

**Methylierungsanalysen und Charakterisierung
epigenetischer Regulationselemente bei
Imprintingkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jasmin Beygo

aus Oelde

August 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Rahmann

3. Gutachter: -----

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2014

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

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; 22:544-57.

Berland S, Appelback M, Bruland O, **Beygo J**, Buiting K, Mackay DJ, Karen Temple I, Houge G.

Evidence for anticipation in Beckwith-Wiedemann syndrome.

Eur J Hum Genet 2013; 21:1344-8.

Beygo J, Ammerpohl O, Gritzan D, Heitmann M, Rademacher K, Richter J, Caliebe A, Siebert R, Horsthemke B, Buiting K.

Deep Bisulfite Sequencing of Aberrantly Methylated Loci in a Patient with Multiple Methylation Defects.

PLoS One 2013; 8:e76953.

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 2014.

2.2.12.1	Präparation von <i>Amplicon libraries</i> für den Roche/454 GS Junior	44
2.2.12.2	Aufreinigung der <i>Amplicon libraries</i> und Sequenzier-Lauf auf dem Roche/454 GS Junior	45
2.2.12.3	Datenauswertung der Methylierungsanalysen.....	46
2.2.13	Pseudoprobandenansatz	46
3.	ERGEBNISSE	48
3.1	GENOMWEITE SUCHE NACH <i>CIS</i> - UND <i>TRANS</i> -AGIERENDEN FAKTOREN MITTELS SNP-ARRAYS IN PWS- UND AS-PATIENTEN MIT EINEM IMPRINTINGDEFEKT	48
3.2	SUCHE NACH NEUEN GEIMPRINTETEN GENEN	51
3.3	MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN VON BWS-PATIENTEN MIT VERÄNDERUNGEN IN DER ICR1	68
3.3.1	ICR1-Mikrodeletionen	68
3.3.2	OCT-Bindestellen in der ICR1	81
3.4	MIKRODELETIONEN IN DER GEIMPRINTETEN REGION AUF CHROMOSOM 14Q32	85
3.4.1	Hochdurchsatz-Methylierungsanalyse der <i>MEG3</i> - und der IG-DMR	91
4.	DISKUSSION.....	97
4.1	GENOMWEITE SUCHE NACH <i>CIS</i> - UND <i>TRANS</i> -AGIERENDEN FAKTOREN MITTELS SNP-ARRAYS IN PWS- UND AS-PATIENTEN MIT EINEM IMPRINTINGDEFEKT	97
4.2	SUCHE NACH NEUEN GEIMPRINTETEN GENEN	98
4.3	SEKUNDÄRE EPIMUTATIONEN DER ICR1 AUF CHROMOSOM 11P15.5 BEI BWS-PATIENTEN	103
4.3.1	Mikrodeletionen der ICR1 und der Einfluss der räumlichen Organisation der verbliebenen CTCF-Bindestellen.....	103
4.3.2	Auswirkungen von Punktmutationen der OCT-Bindestellen.....	106
4.4	NEU IDENTIFIZIERTE DELETIONEN INNERHALB DER GEIMPRINTETEN REGION 14Q32 STÜTZEN DIE HYPOTHESE EINER HIERARCHISCHEN INTERAKTION VON <i>MEG3</i> - UND IG-DMR.....	108
5.	ZUSAMMENFASSUNG	112
6.	LITERATUR.....	114
7.	ANHANG.....	133

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
AS	Angelman-Syndrom
bp	Basenpaar
biCHM	biparentale komplette hydatidiforme Blasenmole
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
cen	Centromer
CNV	<i>copy number variation</i> ; Kopienzahlvariation
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge Cytosin, (Phosphatgruppe,) Guanin
CpG Island	CG-reiche Region (> 200 bp; oft im Promotorbereich von Genen); CGI
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i> , Zinkfinger Protein
CTCF1 - 6	CTCF-Bindestellen 1 bis 6
DMR	differentiell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Primer	<i>forward</i> Primer
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
h	Stunde
IC	Imprinting Center
ICR	<i>Imprinting control region</i> ; Imprintingkontrollregion
ID	Imprintingdefekt
IG-DMR	<i>Intergenic differentially methylated region</i> ; differentiell methylierte Region zwischen <i>DLK1</i> und <i>MEG3</i> auf Chromosom 14q32
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>
kb	Kilobasenpaar
M	mol/l
mat	maternal
Mb	Megabasenpaar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA	<i>micro</i> RNA

ml	Milliliter
MSA	Mikrosatellitenanalyse
MS-MLPA	methylierungsspezifische <i>multplex ligation-dependent probe amplification</i>
MS-PCR	methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion
NaOH	Natronlauge, Natriumhydroxid-Lösung
ng	Nanogramm
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	<i>petit</i> ; kurzer Arm eines Chromosoms
pat	paternal
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PWS	Prader-Willi-Syndrom
q	<i>queue</i> ; langer Arm eines Chromosoms
QC	<i>quality control</i> ; Qualitätskontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
R-Primer	<i>reverse</i> Primer
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotidvariation
SRS	Silver-Russel-Syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tel	Telomer
U	Uracil
U	<i>Unit</i> ; Einheit der Enzymaktivität
UPD	Uniparentale Disomie
T _m	Schmelztemperatur
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Genomisches Imprinting

Genomisches Imprinting (genomische Prägung) ist ein epigenetischer Prozess, der dazu führt, dass bestimmte Gene oder Chromosomenabschnitte in somatischen Zellen elternspezifisch exprimiert werden. Das heißt, dass diese Gene monoallelisch entweder nur vom maternalen oder nur vom paternalen Allel exprimiert werden und somit funktionell hemizygot sind. Die Steuerung dieses Prozesses erfolgt durch eine spezifische Markierung der dem Imprinting unterliegenden Genloci, die bereits in der elterlichen Keimbahn gesetzt wird (Reik und Walter 2001; Ideraabdullah et al. 2008; Horsthemke 2010).

Bereits Anfang der 1980er Jahre konnte durch Pronukleus-Transplantationsexperimente bei Mäusen gezeigt werden, dass die parental Genome funktionell nicht äquivalent sind und beide benötigt werden, um eine normale Embryonalentwicklung zu ermöglichen (McGrath und Solter 1984; Surani et al. 1984 und 1986). Bei diesen Experimenten wurde entweder der paternale Pronukleus durch einen weiteren maternalen ersetzt oder umgekehrt der maternale durch einen weiteren paternalen Pronukleus, so dass jeweils genomweite uniparentale Disomien vorlagen. In beiden Fällen konnte keine normale Embryonalentwicklung beobachtet werden und die Embryonen starben etwa zur Mitte der normalen Tragzeit ab. Bei Embryonen deren diploides Genom ausschließlich maternalen Herkunft war (gyno- bzw. parthenogenetisch), entwickelte sich hauptsächlich embryonales Gewebe, jedoch kein oder kaum extraembryonales (Trophoblast). Embryonen mit ausschließlich paternalem Genom (androgenetisch) hingegen, entwickelten extraembryonale Strukturen, jedoch so gut wie kein embryonales Gewebe. In jüngerer Zeit konnten Experimente an parthenogenetischen Mausembryonen zeigen, dass eine normalisierte Gendosis geimprinteter Gene eine normale Embryonalentwicklung ermöglicht. Damit ist die korrekte Expression von geimprinteten Genen der entscheidende Faktor für eine erfolgreiche Entwicklung des Embryos (Kono et al. 2004; Kawahara et al. 2007). Die bei Mäusen beschriebenen Phänotypen von andro- bzw. gynogenetischen Embryonen wurden in ähnlicher Form auch beim Menschen beobachtet. Dabei zieht das Fehlen des paternalen Genoms die Entwicklung eines Ovarialteratoms mit embryonalem Gewebe aller drei Keimblätter, jedoch ohne extraembryonale Strukturen nach sich. Das Fehlen des maternalen Genoms hingegen führt zur Entwicklung androgenetischer Blasenmole, die aus extraembryonalem Gewebe bestehen (Hall et al. 1990; Williams et al. 2010a; Fallahian et al. 2013; siehe Kapitel 1.1.3).

Die Zuordnung unterschiedlicher, elternspezifischer Effekte (*parent-of-origin* Effekte) zu einzelnen Chromosomen erfolgte u.a. über (segmentale) uniparentale Disomien (UPDs) bei Mäusen. Dazu wurden verschiedene Translokations-Linien miteinander gekreuzt, um Embryonen mit kompletten, diploiden Chromosomensätzen zu erzeugen, bei denen einzelne Chromosomen oder Chromosomensegmente nur von einem Elternteil stammten (Searle und Beechey 1978; Cattanach und Kirk 1985; Cattanach 1986; Ferguson-Smith 2011). Im Jahr 1991 beschrieben Barlow und Kollegen als erstes geimprintetes Gen den murinen *insulin-like growth factor 2 receptor* (*Igf2r*; Barlow et al. 1991). Kurz darauf folgten mit *Igf2* und *H19* zwei weitere Gene, die später auch im Menschen als geimprintet beschrieben wurden (DeChiara et al. 1991; Ferguson-Smith et al. 1991; Bartolomei et al. 1991; Rachmilewitz et al. 1992). Heute sind je ca. 100 geimprintete Gene in der Maus und im Menschen bekannt, von denen die meisten konserviert sind (<http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting>, <http://www.geneimprint.com/> und <http://igc.otago.ac.nz/home.html>; Dindot et al. 2009; Bartolomei und Ferguson-Smith 2011; Horsthemke 2014). Ein Teil dieser Gene wird nur in bestimmten Geweben oder nur zu bestimmten Zeitpunkten während der Entwicklung elternspezifisch exprimiert. Einige davon z.B. nur in der Plazenta während der frühen Embryonalphase (Prickett und Oakey 2012). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die 1991 von Moore und Haig postulierte sogenannte Geschlechterkonflikthypothese. Sie besagt, dass paternal exprimierte Gene eher das Wachstum des Embryos in der prä- und neonatalen Phase fördern, während maternal exprimierte Gene das Wachstum eher begrenzen, um die Ressourcen der Mutter zu schonen (Moore und Haig 1991; Haig et al. 1997; Wilkins und Haig 2003). Dies geht darauf zurück, dass Männer ihre Gene über mehrere Frauen weitergeben können und die meisten Ressourcen von der Mutter für das jeweilige Kind 'akquirieren wollen'. Frauen hingegen können ihre Gene nur durch multiple Schwangerschaften weitergeben und sind daher daran 'interessiert', ihre Ressourcen auf mehrere Schwangerschaften zu verteilen. Ein Beispiel auf molekularer Ebene sind *Igf2* und *Igf2r*. Der Wachstumsfaktor *Igf2* wird nur vom paternalen Allel exprimiert, wohingegen sein 'Gegenspieler', der vom *Igf2r*-Gen codierte *Igf2*-Rezeptor, nur vom maternalen Allel exprimiert wird. Der Rezeptor fängt *Igf2* ab und wirkt damit dem Wachstum entgegen. Für diese Hypothese spricht außerdem, dass genomisches Imprinting nur bei Eutheria (Plazentatieren) und Metatheria (bzw. nur den rezenten Marsupialia; Beuteltieren) sowie einigen Pflanzen vorkommt, nicht jedoch bei Monotremata (Kloakentieren). Diese gebären ihre Nachkommen nicht lebend, sondern legen Eier, so dass die von der Mutter

aufzuwendenden Ressourcen von vornherein begrenzt sind. Daher wird angenommen, dass eine Co-Evolution des genomischen Imprintings mit der Plazenta in Säugern und dem Endosperm in Pflanzen stattgefunden haben könnte (Feil und Berger 2007; Renfree et al. 2009 und 2013; Horsthemke 2010).

Die Verteilung geimprinteter Gene über das Genom ist unregelmäßig. Die meisten sind jedoch in Gruppen (Genclustern) angeordnet, deren Imprint meist von einer *cis*-agierenden Imprintingkontrollregion (ICR), auch Imprinting Center (IC) genannt, reguliert wird. Die Identifizierung der im Menschen auf den Chromosomen 6, 7, 11, 14, 15 und 20 lokalisierten Gencluster erfolgte dabei häufig über Imprintingerkrankungen (Horsthemke 2010 und 2014; Ferguson-Smith 2011; Bartolomei und Ferguson-Smith 2011). So berichteten Lubinsky und Kollegen bereits 1974 über einen *parent-of-origin* Effekt beim familiären Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Später konnten Zusammenhänge zwischen Phänotypen und bestimmten Chromosomen bzw. chromosomalen Regionen auch mit Hilfe von uniparentalen Disomien hergestellt werden (Lubinsky et al. 1974; Nicholls et al. 1989; Malcolm et al. 1991; Henry et al. 1991; Kotzot et al. 1995).

Imprintingcluster können sich über einige kb bis hin zu einigen Mb erstrecken und eine unterschiedlich große Anzahl sowohl von maternal als auch paternal exprimierten Genen beinhalten. Oft sind nicht-codierende RNAs wie z.B. *H19* auf Chromosom 11p15.5 oder *MEG3* auf Chromosom 14q32 vorhanden, sowie Gruppen von micro- oder snoRNAs (z.B. *SNORD116* auf Chromosom 15q11q13; Edwards und Ferguson-Smith 2007; Horsthemke und Buiting 2008; Bartolomei und Ferguson-Smith 2011).

1.1.1 Regulation des genomischen Imprintings – DNA-Methylierung

Die Regulation der elternspezifischen, monoallelischen Expression von geimprinteten Genen kann durch verschiedene epigenetische Mechanismen wie Histonmodifikationen, Chromatin-Konformationen oder DNA-Methylierung erfolgen. Letztere kommt bei Mammalia hauptsächlich im Kontext von CpG-Dinukleotiden (Cytosin gefolgt von Guanin; CpGs) vor, wobei das Cytosin an seiner 5'-Position eine Methylgruppe trägt und daher auch als 5-Methylcytosin bezeichnet wird (Bird 2002; Cedar und Bergman 2009). Da methylierte Cytosine dazu tendieren, durch Deaminierung in Thymin umgewandelt zu werden, sind im

Genom insgesamt weniger CpG-Dinukleotide vorhanden, als man unter normalen Umständen erwarten würde. CpGs kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit fast im gesamten Genom vor, so z.B. in repetitiven Elementen wie LINEs oder SINEs (u.a. Alu Elemente), in Transposons und *gene bodies*, wobei sie dort mehrheitlich methyliert vorliegen (Bird 2002; Deaton und Bird 2011). Überdurchschnittlich oft sind CpGs in sogenannten CpG Islands (CGIs) vertreten, wo sie in der Regel unmethyliert sind (Bird 1986; Illingworth und Bird 2009; Jones 2012). CGIs wurden ursprünglich von Gardiner-Garden und Frommer definiert (Größe mindestens 200 bp, CG Gehalt über 50 % und ein Verhältnis von erwarteten zu vorhandenen CpGs über 0,6; Gardiner-Garden und Frommer 1987). Diese Definition wurde mittlerweile weiter angepasst, um z.B. repetitive Sequenzen auszuschließen (Takai und Jones 2002). CGIs liegen zu einem Großteil in Promotorbereichen von Genen und sind so an deren Regulation beteiligt. Unmethylierte CGIs sind mit der Transkription eines Gens assoziiert, während CGIs in ihrer methylierten Form mit Repression assoziiert sind und die Genexpression verhindern. Dies kann z.B. durch die Blockierung von Transkriptionsfaktoren oder der Rekrutierung von Methyl-bindenden Proteinen erfolgen, die wiederum mit Repression der Genexpression (*gene silencing*) und Änderungen der Chromatin-Konformation assoziiert sind (Fazzari und Grealley 2004; Goll und Bestor 2005; Dupont et al. 2009). Liegen CGIs im Promotorbereich von geimprinteten Genen, überlappen sie meist mit differentiell methylierten Regionen (DMRs). In diesen DMRs sind die CpGs auf einem Allel methyliert und verhindern damit die Genexpression. Auf dem anderen Allel sind sie unmethyliert und führen so zu einer monoallelischen, elternspezifischen Expression des Gens (Goll und Bestor 2005; Bartolomei und Ferguson-Smith 2011).

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden ist meist symmetrisch, das heißt, sie ist auf beiden DNA-Strängen gleich. Bei der Replikation wird die Methylierung semi-konservativ erhalten, wobei vor allem die *maintenance* Methyltransferase DNMT1 beteiligt ist. Sie erkennt (zusammen mit UHRF1, alias NP95) hemimethylierte DNA und überträgt das Methylierungsmuster auf neu synthetisierte DNA-Stränge. Nach neueren Erkenntnissen spielen auch die beiden sogenannten *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Methylierung während der Replikation (Okano et al. 1999; Bestor 2000; Edwards und Ferguson-Smith 2007; Jones und Liang 2009; MacDonald und Mann 2014).

Während der Embryonalentwicklung werden mehrere Phasen der globalen epigenetischen Reprogrammierung durchlaufen (Abbildung 1; Reik et al. 2001; Reik und Walter 2001; Cedar

und Bergman 2009). Nach der Fertilisation findet eine globale Demethylierung der beiden parental Genome statt, die sich zu diesem Zeitpunkt noch in getrennten Pronuclei befinden. Das paternale Genom wird direkt nach der Fertilisation aktiv demethyliert. Neuere Studien konnten zeigen, dass diese Demethylierung u.a. mit Hilfe von sogenannten TET-Enzymen (*ten-eleven translocation enzymes*; hauptsächlich TET3) erfolgt. Diese können 5-Methylcytosin durch Oxidation in 5-Hydroxymethylcytosin umwandeln, welches bei der DNA-Replikation nicht aufrechterhalten wird und so verloren geht (Tahiliani et al. 2009; Ficz et al. 2011; Wossidlo et al. 2011; Williams et al. 2012; Hackett und Surani 2013). Die Demethylierung des maternalen Genoms setzt etwas später ein als die des paternalen. Bisher ging man davon aus, dass die Demethylierung beim maternalen Genom passiv durch Replikation erfolgt. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass auch hier eine aktive Demethylierung stattfindet und auch in diesem Fall 5-Hydroxymethylcytosin vorhanden ist (Wang et al. 2014).

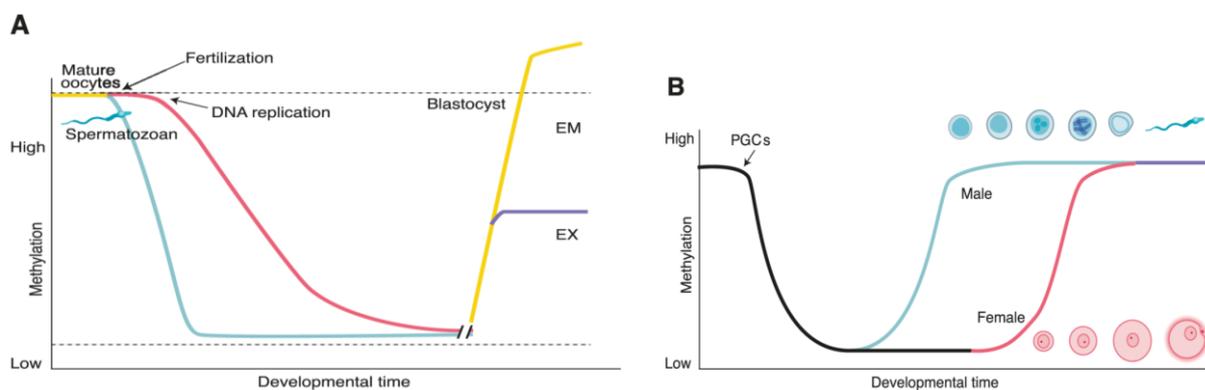


Abbildung 1: Methylierungsumbildung (A) während der Embryonalentwicklung und (B) in Keimzellen

Die Abbildung beschreibt globale Prozesse der Methylierungsumbildung. Während der Embryonalentwicklung (A) erfolgt zunächst eine globale Demethylierung, bei der das paternale Genom (blau) direkt nach der Fertilisation und etwas später das maternale Genom (rot) aktiv demethyliert werden. Anschließend werden bei der globalen Remethylierung neue, zell- bzw. gewebspezifische Methylierungsmuster etabliert. Die Methylierung an geimprinteten Loci (gestrichelte Linie) ist vor diesen Umbildungsprozessen jedoch geschützt.

In primordialen Keimzellen (B) erfolgt ebenfalls eine globale Demethylierung, welche auch geimprintete Loci betrifft. Sie wird Imprint-Auslöschung (*imprint erasure*) genannt. Danach werden die keimbahn-spezifischen Methylierungsimprints neu etabliert (*imprint establishment*) und postzygot bei allen folgenden Zellteilungen und damit auch in somatischen Zellen aufrechterhalten (*imprint maintenance*). Dabei erfolgt die Etablierung in den Prospermatogonien und ist bei Geburt abgeschlossen bzw. setzt in Oozyten erst nach der Geburt ein.

EM – embryonales Gewebe; EX – extraembryonales Gewebe; PGC – primordiale Keimzelle (*primordial germ cell*). Verändert nach Reik et al. 2001.

Auf die globale Demethylierung folgt eine globale Remethylierung, die zell- bzw. gewebsspezifische Methylierungsmuster etabliert und etwa zur Zeit der Implantation (Blastozystenstadium) abgeschlossen ist (Reik und Walter 2001; Seisenberger et al. 2013; Inbar-Feigenberg et al. 2013; Hackett und Surani 2013). Regionen, die dem Imprinting unterliegen, sind vor diesen globalen De- und Remethylierungswellen geschützt und der bereits in den Keimzellen gesetzte Imprint wird aufrecht erhalten (Abbildung 1). In den Keimzellen findet ebenfalls eine Demethylierung statt, wobei auch die Imprints gelöscht (*imprint erasure*) werden. Dies ist notwendig, damit anschließend eine keimbahnspezifische Imprint-Etablierung (*imprint establishment*) erfolgen kann. Diese Imprints werden bei allen folgenden Zellteilungen und somit auch postzygot in somatischen Zellen aufrecht erhalten (*imprint maintenance*; Tucker et al. 1996; Reik et al. 2001; Edwards und Ferguson-Smith 2007; Horsthemke und Buiting 2008). Daten aus Mausexperimenten haben gezeigt, dass die Imprint-Etablierung in der paternalen Keimbahn bereits in den Prospermatogonien, nach Eintritt des mitotischen Arrests, stattfindet und bei Geburt abgeschlossen ist. In der maternalen Keimbahn hingegen verbleiben die Keimzellen zunächst in einem meiotischen Arrest. Die Imprint-Etablierung setzt nach der Geburt während des Oozytenwachstums ein und ist erst in ausgewachsenen Oozyten abgeschlossen (Reik et al. 2001; Sasaki und Matsui 2008; MacDonald und Mann 2014).

1.1.2 Molekulargenetische Hintergründe zur Entstehung von Imprintingkrankungen

Imprintingkrankungen können durch verschiedene molekulargenetische Defekte ausgelöst werden, die zu Gendosisveränderungen geimprinteter Gene führen. Dies können Deletionen, uniparentale Disomien (UPDs) oder Imprintingdefekte (IDs) sein. Eher selten sind Mutationen in geimprinteten Genen kausal für eine Imprintingkrankung, wie z.B. Mutationen im *UBE3A*-Gen beim Angelman-Syndrom oder im *CDKN1C*-Gen beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Weiterhin können chromosomale Umstrukturierungen zu Imprintingkrankungen führen (Horsthemke und Buiting 2006; Butler 2009; Horsthemke 2010).

Der Begriff der uniparentalen Disomie wurde 1980 von Engel geprägt und bezieht sich auf eine Situation, in der beide homologen Chromosomen (oder Teile eines Chromosoms; segmentale UPD) von einem Elternteil stammen (Engel 1980; Kotzot et al. 2001 und 2008).

Eine UPD kann ohne Konsequenzen bleiben, zu einer autosomal-rezessiven Erkrankung oder zu einer Imprintingerkrankung führen. Letzteres wurde für alle Chromosomen mit Imprintingclustern (Chromosomen 6, 7, 11, 14, 15 und 20) mit unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben (Engel 2006; Yamazawa et al. 2010). UPDs können durch verschiedene Mechanismen, wie der *trisomy* oder *monosomy rescue*, Gameten-Komplementation, Postfertilisationsfehlern oder auch durch Robertson'sche Translokationen entstehen (Kotzot 1999; Robinson 2000; Hoffmann und Heller 2011). Eine Trisomie kann durch die Fertilisation einer normalen, haploiden Keimzelle mit einer für ein Chromosom disomen Keimzelle entstehen. Bei der *trisomy rescue* wird dies durch den zufälligen Verlust eines der Chromosomen ausgeglichen. Disome Keimzellen können z.B. während der Oogenese durch eine *non-disjunction* während der Meiose I oder II auftreten, was sich in einer Hetero- bzw. Isodisomie (zwei verschiedene bzw. zwei gleiche Chromosome eines Elternteils) in der Nähe des Centromers widerspiegeln würde. Ein *monosomy rescue* würde nach der Fertilisation einer für ein Chromosom nullosomen mit einer normalen, haploiden Keimzelle auftreten. In einer solchen Zygote müsste sehr früh eine Duplikation des monosom vorliegenden Chromosoms stattfinden (Isodisomie), um eine weitere Entwicklung des Embryos zu ermöglichen. Die Entstehung von segmentalen UPDs erfolgt hauptsächlich durch somatische Rekombination während der Mitose (Yamazawa et al. 2010; Hoffmann und Heller 2011).

Bei Imprintingdefekten wird zwischen primären und sekundären IDs unterschieden. Ein Methylierungsdefekt ohne zugrunde liegende Sequenzveränderung wird als primärer ID bezeichnet. Auch Mutationen in *trans*-agierenden Faktoren können die Methylierung geimprinteter Loci beeinflussen, wobei in solchen Fällen meist mehrere Loci betroffen sind (Horsthemke und Buiting 2008; Mackay et al. 2008; Azzi et al. 2009; Eggermann et al. 2011b). Bei sekundären IDs hingegen entsteht die Methylierungsstörung durch einen Defekt in *cis*, wie zum Beispiel einer Imprintingcenter Deletion (Buiting et al. 1995; Horsthemke und Buiting 2006; Horsthemke 2010).

Zu einem primären ID kommt es, wenn Fehler während der epigenetischen Reprogrammierung in den Keimzellen auftreten (Reik et al. 2001; Horsthemke und Buiting 2006; siehe Kapitel 1.1.1; Abbildung 2). Findet ein Fehler bei der Imprint-Auslöschung oder Etablierung in der Keimbahn statt, ist dieser Imprintingdefekt in allen daraus resultierenden Zellen vorhanden. Ein Fehler bei der postzygoten Aufrechterhaltung des Imprints führt zu einem Imprintingfehler im Mosaik (Nazlican et al. 2004; Horsthemke und Buiting 2008). Dabei trägt ein Teil der Zellen den korrekten, der andere Teil den fehlerhaften Imprint.

