Kolarova J, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Caliebe A, Siebert R, **Frequency of altered DNA methylation at imprinted loci in children born SGA**, Eur J Hum Genet, Band 20, Ergänzungsband 1, 2012

Kolarova J, Gutwein J, von Kampen O, Schafmayer C, Kalthoff H, Hampe J, Siebert R, Ammerpohl O, **A DNA-methylation survey of 117 tumor samples and corresponding normal controls revealed more than 640 genes aberrantly methylated in colorectal cancer**, Eur J Hum Genet, Band 20, Ergänzungsband 1, 2012

Unveröffentlichte Tagungsbeiträge:

Kolarova J<sup>\*</sup>, Bens S<sup>\*</sup>, Gutwein J, Monk D, Eggermann T, Buiting K, Leohold J, Riepe FG, Thiele-Schmitz S, Gillessen-Kaesbach G, Prawitt D, Ammerpohl O, Horsthemke B, Caliebe A, Siebert R, **Array based DNA Methylation analysis in a cohort of patients with multi locus methylation defects**, 1st European Imprinting Disorders School, 2014, Frankreich

Bens S, Kolarova J, Haake A, Richter J, Leohold J, Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillessen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R, **DNA-Methylierungsanalysen bei SGA-geborenen Kindern im Rahmen des BMBF-geförderten Imprintingnetzwerks "Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms"**, Norddeutsches Humangenetiker Treffen 2012, Bremen, Deutschland

Kiel, den