Je nachdem zu welchem Zeitpunkt während der Entwicklung der Fehler auftritt, variiert der Anteil der Zellen mit korrektem Imprint oder können unterschiedliche Gewebetypen betroffen sein (Weksberg et al. 2010; Begemann et al. 2011).

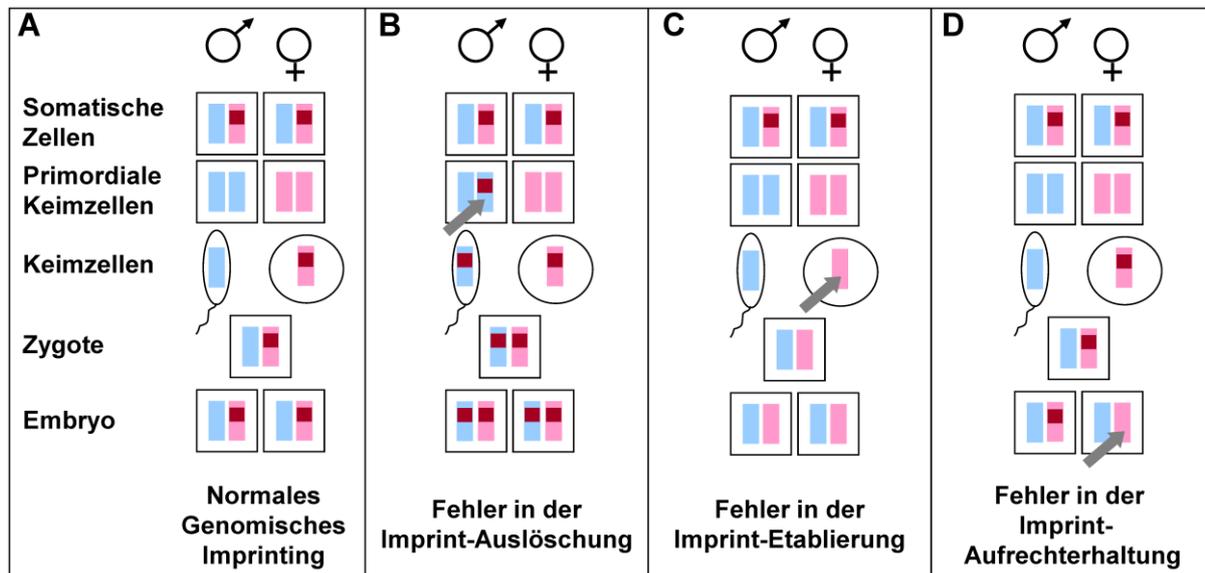


Abbildung 2: Genomisches Imprinting und Entstehungsmechanismen von Imprintingdefekten

Die Abbildung zeigt die epigenetische Reprogrammierung bezogen auf den Zyklus von Imprint-Auslöschung, -Etablierung und -Aufrechterhaltung während der Keimzellentwicklung, in der Zygote und im Embryo. Zur Vereinfachung ist jeweils nur ein Chromosomenpaar mit einem maternalen Methylierungs imprint abgebildet. In (A) ist der normale Verlauf der Reprogrammierung dargestellt, bei der der Imprint in den primordialen Keimzellen ausgelöscht wird, bevor eine elternspezifische Etablierung erfolgt und der Imprint in Zygote und Embryo aufrechterhalten wird. In (B) bis (D) sind mögliche Entstehungsmechanismen von Imprintingdefekten (graue Pfeile) aufgrund von primären Epimutationen abgebildet: Ein Fehler in der Imprint-Auslöschung (B), der Imprint-Etablierung (C) und der postzygoten Imprint-Aufrechterhaltung (D).

blau – paternales Chromosom; rot – maternales Chromosom; dunkelrotes Quadrat – maternaler Methylierungs imprint. Abbildung freundlicherweise von Prof. Dr. Bernhard Horsthemke zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung der molekularen Ursachen bei Imprintingerkrankungen werden Methylierungsanalysen z.B. mittels MS-MLPA (methylierungsspezifische *multiplex ligation dependent probe amplification*), welche eine gleichzeitige Untersuchung von Gendosis und Methylierung ermöglicht, oder mittels MS-PCR (methylierungsspezifische PCR) durchgeführt. Bei einer auffälligen Methylierung (Hypo- oder Hypermethylierung) und einer normalen Gendosis wird in der Regel eine weiterführende Mikrosatellitenanalyse (MSA) auf

Familiebene angeschlossen, um eine Unterscheidung von ID und UPD zu ermöglichen (Ramsden et al. 2010; Eggermann et al. 2011a und 2014; Buiting et al. 2014a und b).

Für viele Methylierungsanalysen nutzt man die Eigenschaft von Bisulfit unmethylierte Cytosine der DNA in Uracil umzuwandeln, welches dann in einer nachfolgenden PCR durch Thymin ersetzt wird. Da methylierte Cytosine vor dieser Reaktion geschützt sind, kann in nachfolgenden Analysen (z.B. Sanger-Sequenzierung mit vorheriger Klonierung) zwischen methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden unterschieden werden.

1.1.3 *Cis-* und *trans-*agierende Faktoren

Bei der Auslöschung, Neuetaablierung und Aufrechterhaltung der Methylierungsprints sind eine Vielzahl von *cis-* und *trans-*agierenden Faktoren beteiligt. Bisher ist jedoch nur wenig darüber bekannt, welche Faktoren dies sind und wie sie zusammenwirken. Zu den bekannten regulatorischen Elementen in *cis* zählen die Imprintingcenter oder Imprintingkontrollregionen, wie zum Beispiel auf den Chromosomen 11, 14 und 15. Bekannte *trans*-Faktoren sind u.a. die bereits erwähnten Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L) und TETs, sowie weitere an der epigenetischen Reprogrammierung beteiligte Proteine wie z.B. STELLA (alias DDPA3), ELP3, ZFP57, KDM1B, SETDB1 oder TRIM28 (alias KAP1; Ciccone et al. 2009; Ideraabdullah und Bartolomei 2011; Quenneville et al. 2012; Girardot et al. 2013; Dean 2014). Bisher konnten vier Gene identifiziert werden, bei denen Mutationen zu multiplen Imprintingdefekten führen: *NLRP7*, *NLRP2*, *KHDCL3* und *ZFP57*. *NLRP7* wurde als erstes sogenanntes *maternal effect* (maternales Effekt-) Gen beschrieben. Mutationen in diesem Gen wurden bei Frauen mit rekurrenten, biparentalen hydatidiformen Molschwangerschaften (biCHMs; OMIM #231090) beobachtet. In der Mehrheit der Fälle liegen die Mutationen homozygot bzw. compound heterozygot vor, während heterozygote Mutationen nur in wenigen Fällen als kausal beschrieben wurden (Moglabey et al. 1999; Murdoch et al. 2006; Qian et al. 2007 und 2011; Zhang et al. 2008; Williams et al. 2010a; Messaed et al. 2011). Neben den Molschwangerschaften wurden auch gehäuft Aborte und Totgeburten beobachtet, während nur in Ausnahmefällen Kinder lebend geboren wurden (Murdoch et al. 2006; Deveault et al. 2009; Ulker et al. 2013; Caliebe et al. 2014). Methylierungsanalysen bei biCHMs zeigten an mehreren der untersuchten

geimprinteten Loci Auffälligkeiten (Judson et al. 2002; El-Maarri et al. 2003; Kou et al. 2008; Hayward et al. 2009; Nguyen und Slim 2014).

In einem Fall von familiärem Beckwith-Wiedemann-Syndrom mit einer weiteren Methylierungsstörung an einem geimprinteten Locus konnte bei der Mutter eine homozygote Mutation in *NLRP2* beobachtet werden, die als kausal angesehen wurde (Meyer et al. 2009). *NLRP7* gehört, wie auch *NLRP2*, zu einer Protein-Familie, deren Mitglieder hauptsächlich bei der Immunantwort eine Rolle spielen. Einige werden jedoch in Oozyten stark exprimiert und scheinen hier eine essentielle Rolle bei der epigenetischen Reprogrammierung zu spielen (Tian et al. 2009; Kufer und Sansonetti 2011; Mahadevan et al. 2013; Duenez-Guzman und Haig 2014). *NLRP7* ist in Mäusen nicht vorhanden und konnte daher auch nicht näher untersucht werden. Der *knockdown* von *Nlrp2* führte jedoch zu einem frühen Stopp in der murinen Embryonalentwicklung (Peng et al. 2012). Auch der *knockout* von *Nlrp5* und *Nlrp14* führte zu einer frühen embryonalen Letalität (Tian et al. 2009).

Bei Frauen mit rekurrenten biCHMs ohne Mutationen in *NLRP7* konnte *KHDC3L* (alias *C6orf221*), welches mit *NLRP7* co-exprimiert wird, als weiteres *maternal effect* Gen identifiziert werden (Parry et al. 2011; Reddy et al. 2013; Nguyen und Slim 2014).

Bei Patienten mit transientem neonatalen Diabetes mellitus und einer Hypomethylierung an mehreren geimprinteten Loci konnten Mutationen im *ZFP57*-Gen identifiziert werden. Dieser *trans*-Faktor wurde später als mit DNMTs assoziiert beschrieben (Mackay et al. 2008; Li et al. 2008; Quenneville et al. 2011).

1.2 Imprintingkrankungen

Insgesamt sind acht Imprintingkrankungen bekannt, deren klinische Charakteristika und die chromosomale Lokalisationen der beteiligten Loci in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Auf einige wird in der hier vorliegenden Arbeit detaillierter eingegangen.

Tabelle 1: Imprintingkrankungen

Imprintingkrankung	Chromosomale Region	Klinische Merkmale
Transienter neonataler Diabetes mellitus (TNDM)	6q24	intrauterine Wachstumsverzögerung, Neonataler Diabetes mellitus (bis ca. sechs Monate)
Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS)	11p15.5	Prä- und postnataler Großwuchs, Hemihypertrophie, Makroglossie, neonatale Hypoglykämie
Silver-Russel-Syndrom (SRS)	11p15.5 7p und 7q	Prä- und postnatale Wachstumsretardierung, faziale Dismorphien
Upd(14)pat-Syndrom	14q32	Glockenförmiger Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen, Intelligenzminderung
Upd(14)mat-Syndrom	14q32	Kleinwuchs mit kleinen Händen und Füßen, Adipositas, frühzeitige Pubertät
Angelman-Syndrom (AS)	15q11q13	Intelligenzminderung, keine Sprachentwicklung, Ataxie, freundliches Verhalten (Lachen), Krampfanfälle
Prader-Willi-Syndrom (PWS)	15q11q13	Neonatale Muskelhypotonie, später Hyperphagie und Adipositas, Intelligenzminderung
Pseudo-Hypoparathyreoidismus Typ Ib	20q13.3	Resistenz gegen Parathyreoidhormone

1.2.1 Angelman-Syndrom und Prader-Willi-Syndrom

Angelman-Syndrom (AS) und Prader-Willi-Syndrom (PWS) sind zwei distinkte neurogenetische Erkrankungen, die durch einen Funktionsverlust von Genen innerhalb der dem Imprinting unterliegenden Region auf Chromosom 15q11q13 verursacht werden.

Patienten mit AS (OMIM #105830) wurden erstmals 1965 von Harry Angelman beschrieben (Angelman 1965). Zu den klinischen Merkmalen zählen eine schwere mentale Retardierung mit fehlender oder stark eingeschränkter Sprachentwicklung, Ataxie, Mikrozephalie, faziale Auffälligkeiten wie ein breiter Mund, ein prominentes Kinn und tiefliegende Augen, epileptische Anfälle, Schlafstörungen und charakteristische Verhaltensmerkmale wie ein

freundliches Wesen und häufiges, unbegründetes Lachen (Dan 2009; Buiting 2010; Dagli et al. 2012).

PWS (OMIM #176270) wurde 1956 von Andrea Prader, Alexis Labhart und Heinrich Willi beschrieben (Prader et al. 1956). Patienten fallen zunächst durch ein geringes Geburtsgewicht und eine muskuläre Hypotonie während der neonatalen Phase, die mit Fütterungsproblemen einhergeht, auf. Später entwickelt sich eine Hyperphagie mit stammbetonter Adipositas. Weitere phänotypische Merkmale sind eine meist moderate mentale Retardierung, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, Hypogonadismus, eine unvollständige oder fehlende Pubertät, charakteristische faziale Merkmale wie mandelförmige Augen und herabgezogene Mundwinkel sowie Verhaltensauffälligkeiten wie Temperamentsausbrüche, *skin picking* (Dermatillomanie) und obsessiv-kompulsives Verhalten (Cassidy und Driscoll 2009; Buiting 2010). Die Inzidenz dieser beiden Syndrome wird in der Literatur mit ca. 1/10.000 - 1/25.000 angegeben (Buiting 2014a und b).

Die molekulargenetischen Ursachen für AS und PWS sind Deletionen der Region 15q11q13, uniparentale Disomien (UPDs) und Imprintingdefekte (IDs) sowie Mutationen im *UBE3A*-Gen bei AS (Horsthemke und Wagstaff 2008; Buiting 2010; Ramsden et al. 2010; Cassidy et al. 2012). Dabei führt der Funktionsverlust der paternal exprimierten Gene zu PWS, während ein Funktionsverlust des maternal exprimierten Gens *UBE3A* zu AS führt (Abbildung 3). Die Besonderheit des *UBE3A*-Gens ist, dass es nur im Gehirn elternspezifisch exprimiert wird, während in anderen Geweben eine biallelische Expression vorliegt (Kishino et al. 1997; Matsuura et al. 1997). Der Beitrag einzelner paternal exprimierter Gene zum PWS-Phänotyp ist bisher nicht genau bekannt. In den letzten Jahren wurden jedoch Patienten mit einem PWS ähnlichen Phänotyp beschrieben, die atypische Deletionen des *SNORD116*-Genclusters aufwiesen, so dass diesem eine wichtige Rolle bei PWS zugeschrieben wird (Sahoo et al. 2008; de Smith et al. 2009; Duker et al. 2010).

Bei der Mehrheit der AS- und PWS-Patienten (~ 70 - 75 %) liegt eine ca. 5 - 7 Mb große interstitielle Deletion vor, die in der Regel *de novo* auftritt. Solch eine Deletion führt zu AS, wenn sie auf dem maternalen Allel liegt und zu PWS, wenn sie auf dem paternalen Allel liegt. Die Bruchpunkte liegen dabei meist in einer von drei definierten Bruchpunktclusterregionen und werden daher in Klasse I- und Klasse II-Deletionen unterteilt (BP1 - BP3; Abbildung 3; Butler und Palmer 1983; Knoll et al. 1989; Amos-Landgraf et al. 1999; Christian et al. 1999). Diese Bruchpunktclusterregionen scheinen jeweils durch multiple Duplikationen entstanden zu sein und weisen daher eine hohe Sequenzidentität (Sequenzhomologie) auf, was ein

erhöhtes Risiko für intra- und interchromosomale, nicht-homologe Rekombination birgt (Buiting et al. 1992 und 1998; Ji et al. 1999 und 2000; Nicholls und Knepper 2001).

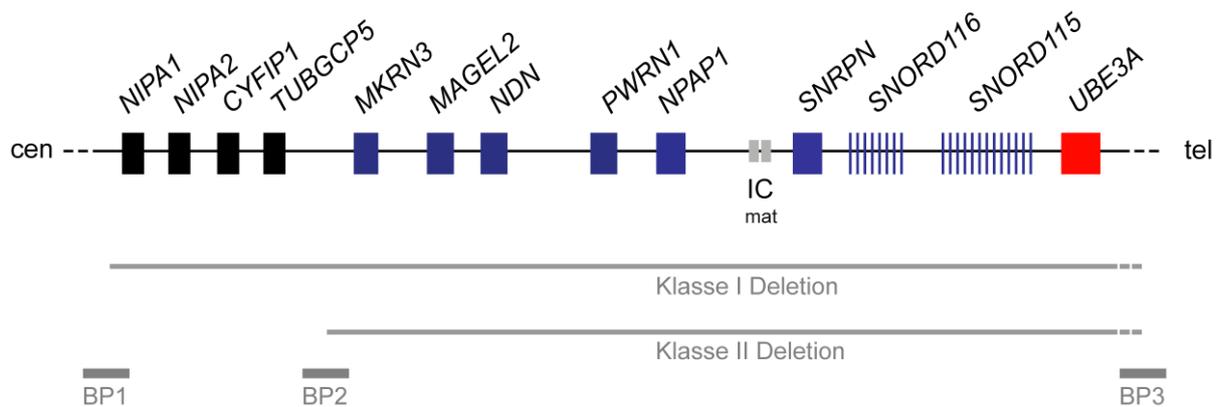


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Region 15q11q13

Die Abbildung gibt die schematische Übersicht der dem Imprinting unterliegenden Region 15q11q13 wieder. Die paternal exprimierte Gene sind in blau dargestellt, das maternal exprimierte Gen *UBE3A* in rot. Biallelisch exprimierte Gene sind in schwarz wiedergegeben und in der Reihenfolge abgebildet, wie sie in Chai et al. 2003 beschrieben wurden. Die Darstellung der elternspezifischen Expression bezieht sich auf die Situation im Gehirn.

Die Bruchpunktclusterregionen (BP) 1 bis 3 sowie die daraus resultierenden Klasse I- und Klasse II-Deletionen sind als graue Balken angedeutet. Das Imprinting Center (IC) setzt sich aus dem AS- und dem PWS-SRO zusammen und ist auf dem maternalen Allel methyliert.

mat – maternal; cen – centromerisch; tel – telomerisch. Ohne Maßstab.

Verändert nach Buiting et al. 2014c.

Bei PWS ist in ~ 25 - 30 % der Fälle eine maternale uniparentale Disomie 15 [upd(15)mat] die Ursache. Dabei sind in den Patienten beide Kopien des Chromosoms 15 maternalen Ursprungs, so dass es zu einem Verlust der Expression der ausschließlich paternal exprimierten Gene kommt. Beim AS sind nur ~ 1 - 2 % der Fälle auf eine upd(15)pat zurückzuführen, bei der beide Kopien paternalen Ursprungs sind und es damit zu keiner Expression von *UBE3A* kommt (Malcolm et al. 1991; Nicholls et al. 1989; Buiting 2010). Imprintingdefekte, bei denen die Allele einen falschen Imprint tragen, sind bei PWS in ~ 1 - 3 % und bei AS in ~ 2 - 4 % der Fälle kausal. Zu AS kommt es dabei, wenn ein paternaler Imprint des maternalen Allels zum Expressionsverlust von *UBE3A* führt. Ein maternaler Imprint auf dem paternalen Chromosom hingegen resultiert in einem Expressionsverlust der normalerweise paternal exprimierten Gene und führt zu PWS. IDs treten in der Mehrheit der Fälle ohne zugrunde liegende Sequenzveränderung auf (primäre

Epimutation; siehe Kapitel 1.1.2). Bei ~ 10 - 15 % der AS- und PWS-Patienten mit ID liegt jedoch eine Deletion des Imprinting Centers (IC) vor (sekundäre Epimutation; Sutcliffe et al. 1994; Buiting et al. 1995, 1998 und 2003; Horsthemke und Buiting 2006; Horsthemke und Wagstaff 2008). Das IC liegt *upstream* des *SNURF-SNRPN*-Gens und reguliert das Imprinting der Region 15q11q13 in *cis*. Es weist eine zweigeteilte Organisation auf, die mittels überlappender Deletionen auf zwei kleinste Bereiche, genannt AS- bzw. PWS-SRO (*smallest region of overlap*) eingegrenzt werden konnten (Ohta et al. 1999a und b; Buiting et al. 1999 und 2003).

Das Wiederholungsrisiko liegt bei einem sekundären Imprintingdefekt aufgrund einer familiären IC-Deletion bei 50 %, bei einem ID mit primärer Epimutation hingegen bei < 1 %. Interessant ist, dass bei AS-Patienten ein ID viel häufiger im Mosaik auftritt (~ 30 %), also nicht in allen Zellen vorliegt, als bei PWS (Gillissen-Kaesbach et al. 1999; Wey et al. 2005; Williams et al. 2010b). Der Grad des Mosaiks ist dabei variabel und kann sich mildernd auf den Phänotyp auswirken (Nazlican et al. 2004). Bei AS werden Mosaikdarstellungen darauf zurückgeführt, dass der Imprintingdefekt postzygot durch einen Fehler in der Aufrechterhaltung des Imprints auf dem maternalen Allel verursacht wird. Kommt es zu einem Fehler bei der Imprintetablierung, tritt ein AS-ID ohne Mosaik auf. Bei PWS hingegen gibt es Hinweise darauf, dass IDs meist durch einen Fehler bei der Auslöschung des Imprints in der Keimbahn des Vaters auftreten, da in allen informativen Familien das (groß-)mütterliche Allel betroffen war, so dass man hier von einer *epigenetic inheritance*, also der Vererbung eines epigenetischen Zustands, sprechen kann (Buiting et al. 1998 und 2003).

Bei AS ist in ~ 5 - 10 % der Fälle eine Mutation im *UBE3A*-Gen ursächlich, während bei ~ 10 - 15 % der Patienten trotz klinischer Diagnose keine molekulargenetische Ursache nachweisbar ist (Kishino et al., 1997; Matsuura et al., 1997; Buiting et al. 2010; Ramsden et al. 2010; Buiting et al. 2014b).

Im Gegensatz zu AS, das durch den Funktionsverlust des maternal exprimierten Gens *UBE3A* verursacht wird, konnte bei PWS bisher keines der paternal exprimierten Gene in der Region 15q11q13 als ausschließlicher Auslöser der Erkrankung identifiziert werden. Zu den paternal exprimierten Genen gehören die intronlosen und vermutlich durch Retrotransposition entstandenen Gene *MKRN3* (*makorin ring finger protein 3*), *MAGEL2* (*MAGE-like 2*), *NDN* (*Necdin*) und *NPAPI* (*nuclear pore associated protein 1*, ehemals *C15orf2*; Abbildung 3; Jong et al. 1999; Boccaccio et al. 1999, MacDonald und Wevrick 1997; Hore et al. 2007; Färber et al. 2000; Neumann et al. 2014; Nicholls und Knepper 2001). Weiterhin umfasst die

ca. 1 - 1,5 Mb große, dem Imprinting unterliegende Region das *SNURF-SNRPN*-Transkript (*SNRPN upstream reading frame - small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) sowie ca. 80 C/D Box snoRNA-Gene (*SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*, *SNORD109A* und *B*), von denen einige in snoRNA-Clustern angeordnet sind (*SNORD115* und *SNORD116*; Cavaille et al. 2000; Wirth et al. 2001; Runte et al. 2001a). Das *SNURF-SNRPN*-Transkript dient dabei als eine Art Wirts-Transkript für die snoRNA-Gene und ist als *antisense*-Transkript an der Regulation der monoallelischen Expression von *UBE3A* beteiligt (Runte et al. 2001b und 2004).

1.2.2 Beckwith-Wiedemann-Syndrom

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS; OMIM #130650) ist eine Großwuchs-assoziierte Imprintingkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1:13.700 - 17.000 (Weksberg et al. 2010; Eggermann et al. 2014a). Der Name des Syndroms geht auf John Bruce Beckwith und Hans-Rudolf Wiedemann zurück, die im Jahr 1969 unabhängig voneinander den Phänotyp beschrieben (Beckwith 1969; Wiedemann 1969). Charakteristische klinische Merkmale sind neben dem prä- und postnatalen Großwuchs (Makrosomie), Körperasymmetrie (Hemihyperplasie), Makroglossie, Bauchwanddefekte wie Nabelhernien, Omphalozelen oder Rektusdiastasen, Viszeromegalie, Ohrkerben, neonatale Hypoglykämie und je nach zugrunde liegender molekularer Ursache, ein deutlich erhöhtes Risiko für Tumore im frühen Kindesalter, v.a. für Wilms-Tumore (Bliet et al. 2004; Cooper et al. 2005; Weksberg et al. 2005 und 2010; Choufani et al. 2010 und 2013). Die Ausprägung des Phänotyps ist sehr variabel, so dass manche Patienten z.B. nur eine leichte Makrosomie oder Hemihyperplasie aufweisen. Daher könnte die Inzidenz des BWS höher liegen, als bisher angenommen (Weksberg et al. 2010).

Die molekulargenetischen Ursachen für BWS sind vielfältig und hängen mit genetischen und epigenetischen Veränderungen innerhalb der dem Imprinting unterliegenden Region auf Chromosom 11p15.5 zusammen. Je nach der zugrunde liegenden molekularen Ursache kann es dabei anstelle des mit Großwuchs-assoziierten BWS zu einem reziproken Phänotyp, dem u.a. mit einer Wachstumsretardierung assoziierten Silver-Russel-Syndrom kommen (Eggermann et al. 2008; Azzi et al. 2014). Auf dieses Krankheitsbild wird jedoch im Weiteren nicht näher eingegangen.

Die geimprinteten Gene der Region 11p15.5 sind, im Gegensatz zu anderen Imprintingdomänen, wie z.B. auf Chromosom 15q11q13 oder 14q32, in zwei Genclustern organisiert, die durch mehrere biallelisch exprimierte Gene voneinander getrennt sind. Der Imprint der beiden Gencluster wird dabei jeweils von einer eigenen Imprintingkontrollregion (ICR) reguliert (Abbildung 4; Smilnich et al. 1999; Horike et al. 2000; Maher und Reik 2000; Demars und Gicquel 2012). Die telomerisch gelegene ICR1 ist auf dem paternalen Allel methyliert und auf dem maternalen Allel unmethyliert. Sie reguliert die reziproke Expression des fetalen Wachstumsfaktors *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*; paternal exprimiert) und der langen, nicht-codierenden RNA *H19* (maternal exprimiert). Die ICR1 liegt *upstream* von *H19* in einem *repeat* Cluster, welches mehrere CTCF- und OCT-Bindestellen enthält (siehe Kapitel 1.2.2.1; Rachmilewitz et al. 1992; Rainier et al. 1993; Jinno et al. 1996; Lighten et al. 1997; Frevel et al. 1999; Takai et al. 2001; Soejima und Higashimoto 2013).

Die centromerisch gelegene ICR2 (auch als KvDMR bezeichnet) ist, im Gegensatz zur ICR1, auf dem maternalen Allel methyliert. Sie liegt im 5' Bereich des paternal exprimierten Gens *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*; alias *LIT1*), welches das *antisense*-Transkript zum maternal exprimierten *KCNQ1* (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1*) darstellt. Weitere von der ICR2 regulierte Gene sind u.a. die vom maternalen Allel transkribierten *KCNQ1DN* (*KCNQ1 downstream neighbor*) und *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*; Mitsuya et al. 1999; Lee et al. 1997; Matsuoka et al. 1995 und 1996; Tsugu et al. 2000; Soejima und Higashimoto 2013).

Die häufigste molekulare Ursache für BWS ist eine Hypomethylierung der ICR2 (meist im Mosaik), die bei ~ 50 % aller Patienten mit BWS vorliegt und überwiegend sporadisch aufgrund einer primären Epimutation auftritt. Bei ~ 20 % der Patienten liegt eine paternale UPD der Region 11p15.5 vor. Diese resultiert gleichzeitig in einer Hypomethylierung der ICR2 und einer Hypermethylierung der ICR1, da beide Chromosomen paternalen Ursprungs sind. Mutationen des Gens *CDKN1C* auf dem maternalen Allel werden in ~ 5 % der BWS-Fälle beobachtet. Ebenfalls bei ~ 5 % der Patienten ist eine Hypermethylierung der ICR1 ursächlich, die auch hier meist sporadisch auftritt. Es wurden jedoch einige Fälle beschrieben, bei denen Mutationen der OCT-Bindestellen oder Mikrodeletionen innerhalb der ICR1 zur Hypermethylierung geführt haben (sekundäre Epimutation). Weiterhin kann bisher bei einer Gruppe von ~ 13 - 15 % der Patienten mit klinisch diagnostiziertem BWS keine molekulargenetische Ursache identifiziert werden (Cerrato et al. 2008; Weksberg et al. 2010; Choufani et al. 2010 und 2013; Demars und Gicquel 2012; Jacob et al. 2013; Eggermann et al. 2014a).

Dies könnte u.a. auch darauf zurückzuführen sein, dass Imprintingdefekte in der Mehrzahl im Mosaik vorliegen und der Grad der Methylierungsveränderungen in den untersuchten Geweben zu gering ausgeprägt sein könnte, um sie mit heutigen Methoden detektieren zu können (Eggermann et al. 2014a).

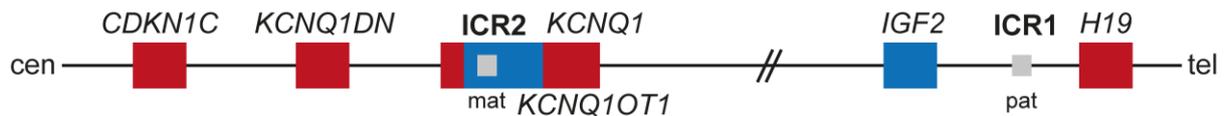


Abbildung 4: Übersicht der Region 11p15.5

Die Abbildung zeigt eine Auswahl der geimprinteten Gene der Region 11p15.5. Centromerisch (cen) liegt die ICR2, welche auf dem maternalen (mat) Allel methyliert ist. Sie reguliert die elternspezifische Expression von *KCNQ1* und seinem *antisense*-Transkript *KCNQ1OT1* sowie von *KCNQ1DN* und *CDKN1C*. Die ICR1 liegt weiter telomerisch (tel) und ist von der ICR2 durch einige geimprintete und nicht geimprintete Gene getrennt. Sie ist auf dem paternalen (pat) Allel methyliert und steuert die reziproke Expression von *H19* und *IGF2*.

rot – maternal exprimiert; blau – paternal exprimiert; grau – ICRs; pat – paternales Allel methyliert; mat – maternales Allel methyliert; tel – telomerisch; cen – centromerisch. Ohne Maßstab.

1.2.2.1 Aufbau der ICR1 und molekulare Ursachen für sekundäre Epimutationen – Mutationen der OCT-Bindestellen und Mikrodeletionen

Die ICR1 ist ein ca. 5 kb großer Bereich, der etwa 2 kb *upstream* von *H19* liegt. Er beinhaltet insgesamt sieben Bindestellen für das Zinkfinger-Protein *CTCF* (*CCCTC-binding factor*), sowie drei OCT4/SOX2-Bindemotive (OCT-Bindestellen; Phillips und Corces 2009; Choufani et al. 2010; Merckenschlager und Odom 2013; Hori et al. 2002). Die Bindung des ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors CTCF an die Bindestellen innerhalb der ICR1 verhindert die Methylierung des normalerweise unmethylierten maternalen Allels. Die bereits in der Keimbahn gesetzte Methylierung des paternalen Allels hingegen blockiert eine Bindung von CTCF (Kanduri et al. 2000; Holmgren et al. 2001; Schoenherr et al. 2003; Bartolomei 2009). Die ICR1 wirkt in Abhängigkeit von CTCF als Isolator, d.h. sie blockiert die Interaktion von Enhancer- und Promotor-Elementen. In diesem Fall bewirkt die Bindung von CTCF an die ICR1, dass Chromatin-Konformationen höherer Ordnung induziert werden, was dazu führt, dass die Aktivierung von *IGF2*-Promotoren durch *downstream* Enhancer auf dem maternalen Allel und damit die Expression von *IGF2* blockiert wird. Da die

Methylierung auf dem paternalen Allel die Bindung von CTCF inhibiert, ist die Isolatorfunktion der ICR1 nicht aktiv, wodurch *IGF2* vom paternalen Allel exprimiert werden kann (Hark et al. 2000; Bell et al. 2000; Murrell et al. 2004; Kurukuti et al. 2006; Nativio et al. 2011).

Neben der Bindung von CTCF konnte, zumindest im Mausmodell, auch für die Bindung von OCT4 an die OCT-Bindestellen gezeigt werden, dass sie notwendig ist, um den unmethylierten Status des maternalen Allels aufrecht zu erhalten (Hori et al. 2002; Zimmerman et al. 2013; Sakaguchi et al. 2013).

Der Aufbau der ICR1 zeigt eine zweigeteilte Organisation aus mehreren hoch homologen Sequenzblöcken, den sogenannten A- und B-repeats (Abbildung 5). Beide Abschnitte beinhalten dabei jeweils drei CTCF-Bindestellen sowie eine OCT-Bindestelle. Der centromerisch gelegene Abschnitt besteht aus den repeats B7, B6, B5 und A2 und beinhaltet die CTCF-Bindestellen eins bis drei (in B7 bis B5). Der telomer gelegene Abschnitt besteht aus dem nur z.T. vorhandenen repeat B4, sowie B3, B2, B1 und A1 und beinhaltet die drei CTCF-Bindestellen vier bis sechs (in B3 bis B1). Die siebte CTCF-Bindestelle ist *downstream* von A1 lokalisiert. Die drei OCT-Bindestellen befinden sich jeweils in den repeats A1 und A2 sowie *upstream* von B7.

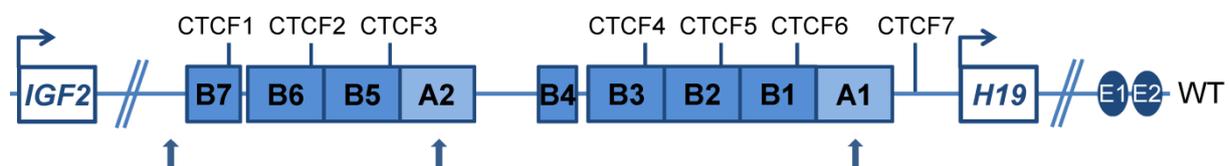


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der ICR1

Die Abbildung zeigt den Aufbau der *upstream* von *H19* gelegenen ICR1 von Centromer zu Telomer. Die ICR1 setzt sich aus mehreren hoch homologen *repeat*-Blöcken zusammen, die eine zweigeteilte Organisation aufweisen. Jeweils drei bis vier B-repeats (B7 bis B5 bzw. B4 bis B1) und ein A-repeat (A2 bzw. A1) bilden dabei eine Einheit mit jeweils drei CTCF-Bindestellen (CTCF1 bis CTCF6). Weiterhin liegen insgesamt drei OCT-Bindestellen innerhalb der ICR1, jeweils eine in den beiden A-repeats sowie eine *upstream* von B7 (gekennzeichnet mit Pfeilen).

WT – Wildtyp; E1 und E2 – Enhancer; CTCF1 bis 7 – CTCF-Bindestellen 1 bis 7. Ohne Maßstab. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

Punktmutationen in OCT-Bindestellen wurden erstmals von Demars und Kollegen bei einer Familie mit mehreren BWS-Patienten in einer Generation als kausal beschrieben (Demars et al. 2010). Sie konnten einen Einzelnukleotidaustausch innerhalb der im A2-repeat gelegenen OCT-Bindestelle identifizieren. Dieser führt, wenn er auf dem maternalen Allel liegt, zu einer

Hypermethylierung der ICR1. Auf dem methylierten paternalen Allel hingegen hat eine solche Mutation keine Auswirkungen und kann stumm weitergegeben werden. Später konnten in drei weiteren Familien zwei andere Einzelnukleotidaustausche identifiziert werden, die ebenfalls die in A2 gelegene OCT-Bindestelle betrafen (Poole et al. 2012; Higashimoto et al. 2013).

Als eine weitere Ursache von sekundären Epimutationen der ICR1 bei BWS-Patienten sind unterschiedlich große Mikrodeletionen der Region beschrieben worden (Sparago et al. 2004 und 2007; Cerrato et al. 2005; Prawitt et al. 2005a und b; Demars et al. 2010 und 2011; De Crescenzo et al. 2011). Auch in diesen Fällen führte eine Deletion nur dann zur Hypermethylierung der verbliebenen ICR1-Sequenz und BWS, wenn sie auf dem maternalen Allel lag, während eine Deletion auf dem methylierten paternalen Allel keine Auswirkungen hatte. Die meisten dieser Deletionen wiesen eine Größe von ca. 1,4 - 1,8 kb auf und führten in der Regel zum Verlust von ein bis zwei CTCF-Bindestellen. Weiterhin waren Deletionen dieser Art meist mit einer sehr starken Hypermethylierung und einer vollständigen Penetranz des BWS-Phänotyps assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigte eine Familie mit einer 2,2 kb großen Deletion (B5/B1), die zum Verlust von drei CTCF-Bindestellen führt, eine unvollständige Penetranz in Bezug auf Hypermethylierung und BWS-Phänotyp (Prawitt et al. 2005a). Es wurde vermutet, dass diese Deletion nur in Verbindung mit einem weiteren Ereignis (*„second hit“*), in diesem Fall einer *IGF2*-Duplikation, zur Ausprägung des BWS führt. In einer weiteren Familie mit einer ebenfalls 2,2 kb großen Deletion mit anderen Bruchpunkten (B6/B2) konnte jedoch bei allen Deletionsträgern eine leichte Hypermethylierung beobachtet werden, die allein ausreichend war, um BWS hervorzurufen (Demars et al. 2011).

1.2.3 Upd(14)mat- und upd(14)pat-Syndrom

Uniparentale Disomien (UPDs) des Chromosoms 14 gaben erste Hinweise darauf, dass sich auch auf diesem Chromosom Gene befinden, die dem Imprinting unterliegen. Dabei führt sowohl eine maternale als auch eine paternale uniparentale Disomie 14 zu einem klinisch distinkten Phänotyp. Die upd(14)-Syndrome wurden erstmals im Jahr 1991 bei Patienten mit UPDs des langen Arms des Chromosoms 14 aufgrund von Robertson'schen Translokationen beschrieben (Temple et al. 1991; Wang et al. 1991). Dabei zeigen Patienten mit einem

upd(14)pat-Syndrom (OMIM #608149), bei dem beide Kopien des Chromosoms 14 vom Vater stammen, als besonders charakteristisches phänotypisches Merkmal einen kleinen, glockenförmigen Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen, der oft zu respiratorischer Insuffizienz führt. Weitere Merkmale sind Bauchwanddefekte, Wachstumsretardierung, Entwicklungsverzögerung und faziale Dysmorphien sowie Polyhydramnion und Plazentomegalie während der Schwangerschaft (Wang et al. 1991; Ogata et al. 2008; Naik et al. 2010; Irving et al. 2010; Hoffmann und Heller 2011). Der Phänotyp einer maternalen uniparentalen Disomie 14, bei der beide Chromosomen 14 von der Mutter stammen, ist hingegen weitaus milder und heterogener. Die klinischen Merkmale beinhalten prä- und postnatale Wachstumsretardierung, muskuläre Hypotonie, kleine Hände, Pubertas praecox sowie eine später einsetzende Adipositas (Temple et al. 1991; Pentao et al. 1992; Mitter et al. 2006; Hoffmann und Heller 2011). Das klinische Spektrum zeigt dabei Überlappungen mit der Symptomatik des Prader-Willi-Syndroms (Hosoki et al. 2008).

Die Phänotypen der beiden upd(14)-Syndrome sind auf eine Dysregulation von elternspezifisch exprimierten Genen innerhalb der geimprinteten Region auf 14q32 zurückzuführen. In diesem Bereich ist ein ca. 1 Mb großes, dem Imprinting unterliegendes Gencluster lokalisiert. Neben den paternal exprimierten Genen *RTL1* (*retrotransposon-like 1*) und *DLK1* (*delta-like 1 homolog, Drosophila*) sind die maternal exprimierten Gene *MEG3* (*maternally expressed gene 3*, vormals *GTL2 - genetrapp locus 2*), das *RTL1 antisense transcript* (*RTL1as*), *MEG8* (*maternally expressed gene 8*) sowie ein sno- und ein microRNA-Cluster vorhanden (Abbildung 6; Wylie et al. 2000; Miyoshi et al. 2000; Charlier et al. 2001; Cavaille et al. 2002; Seitz et al. 2004). Die Regulation der elternspezifischen Expression dieser Gene erfolgt durch zwei DMRs, die auf dem paternalen Allel methyliert und auf dem maternalen Allel unmethyliert sind. Von beiden wird angenommen, dass sie als ICRs

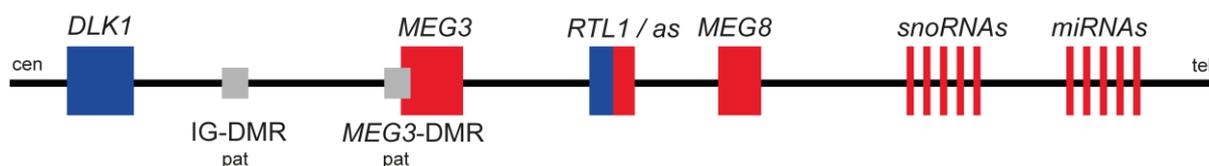


Abbildung 6: Schematische Übersicht des geimprinteten Genclusters in der Region 14q32

Die Abbildung zeigt die paternal (blau) und maternal (rot) exprimierten Gene der Region 14q32. Die beiden als ICR fungierenden IG-DMR und *MEG3*-DMR sind als graue Kästchen dargestellt. Die Methylierung ist jeweils nur auf dem paternalen Allel vorhanden.

pat – paternales Allel methyliert; cen – centromerisch; tel – telomerisch. Ohne Maßstab. Verändert nach Beygo et al. 2014.

fungieren (Wylie et al. 2000; Lin et al. 2003; Kagami et al. 2010). Die *intergenic* (IG-)DMR liegt zwischen *DLK1* und *MEG3*, während die *MEG3*-DMR im Promotorbereich des *MEG3*-Gens lokalisiert ist (Wylie et al. 2000; Lin et al. 2003). Der Imprint der IG-DMR wird auch als primärer Imprint bezeichnet, da er bereits in der Keimbahn gesetzt wird, während dies an der *MEG3*-DMR erst sekundär nach der Fertilisation erfolgt (Takada et al. 2002; Geuns et al. 2007).

Als molekulare Ursachen der upd(14)-Syndrome sind neben (segmentalen) UPDs in den letzten Jahren sowohl bei Patienten mit upd(14)mat- als auch mit upd(14)pat-Syndrom Imprintingdefekte und Deletionen als kausal beschrieben worden (Temple et al. 2007; Buiting et al. 2008; Kagami et al. 2008 und 2010). Diese unterschiedlichen molekularen Ursachen scheinen jedoch keine phänotypischen Unterschiede nach sich zu ziehen (Ogata et al. 2008; Hoffmann und Heller 2011). Die meisten der bisher beschriebenen Deletionen beinhalten beide DMRs (Kagami et al. 2008; Buiting et al. 2008; Bena et al. 2010). Nur bei zwei Patientinnen konnten bisher Deletionen beobachtet werden, die jeweils nur die IG- oder nur die *MEG3*-DMR umfassen (Kagami et al. 2010). Nähere Untersuchungen der Methylierungsmuster an der jeweils nicht deletierten DMR zeigten, dass bei einer Deletion der IG-DMR die *MEG3*-DMR eine Hypermethylierung aufweist, während der Verlust der *MEG3*-DMR keine Auswirkungen auf das Methylierungsmuster der IG-DMR hat. Basierend auf den Daten dieser beiden Patientinnen postulierten Kagami und Kollegen die Hypothese, dass die IG-DMR in einer Art hierarchischer Interaktion über der *MEG3*-DMR stehen würde (Kagami et al. 2010).

1.3 Zielsetzung

Die Regulation geimprinteter Gene und Gencluster, sowie die Beteiligung von *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren, ist bisher nur in Teilen verstanden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene patientenbezogene Ansätze verfolgt, um regulatorische Elemente und neue geimprintete Gene zu identifizieren und die Auswirkungen von Deletionen und Mutationen in *cis* bei Patienten mit Imprintingkrankungen zu untersuchen.

Bei Patienten mit PWS oder AS liegt in einem kleinen Teil der Fälle ein primärer Imprintingdefekt in der chromosomalen Region 15q11q13 vor, der durch Fehler bei der Auslöschung, Etablierung oder Aufrechterhaltung des Methylierungsprints in der Keimbahn entstehen kann. Da die Ursache hierfür bisher nicht bekannt ist, soll im Rahmen dieser Arbeit ein Patientenkollektiv mittels Affymetrix SNP Array 6.0 auf Kopienzahlveränderungen untersucht werden, um mögliche *cis*- und *trans*-regulatorische Elemente zu identifizieren.

Bei einem Kind mit multiplen Imprintingdefekten sollen weitere Gene, an denen der Patient Methylierungsveränderungen zeigt, im Hinblick auf eine allelspezifische Methylierung und Expression hin untersucht werden, um neue geimprintete Gene zu identifizieren.

Eine seltene Ursache des BWS ist die Hypermethylierung der ICR1 auf Chromosom 11p15.5 aufgrund von Mikrodeletionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen bei einer Patientin die Deletionsbruchpunkte charakterisiert und weitere Familienmitglieder auf das Vorhandensein der Deletion hin untersucht werden. Außerdem sollen quantitative Methylierungsanalysen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior etabliert und durchgeführt werden. Weitere Familien mit unterschiedlichen ICR1-Mikrodeletionen sollen ebenfalls detaillierten Methylierungsanalysen unterzogen werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Art der Deletion und dem Grad der Methylierung näher zu untersuchen.

In einer BWS-Familie mit einer OCT4-Mutation in der ICR1 wurde eine Zunahme der klinischen Merkmale von einer Generation zur nächsten beobachtet. Hochquantitative Methylierungsanalysen sollen darüber Aufschluss geben, ob der Grad der Methylierung mit der phänotypischen Ausprägung korreliert.

Patienten mit einem upd(14)pat-Syndrom aufgrund von Deletionen sind bisher nur in Einzelfällen beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Deletionen von zwei Patienten charakterisiert und eine detaillierte Methylierungsanalyse durchgeführt werden, um neue Erkenntnisse über die Interaktion der beiden ICRs in der chromosomalen Region 14q32 zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Peqlab (Erlangen) und Sigma (Heidelberg) in *pro analysis* Qualität bezogen.

2.1.2 Standardlösungen

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
0,114 % Essigsäure
1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3 DNA-Größenstandards

MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker (Thermo Fisher Scientific)
1 kb DNA Ladder (Life Technologies)

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide und Sonden wurden, sofern sie nicht bereits im Institut etabliert waren, mit Hilfe folgender Programme erstellt:

Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)

Roche UPL (<https://www.roche-applied-science.com/shop/CategoryDisplay?cataloged=10001&tab=&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1&storeId=15006>)

Die Sequenzen sind im Anhang (Tabelle A1 - A7) aufgeführt.

Zur Durchführung von *in-silico* PCRs wurden folgende Programme verwendet:

UCSC in-silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgid=353942411>)

BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch>)

2.1.5 Enzyme

AmpliTaq[®] Gold Polymerase (Roche)

HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen)

Expand Long Range dNTPack (Roche)

DNase RQ1 (Promega)

Reverse Transkriptase (Applied Biosystems)

RNase Inhibitor (Applied Biosystems)

LightCycler[®] 480 Probes Master Mix (Roche)

2.1.6 Patienten

Die klinische Diagnose der in dieser Arbeit beschriebenen Patienten wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt und molekulargenetisch gesichert.

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt (No. 08-3858). Bei zugeschickten Proben lagen Ethikvoten der jeweiligen Universitäten vor. Von allen Patienten lagen Einverständniserklärungen vor.

2.1.6.1 Patienten mit Angelman- oder Prader-Willi-Syndrom mit Imprintingdefekt

Es wurden insgesamt 62 Patienten mit AS (davon 27 im Mosaik) und 46 Patienten mit PWS und einem Imprintingdefekt am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen rekrutiert, bzw. von internationalen Laboren zur weiteren molekularen Charakterisierung, hauptsächlich zum Ausschluss von IC-Deletionen, zugeschickt.

Alle PWS-ID Patienten zeigten charakteristische phänotypische Merkmale wie muskuläre Hypotonie und Trinkschwäche sowie eine Entwicklungsverzögerung. Die AS-ID Patienten wiesen eine mentale Retardierung mit fehlender Sprachentwicklung sowie Ataxie und freundliches Verhalten auf. Bei den 27 AS-ID Patienten mit Methylierungsmosaik war der Phänotyp teilweise milder bzw. atypisch mit Überlappungen zu PWS.

2.1.6.2 Patient mit Multilocus-Methylierungsdefekt (MLMD)

Der Patient mit Multilocus-Methylierungsdefekt wurde am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts Universität Kiel (BMBF Netzwerk Imprinting-Erkrankungen) rekrutiert.

Der Patient (III-2) wurde in der 32. SSW als Kind gesunder, nicht-konsanguiner türkischer Eltern geboren. Eine vorhergehende Schwangerschaft (III-1) wurde aufgrund von zahlreichen Fehlbildungen terminiert, eine nachfolgende Schwangerschaft (III-3) endete in einem Spontanabort. Der Patient zeigte u.a. grobe Gesichtsmerkmale, eine Omphalozele sowie ein asymmetrisches Körperwachstum. Eine erste Verdachtsdiagnose war daher ein BWS oder SRS. Methylierungsanalysen bestätigten Veränderungen auf Chromosom 11p15 an beiden ICRs sowie weitere Methylierungsveränderungen an anderen geimprinteten Loci. Klinische Daten und Methylierungsanalysen in Caliebe et al. 2014.

2.1.6.3 Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom mit Mikrodeletionen in der ICR1

Familie 8 wurde am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen über die Routinediagnostik rekrutiert. DNA-Proben der weiteren in dieser Arbeit untersuchten Familien wurden von Kooperationspartnern aus Neapel (Familien 2, 3, 4 und 6; Andrea Riccio, Department of Structural and Functional Biology, University of Naples ‘Federico II’ und Department of Environmental Science, Second University of Naples, Italien) und Mainz (Familie 7; Dirk Prawitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mainz; BMBF Netzwerk Imprinting-Erkrankungen) zur Verfügung gestellt. Klinische Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Detaillierte klinische und molekulargenetische Daten sind in folgenden Veröffentlichungen zu finden: Familie 2 in Sparago et al. 2004 und 2007, bezeichnet als Family 2 bzw. E; Familie 3 in Sparago et al. 2007, bezeichnet als Family C; Familie 4 in Cerrato et al. 2005 und Sparago et al. 2007, bezeichnet als Family A; Familie 6 in De Crescenzo et al. 2011; Familie 7 in Prawitt et al. 2005a und b und Familie 8 in Beygo et al. 2013a, aus der auch die Nummerierung der Familien übernommen wurde. Stammbäume der einzelnen Familien sowie Details zu den Deletionen sind im Ergebnisteil, Kapitel 3.3.1, zu finden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der klinischen Daten der untersuchten BWS-Patienten

Familie	2	3	4		6		7	8
Deletionsgröße	1,8 kb	1,4 kb	1,8 kb		1,8 kb		2,2 kb	2,2 kb
Bruchpunkte	B6/B3	B5/B3	B6/B3		B5/B2		B5/B1	B5/B1
Person	III-3	II-1	II-1	III-2	II-2	III-1	III-2	III-1
	P	P	M	P	M	P	P	P
Geburtsgewicht > 90. Perzentile	-	-	+	+	+	+	+	+
Postnataler Großwuchs	+	-	-	-	-	-	+	+
Makroglossie	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemihyperplasie	+	-	-	+	-	-	-	+
Bauchwanddefekte	+	+	-	-	-	+	+	-
Ohrkerben	-	-	-	+	-	+	+	+
Hypoglykämie	+	-	-	+	-	+	-	+
Polyhydramnios	+	-	-	-	-	+	-	-
Naevus flammeus	+	+	-	-	-	-	-	-
Viszeromegalie	+	-	-	-	-	+	+	-
frühkindliche Tumore (u.a. Wilms-Tumor)	-	-	-	+	-	-	+	-
Urogenitale Anomalien	-	+	-	-	+	+	-	-

Tabelle verändert nach Beygo et al. 2013a. P - Patient; M - Mutter. Personenbezeichnungen siehe Stammbäume in Kapitel 3.3.1.

2.1.6.4 Familie mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom aufgrund einer Mutation in einer OCT-Bindestelle in der ICR1

DNA aus peripherem Blut beziehungsweise Mundschleimhaut wurde von Kooperationspartnern in Norwegen (Siren Berland, Gunnar Houge; Center for Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, and Department of Clinical Medicine, University of Bergen, Norwegen) zugesandt, die auch die klinische Diagnose eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms gestellt und die kausale Mutation in der OCT-Bindestelle identifiziert haben.

Drei Schwestern der Familie (II-1, II-3 und II-4) zeigen einen Großwuchs oberhalb der 96. Perzentile (178, 185 bzw. 187 cm) und ein verlängertes post-pubertäres Größenwachstum, was kein typisches Merkmal des BWS ist. II-1 und II-4 hatten zudem vergrößerte Zungen und lagen mit ihrem jeweiligem Geburtsgewicht (II-1 5 kg; > 97,5. Perzentile; 40. SSW; II-4 2350 g; 99. Perzentile; 31. SSW) im oberen Normbereich. Bei keiner der drei Schwestern konnten weitere Merkmale, die zum phänotypischen Erscheinungsbild des BWS passen, beobachtet werden.

In der dritten Generation wurden vier Kinder geboren, von denen drei an BWS erkrankt sind und klassische phänotypische Merkmale aufweisen.

Patientin III-1 wog bei ihrer Geburt in der 38. SSW 4860 g (860 g > 97,5. Perzentile) bei einer Größe von 53 cm (97,5. Perzentile). Neben dem Großwuchs lagen eine Makroglossie, sowie ein Wilms-Tumor vor. Ihre Schwester (III-2) wurde in der 40. SSW mit einem Gewicht von 5280 g (880 g > 97,5. Perzentile) geboren. Auch sie zeigte eine Makroglossie, sowie vergrößerte Nieren und entwickelte später einen Wilms-Tumor.

III-3 wurde in der 29. SSW per Kaiserschnitt geboren, verstarb jedoch kurz darauf. Auch bei ihm lag ein Großwuchs vor (2130 g; 330 g > 97,5. Perzentile; 44 cm), eine Viszeromegalie, wobei besonders die Nieren betroffen waren sowie eine Makroglossie. Keiner der Patienten zeigte eine Körperasymmetrie oder neonatale Hypoglykämie. Klinische Angaben aus Berland et al. 2013.

2.1.6.5 Patienten mit einem upd(14)pat-Syndrom

Patient 1 wurde am Institut für Humangenetik Lübeck, Universität zu Lübeck (BMBF Netzwerk Imprinting-Erkrankungen) rekrutiert, wo auch die klinische Diagnose erstellt wurde.

Die Patienten 2 und 3 wurden am Institut für Humangenetik, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (BMBF Netzwerk Imprinting-Erkrankungen) diagnostiziert und rekrutiert. In allen Fällen wurden DNA-Proben für weiterführende Analysen ans Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen, geschickt.

Patient 1 wurde in der 32+2 SSW mit einer Größe von 47 cm (+1,6 SD; Standardabweichung) und einem Gewicht von 2600 g (+0,5 SD) geboren. Die Schwangerschaft wurde durch einen Polyhydramnion kompliziert. Außerdem lag eine Plazentomegalie vor. Der Patient hatte einen kleinen, glockenförmigen Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen, dem auffälligsten phänotypischen Merkmal eines upd(14)pat-Syndroms. Außerdem zeigte der Patient eine ausgeprägte Muskelhypotonie und eine Retromikrognathie. Klinische Angaben aus Beygo et al. 2014.

Patient 2 wurde in der 35. SSW mit einer Größe von 46 cm (-1,8 SD) und einem Gewicht von 3125 g (+2,4 SD) per Kaiserschnitt geboren. Die Schwangerschaft wurde durch einen

Polyhydramnion kompliziert. Der Patient war das zweite Kind konsanguiner, türkischer Eltern und hat einen gesunden älteren Bruder. Eine erste Schwangerschaft endete in der 18. SSW, es liegen jedoch keine klinischen Angaben dazu vor. Der Patient zeigte den klassischen Phänotyp des upd(14)pat-Syndroms mit einem kleinen, glockenförmigen Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen, einem charakteristischen fazialen Phänotyp mit Retromikrognathie, vollen Wangen und einem vorstehenden Philtrum. Es bestanden eine ausgeprägte Muskelhypotonie, Fütterungs- und Atmungsschwierigkeiten. Außerdem bestand eine Leistenhernie, die operativ versorgt wurde.

Seine ebenfalls betroffene Schwester (Patientin 3) wurde auch in der 35. SSW geboren. Sie wog 2800 g (+1,1 SD) bei einer Größe von 45 cm (-1,1 SD). Sie zeigte die gleichen phänotypischen Merkmale des upd(14)pat-Syndroms wie ihr Bruder, jedoch meist in etwas milderer Form. Es lagen eine Nabelhernie sowie eine Rektusdiastase vor.

Die Mutter zeigte keine phänotypischen Auffälligkeiten. Klinische Angaben aus Beygo et al. 2014.

Weiterhin wurde uns freundlicherweise eine DNA-Probe einer bereits publizierten Patientin mit upd(14)pat-Syndrom und klassischen phänotypischen Merkmalen aufgrund einer 4,3 kb großen Deletion von Andrew Green (National Centre for Medical Genetics, Our Lady's Hospital, Crumlin, Dublin, and School of Medicine and Medical Science University College Dublin, Ireland) für Kontrolluntersuchungen zur Verfügung gestellt (Kagami et al. 2010).

2.1.6.6 Normalkontrollen

Blutproben von gesunden, anonymen Blutspendern wurden vom Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen (Dr. Holtmann, Prof. Horn) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von DNA aus peripherem Blut erfolgte mittels FlexiGene-Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 3 ml EDTA-Blut mit 7,5 ml FG1-Puffer durch mehrmaliges (5x) invertieren vermischt. Die Zellkerne wurden 5 min bei 200 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,5 ml mit Proteinase K versetztem FG2-Puffer homogenisiert und die Lösung invertiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 65 °C im Wasserbad wurde die DNA durch Zugabe von 1,5 ml 100%igem Isopropanol gefällt und durch mehrmaliges Invertieren präzipitiert. Der Ansatz wurde für 3 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation von 3 min bei 2000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 min an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 300 µl FG3-Puffer wurde die DNA zum Lösen für 1 h bei 65 °C im Thermomixer (850 rpm) inkubiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Taumel-Rollermischer gelöst.

2.2.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus peripherem Blut erfolgte mittels QIAamp RNA Blood-Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Zu einem Volumen Blut (1,5 ml) wurde das 5-fache Volumen Erythrozyten-Lyse Puffer (EL-Puffer; 7,5 ml) gegeben, 10 - 15 min auf Eis inkubiert und währenddessen zweimal kurz mittels Vortex gemischt. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 400 g und 4 °C, um die Lymphozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und zwei Volumen (3 ml) EL-Puffer hinzugegeben. Die Zellen wurden mittels Vortex gelöst und anschließend erneut für 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µl mit β -Mercapthoethanol versetztem RLT-Puffer gelöst. Der Ansatz wurde in eine QiaShredder-Säule überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und ein Volumen (600 µl) RLT-Puffer zu den lysierten Lymphozyten gegeben. Der Ansatz wurde auf eine QIAamp RNA Säule übertragen und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert (Waschschritt), bevor die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer erneut für 15 s bei 8000 g zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und ein DNaseI-Verdau auf der Säule durchgeführt, um möglicherweise

verbliebene DNA zu entfernen. Dazu wurde das RNase-Free DNase Set (Qiagen) verwendet. Zu 70 µl RDD-Puffer wurden 10 µl DNaseI (3 U) gegeben, mit der Pipette gemischt und auf die Säule mit der gebundenen RNA pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit 350 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer (jeweils Zentrifugation für 15 s bei 8000 g). Danach wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Nach Verwurf des Durchflusses wurde für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um möglicherweise verbliebene Spuren von Ethanol zu entfernen. Die RNA wurde in 30 - 50 µl RNase-freiem H₂O eluiert (1 min, 8000 g) und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop[®] ND-1000 bzw. ND-2000 UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht bei DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA von 40 µg/ml. Als Grad für die Reinheit wird der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt, der bei reiner DNA ca. 1,8, bei reiner RNA ca. 1,8 bis 2,1 betragen sollte.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus genomischer DNA, cDNA und Bisulfit-behandelter DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. 1986. Standardmäßig wurde für die Amplifikation von DNA die AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Roche) verwendet. Ein Ansatz von in der Regel 25 µl Endvolumen enthielt 1 x Polymerasepuffer, 150 µM dNTPs, 3 mM MgCl₂ (Magnesiumchlorid), jeweils 0,4 µM F- und R-Primer und 1 U Polymerase mit 50 - 100 ng DNA. Bei der PCR-Reaktion selbst erfolgten meist 35 Zyklen mit einer Denaturierung von 20 s bei 95 °C, einer Annealingphase von 20 s bei einer primerspezifischen Temperatur in Abhängigkeit von der T_m sowie einer Elongation von 30 s bei 72 °C. Dabei wurde die Dauer der Elongation der Größe des PCR-Produktes angepasst. Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine Polymerase-spezifische Aktivierung bei 95 °C, die bei der AmpliTaq Gold 10 min betrug. Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Elongationsphase von 4 min bei ebenfalls 72 °C durchgeführt. In einigen

Fällen wurde das *Touchdown*-PCR Programm, modifiziert nach Zeschnigk et al. 2009, verwendet. Dabei werden nach der Aktivierung der Polymerase bei 95 °C zunächst 14 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, dann 20 s mit einer pro Zyklus um 0,5 °C erniedrigten Annealingtemperatur durchgeführt, um die Spezifität des Produktes zu erhöhen, gefolgt von der Elongation mit 30 s bei 72 °C. Im Anschluss folgten in der Regel 35 Zyklen mit dem normalen PCR-Programm. Durch die zunächst höhere Annealingtemperatur wird zwar die Quantität der Amplifikation reduziert, jedoch die Spezifität erhöht, so dass am Ende der ersten 14 Zyklen spezifische Amplifikate als weiteres *template* (Matrize) für die PCR vorliegen (Tabelle A1).

Die Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA wurde in der Regel mit dem HotStarTaq Master Mix (Qiagen) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.12.1).

Für longrange PCRs mit Produktgrößen von mehr als 2,5 kb wurde das Expand Long Range dNTPack (Roche) verwendet. Ein Ansatz enthielt 1 x Polymerasepuffer mit MgCl₂, 500 µM dNTPs, jeweils 0,6 mM F- und R-Primer, bis zu 500 ng DNA sowie bei Bedarf 6 % DMSO in einem Endvolumen von 50 µl. Das PCR-Programm wurde wie vom Hersteller beschrieben ausgeführt, wobei die Elongationszeit der Größe des PCR-Produktes angepasst wurde (Tabelle A2 und A3).

2.2.5 Reverse Transkription von RNA

RNA wurde mittels Reverser Transkriptase und *random hexamer* Primern in cDNA umgeschrieben. In den meisten Fällen, vor allem aber, wenn für die Expressionsanalyse keine intron-überspannenden Primer genutzt werden konnten, wurde zunächst ein DNase-Verdau mit dem RQ1 Kit (Promega) durchgeführt. RNA (100 - 1000 ng) wurde in einem 10 µl Ansatz mit 1 x RQ1 Reaktionspuffer und 1 U RQ1 DNase für 30 min bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Stop Solution und Inkubation für 10 min bei 65 °C terminiert. Für die reverse Transkription (RT) wurde das Applied Biosystems[®] GeneAmp[®] RNA PCR Kit (Life Technologies) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Ein Ansatz enthielt 1 x PCR-Puffer, 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 2,5 µM Random-Hexamers, 1 U RNase Inhibitor, 2,5 U Reverse Transkriptase und 100 - 1000 ng RNA in einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion erfolgte durch 10 min Annealing bei 21 °C, 15 min reverser Transkription bei 42 °C und einer abschließenden Denaturierung bei 99 °C für 5 min. Standardmäßig wurden Kontrollreaktionen mit RNA aber

ohne Reverse Transkriptase mitgeführt, um eine DNA-Kontamination der RNA-Probe auszuschließen, sowie Kontrollreaktionen mit Reverser Transkriptase jedoch ohne RNA, um auch eine Kontamination der RT-PCR-Reagenzien auszuschließen.

Die so generierte cDNA wurde genutzt, um spezifische Produkte mittels PCR (siehe Kapitel 2.2.4) amplifizieren zu können, wozu jeweils 10 µl des RT-Ansatzes in die entsprechende PCR überführt wurden. Um auch bei diesem Schritt mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde zusätzlich bei jeder PCR eine Region des *housekeeping* Gens *ACTB* (β -Aktin) mit Intron-überspannenden Primern amplifiziert. Die Produkte dieser Primer auf DNA- und RNA-Ebene unterscheiden sich um ca. 100 bp (Buiting et al. 2001).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 1 - 2%igen Mini-Gelen mit 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde 0,4 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zu Gelen und Laufpuffer gegeben. Da EtBr mit der DNA interkaliert und unter UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) angeregt wird, kann so die DNA auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurden DNA-Längenstandards mitgeführt (siehe Kapitel 2.1.3). Die DNA-Proben wurden mit 1 x Ladepuffer (Thermo Scientific) aufgetragen und die Elektrophorese bei ca. 80 - 120 V in TAE-Laufpuffer durchgeführt.

2.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Elution aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von PCR-Amplifikaten aus Agarose-Gelen wurde für Fragmente bis zu einer Größe von 4 kb das MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen), für größere Fragmente das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit leichten Änderungen verwendet. Die PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe eines Skalpells unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gewogen und mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt, bevor sie für 10 min bei 50 °C und 850 rpm in einem Thermomixer gelöst wurden. Nach Zugabe von einem Volumen 100%igem Isopropanol wurde der Ansatz auf eine QIAquick bzw. MinElute Säule

überführt und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde dann mit 500 µl QG-Puffer (1 min bei 10.000 g) gewaschen, um verbliebene Agarose zu entfernen. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und 2 min inkubiert, um die Reinheit zu erhöhen (1 min bei 10.000 g). Da Ethanol-Rückstände bei nachfolgenden Reaktionen stören könnten, wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und erneut zentrifugiert (1 min bei 10.000 g). Danach noch verbliebene Ethanol-Rückstände wurde vom unteren Rand der Säule abpipettiert und diese für 15 min bei Raumtemperatur offen stehen gelassen. Die Elution der DNA erfolgte in zwei Schritten bei denen jeweils 10 µl (15 µl bei QIAquick) 50 °C warmes H₂O auf die Membran der Säule gegeben, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert wurde.

ExoSAP-IT

Für weitere Analysen von DNA-Fragmenten z.B. mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.8) müssen vor allem freie Nukleotide und Primerdimere aus dem Reaktionsprodukt entfernt werden, da sie die Sequenzreaktion stören würden. Diese Aufreinigung wurde bei den meisten PCR-Produkten mittels USB[®] ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup[®] (Affymetrix) durchgeführt. Dabei wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 2 µl ExoSap-IT Reagenz vermischt und der Ansatz im Thermocycler zunächst für 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch 15 min bei 80 °C gestoppt wurde.

2.2.8 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Didesoxy-Kettenterminations-Methode nach Sanger et al. (1977). Dabei kommt es durch den Einbau von Fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden zu einem Kettenabbruch während der Sequenzreaktionen. Da dieser Abbruch an jeder Stelle des zu sequenzierenden Fragments auftritt, entsteht ein Gemisch von unterschiedlich langen Fragmenten. In einem automatischen Sequenzierer werden diese Fragmente der Länge nach mittels Elektrophorese aufgetrennt und dabei die Fluoreszenz detektiert. Für die Sequenzreaktionen wurde das Applied Biosystems BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) verwendet. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt 0,5 µM F- oder R-Primer, 2 - 4 µl BigDye[®] mit der entsprechenden Menge BigDye[®] Puffer sowie ca. 20 ng DNA oder 2 µl aufgereinigte DNA aus einem ExoSap-IT Ansatz. Für eine Sequenzreaktion wurde folgendes Programm

verwendet: Denaturierung für 1 min bei 96 °C, gefolgt von 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 96 °C, 5 s bei einer primerspezifischen Annealingtemperatur und 4 min Elongation bei 60 °C. Um freie Didesoxynukleotide zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung mittels Sephadex Gelfiltration (GE Healthcare, München) bevor die Produkte mit Formamid versetzt und mit einem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) sequenziert wurden. Die Datenanalyse wurde mit den Programmen Sequencing Analysis (Applied Biosystem) und Geneious (Biomatters) durchgeführt.

2.2.9 Analysen mit dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Zur Untersuchung von Kopienzahlvariationen (*copy number variations*; CNVs) wurden Genome-Wide Human SNP Arrays 6.0 (Affymetrix) genutzt, die im Biochiplabor, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen von Herrn PD Dr. Klein-Hitpaß durchgeführt wurden. Der SNP Array 6.0 beinhaltet über 1,8 Millionen Sonden, von denen jeweils ca. die Hälfte zur Detektion von CNVs (Dosis) bzw. SNPs (*single nucleotide polymorphism*; Genotyp und Dosis) designt wurden.

Für die Durchführung wurde die zu untersuchende DNA zunächst in zwei Ansätze geteilt und mit einer Restriktionsendonuklease (*NspI* bzw. *StyI*) geschnitten. Die so entstandenen Fragmente wurden anschließend an Adaptoren ligiert und mittels PCR amplifiziert. Danach wurden die beiden Ansätze vereint und aufgereinigt, bevor die Amplifikate fragmentiert und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert wurden (*labeling*). Anschließend erfolgte die Hybridisierung auf SNP Array 6.0 Chips. Die Signale wurden mit einem GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) detektiert. Für die nachfolgenden Analysen wurden die Genotyping Console™ Software (GTC v4.1) sowie der GTC Browser (beide Affymetrix) genutzt.

Die Analyse der Patienten-Datensätze erfolgte durch mich unter Verwendung einer Referenzgruppe bestehend aus 40 Datensätzen von Normalkontrollen, die auf dem gleichen System untersucht wurden, um mögliche technische Artefakte zu minimieren. Nach einer ersten Analyse mit der GTC wurden die Datensätze nach Qualitätsstandards gefiltert, um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse möglichst gering zu halten. Die QC (*quality control*) *call rate* gibt dabei an, wieviel Prozent einer bestimmten Gruppe von SNPs (*tag* SNPs) ein Ergebnis erbracht haben. Der *contrast* QC hingegen gibt an, wie gut die Genotypen von SNPs unterscheidbar sind. Der *median of the absolute pairwise differences* (MAPD) ist ein Maß zur Beurteilung des Hintergrundrauschens bei CNV-Analysen. Dazu wird der

Median der \log_2 ratios aller benachbarter Sonden herangezogen. Es wurden die Standardparameter mit QC *call rate* von über 80 %, einem *contrast* QC > 0,4 und einer MAPD von < 0,35 gewählt, sowie zusätzlich eine manuelle Inspektion durchgeführt. Datensätze, die diese Anforderungen nicht erfüllten, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen und die Berechnungen der Daten für CNVs ohne diese Proben wiederholt. Die Daten zum CNV-Overlap basieren auf dem Affymetrix annotation file na32 (veröffentlicht Mitte 2011). Die Positionsangaben basieren auf hg19.

2.2.10 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Zur Bestätigung der mittels SNP Array identifizierten Kopienzahlvariationen und zur Untersuchung des parental Status wurden quantitative *real-time* PCRs (qPCRs) durchgeführt. Dabei werden die generierten PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Amplifikation gemessen und geben so Aufschluss über die Ausgangsmenge der Zielsequenz. Basierend auf den Werten von Normalkontrollen wird ein Standard bestimmt, so dass eine Abweichung hin zu einem geringeren Wert (Deletion) oder einem größeren Wert (Duplikation) beobachtet werden kann. Die spezifischen qPCR Assays (Primer und Sonde) wurden mit dem Universal Probe Library Assay Design Center entworfen (Roche; Tabelle A4). Es wurden Sonden der Universal Probe Library (UPL; Roche) verwendet, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter- und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff tragen. Solange Reporter und Quencher räumlich eng beieinanderliegen, kann die Fluoreszenz nicht detektiert werden, da sie im Absorptionsspektrum des Quenchers liegt. Bei der Amplifikation werden die Farbstoffe von der Sonde gelöst, so dass eine Detektion der Fluoreszenz erfolgen kann. Das detektierbare Fluoreszenz-Signal steigt während der PCR-Zyklen proportional zum generierten PCR-Produkt und das Ergebnis kann in *real time* (Echtzeit) ermittelt werden.

Die qPCRs wurden unter meiner Anleitung von Frau Melanie Heitmann am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Ein Ansatz mit einem Endvolumen von 25 μ l enthielt 1x LightCycler[®] 480 Probes Master Mix (Roche), jeweils 0,36 μ M F- und R-Primer, 0,25 μ M UPL-Sonde und 50 ng DNA.

PCR-Reaktion und Fluoreszenz-Detektion wurden mit dem LightCycler[®] 480 II Real-Time PCR System (Roche) wie folgt durchgeführt: 10 min 95 °C gefolgt von 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C, 1 min bei 60 °C und 30 s bei 37 °C. Die Reaktionen wurden jeweils als Duplikate

bzw. Triplikate durchgeführt. Es wurden bei jedem Assay mindestens zwei Normalkontrollen und ein weiterer Assay wie z.B. *TRPS1* (siehe Tabelle A5) zur Normalisierung mitgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der LightCycler® 480 Software (Roche).

2.2.11 Bisulfit-Konvertierung

Für Methylierungsanalysen wurde DNA zunächst einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen. Dabei werden alle unmethylierten Cytosine an ihrer 4'-Position desaminiert und so in Uracil umgewandelt. Methylierte Cytosine, die in Mammalia hauptsächlich in einem CpG-Kontext vorkommen, sind hingegen durch ihre Methylgruppe an ihrer 5'-Position (5-Methylcytosin) vor dieser Konvertierung geschützt. Bei einer nachfolgenden Amplifikation der Bisulfit-konvertierten DNA mittels PCR wird Uracil durch Thymin ersetzt, so dass zwischen methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden unterschieden werden kann.

Für die Bisulfit-Konvertierung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Zuerst wurden 2 µg DNA in 50 µl H₂O gelöst. Diese wurde dann durch Zugabe von 5,5 µl 3 M NaOH und einer Inkubation von 15 min bei 37 °C, gefolgt von 2 min bei 95 °C und anschließender sofortiger Lagerung auf Eis denaturiert. Für die Bisulfit-Lösung wurden zunächst 8,5 g Natrium-Bisulfit in 15 ml H₂O gelöst und nach Zugabe von 0,9 ml 50 mM Hydrochinon und 1 ml 10 N NaOH (pH 5,0 - 5,3) auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Von der Bisulfit-Lösung wurden jeweils 500 µl zu den Proben gegeben und diese über Nacht bei 50 °C im Dunkeln inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers. Zur so aufgereinigten, Bisulfit-konvertierten DNA wurden 5,5 µl 3 M NaOH gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 55 µl 6 M NH₄OAc, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 350 µl 100%iges Ethanol hinzugefügt und der Ansatz 20 min bei 16.000 g zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Des Weiteren wurde das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers genutzt. Dafür wurden zunächst zum CT Conversion Reagent Konzentrat 900 µl H₂O, 300 µl M-Dilution Puffer und 50 µl M-Dissolving Puffer hinzugegeben und 10 min auf einem Taumel-Rollermischer gelöst. Anschließend wurden 500 ng DNA in 20 µl H₂O gelöst, mit 130 µl des CT Conversion Reagent vermischt, in einem Heizblock für 10 min bei 98 °C denaturiert und anschließend für 2,5 h bei 64 °C inkubiert. Auf eine Zymo-Spin IC

Säule wurden zunächst 600 µl des M-Binding Puffers aufgebracht und anschließend die Probe dazugegeben und vermischt. Nach 30sekündiger Zentrifugation (10.000 g) wurde die Säule mit 100 µl M-Wash Puffer gewaschen (30 s bei maximaler Geschwindigkeit). Nach Zugabe von 200 µl M-Desulphonation Puffer und einer 15 - 20minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine erneute Zentrifugation für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 200 µl M-Wash Puffer und anschließender Zentrifugation (30 s bei maximaler Geschwindigkeit) wurde die Bisulfit-konvertierte DNA in 10 µl M-Elution Puffer eluiert und danach bei -20 °C gelagert.

2.2.12 Methylierungsanalysen

Für Methylierungsanalysen wurde die hochquantitative Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung (*deep bisulfite sequencing*) auf dem Roche/454 Genome sequencer (GS) Junior etabliert.

2.2.12.1 Präparation von *Amplicon libraries* für den Roche/454 GS Junior

Für die Herstellung der *Amplicon libraries* wurde ein zweistufiges Protokoll etabliert. Im ersten Schritt wurde eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt, die an ihrem jeweiligen 5'-Ende eine universelle *tag*-Sequenz aufwiesen (Tabelle A1, A6 und A7). Im zweiten Schritt wurden - ebenfalls mittels PCR - Proben-spezifische Barcode-Sequenzen (MIDs, *multiplex identifiers*, siehe Tabelle A7), eine 4 bp lange *Key*-Sequenz sowie A- bzw. B-Primer angefügt. Diese Primer werden für die klonale Amplifikation der Sequenzen in der Emulsions-PCR (emPCR) benötigt, während die *Key*-Sequenz später für Filter-Schritte bei der Datenanalyse genutzt wird.

Für beide PCRs wurde das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) genutzt. Ein Ansatz der ersten PCR mit einem Endvolumen von 25 µl enthielt 1 x HotStarTaq Master Mix, jeweils 0,2 µM F- bzw. R-Primer und 1 µl Bisulfit-konvertierte DNA. Nach einer Aktivierungszeit von 15 min bei 95 °C im Thermocycler folgten meist 40 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95°C, 45 s bei einer primerspezifischen Annealingtemperatur und 45 s Elongation bei 72 °C gefolgt von einer finalen Elongation von 10 min bei 72 °C. Nach einem Qualitätstest mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.6) folgte die zweite PCR (Re-PCR) mit 1 x HotStarTaq Master Mix, jeweils 0,2 µM F- bzw. R-Primer und 3 µl PCR-Produkt in einem 50 µl Ansatz. Die Amplifikation erfolgte mittels *2-step* Protokoll: nach 15 min Aktivierung bei 95 °C

folgten meist 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C und 1 min Elongation bei 72 °C mit anschließender finaler Elongation von 10 min bei 72 °C.

Auch Produkte dieser zweiten PCR wurden mittels Gelelektrophorese z.B. im Hinblick auf Primer-Dimere und Spezifität überprüft und gegebenenfalls mittels Gelelution (siehe Kapitel 2.2.7) aufgereinigt.

2.2.12.2 Aufreinigung der *Amplicon libraries* und Sequenzier-Lauf auf dem Roche/454 GS Junior

Jeweils 22,5 µl PCR-Produkt bzw. das Gesamtvolumen einer Gelelution wurden mit H₂O auf ein Endvolumen von 45 µl gebracht. Die weitere Probenvorbereitung sowie der Sequenzier-Lauf auf dem Roche/454 GS Junior wurden von Frau Melanie Heitmann am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Die *Amplicon libraries* wurden mittels Agencourt[®] AMPure[®] XP System (Beckman Coulter) entsprechend den Empfehlungen von Roche (Roche Amplicon Library Preparation Method Manual) aufgereinigt und im Anschluss mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (ThermoScientific) quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.3). Die *Amplicon libraries* wurden verdünnt und *gepoolt*, bevor sie in einer Emulsions-PCR klonal amplifiziert wurden. Dabei bilden die Tropfen der Emulsion einzelne Reaktionsräume. In diesen befindet sich jeweils ein DNA *capture bead*, an den A- bzw. B-Primersequenzen gebunden sind, sowie eine Sequenz aus der gepoolten *Amplicon library*. Diese wird innerhalb dieses Tropfens über die A- und B-Primer an den *bead* gebunden und klonal amplifiziert. Anschließend wird die Emulsion aufgebrochen und die *beads* mit den gebundenen Produkten, die als *single strand* vorliegen, aufgereinigt. Die *beads* werden auf eine PicoTiter Platte aufgebracht, wobei jeweils nur ein *bead pro well* ‚Platz findet‘, so dass Kontaminationen verhindert werden. Bei der anschließenden Sequenzierung auf der Roche/454 GS Junior Plattform werden sogenannte *flows* durchgeführt, d.h. Lösungen mit den vier fluoreszenzmarkierten Basen werden über die *wells* gespült. Wird eine Base eingebaut, kommt es zu einem Signal, das für jedes *well* detektiert und dann über *flowgrams* zu den entsprechenden Sequenzen umgerechnet wird.

Die emPCR und die anschließende Sequenzierung wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Roche emPCR Amplification Method Manual - Lib-A und Roche Sequencing Method Manual).

2.2.12.3 Datenauswertung der Methylierungsanalysen

Da Bisulfit-Sequenzen durch die Unterrepräsentation der Base Cytosin zur Bildung von (Thymin-) Homopolymeren neigen, welche häufiger zu Sequenzfehlern führen und damit die Qualitätswerte der Einzelsequenzen herabsetzen, wurden die Filterparameter angepasst (Beygo et al. 2013b).

Für die Auswertung der Daten erfolgte zunächst eine Trennung der Sequenzen nach MID mit dem Programm Geneious (Biomatters, Auckland, Neuseeland). Die Methylierungsanalyse erfolgte mit dem BiQAnalyzer (Lutsik et al. 2011) mit leicht geänderten Standardeinstellungen: *minimal conversion rate* 0,8 und *maximal fraction of unrecognised sites* 0,1. Die Einstellungen bewirken, dass Sequenzen mit einer Konvertierungsrate unter 0,8 (< 80 %) sowie Sequenzen, die eine Sequenzidentität von weniger als 90 % (> 10 % Fehler oder Lücken - *gaps*) aufweisen, ausgefiltert werden, um die Qualität der Ergebnisse zu verbessern.

Außerdem wurden Methylierungsanalysen mit der im Instiut für Genominformatik (Sven Rahmann, Universitätsklinikum Essen) entwickelten Amplikyzer-Software auf Grundlage der .sff Dateien des Roche/454 GS Juniors mit Standardeinstellungen durchgeführt (Rahmann et al. 2013).

2.2.13 Pseudoprobandenansatz

Der Pseudoprobanden- oder Permutationsansatz wurde herangezogen, um zu zeigen, dass sich die Methylierung im Patienten signifikant von der Methylierung der Kontrollen unterscheidet und dass dies unabhängig ist von den gewählten Kontrollen. Weiterhin konnte so der Grad der aberranten Methylierung ermittelt werden.

Da beim Patienten eine Doppelbestimmung der Methylierung auf dem 27k Array (Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip; Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel; BMBF Netzwerk Imprinting-Erkrankungen) vorgenommen wurde, um technische Störfaktoren zu minimieren, wurden diese Daten zunächst gemittelt. Anschließend wurde für jedes auf dem 27k Array untersuchten CpG-Dinukleotid die beim Patienten ermittelte Methylierung mit der durchschnittlichen Methylierung von 18 nicht verwandten Normalkontrollen verglichen. CpGs die einen Unterschied von $\geq 0,3$ β -Werten aufwiesen, wurden als aberrant methyliert eingestuft. Dieser Schwellenwert wurde nach manueller Inspektion der Methylierungswerte

geimprinteter Gene bei den Normalkontrollen gewählt und möglichst strikt gefasst, um die Zahl falsch-positiver Ergebnisse gering zu halten.

Danach wurde der Patient als Teil des Normalkontrollenkollektivs betrachtet und an seiner Stelle eine Normalkontrolle als Patient eingestuft und den Normalkontrollen gegenübergestellt (Permutation). Dafür wurde der Durchschnitt des nun definierten Normalkontrollenkollektivs (Patient und 17 Normalkontrollen) neu berechnet und dann für alle CpGs der Vergleich der Methylierung durchgeführt. Dies wurde für alle 18 Normalkontrollen wiederholt.

Zusätzlich wurde der Pseudoprobandenansatz unter Hinzunahme der Eltern des Patienten wiederholt, um auch bei ihnen eine Methylierungsstörung auszuschließen. Dabei wurden zunächst ebenfalls die Werte der Doppelbestimmungen der 27k Arrays gemittelt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle A11 aufgelistet. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Daten nach Abschluß der Berechnung aufsteigend nach dem Methylierungsgrad des Patienten sortiert.

Weiterhin wurde der empirische p-Wert für Monte-Carlo-Prozeduren berechnet, um auszuschließen, dass die Anzahl der beim Patienten aberrant methylierten CpGs zufällig entstanden sein könnte (Davison und Hinkley 1997; North et al. 2002). Dabei entspricht der empirische p-Wert einer Beobachtung (p_{emp}) der Anzahl der Permutationen, die einen Wert größer oder gleich dem tatsächlich beobachteten Wert (r), dividiert durch die Anzahl der durchgeführten Permutationen (n), aufweisen ($p_{\text{emp}} = r/n$). Unter Berücksichtigung einer Korrektur für kleine Werte für r wird der empirische p-Wert wie folgt berechnet: $p_{\text{emp}} = (r+1) / (n+1)$. Da keine der untersuchten Normalkontrollen mehr CpGs mit aberranter Methylierung zeigte als die 87 CpGs beim Patienten folgt daraus: $p_{\text{emp}} = (0+1) / (19+1) = 0,05$ (Beygo et al. 2013b).

Das obere Limit des 95%-Konfidenzintervalls wurde wie bei Clopper und Pearson beschrieben berechnet (Clopper und Pearson 1934; persönliche Kommunikation Dr. André Scherag).

Durchschnittswerte und Standardabweichungen (SD) wurden nach Standardverfahren berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Genomweite Suche nach *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren mittels SNP-Arrays in PWS- und AS-Patienten mit einem Imprintingdefekt

Zu den molekularen Ursachen des Prader-Willi- (PWS) bzw. Angelman-Syndroms (AS) zählen unter anderem Imprintingdefekte (IDs) der Region 15q11q13. Diese werden in primäre IDs, bei denen Methylierungsveränderungen ohne zugrunde liegende Sequenzveränderungen auftreten und sekundäre IDs, bei denen die Methylierungsveränderungen sekundär z.B. durch Deletionen des Imprintingcenters (IC) hervorgerufen werden, unterschieden. Beim AS aufgrund eines primären IDs trägt das maternale Allel den unmethylierten paternalen Imprint, während bei PWS das paternale Allel den methylierten maternalen Imprint trägt. Interessanterweise liegt die Methylierungsstörung bei AS recht häufig im Mosaik vor, was auf einen Fehler in der postzygoten Aufrechterhaltung der Methylierung hinweist, während bei PWS nur sehr wenige Fälle im Mosaik beschrieben sind. Liegt der Methylierungsfehler nicht im Mosaik vor, weist dies auf einen Fehler in der Auslöschung oder der Etablierung des Imprints in der Keimbahn hin. Wodurch solche Fehler entstehen konnte bislang nicht geklärt werden. Um mögliche *cis*- und/oder *trans*-agierende Faktoren zu identifizieren, die bei der Ätiologie von IDs eine Rolle spielen könnten, wurden 46 PWS-Patienten mit ID und 62 AS-Patienten mit ID - davon 27 mit ID im Mosaik - mittels Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 untersucht (siehe Tabelle 3). Dieser Array ermöglicht die Detektion von Kopienzahlvariationen basierend auf über 1,8 Millionen Sonden, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen.

Tabelle 3: Übersicht der mittels Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 analysierten Proben

		AS-ID	PWS-ID	Interne Kontrollen
Gesamt		62	46	40
davon ID im Mosaik		27	1	-
Geschlecht	weiblich	29	21	20
	männlich	33	25	20
Ø QC call rate		95,62	96,44	96,15
Ø contrast QC		1,92	1,94	2,11
Ø MAPD		0,21	0,22	0,20

QC *call rate*, *contrast QC* und MAPD sind Qualitätsparameter (siehe Kapitel 2.2.9).

ID - Imprintingdefekt; QC - Quality control; MAPD - *median of the absolute pairwise differences*.

Innerhalb der PWS/AS-kritischen Region auf Chromosom 15q11q13 wurde nach Kopienzahlveränderungen (CNVs) mit einer Größe von mindestens 5 kb und einer minimalen Anzahl von 10 Markern gesucht. Außerdem wurden alle CNVs berücksichtigt, die bis zu 50 % mit bereits bekannten CNVs überlappen. Der hohe Grad an Überlappung wurde in diesem Fall gewählt, um auch solche Varianten detektieren zu können, die neben Regionen mit bekannten CNVs auch benachbarte *cis*-regulatorische Elemente betreffen könnten. Bei keinem der untersuchten Patienten konnten Deletionen oder Duplikationen beobachtet werden, die das IC oder Gene zwischen *MKRN3* und *ATP10A* betreffen. Eine Ausdehnung der Analyse auf das gesamte Chromosom 15 wurde für CNVs größer 20 kb jedoch ebenfalls mit mindestens 10 Markern und einer Überlappung mit bekannten CNVs von bis zu 10 % durchgeführt, da hier die Wahrscheinlichkeit von unmittelbar *cis*-agierenden Faktoren geringer ist. Bei dieser Analyse konnten 17 CNVs beobachtet werden. Nur zwei dieser CNVs waren größer als 100 kb und wurden später näher untersucht (Tabelle A8). Die Größe von 100 kb wurde dabei als Grenze herangezogen, da sie als Standardparameter in der Diagnostik gilt (Buysse et al. 2009; Gijsbers et al. 2011). Zwei der 17 CNVs entfallen auf zwei verschiedene AS-Patienten, während die anderen 15 CNVs bei nur fünf PWS-Patienten beobachtet werden konnten. Letztere sind daher vermutlich mehrheitlich eher auf falsch-positive CNVs als auf echte Variationen zurückzuführen. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass Qualitätsunterschiede bzw. -defizite bei so geringen Größen der Varianten mehr ins Gewicht fallen. Zwei CNVs auf 15q15.1 mit der minimal erforderlichen Größe von 20 kb überlappen komplett, zwei CNVs auf 15q22.2 nur zum Teil. Letztere betreffen kein Gen und werden somit als nicht relevant erachtet. Für die CNVs auf 15q15.1 sind mittlerweile mehrere Varianten bekannt (*database of genomic variants*, DGV; <http://projects.tcag.ca/variation>) und werden somit ebenfalls als nicht relevant erachtet.

Um *trans*-agierende Faktoren zu identifizieren, wurden die Analysen auf alle Chromosomen – mit Ausnahme der Gonosomen (X- und Y-Chromosom) – ausgedehnt. Dabei wurden CNVs mit einer Größe von mehr als 100 kb und mehr als 10 Markern berücksichtigt, die mit bekannten CNVs zu 10 % oder weniger überlappten. Diese Analyse erbrachte 33 CNVs, davon 20 bei AS- und 13 bei PWS-Patienten (Tabelle 4 und Tabelle A9). Die 33 CNVs wurden manuell zunächst auf die in diesen Regionen vorhandenen Gene überprüft. CNVs in sogenannten Genwüsten, also Regionen ohne in der Referenzsequenz-Datenbank (RefSeq) verzeichnete Gene, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Weiterhin wurden CNVs

ausgeschlossen, für die mittlerweile größtenteils überlappende Varianten in der *database of genomic variants* veröffentlicht wurden (Stand: November/Dezember 2011; Tabelle 4 und Tabelle A4). Auch hier waren, mit Ausnahme einer Duplikation auf Chromosom 12q24, keine rekurrenten CNVs zu beobachten.

Tabelle 4: Übersicht der CNVs > 100 kb

	CNVs	Genwüsten	neue Varianten	qPCR	bestätigt
Gesamt	33	7	7	14	11
AS	20	2	4	11	9
davon Deletionen	7	2	1	2	2*
davon Duplikationen	13	0	3	9	7
PWS	13	5	3	3	2
davon Deletionen	5	2	1	1	1
davon Duplikationen	8	3	2	2	1

Die Tabelle gibt die CNVs mit einer Größe über 100 kb und einer Überlappung mit bekannten CNVs von weniger als 10 % wieder.

* Beide Deletionen *de novo* im gleichen Patienten.

Insgesamt wurden 14 CNVs mittels quantitativer PCR (qPCR) untersucht, von denen elf (drei Deletionen und acht Duplikationen) verifiziert und auf ihren Erbgang hin untersucht werden konnten (Tabelle A10). Eine der Deletionen und alle acht Duplikationen waren entweder paternal oder maternal ererbt und wurden daher als nicht pathogen erachtet. Die Duplikation auf Chromosom 12q24 konnte bei einem der beiden Patienten bestätigt werden und ist maternal ererbt. Mittlerweile ist sie als bekannte Variante in der DGV verzeichnet. Zwei Deletionen waren bei den Eltern nicht nachzuweisen und damit beim Patienten als *de novo* anzusehen, auch wenn ein Keimbahnmosaik bei den Eltern nicht auszuschließen ist. Interessanterweise traten beide *de novo* CNVs im gleichen AS-Patienten auf. Bei keinem der 33 CNVs konnten jedoch Gene identifiziert werden, die mit Imprinting, Methylierung oder anderen Modifikationen der DNA in Verbindung gebracht werden konnten (Tabelle A4).

3.2 Suche nach neuen geimprinteten Genen

Methylierungsveränderungen an mehreren geimprinteten Loci wurden oft im Zusammenhang mit Mutationen in sogenannten *maternal effect* Genen bei den Müttern beschrieben (siehe Kapitel 1.1.3). Eines dieser Gene ist *NLRP7*, bei dem Mutationen in der Mehrheit der Fälle zu rekurrenten, biparentalen Molschwangerschaften führen. Dabei kommt es nur zur Entwicklung eines Trophoblasten, jedoch keines bzw. kaum embryonalen Gewebes. Nur in sehr seltenen Fällen werden Kinder lebend geboren. Wir hatten die Gelegenheit das einzig lebend geborene Kind einer Mutter mit einer heterozygoten Mutation in *NLRP7* (p.A719V) im Hinblick auf Methylierungsveränderungen zu untersuchen. Dieser Patient zeigte an allen getesteten geimprinteten Loci eine Methylierungsauffälligkeit (Caliebe et al. 2014). Weiterführende Methylierungsuntersuchungen an DNA aus Blut des Patienten sowie seiner Eltern und 18 Normalkontrollen wurden mittels Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip (27k Array) am Institut für Humangenetik in Kiel durchgeführt (GEO accession number GSE47879). Die Ergebnisse bestätigten die Methylierungsauffälligkeiten im Patienten an geimprinteten Loci und zeigten weitere Abweichungen an Loci die, soweit bislang bekannt, nicht dem Imprinting unterliegen. Diese Daten führten zur Identifizierung

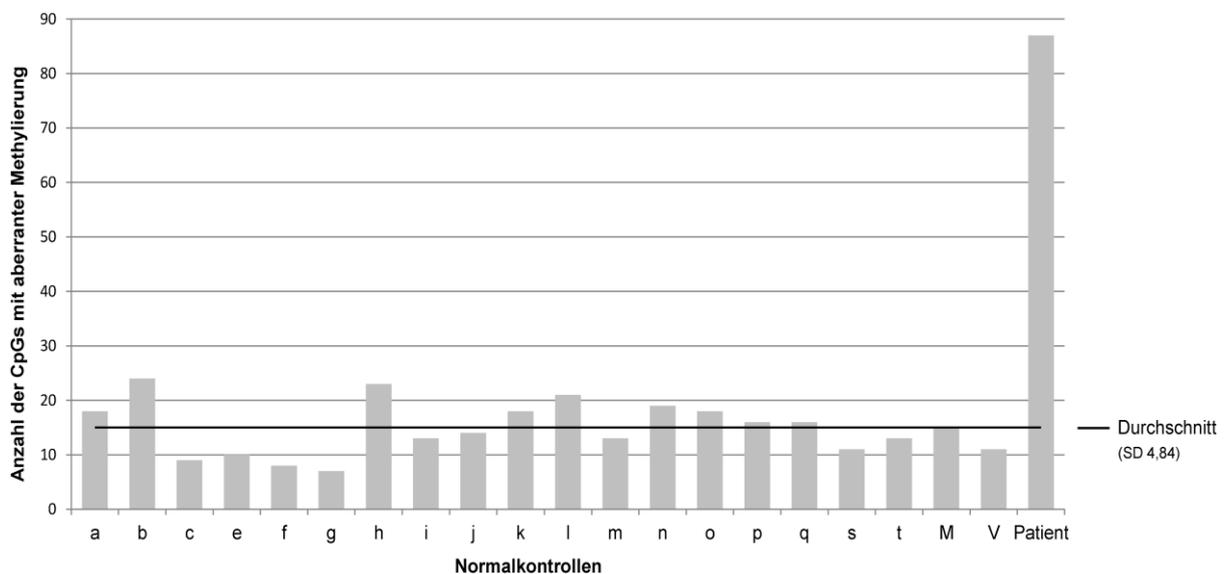


Abbildung 7: Pseudoprobandenansatz

Das Diagramm zeigt die Anzahl der CpG-Dinukleotide, die bei den Normalkontrollen (a - c, e - q, s - t), den Eltern des Patienten (M – Mutter; V – Vater) und beim Patienten selbst im Zuge des Pseudoprobanden-/Permutationsansatzes eine Methylierungsveränderung von $\geq 0,3$ β -Werten zeigten. Die durchschnittliche Anzahl der CpGs mit Methylierungsveränderung betrug ~ 15 CpGs mit einer SD von 4,84 (bei Exklusion des Patienten). Der Patient selbst wich 14,92 SD von diesem Durchschnitt ab. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

eines neuen geimprinteten Gens – *RBI* (Kanber et al. 2009). Um weitere bisher unbekannte Gene, die dem Imprinting unterliegen, zu identifizieren wurde zunächst der Grad der Methylierungsstörung im Patienten anhand der Daten des 27k Arrays ermittelt, wozu ein Pseudoprobanden-/Permutationsansatz verwendet wurde. Im Anschluss daran wurde die Methylierung von ausgewählten Kandidatengenen mittels hochquantitativer Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung analysiert und im Hinblick auf allelspezifische Methylierung untersucht.

Der Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip untersucht die Methylierung an über 27.000 einzelnen CpG-Dinukleotiden, die über das gesamte Genom verteilt liegen. Die Ermittlung des Grads der Methylierung erfolgt dabei über die Hybridisierung von Sonden für methylierte oder unmethylierte CpGs, was durch unterschiedlich fluoreszierende Lichtsignale detektiert wird. Der Grad der Methylierung wird als β -Wert dargestellt, der als Quotient von methyliertem Signal zum Gesamtsignal, welches sich aus methyliertem und unmethyliertem Signal zusammensetzt, wiedergegeben wird (Bibikova et al. 2009). Die Skala reicht von 0,0 für komplett unmethyliert bis 1,0 für komplett methyliert.

Beim Pseudoprobanden-/Permutationsansatz wurden, basierend auf den Rohdaten des 27k Arrays, zunächst die Methylierungsraten des Patienten (Durchschnittswerte zweier technischer Replikate) mit den durchschnittlichen Methylierungsraten der 18 Normalkontrollen verglichen. CpGs, die einen Unterschied von $\geq 0,3$ β -Werten aufwiesen, wurden als aberrant methyliert betrachtet. Um mögliche Störfaktoren der Methylierung aufgrund von Assoziationen mit X-Inaktivierung zu vermeiden, wurden alle auf den Gonosomen lokalisierten Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Beim Patienten zeigten 131 CpGs eine Methylierung über dem festgesetzten Grenzwert von $\geq 0,3$ β -Werten. Von diesen CpGs waren 44 mit bekannten geimprinteten Genen assoziiert (basierend auf den Daten von <http://www.geneimprint.com> und <http://igc.otago.ac.nz>; Stand Februar 2011). Die anderen 87 CpGs waren mit 85 Genen assoziiert, von denen bislang nicht bekannt ist, ob sie dem Imprinting unterliegen (Abbildung 7 und Tabelle A11). Im Gegensatz zu den 87 CpGs beim Patienten zeigte sich bei den Normalkontrollen im Durchschnitt nur bei ca. 15 CpGs eine abweichende Methylierung mit einer Standardabweichung (SD) von 4,84. Die Eltern des Patienten lagen mit 15 (Mutter) bzw. 11 CpGs (Vater) mit abweichender Methylierung im Normalbereich. Die 87 CpGs mit aberranter Methylierung im Patienten entsprechen einer Abweichung vom Durchschnitt um 14,92 SD, was das Vorhandensein einer Multilocus-

Methylierungsstörung im Patienten bestätigt. Der empirische p-Wert beträgt 0,05 und das obere Limit des 95%-Konfidenzintervalls 0,176 (siehe Kapitel 2.2.13).

Nach einer Literaturrecherche (Stand Februar 2011) wurden insgesamt elf der 85 Gene mit einer Methylierungsauffälligkeit im Patienten zur genaueren Untersuchung mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior System ausgewählt. Bei zehn dieser Gene zeigte der Patient im Vergleich zu den Normalkontrollen eine Hypomethylierung, bei einem eine Hypermethylierung. Um die Methylierung auf Allelspezifität hin untersuchen zu können, wurden nur Gene ausgewählt, bei denen sowohl das auf dem 27k Array untersuchte CpG als auch ein in Normalkontrollen informativer SNP im Amplicon enthalten waren. Bei sieben der elf hier untersuchten Kandidatengene lag die durchschnittliche Methylierung der Normalkontrollen zwischen $\sim 0,4$ und $0,6$ β -Werten, was den Erwartungen für einen geimprinteten Locus entspricht. Da je nach Lage der auf dem 27k Array untersuchten CpGs im Bezug zu bekannten DMRs auch eine höhere Methylierung bei den Normalkontrollen beobachtet werden konnte, wurden auch drei Gene mit einer Methylierung um $0,7$ β -Werten untersucht (*ACTN3*, *ECEL1* und *GAL3ST1*; Tabelle 3). Weitere acht Kandidatengene wurden von Frau Daniela Gritzan im Zuge ihrer medizinischen Dissertation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen untersucht. Diese Daten werden in ihrer medizinischen Dissertation bzw. sind in Beygo et al. 2013b beschrieben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der näher untersuchten Kandidatengene bei ausgewählten Beispielen vorgestellt. Die Daten sind in Tabelle 6 und 7 sowie in Beygo et al. 2013b zusammengefasst. Allgemein wurde bei den Normalkontrollen und dem Patienten der Methylierungsstatus in peripherem Blut untersucht. Die Methylierungswerte der Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung geben immer den Durchschnittswert über alle analysierten CpG-Dinukleotide und Einzelsequenzen wieder. Die Methylierungswerte der einzelnen CpGs können dabei variieren.

Um mögliche geschlechterspezifische Unterschiede in der Methylierung detektieren zu können, wurden die Normalkontrollen so ausgewählt, dass – soweit möglich – bei jedem Kandidatengenen jeweils eine weibliche und eine männliche Normalkontrolle untersucht werden konnte.

Tabelle 5: Liste der mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersuchten Gene

Untersuchte Gene	CpG (27k array ID)	CpG Island	Patient zeigt
<i>ACTN3</i>	cg08012287	nein	Hypomethylierung
<i>CCDC19</i>	cg02849695	CpGs 4 - 27	Hypomethylierung
<i>CHP2 (LOC63928)</i>	cg21745164	nein	Hypomethylierung
<i>ECEL1</i> [#]	cg25431974 und cg02932167	ja	Hypomethylierung
<i>FAM50B</i> [*]	cg01570885	ja	Hypomethylierung
<i>GAL3ST1</i>	cg09022808	nein	Hypomethylierung
<i>HOXB6</i>	cg16848873	nein	Hypomethylierung
<i>POU3F1</i>	cg17791651	ja	Hypomethylierung
<i>TRPC3</i>	cg18474934	ja	Hypomethylierung
<i>TSPO (BZRP)</i>	cg00343092	ja	Hypermethylierung
<i>ZNF710</i>	cg01185080	ja	Hypomethylierung

Die Tabelle fasst die Daten der auf dem 27k Array untersuchten CpGs zusammen und gibt die ID der CpGs sowie die Methylierung des Patienten im Vergleich zu den Normalkontrollen an. Weiterhin ist angegeben in wie weit die untersuchten Amplicons innerhalb eines vorhandenen CpG Islands liegen (UCSC Browser, hg18).

[#] Zwei CpGs zeigten eine auffällige Methylierung; ^{*} *FAM50B* wurde als dem Imprinting unterliegend beschrieben (Zhang et al. 2011a; Nakabayashi et al. 2011).

Weitere acht Gene wurden von Frau Daniela Gritzan im Zuge ihrer medizinischen Dissertation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen untersucht (siehe Beygo et al. 2013b).

FAM50B

Eines der elf ausgewählten Kandidatengene – *FAM50B* (*family with sequence similarity 50, member B*) – wurde aufgrund einer computergestützten Analyse als dem Imprinting unterliegend vorhergesagt (Luedi et al. 2007). Während meiner Arbeit konnten Zhang et al. und Nakabayashi et al. zeigen, dass *FAM50B* in mehreren Geweben auf dem maternalen Allel methyliert und damit inaktiviert ist und nur vom unmethylierten paternalen Allel exprimiert wird und somit dem Imprinting unterliegt (Zhang et al. 2011a; Nakabayashi et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus von *FAM50B* in peripherem Blut von zwei Normalkontrollen und dem Patienten mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersucht. Das generierte Amplicon lag innerhalb eines CpG Islands (CGI 143, UCSC Browser, hg18) im Promotorbereich des Gens. Die durchschnittliche Methylierung der beiden Normalkontrollen betrug 52,7 bzw. 49,4 %, was den Erwartungen für einen dem Imprinting unterliegenden Locus entspricht (Abbildung 8A, Tabelle 6). Diese Werte stimmen auch mit den Ergebnissen des 27k Arrays überein, der eine durchschnittliche Methylierung der 18 dort untersuchten Normalkontrollen von 0,51 β -Werten gezeigt hatte (Bereich 0,46 - 0,55;

Tabelle 6). Beim Patienten konnte im Vergleich dazu eine starke Hypomethylierung mit einem β -Wert von 0,19 beobachtet werden. Das Ergebnis der Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung bestätigte diesen Trend und zeigte eine noch deutlichere Hypomethylierung mit einem Methylierungslevel von 1,4 %. Bei den beiden untersuchten Normalkontrollen konnte aufgrund des vorliegenden informativen SNPs (rs2239713; Tabelle A12) eine Trennung der Allele durchgeführt werden. Dabei konnten jeweils nur einem Allel nahezu komplett unmethylierte Sequenzen und dem anderen Allel nur nahezu komplett methylierte Sequenzen zugeordnet werden, so dass hier eine allelspezifische Methylierung vorliegt (Abbildung 8A, Tabelle A12). Da keine DNA der Eltern der Normalkontrollen vorhanden war, konnte die parentale Herkunft der Allele hier nicht bestimmt werden. Der Patient war für diesen SNP nicht informativ.

Weiterhin wurden Expressionsanalysen in Blut von vier Normalkontrollen durchgeführt. Bei allen zeigte sich eine monoallelische Expression (rs6597007), die unabhängig vom Genotyp des exprimierten Allels war (A oder G; Abbildung 8B; Tabelle A12). Die monoallelische Expression in Zusammenhang mit der allelspezifischen Methylierung weist darauf hin, dass *FAM50B* in Blut dem Imprinting unterliegt und bestätigt damit vorherige Berichte (Nakabayashi et al. 2011; Zhang et al. 2011a).

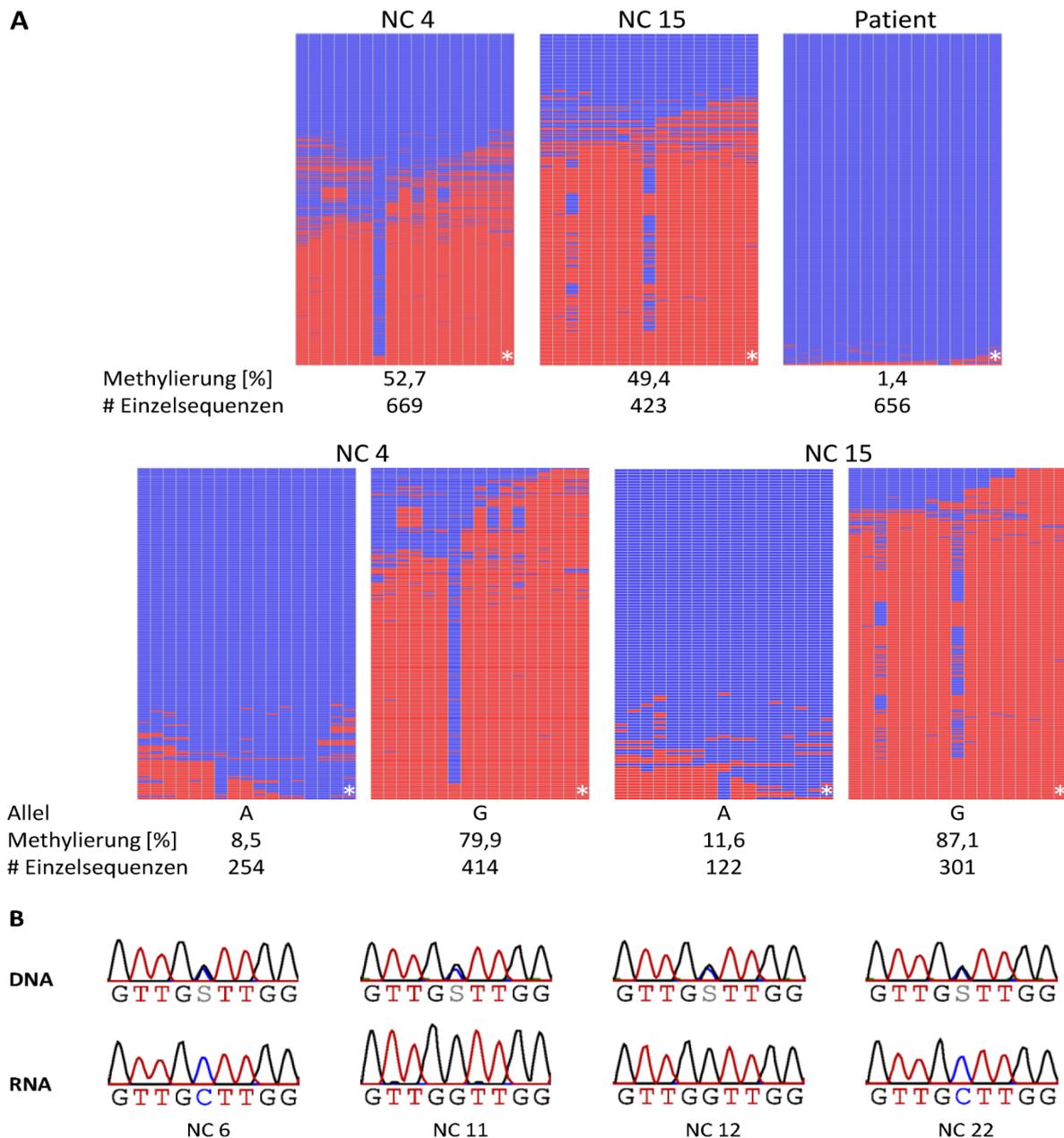


Abbildung 8: Ergebnisse der *FAM50B* Methylierungs- (A) und Expressionsanalysen (B)

(A) Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *FAM50B* in Blut von zwei Normalkontrollen (NCs) und dem Patienten. Die Ergebnisse sind vor (oben) und nach Trennung der Allele (unten; rs2239713) dargestellt. Der Patient war für diesen SNP nicht informativ.

Unter jedem Plot sind die durchschnittliche Methylierung per Amplicon (in %; über 17 CpGs) und die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen angegeben. Da in diesem Fall die Anzahl der Sequenzen pro Allel ungleichmäßig war, wurde die Gesamtmethylierung aus den Einzeldaten berechnet. Der * kennzeichnet das auf dem 27k Array untersuchte CpG (cg01570885; CpG 17). Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation.

(B) zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen an DNA und RNA aus Blut von vier Normalkontrollen (rs6597007 C/G). In allen Fällen ist eine klare monoallelische Expression zu sehen, die unabhängig vom SNP-Allel ist. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

TRPC3

Bei *TRPC3* (*transient receptor potential channel subfamily C, member 3*) zeigten die Ergebnisse des 27k Arrays beim Patienten eine Hypomethylierung (β -Wert 0,24) im Vergleich zu den Normalkontrollen (\emptyset β -Wert 0,62; Bereich 0,41 - 0,78). Die Methylierungsanalyse erfolgte im CpG Island 55, welches in der Promotorregion von Transkript 2/Isoform b liegt (UCSC Browser, hg18; uc003ief.1; NM_003305). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung zeigte eine 8,5%ige Methylierung beim Patienten. Damit konnte an diesem Locus das Ergebnis des 27k Arrays ebenfalls verifiziert werden, auch wenn die detektierte Hypomethylierung stärker ausgeprägt war. Da sich bei der Untersuchung der Normalkontrollen deutliche interindividuelle Unterschiede zeigten, wurden in diesem Fall Proben von insgesamt acht Individuen untersucht. Die durchschnittliche Methylierung variierte zwischen 47,2 und 72,1 % (siehe Abbildung 9A), was sich mit den Daten des 27k Arrays deckt (Bereich von 0,41 bis 0,78 β -Werten; siehe Tabelle 6). Nach der Trennung der Allele bei fünf der acht Normalkontrollen mit Hilfe eines informativen SNPs (rs13121031; Tabelle A12) zeigte sich eine zufällige Verteilung der Methylierung über beide parentalen Allele (siehe Abbildung 9A und A1). Interessanterweise konnte bei einer der Normalkontrollen sogar eine fast allelspezifische Methylierung beobachtet werden, wobei für die Allele eine Methylierung von 16,1 % bzw. 92,2 % vorlag (NC 12). Die anderen drei Normalkontrollen waren homozygot für den im Amplicon vorhandenen SNP. Sie zeigten mit 55 und 59 % (C-Allel) bzw. 69 % (G-Allel) ähnliche Methylierungslevel wie die heterozygoten Normalkontrollen. Somit war kein Einfluss des Genotyps des vorliegenden SNPs (rs13121031) auf den Grad der Methylierung oder die Verteilung der Methylierung auf die Allele zu erkennen. Ferner lag auch keine allelspezifische Methylierung vor.

Zusätzlich wurden Expressionsanalysen an RNA aus peripherem Blut von sechs Normalkontrollen durchgeführt. Der dafür genutzte SNP deckt beide Isoformen von *TRPC3* ab (rs11732666 in Exon 8 von Transkript 2/Isoform b (UCSC Browser, hg18; uc003ief.1; NM_003305) bzw. in Exon 9 von Transkript 1/Isoform a, (UCSC Browser, hg18; uc003ieg.1; NM_001130698) Tabelle A12). Die Ergebnisse variierten stark und zeigten sowohl biallelische als auch stark in Richtung eines Allels verschobene Expressionsmuster (*skewing*), was mit der zufälligen Methylierung der Allele in Einklang steht (Abbildung 9B).

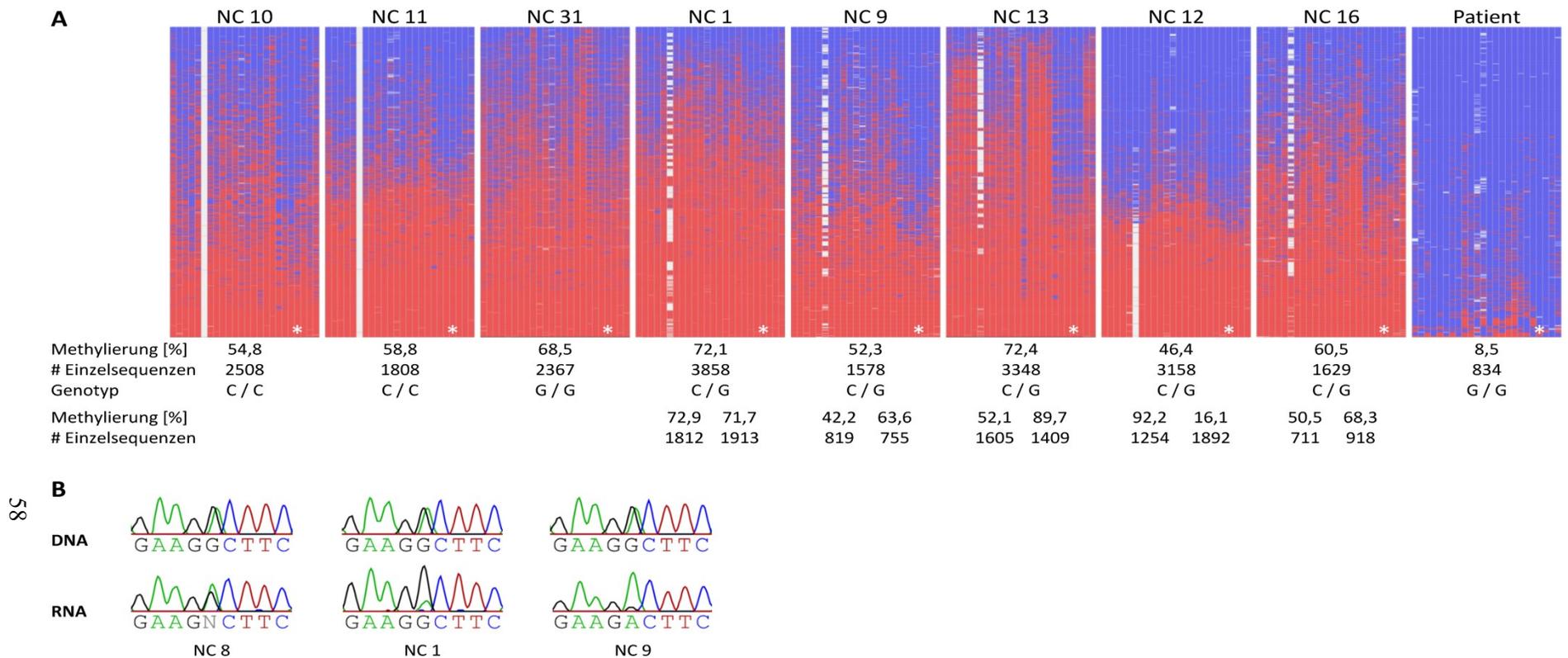


Abbildung 9: Ergebnisse der Methylierungs- (A) und Expressionsanalysen (B) von *TRPC3*

(A) Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *TRPC3* für acht Normalkontrollen (NC; DNA aus Blut) und dem Patienten. Der durchschnittliche Grad der Methylierung für das gesamte Amplicon (in %), die Anzahl der Einzelsequenzen, sowie der Genotyp für einen SNP (rs13121031) sind unter jedem Methylierungsplot dargestellt. Bei den heterozygoten NCs sind die Angaben für beide Allele getrennt angegeben (siehe auch Abbildung A1). Der * kennzeichnet das auf dem 27k Array untersuchte CpG (cg18474934; CpG 21). Der SNP rs13121031 führt zum Verlust des CpG-Dinukleotids an CpG 6, so dass die Verteilung der Methylierung über die beiden parentalen Allele hier abgelesen werden kann. Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation.

(B) Exemplarische Ergebnisse der Expressionsanalysen in Blut von drei Normalkontrollen (rs11732666). Verändert nach Beygo et al. 2013b.

ACTN3

Ein weiteres untersuchtes Kandidatengen war *ACTN3* (*actinin alpha 3*) auf Chromosom 11q13.2. Hier zeigte der Patient mit einem β -Wert von 0,32 (27k Array) eine Hypomethylierung im Vergleich zu den Normalkontrollen, die eine durchschnittliche Methylierung von 0,72 β -Werten aufwiesen (Bereich von 0,65 - 0,81; Tabelle 6). Die Methylierungsanalysen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung bestätigten diese Werte und zeigten eine durchschnittliche Methylierung von 39 % im Patienten, sowie 70 bzw. 74 % Methylierung bei der Untersuchung von DNA aus Blut von zwei Normalkontrollen. Interessanterweise zeigten die Methylierungsplots hier ein recht auffälliges, jedoch einheitliches Muster, bei dem jeweils ein CpG-Dinukleotid (CpG 1, 3 und 5) hohe Methylierungswerte zwischen 80 - 90 % erreichte, während das jeweils direkt benachbarte CpG (CpG 2 und 4) eine viel geringere Methylierung von nur ca. 40 - 50 % zeigte. Dieses „Muster“ und der Grad der Methylierung blieben auch nach der Trennung der Allele bei beiden Normalkontrollen gleich (Abbildung 10, Tabelle 7), womit bei *ACTN3* keine allelspezifische Methylierung vorliegt.

ECEL1

Bei *ECEL1* (*endothelin converting enzyme-like 1*; Chromosom 2q37.1) zeigten zwei auf dem 27k Array untersuchte CpG-Dinukleotide eine abweichende Methylierung oberhalb des Grenzwertes von $\geq 0,3$ β -Werten (Tabelle 5). Die Normalkontrollen zeigten eine durchschnittliche Methylierung von 0,76 β -Werten (Bereich 0,56 - 0,86; Tabelle 6), während der Patient im Vergleich dazu mit 0,28 β -Werten eine starke Hypomethylierung aufwies. Die Methylierungsanalysen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung zeigten über den gesamten untersuchten Bereich Werte von 15,5 bzw. 14,8 % in Blut von zwei Normalkontrollen, sowie 5,8 % beim Patienten. Die Diskrepanz der Werte vom 27k Array und der Hochdurchsatz-Sequenzierung erklärt sich durch eine unterschiedliche Verteilung der Methylierung über die untersuchte Region. Die ersten etwa zehn CpG-Dinukleotide weisen, vor allem bei den Normalkontrollen, eine viel höhere Methylierung auf als die nachfolgenden CpGs (Abbildung 11). Das erste untersuchte CpG-Dinukleotid entspricht dabei dem ersten CpG innerhalb eines CpG Islands (CpG Island 256, UCSC Browser, hg18). Solch ein Bereich wird oft auch als CGI *shore* bezeichnet. Der Methylierungsgrad an den Grenzen von CGIs kann, wie in diesem Fall, von dem weiter mittig vorliegenden Level abweichen. Dabei können

die Übergänge der verschiedenen Methylierungslevel recht abrupt oder, wie hier, eher fließend erfolgen.

Nach Trennung der Allele bei den beiden Normalkontrollen mit Hilfe eines vorhandenen SNPs (rs2742073, Tabelle A12) zeigten sich keine Unterschiede im Grad der Methylierung. Es liegt daher bei *ECELI* keine allelspezifische Methylierung vor.

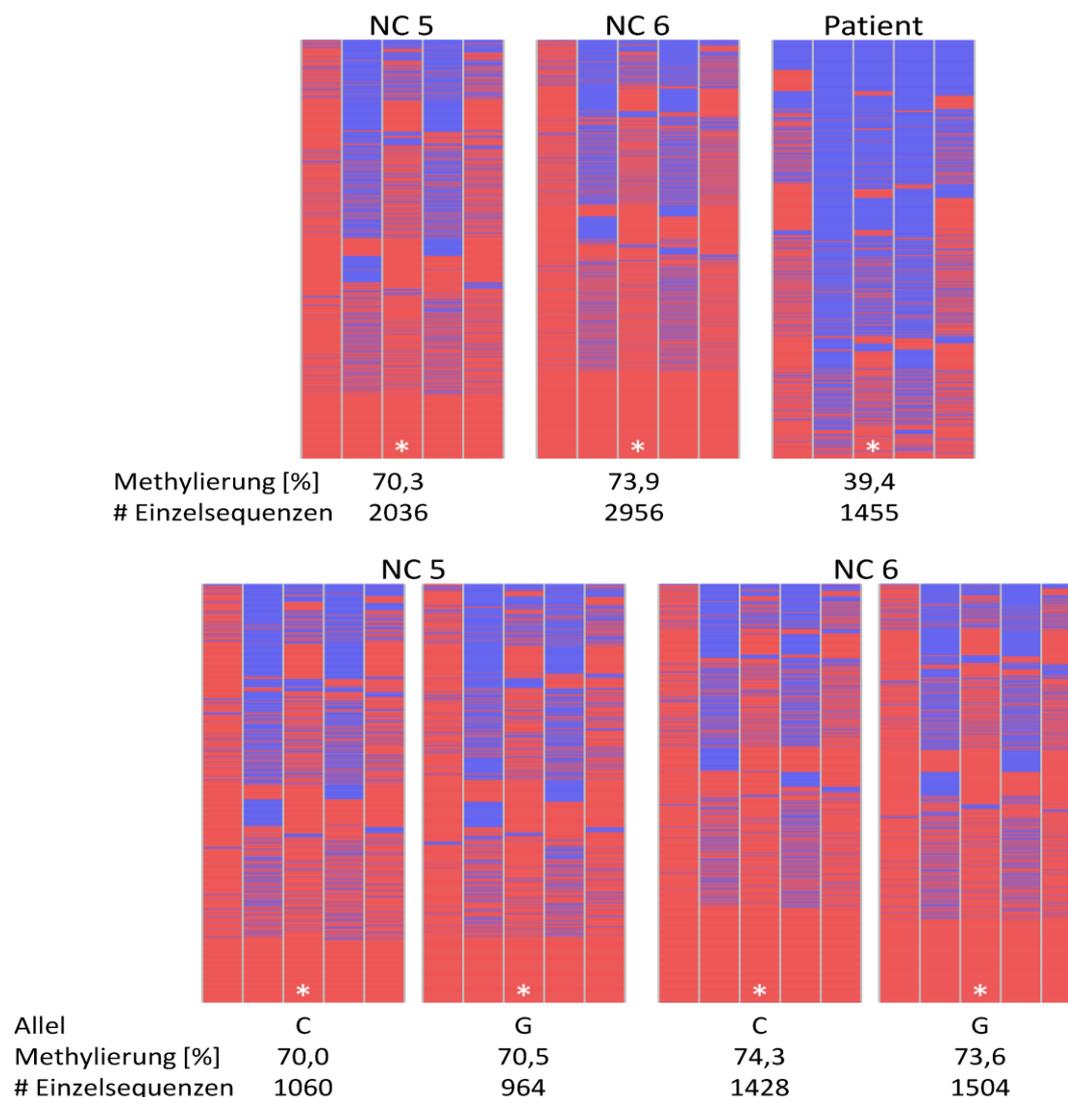


Abbildung 10: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *ACTN3*

Im oberen Teil der Abbildung sind die Methylierungsplots mit jeweils fünf untersuchten CpG-Dinukleotiden für zwei Normalkontrollen (NC) und den Patienten dargestellt. Der untere Teil zeigt die Plots der NCs nach Trennung der Allele (rs17496586). Die durchschnittliche Methylierung über alle CpGs und die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen sind unterhalb jeder Teilabbildung angegeben. Das auf dem 27k Array untersuchte CpG Dinukleotid (cg08012287; CpG 3) ist mit einem * gekennzeichnet.

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

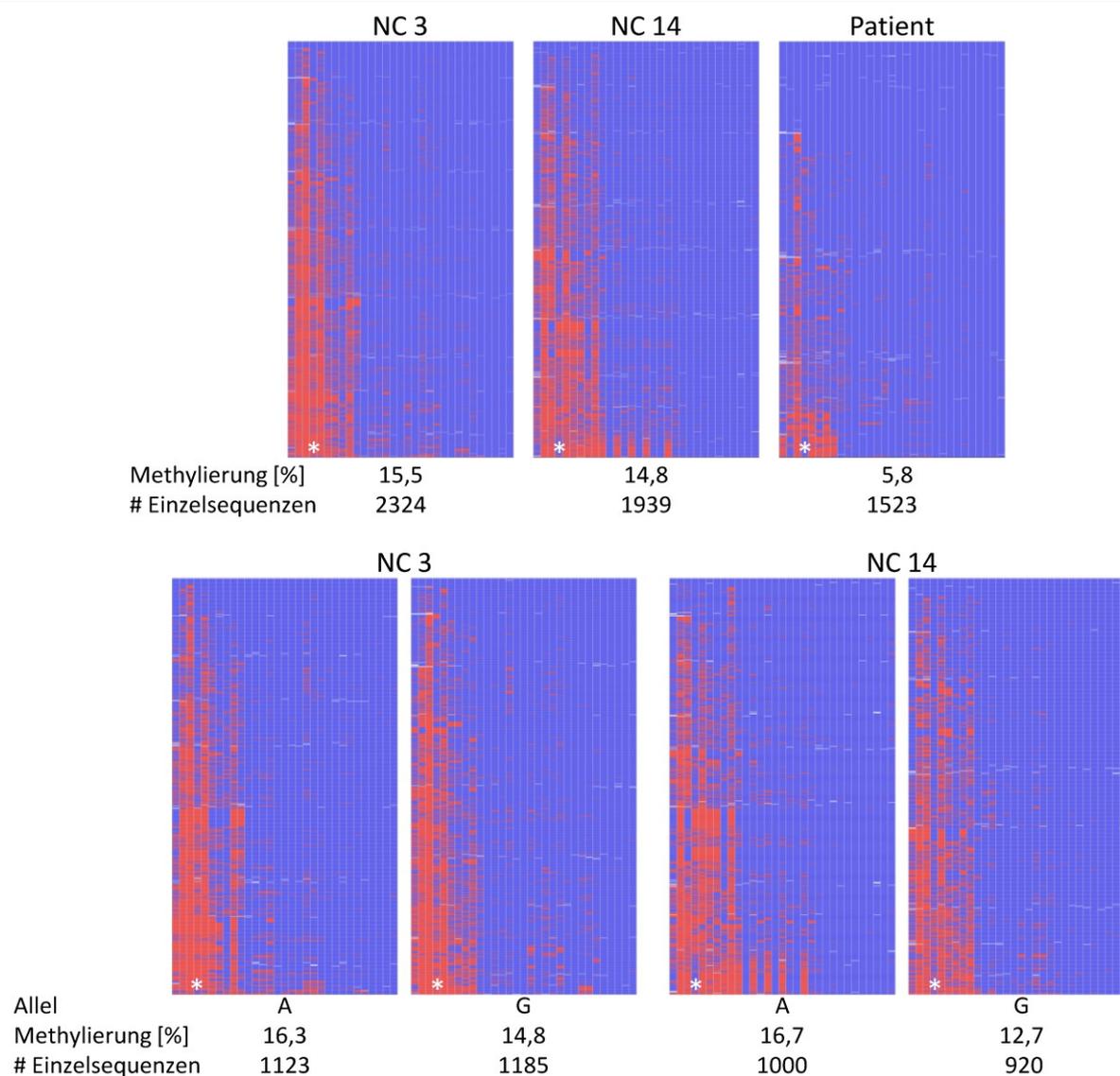


Abbildung 11: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *ECEL1*

Die Abbildung zeigt die Methylierungsplots der beiden untersuchten Normalkontrollen (NC) und des Patienten. Im unteren Teil sind die Ergebnisse nach Trennung der Allele mit Hilfe eines vorhandenen SNPs (rs2742073) zu sehen. Die durchschnittliche Methylierung der Amplicons (in %), sowie die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen ist unter jedem Plot angegeben. Das auf dem 27k Array untersuchte CpG-Dinukleotid ist mit einem * gekennzeichnet (CpG 4; cg25431974). Das zweite CpG mit auffälliger Methylierung (cg02932167; Tabelle 5) entspricht dem dritten CpG im Methylierungsplot.

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

TSPO und *CHP2*

Die Ergebnisse des 27k Arrays zeigten, dass der Patient an vielen Loci Methylierungsveränderungen aufwies. Im Vergleich zu den Normalkontrollen konnte beim Patienten sowohl Hypo- als auch Hypermethylierung beobachtet werden. Als Beispiel für einen Locus mit Hypermethylierung wurde *TSPO* (*translocator protein (18kDa)*; alias *BZRP*) in der vorliegenden Arbeit mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersucht. Die Normalkontrollen zeigten dabei einen sehr geringen Methylierungslevel von durchschnittlich 0,05 β -Werten (Bereich 0,02 - 0,12; Tabelle 6), während die Methylierung beim Patienten bei 0,35 β -Werten lag. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigten für beide Normalkontrollen mit 1,5 bzw. 0,7 % Methylierungslevel, die mit den Daten des 27k Arrays übereinstimmten (Abbildung 12, Tabelle 6). Beim Patienten konnte eine Hypermethylierung mit einem Methylierungsgrad von 18,3 % beobachtet werden. Dieser fiel im Vergleich zu den Array-Daten nicht ganz so ausgeprägt aus wie erwartet. Nach Trennung der Allele mit Hilfe eines informativen SNPs (rs138908, Tabelle A12) konnten bei den Normalkontrollen keine Unterschiede in der Methylierung der beiden Allele beobachtet werden. Bei *TSPO* konnte auch beim Patienten eine Alleltrennung vorgenommen werden. Hier zeigte sich, dass sowohl auf dem maternalen als auch auf dem paternalen Allel eine Hypermethylierung vorhanden war und somit beide parentalen Allele vom Methylierungsdefekt betroffen sind.

Auch bei *CHP2* (*calcineurin B homologous protein 2*) konnte beim Patienten eine Alleltrennung durchgeführt werden. Bei diesem Locus zeigten die Daten des 27k Arrays beim Patienten eine Methylierung von 0,31 β -Werten, während für die Normalkontrollen ein durchschnittlicher β -Wert von 0,63 (Bereich 0,56 - 0,74; Tabelle 6) detektiert werden konnte. Die beiden hier untersuchten Normalkontrollen zeigten mit 73,0 und 69,4 % Methylierung sehr ähnliche Werte. Beim Patienten konnte eine Hypomethylierung von 49,9 % beobachtet werden (Abbildung 13). Nach der Trennung der Allele (rs152041; Tabelle A12) zeigte sich sowohl bei den beiden untersuchten Normalkontrollen als auch beim Patienten eine gleichmäßige Verteilung der Methylierung über beide Allele. Es lag somit keine allelspezifische Methylierung vor. Beim Patienten waren auch hier beide Allele von der Methylierungsveränderung betroffen.

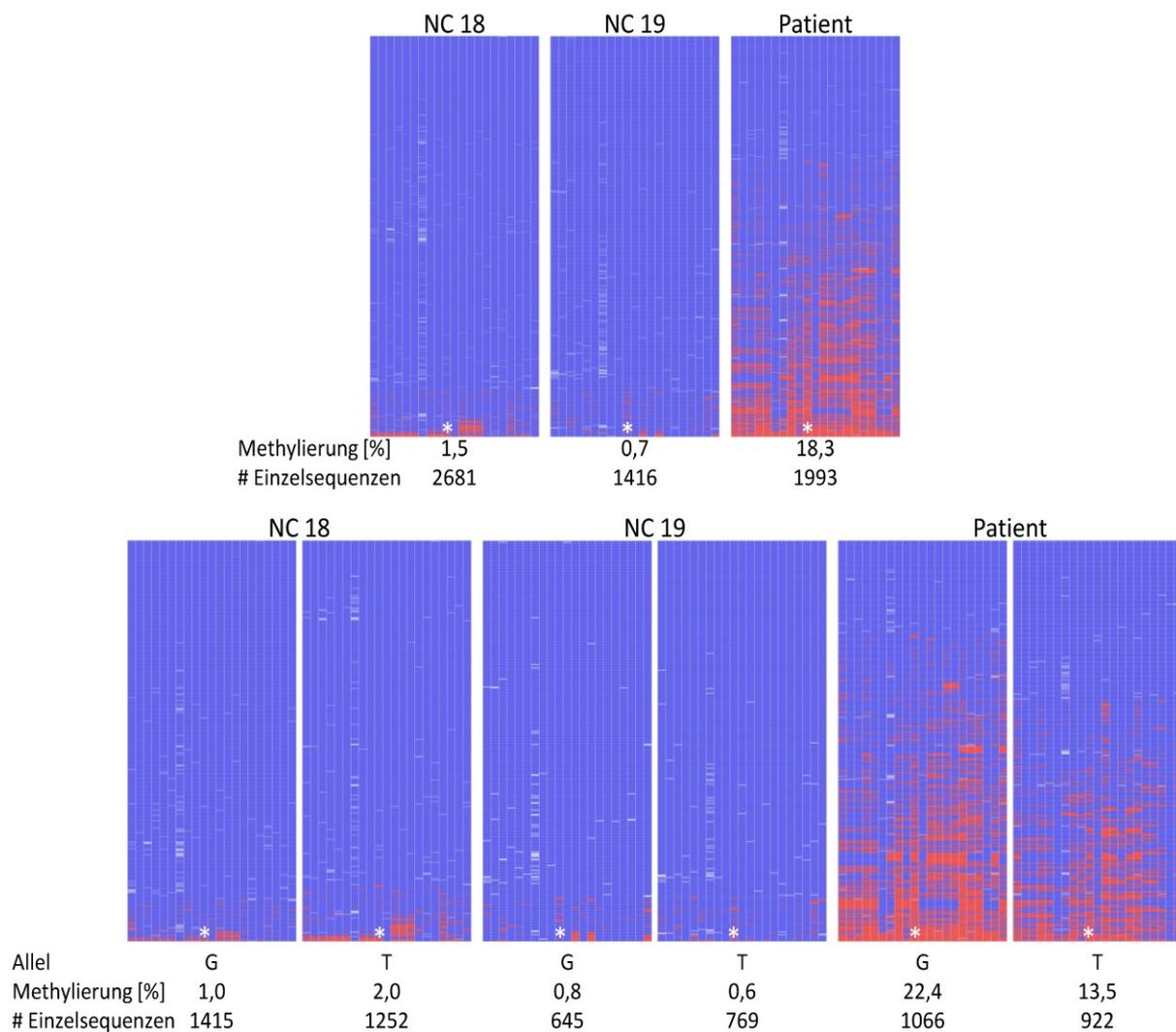


Abbildung 12: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *TSPO*

Die Abbildung zeigt die Methylierungsplots für zwei Normalkontrollen (NCs) und den Patienten jeweils vor (oben) und nach Trennung der Allele (unten). Die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen sowie die durchschnittliche Methylierung über die analysierte Region (mit 21 CpGs) sind unterhalb der Plots angegeben. Die Trennung der Allele wurde mittels eines SNPs (rs138908) vorgenommen. Das mit einem * gekennzeichnete CpG 10 entspricht dem auf dem 27k Array untersuchten CpG-Dinukleotid (cg00343092).

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

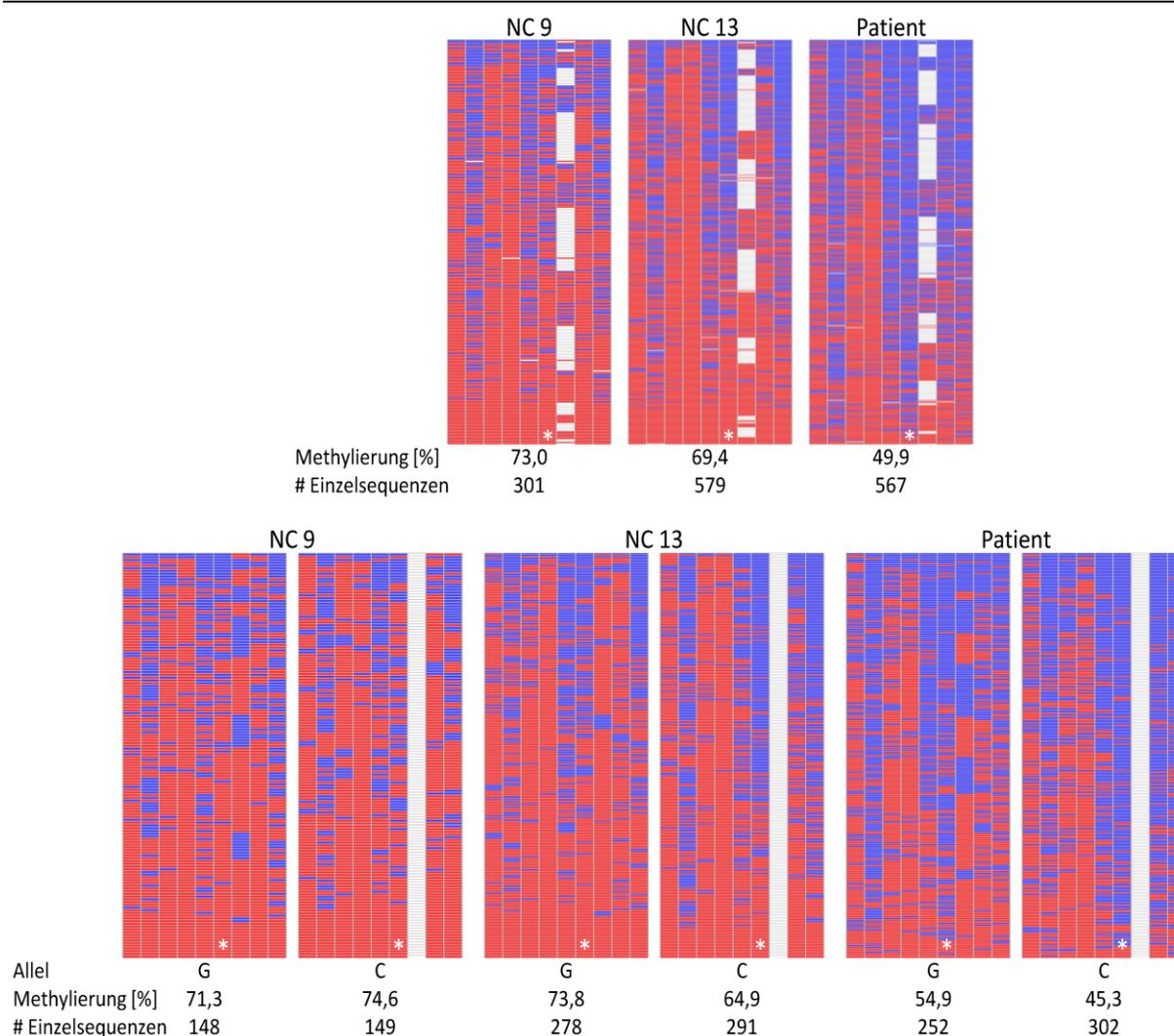


Abbildung 13: Ergebnisse der Methylierungsanalysen für *CHP2*

Die Abbildung fasst die Methylierungsplots der Normalkontrollen (NC) und des Patienten vor (oben) und nach der Trennung der Allele mittels eines vorhandenen SNPs (rs152041; unten) zusammen. Zu jedem Plot sind die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen und die durchschnittliche Methylierung über die untersuchte Region (mit 9 CpGs) angegeben. Bei CpG 7 führt der SNP rs152041 zu einem Verlust des CpG-Dinukleotids, so dass die Verteilung der Methylierung über die beiden parentalen Allele hier abgelesen werden kann. CpG 6 (*) entspricht dem auf dem 27k Array untersuchten CpG-Dinukleotid (cg21745164).

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Soweit nicht anders angegeben, steht weiß für fehlende Sequenzinformation. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

Insgesamt konnten die Methylierungsdaten des 27k Arrays sowohl in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich untersuchten Normalkontrollen als auch im Patienten mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung bestätigt werden. Bei sieben der näher untersuchten elf Kandidatengene lag die durchschnittliche Methylierung der 18 auf dem 27k Array analysierten Normalkontrollen zwischen 0,4 und 0,6 β -Werten, was den Erwartungen an einen geimprinteten Locus entspricht (Tabelle 6). Nur bei *FAM50B* konnte eine allelspezifische Methylierung sowie eine monoallelische Expression ermittelt werden. Dieses Gen wurde während meiner Arbeit als dem Imprinting unterliegend beschrieben (Nakabayashi et al. 2011; Zhang et al. 2011a). Bei den zehn anderen Genen konnte in der jeweils untersuchten Region eine variable und zufällige Methylierung beobachtet werden, welche auch nach Trennung der Allele Bestand hatte (Tabelle 6 und Tabelle 7). Weiterhin war bei den analysierten Fällen kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Methylierung einzelner Allele und dem vorliegenden Genotyp der zur Analyse verwendeten SNPs oder dem Geschlecht der untersuchten Normalkontrollen zu erkennen.

Bei insgesamt acht Genen lag die analysierte Region innerhalb eines vorhandenen CGIs (UCSC Browser, hg18). Jedoch konnte nur bei *TSPO* die bei CGIs in Promotorregionen vorherrschende sehr geringe Methylierung beobachtet werden.

Tabelle 6: Ergebnisse der Methylierungsuntersuchungen der Kandidatengene mittels Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung

Gen	Anzahl CpGs / Amplicon	Anzahl der Einzelsequenzen pro Amplicon					Ø Methylierungslevel pro Amplicon [%] (Roche/454 GS Junior)						27k Array Methylierungsdaten [β-Werte]	
		Normalkontrolle		Normalkontrolle		Patient	Normalkontrolle		Normalkontrolle		Patient	NCs (Ø; Bereich)	Patient	
<i>ACTN3</i>	5	2036	NC 5	2956	NC 6	1455	70,3	NC 5	73,9	NC 6	39,4	0,72; 0,65-0,81	0,32	
<i>CCDC19</i>	27	446	NC 8	358	NC 9	188	28,1	NC 8	39,1	NC 9	19,9	0,46; 0,36-0,63	0,16	
<i>CHP2</i>	9	301	NC 9	579	NC 13	567	73,0	NC 9	69,4	NC 13	49,9	0,63; 0,56-0,74	0,31	
<i>ECEL1</i> [#]	31	2324	NC 3	1939	NC 14	1523	15,5	NC 3	14,8	NC 14	5,8	0,76; 0,56-0,86	0,28	
<i>FAM50B</i> [*]	17	669	NC 4	423	NC 15	656	52,7	NC 4	49,4 [§]	NC 15	1,4	0,51; 0,46-0,55	0,19	
<i>GAL3ST1</i>	5	2324	NC 17	3512	NC 18	1926	79,8	NC 17	75,8	NC 18	43,7	0,75; 0,66-0,83	0,42	
<i>HOXB6</i>	11	620	NC 11	662	NC 13	393	53,3	NC 11	39,3	NC 13	22,2	0,57; 0,34-0,78	0,20	
<i>POU3F1</i>	32	2278	NC 4	2020	NC 5	2084	30,5	NC 4	32,5	NC 5	8,8	0,61; 0,51-0,72	0,11	
<i>TRPC3</i>	24	8 NCs vgl. Abbildung 9				834	8 NCs vgl. Abbildung 9				8,5	0,62; 0,41-0,78	0,24	
<i>TSPO</i>	21	2681	NC 18	1416	NC 19	1993	1,5	NC 18	0,7	NC 19	18,3	0,05; 0,02-0,12	0,38	
<i>ZNF710</i>	40	441	NC 10	339	NC 12	468	63,6	NC 10	46,3	NC 12	29,2	0,64; 0,49-0,76	0,29	

Die Tabelle fasst die Daten der untersuchten Kandidatengene in Bezug auf die Anzahl der untersuchten CpG-Dinukleotide, die Anzahl der Einzelsequenzen und der Methylierung [%] zusammen. Zusätzlich sind die mittels 27k Array gewonnenen Methylierungsdaten jeweils für die Normalkontrollen (NCs) und den Patienten aufgelistet [β-Werte].

[#] Zwei CpGs zeigten eine auffällige Methylierung - die Daten des 27k Arrays in dieser Tabelle beziehen sich auf cg25431974; ^{*} *FAM50B* wurde als dem Imprinting unterliegend beschrieben (Nakabayashi et al. 2011; Zhang et al. 2011a); [§] Aufgrund der ungleichen Verteilung der Einzelsequenzen der beiden Allele wurde die Gesamtmethylierungsrate aus den Einzeldaten berechnet. Aus Beygo et al. 2013b.

Tabelle 7: Ergebnisse der Methylierungsanalysen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung nach Alleltrennung

Gen	Allel	Ø Methylierungslevel pro Amplicon [%]					Anzahl der Einzelsequenzen pro Amplicon				
		Normalkontrolle		Normalkontrolle		Patient	Normalkontrolle		Normalkontrolle		Patient
<i>ACTN3</i>	C	70,0	NC 5	74,3	NC 6	-	1060	NC 5	1428	NC 6	-
	G	70,5		73,6		-	964		1504		-
<i>CCDC19</i>	G	31,0	NC 8	36,9	NC 9	-	213	NC 8	149	NC 9	-
	C	25,5		42,2		-	233		182		-
<i>CHP2</i>	G	71,3	NC 9	73,8	NC 13	54,9	148	NC 9	278	NC 13	252
	C	74,6		64,9		45,3	149		291		302
<i>ECEL1</i>	A	16,3	NC 3	16,7	NC 14	-	1123	NC 3	1000	NC 14	-
	G	14,8		12,7		-	1185		920		-
<i>FAM50B</i>	G	79,9	NC 4	87,1	NC 15	-	414	NC 4	301	NC 15	-
	A	8,5		11,6		-	254		122		-
<i>GAL3ST1</i>	A	80,4	NC 17	76,0	NC 18	-	1244	NC 17	1900	NC 18	-
	G	79,1		75,7		-	1071		1956		-
<i>HOXB6</i>	A	49,8	NC 11	36,7	NC 13	-	241	NC 11	303	NC 13	-
	G	55,5		41,5		-	379		359		-
<i>POU3F1</i>	A	31,3	NC 4	-	NC 5	-	697	NC 4	-	NC 5	-
	G	30,2		-		-	1579		-		-
<i>TRPC3</i>	C	8 Normalkontrollen				-	8 Normalkontrollen				-
	G	vgl. Abbildung 9 und A1				-	vgl. Abbildung 9 und A1				-
<i>TSPO</i>	G	1,0	NC 18	0,8	NC 19	22,4	1415	NC 18	645	NC 19	1066
	T	2,0		0,6		13,5	1252		769		922
<i>ZNF710</i>	G - G	70,3	NC 10	53,0	NC 12	-	142	NC 10	126	NC 12	-
	C - A	60,4		42,3		-	295		213		-

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der Methylierungsanalysen für die Normalkontrollen (NC) und den Patienten nach der Trennung der Allele zusammen und zeigt die Methylierung pro Allel und Amplicon in %, sowie die dazugehörige Anzahl der Einzelsequenzen. Die für die Alleltrennung verwendeten SNPs sind in Tabelle A12 zusammen gefasst. Die jeweiligen Allele sind für den analysierten Strang als genomische Sequenz angegeben. Bei *ZNF710* bezieht sich G/C auf NC 10, G/A auf NC12. Da nicht immer eine eindeutige Zuordnung aller Sequenzen zu einem der beiden Allele möglich war, kann es zu Diskrepanzen zwischen der Anzahl der Einzelsequenzen für ein Amplicon vor und nach der Alleltrennung kommen. Aus Beygo et al. 2013b.

3.3 Molekulargenetische Untersuchungen von BWS-Patienten mit Veränderungen in der ICR1

Die Imprintingkontrollregion 1 (ICR1) ist in der differentiell methylierten Region (DMR) *upstream* von *H19* auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert und reguliert das Imprinting von *H19* und *IGF2*. Die ICR1 ist auf dem paternalen Allel methyliert und damit inaktiv, während das maternale Allel unmethyliert und aktiv ist. Die Organisation der ICR1 ist durch mehrere *repeats* gekennzeichnet. Dies sind sich wiederholende Sequenzabschnitte, die untereinander eine hohe Sequenzidentität (-homologie) aufweisen (Abbildung 14). Weiterhin sind in diesem Bereich Bindestellen für das Zinkfinger-Protein CTCF lokalisiert, dessen Bindung bei der Aufrechterhaltung des unmethylierten Status des maternalen Allels eine wichtige Rolle spielt.

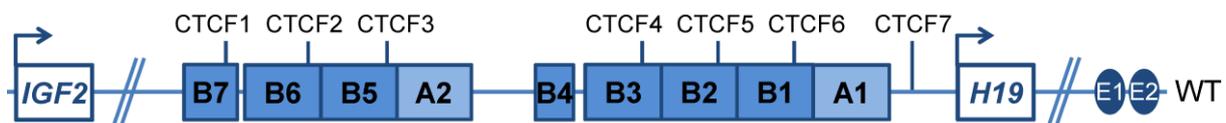


Abbildung 14: Organisation der ICR1

Die Abbildung zeigt die Organisation der ICR1 mit den *repeats* A1, A2 und B1 bis B7 im Kontext mit den beiden benachbarten Genen *IGF2* und *H19* sowie den CTCF-Bindestellen 1 bis 7 in Centromer zu Telomer Orientierung. E1 und E2 – Enhancer.

Ohne Maßstab. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

3.3.1 ICR1-Mikrodeletionen

Im Bereich der ICR1 wurden bislang erst wenige Mikrodeletionen als Ursache für BWS beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2.1). Die in dieser Arbeit untersuchte Patientin (III-1, Familie 8; Abbildung 15) mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom zeigte klassische phänotypische Merkmale wie u.a. Makroglossie, Makrosomie und eine leichte Körperasymmetrie (Hemihyperplasie). Die von Frau Sabine Kaya

(Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) in der Routinediagnostik durchgeführte Untersuchung mittels MS-MLPA (MRC Holland, Kit ME030-B2) zeigte eine normale Methylierung für die ICR2. Für die ICR1 hingegen konnte eine leichte

Familie 8 Δ 2,2 kb (B5/B1)

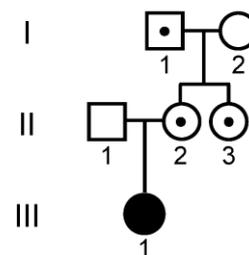


Abbildung 15: Stammbaum Familie 8
Aus Beygo et al. 2013a.

Hypermethylierung beobachtet werden, die die klinische Diagnose eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms bestätigte. Weiterhin zeigten zwei innerhalb der ICR1 lokalisierte Sonden eine Dosisreduktion um ca. 50 %, was auf eine heterozygote Deletion hinweist (Abbildung 16).

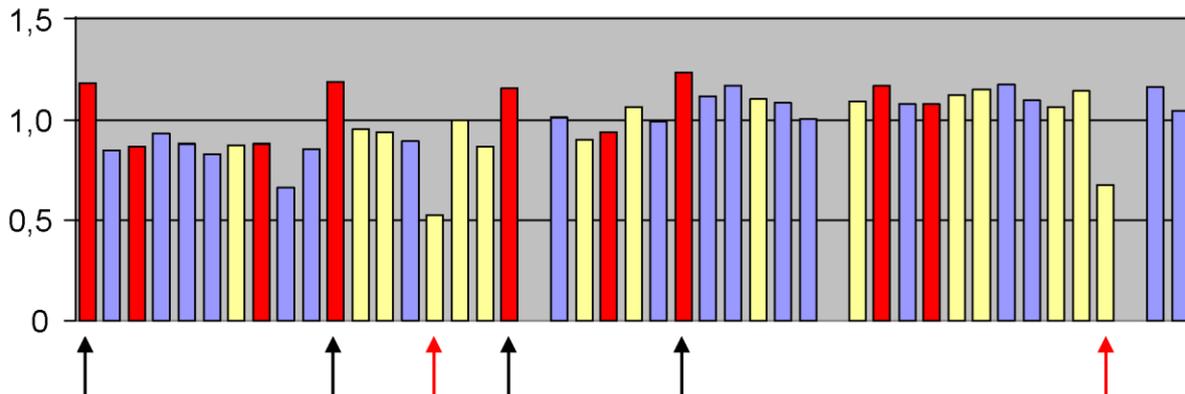


Abbildung 16: Ergebnis der MS-MLPA Untersuchung der Patientin III-1 aus Familie 8

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Gendosis- und Methylierungsuntersuchung mittels MS-MLPA (MRC Holland, Kit ME030-B2) der Patientin III-1. Rote Balken stehen für Methylierungsergebnisse, gelbe und blaue Balken zeigen die Gendosis auf Chromosom 11p15.5 (gelb) bzw. Kontrollregionen auf verschiedenen anderen Chromosomen (blau) an. Die normale Gendosis liegt bei 1,0. Die beiden mit einem roten Pfeil gekennzeichneten Sonden liegen innerhalb der ICR1 und zeigen eine Dosisreduktion um ca. 50 %, was auf eine heterozygote Deletion hinweist. Die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Sonden zeigen eine leichte Hypermethylierung an (normal: 1,0).

Zur Bestätigung der Deletion und zur Charakterisierung der Bruchpunkte wurde eine longrange PCR etabliert, welche die ICR1 abdeckt. Bei der Patientin konnte neben einem Produkt für das Wildtyp-Allel (ca. 6,7 kb) ein weiteres Produkt von ca. 4,4 kb amplifiziert werden. Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes zeigte eine 2.245 bp große Deletion innerhalb der ICR1 (Abbildung 17). Die Bruchpunkte liegen in den *repeats* B5 und B1, die dadurch fusioniert werden (GenBank Accession No. AF125183: 5710-5720/7955-7965). Insgesamt führt die Deletion zum Verlust von drei CTCF-Bindestellen. Die *repeats* A2 sowie B4, B3 und B2 sind vollständig deletiert, zusammen mit den enthaltenen CTCF-Bindestellen 4 (in B3) und 5 (in B2; Abbildung 19). Ob CTCF3 (in B5) deletiert ist oder mit CTCF6 (in B1) fusioniert, kann aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Region nicht genau bestimmt werden. CTCF6 ist zumindest teilweise vorhanden, was durch einen SNP angezeigt wird (rs10732516; Abbildung 17). Daher wird diese Bindestelle im Weiteren als CTCF6 bezeichnet.

Untersuchungen von weiteren Familienmitgliedern mittels MS-MLPA und longrange PCR zeigten, dass die Deletion auch in der gesunden Mutter der Patientin (II-2; Abbildung 15) und ihrer ebenfalls gesunden Schwester (II-3) vorhanden ist. Des Weiteren konnte die Deletion auch im phänotypisch unauffälligen Großvater der Patientin (I-1) nachgewiesen werden, der wie seine beiden Töchter (II-2 und II-3) eine normale Methylierung in der MS-MLPA zeigte. Die Sonden im Bereich von *IGF2* zeigten bei allen Familienmitgliedern eine normale Gendosis. Die Patientin (III-1) hat die Deletion von ihrer Mutter (II-2) ererbt und trägt sie somit auf dem normalerweise unmethylierten maternalen Allel. Ihre Mutter (II-2) und ihre Tante (II-3) haben die Deletion beide von ihrem Vater (Großvater der Patientin; I-1) ererbt und tragen sie auf ihrem methylierten paternalen Allel und zeigen daher keinen Phänotyp. Beim Großvater konnte zu diesem Zeitpunkt nur aufgrund der normalen Methylierung in der MS-MLPA die Hypothese aufgestellt werden, nach der die Deletion auf dem methylierten paternalen Allel liegt.



Abbildung 17: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Bruchpunktregion zwischen B5 und B1

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Sequenzierung der Bruchpunktregion exemplarisch für ein Familienmitglied. Der unterstrichene Bereich kann aufgrund der hohen Sequenzidentität sowohl zum *repeat* B5 als auch zum *repeat* B1 gehören.

Der blau unterlegte *repeat* Bereich kennzeichnet eine Sequenzfolge, die bei mehreren in der Literatur beschriebenen Deletionspatienten in der Bruchpunktregion liegt (Demars et al. 2010). Ein in B1 vorhandener SNP (rs10732516 C/T) ist mit einem gelben Quadrat markiert.

Zur genaueren Untersuchung der Methylierung wurde die hochquantitative Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung für die CTCF-Bindestellen 1 bis 6 zunächst etabliert und als Referenz für jede Bindestelle sechs Normalkontrollen untersucht (Tabelle A13). Alle Normalkontrollen zeigten eine Methylierung von ca. 50 %, was den Erwartungen an einen geimprinteten Locus entspricht. Die durchschnittliche Methylierung der insgesamt 36 untersuchten Normalkontrollen über alle sechs CTCF-Bindestellen betrug 52,91 % mit einer

Standardabweichung von 3,98 und einer durchschnittlichen Konvertierungsrate von 96,75 %. Im Mittel wurden 1646 Einzelsequenzen analysiert, mindestens jedoch 740.

Bei den Mitgliedern von Familie 8 wurden die nicht deletierten CTCF-Bindestellen 1, 2 und 6 näher untersucht (Abbildung 24, 25 und A2; Tabelle 8). Bei der Patientin III-1 konnte mit 72,0 % Methylierung an CTCF1 und 78,1 % an CTCF2 eine leichte Hypermethylierung beobachtet werden, was mit den Ergebnissen der MS-MLPA korreliert. Die CTCF-Bindestelle 6 bot die Möglichkeit das WT- und das deletionstragende Allel getrennt voneinander zu amplifizieren. Für das paternale Allel konnte, wie erwartet, ein Methylierungslevel von 93,6 % beobachtet werden, während das normalerweise unmethylierte maternale Allel mit 33,9 % eine Hypermethylierung aufwies.

Die gesunde Mutter (II-2) und ihre Schwester (II-3), die die Deletion auf ihrem jeweiligen methylierten paternalen Allel tragen, zeigten an den drei untersuchten CTCF-Bindestellen einen normalen Methylierungslevel um 50 %. Auch bei ihnen wurden die Allele bei CTCF6 getrennt untersucht. Die maternalen Allele zeigten keine Methylierung (jeweils 0,4 %), wohingegen das paternale Allel eine fast vollständige Methylierung von 88,7 bzw. 87,8 % aufwies.

Beim Großvater war die Methylierung mit 63,9 % an CTCF1 im oberen, bei CTCF2 mit 53,6 % im Normbereich. Die getrennte Analyse der Allele bei CTCF6 erbrachte 94,7 % Methylierung auf dem paternalen und 0,8 % auf dem maternalen Allel. Durch die getrennte Amplifikation der Allele konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion bei ihm auf dem unmethylierten maternalen Allel liegt und nicht, wie zunächst vermutet, auf dem methylierten paternalen Allel. Das heißt, dass es beim Großvater I-1, im Gegensatz zur Patientin III-1 und den meisten bisher beschriebenen Fällen, trotz Deletion auf dem maternalen Allel zu keiner Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen kam. Damit liegt für den Erbgang dieser Deletion eine verminderte Penetranz vor.

In der Literatur ist eine weitere Familie (Familie 7) mit einer 2,2 kb großen Deletion in der ICR1 beschrieben worden (Prawitt et al. 2005a). Ein Vergleich der Bruchpunkte dieser beiden Familien ergab, dass sie auf Nukleotidebene identisch sind und dass auch der SNP rs10732516 vorhanden ist. Bei Familie 7 sind nicht alle Mitglieder, die die Deletion auf dem maternalen Allel tragen, an BWS erkrankt (Abbildung 18). Dies wurde auf das Vorhandensein einer Duplikation von *IGF2*, die mittels FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) bei einem erkrankten Patienten beobachtet worden war, zurückgeführt.

Durch eine Kooperation mit Kollegen aus Mainz (Dirk Prawitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mainz) wurden uns zwei DNA-Proben von Mitgliedern von Familie 7 (III-2 und II-5) für Methylierungsuntersuchungen zur Verfügung gestellt. Der BWS-Patient III-2 trägt eine 2,2 kb große Deletion auf seinem maternalen Allel, die er von seiner phänotypisch unauffälligen Mutter (II-5)

Familie 7 Δ 2,2 kb (B5/B1)

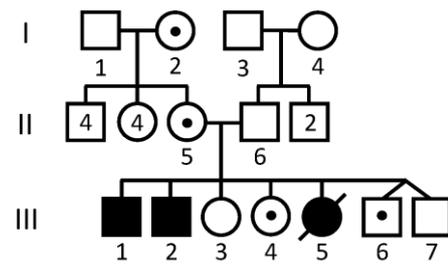


Abbildung 18: Stammbaum Familie 7
Aus Beygo et al. 2013a.

erbt hat. Sie hat die Deletion wiederum von ihrer Mutter (I-2) ererbt, womit die Deletion ebenfalls auf ihrem maternalen Allel liegt. Untersuchungen mittels MS-MLPA (durchgeführt von Frau Sabine Kaya) konnten keine *IGF2*-Duplikation beim Patienten III-2 feststellen. Auch in dieser Familie wurden die drei verbliebenen CTCF-Bindestellen 1, 2 und 6 untersucht (Abbildung 24, 25 und A2; Tabelle 8). An CTCF1 und auch an CTCF2 zeigten sowohl die gesunde Mutter II-5 als auch der Patient III-2 eine leicht erhöhte Methylierung von 71,4 bzw. 68,0 % (CTCF1) und 68,8 bzw. 77,1 % (CTCF2). Da bei diesen Amplicons kein informativer SNP vorhanden war, konnten die Allele hier nicht getrennt werden. Bei CTCF6 hingegen war aufgrund der Deletion eine getrennte Amplifizierung der Allele möglich. Die gesunde Mutter II-5 zeigte hier auf ihrem maternalen Allel mit der Deletion eine Methylierung von 4,0 % und auf ihrem paternalen WT-Allel, wie erwartet, eine fast vollständige Methylierung von 95,3 %. Der Patient III-2 zeigte auf seinem paternalen WT-Allel ebenfalls 95,3 % Methylierung, auf seinem maternalen Allel mit der Deletion dagegen eine 17,0%ige Hypermethylierung, was ausreichend scheint, um zu einem vollen BWS Phänotyp zu führen.

Auch wenn weitere Familienmitglieder nicht untersucht werden konnten, zeigt der Stammbaum in der dritten Generation zwei Kinder (III-4 und III-6), die die 2,2 kb große Mikrodeletion maternal ererbt haben, jedoch gesund sind. Dies ist ein weiterer Hinweis auf unvollständige Penetranz in einer Familie mit einer 2,2 kb großen Deletion.

Durch eine weitere Kooperation mit Kollegen aus Neapel, (Andrea Riccio, Department of Structural and Functional Biology, University of Naples 'Federico II' und Department of Environmental Science, Second University of Naples, Italien) konnten Proben von vier weiteren Familien mit verschiedenen Mikrodeletion in der ICR1 untersucht werden. Bei drei Familien (2, 4 und 6) lag jeweils eine 1,8 kb große Deletion vor. Diese Deletionen wiesen

unterschiedliche Bruchpunkte auf, führten aber in allen Fällen zu einem Verlust von jeweils zwei CTCF-Bindestellen. Bei Familie 3 lag eine 1,4 kb große Deletion vor, die eine CTCF-Bindestelle betraf.

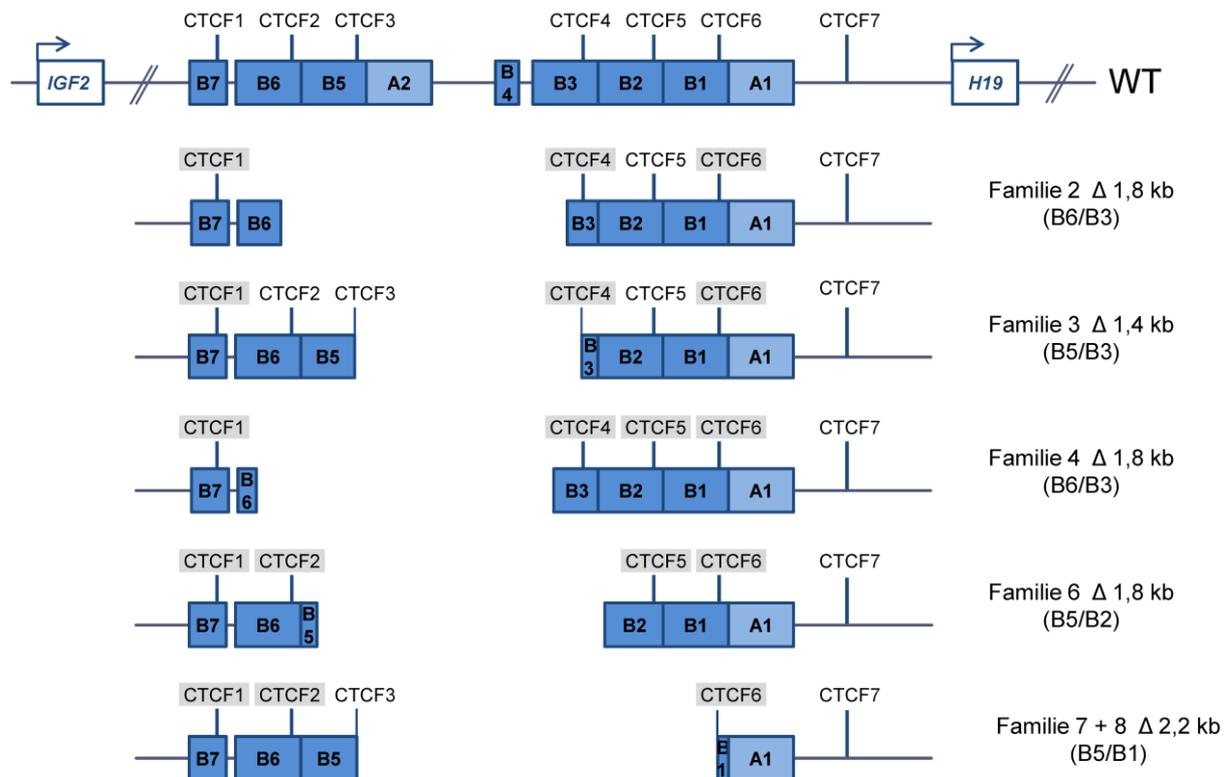


Abbildung 19: Überblick der verschiedenen Mikrodeletionen in der ICR1

Der erste Teil des Schemas zeigt die Anordnung der *repeats* innerhalb der ICR1 auf einem Wildtyp-Allel (WT). Darunter sind die Mikrodeletionen der verschiedenen Familien dargestellt. Bei den Familien 3, 7 und 8 sind jeweils 2 CTCF-Bindestellen zu einer fusioniert, bzw. kann nicht genau bestimmt werden, welche der Bindestellen noch vorhanden sind. Dies wurde mit dünneren Strichen, die zum Namen der jeweiligen CTCF-Bindestellen hinführen, angedeutet.

Grau unterlegte CTCF-Bindestellen wurden mittels Hochdurchsatz-Bisulfittsequenzierung untersucht. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

In Familie 2 wurden der BWS-Patient (III-3; Abbildung 20), der eine 1,8 kb große Deletion (B6/B3) auf seinem maternalen Allel trägt sowie seine nicht erkrankte Mutter (II-5), die die Deletion auf ihrem paternalen Allel trägt, untersucht. Die Bruchpunkte der Deletion liegen in den *repeats* B6 und B3, was den Verlust der beiden CTCF-Bindestellen 2 und 3 bedingt. Insgesamt konnten in dieser Familie drei CTCF-Bindestellen untersucht werden, wobei es bei CTCF4 aufgrund der Nähe zur Deletion möglich war, die beiden Allele getrennt zu amplifizieren. Bei Patient und Mutter konnte für das normalerweise methylierte paternale

Allele eine Methylierung von 96,3 % (III-3) bzw. 92,1 % (II-5) nachgewiesen werden (Abbildung A2 und Tabelle 8). Das unmethylierte maternale Allel zeigte bei der gesunden Mutter mit einer durchschnittlichen Methylierung von 2,4 % nur ganz vereinzelt methylierte Sequenzen, was im Normbereich lag. Beim Patienten (III-3) hingegen zeigte das maternale Allel eine starke Hypermethylierung, die mit 95,4 % dem beobachteten Methylierungsgrad des paternalen Allels entspricht.

Des Weiteren wurden CTCF1 und CTCF6 untersucht, bei denen beide Allele zusammen in einem Amplicon amplifiziert wurden (Abbildung 24 und 25). Die gesunde Mutter (II-5) zeigte, wie erwartet, an beiden Loci eine normale Methylierung von 55,4 bzw. 56,8 %. Der BWS-Patient (III-3) zeigte auch an diesen Positionen eine starke Hypermethylierung mit 93,8 % bei CTCF1 und 86,5 % bei CTCF6 (Abbildung 24 und 25).

In Familie 4 tragen sowohl die Patientin (III-2; Abbildung 21), als auch ihre ebenfalls an BWS erkrankte Mutter (II-1) eine 1,8 kb große Deletion (B6/B3) auf ihrem jeweiligen maternalen Allel. Die Bruchpunkte liegen auch hier in den *repeats* B6 und B3, jedoch an anderen Positionen als bei Familie 2. Die Deletion führt zum Verlust der beiden CTCF-Bindestellen 2 und 3. In dieser Familie war es möglich, bei CTCF1 die Allele getrennt zu amplifizieren. Für die methylierten

paternalen Allele konnten Methylierungslevel von 93,9 % (III-2) bzw. 93,7 % (II-1) beobachtet werden (Abbildung 24 und Tabelle 8). Die normalerweise unmethylierten maternalen Allele wiesen hier, wie auch schon bei dem BWS-Patienten aus Familie 2 (III-3), eine starke Hypermethylierung auf. Dabei zeigte sich bei der Patientin (III-2) mit 93,4 % ein Methylierungsgrad, der auf dem Niveau des paternalen Allels liegt. Bei ihrer ebenfalls an BWS erkrankten Mutter (II-1) war mit 70,7 % gleichfalls eine Hypermethylierung zu

Familie 2 Δ 1,8 kb (B6/B3)

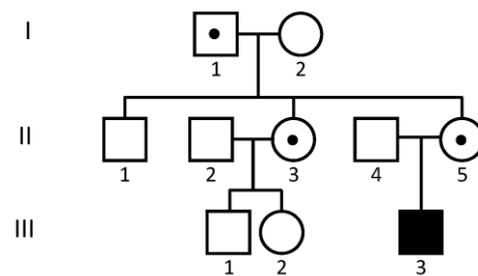


Abbildung 20: Stammbaum Familie 2
Aus Beygo et al. 2013a.

Familie 4 Δ 1,8 kb (B6/B3)

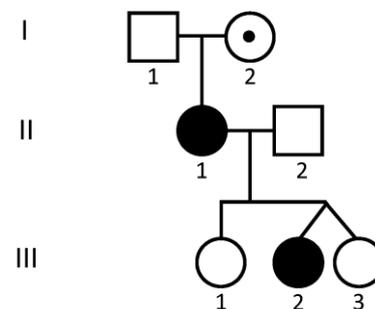


Abbildung 21: Stammbaum Familie 4
Aus Beygo et al. 2013a.

beobachten, die jedoch etwas weniger stark ausgeprägt war als bei ihrer Tochter (III-2). Dieser Trend zeigte sich auch bei den jeweils in einem Amplicon untersuchten CTCF-Bindestellen 4, 5 und 6 (Abbildung 25 und A2), wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei CTCF4 zeigte die Patientin (III-2) eine Gesamtmethylierung über beide Allele von 96,5 %, während bei ihrer Mutter (II-1) 85,6 % beobachtet werden konnten. Bei CTCF5 (III-2: 95,4 %; II-1: 91,6 %) und CTCF6 (III-2: 89,7 %; II-1: 84,7 %) sind die Unterschiede im Methylierungsgrad nicht so stark ausgeprägt.

Bei einer weiteren Familie (Familie 6) mit einer 1,8 kb großen Deletion (B5/B2) konnten ebenfalls zwei erkrankte Mitglieder – der Patient III-1 und seine Mutter II-2 – im Hinblick auf Methylierungsveränderungen untersucht werden

(Abbildung 22). Die Lage der Deletion mit Bruchpunkten in den *repeats* B5 und B2, die zum Verlust von CTCF3 und CTCF4 führte, ermöglichte die getrennte Amplifikation der Allele sowohl bei CTCF2 als auch bei CTCF5. In beiden Fällen zeigten die paternalen Allele des Patienten (III-1) und seiner Mutter (II-2) eine Methylierung zwischen 94,8 und 95,8 % (Abbildung A2, Tabelle 8). Auf dem maternalen Allel zeigte der Patient (III-1) eine starke

Familie 6 Δ 1,8 kb (B5/B2)

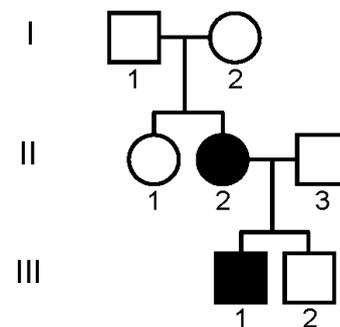


Abbildung 22: Stammbaum Familie 6
Aus Beygo et al. 2013a.

Hypermethylierung von 89,1 % bei CTCF2 und 94,5 % bei CTCF5. Bei seiner Mutter (II-2) konnte bei diesen CTCF-Bindestellen eine Hypermethylierung von 81,4 % (CTCF2) bzw. 80,4 % (CTCF5) beobachtet werden. Wie schon bei Familie 4 ist auch hier der Grad der Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen des maternalen Allels beim Patienten (III-1) z.T. deutlich höher als bei seiner ebenfalls an BWS erkrankten Mutter (II-2). Dies lässt sich auch aus den Ergebnissen für CTCF1 und 6 ablesen, bei denen jeweils ein Amplicon für beide Allele amplifiziert wurde (Abbildung 24 und 25). Bei CTCF1 lag die Methylierung bei 95,7 % beim Patienten (III-1) und bei 89,6 % bei seiner Mutter (II-2; Abbildung 24). Bei CTCF6 zeigte sich ein ähnlich deutlicher Unterschied wie bei CTCF5, wobei der Grad der Hypermethylierung mit 84,2 % beim Patienten (III-1) und 68,7 % bei seiner Mutter (II-2; Abbildung 25) etwas niedriger ausfiel, als bei den anderen untersuchten CTCF-Bindestellen.

In Familie 3 trug der Patient (II-1) eine 1,4 kb *de novo* Deletion (B5/B3) auf seinem maternalen Allel. Die Bruchpunkte befanden sich in den *repeats* B5 und B3, so dass eine CTCF-Bindestelle eliminiert wurde (Abbildung 23). Aufgrund der hohen Sequenzidentität kann nicht genau festgestellt werden, ob CTCF3 vollständig oder CTCF3 und CTCF4 jeweils teilweise deletiert sind. Die getrennte Amplifizierung der Allele bei CTCF4 zeigte auf dem paternalen Allel eine Methylierung von 92,5 % und eine starke Hypermethylierung des maternalen Allels mit 85,1 % (Abbildung A2; Tabelle 8). Auch in diesem Fall wurden für die beiden CTCF-Bindestellen 1 und 6 jeweils beide Allele in einem Amplicon untersucht. Die Resultate zeigten bei CTCF1 95,1 % Methylierung und bei CTCF6 eine im Vergleich dazu etwas niedrigere Hypermethylierung von 82,7 % (Abbildung 24 und 25).

Familie 3 Δ 1,4 kb (B5/B3)

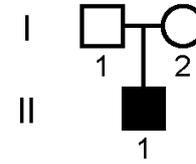


Abbildung 23: Stammbaum Familie 3

Aus Beygo et al. 2013a.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 1,4 und 1,8 kb großen Deletionen in den hier untersuchten Familien in allen Fällen zu einer starken Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen des normalerweise unmethylierten maternalen Allels führte. Dies wiederum geht mit einer vollständigen Penetranz des BWS-Phänotyps einher. Bei den Familien 7 und 8 hingegen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die vorliegende 2,2 kb große Deletion zu einer stochastischen Hypermethylierung führen kann und mit einer unvollständigen Penetranz einhergeht.

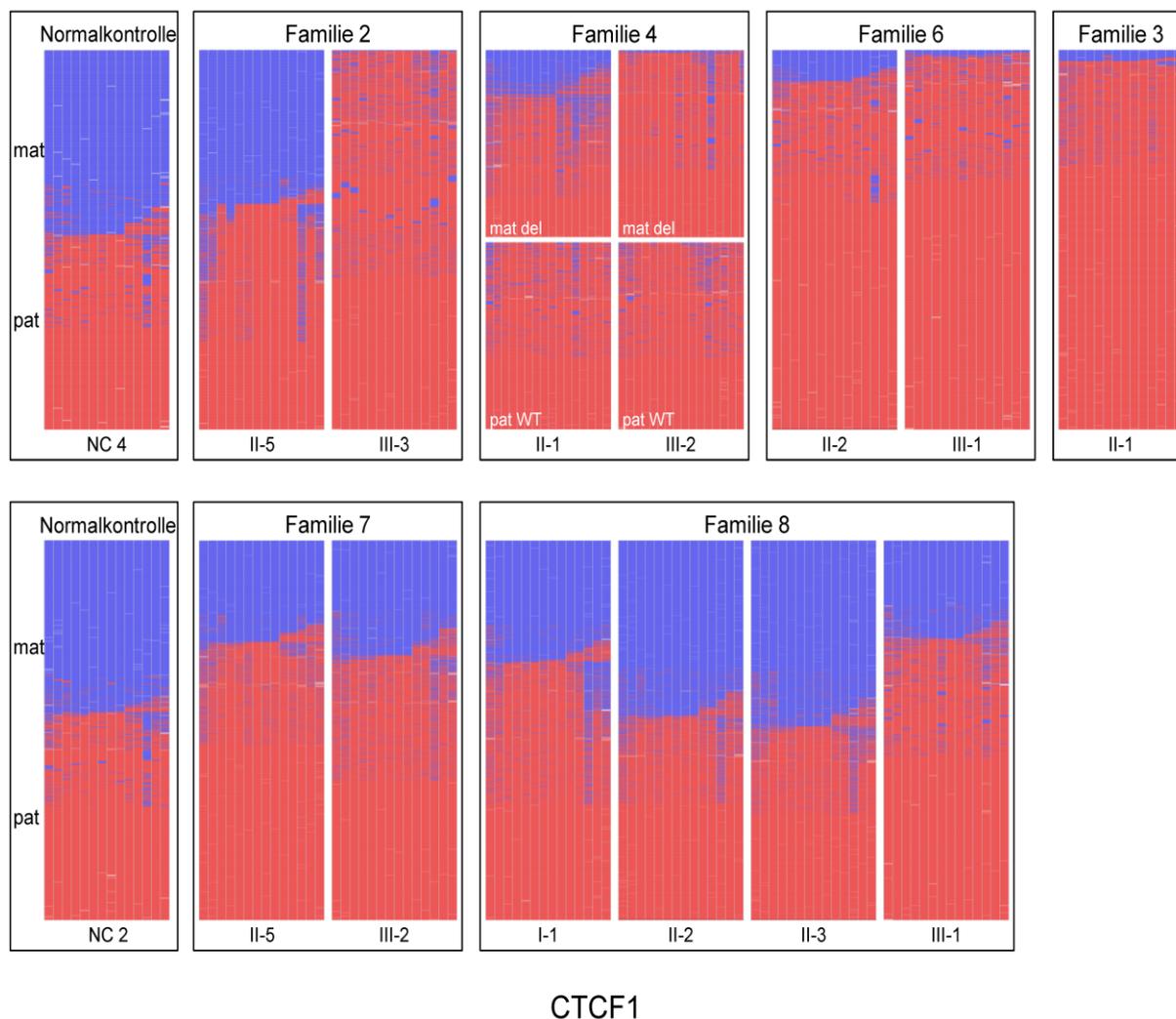


Abbildung 24: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung für CTCF1

Die Abbildungen zeigen die Methylierungsergebnisse für CTCF1 für alle untersuchten Individuen sowie zweier Normalkontrollen (NC) zum Vergleich. Die Bezeichnungen der einzelnen Personen sind den jeweiligen Stammbäumen entnommen.

Bei Familie 4 konnten die Allele getrennt amplifiziert werden.

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation.

NC – Normalkontrolle; mat – maternales Allel; pat – paternales Allel; del – Allel mit Deletion; WT – Wildtyp. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

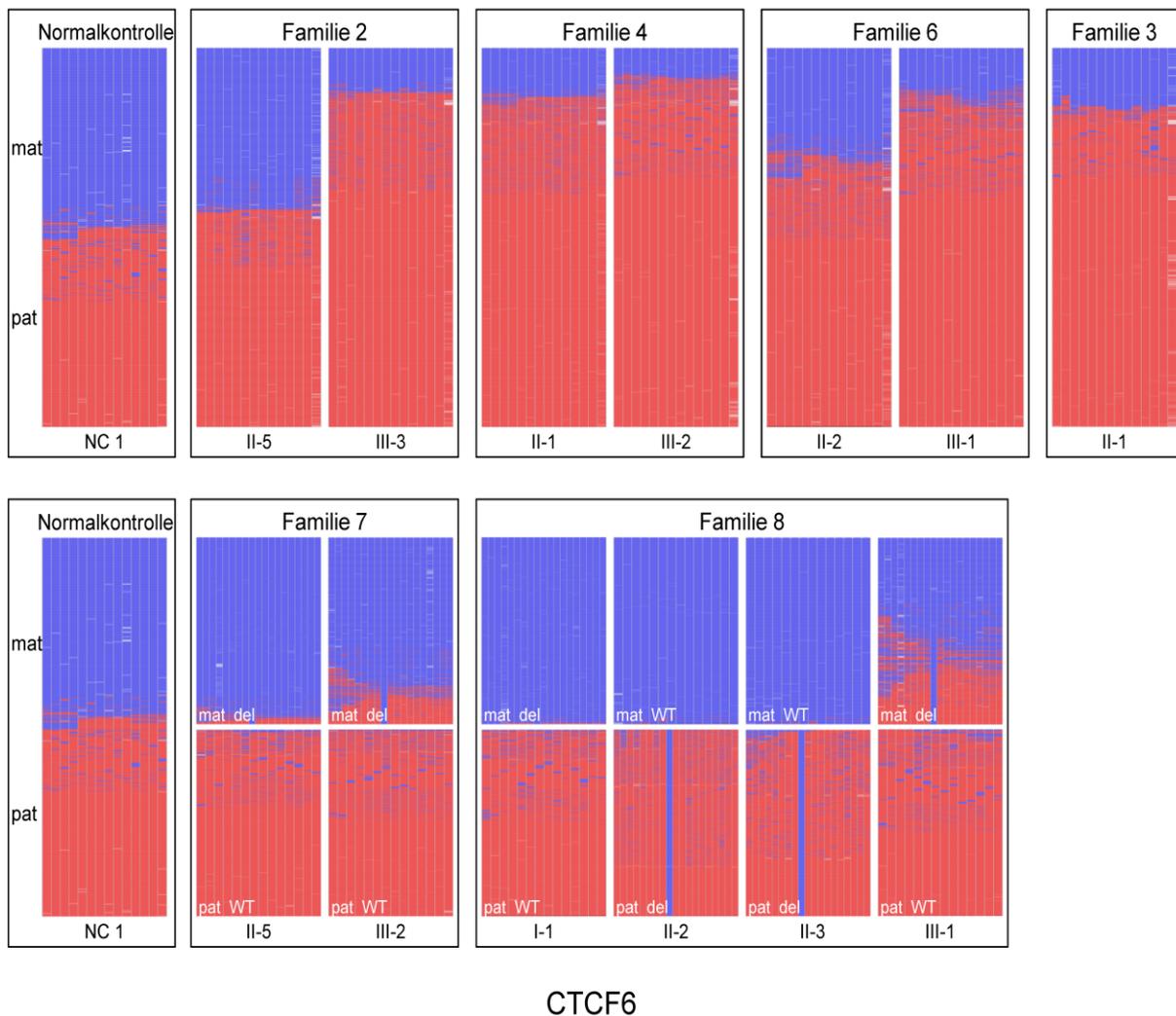


Abbildung 25: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung für CTCF6

Die Abbildungen zeigen die Methylierungsergebnisse für CTCF6 für alle untersuchten Individuen sowie zweier Normalkontrollen (NC) zum Vergleich. Die Bezeichnungen der einzelnen Personen sind den jeweiligen Stammbäumen entnommen.

Bei den Familien 7 und 8 konnten die Allele getrennt amplifiziert werden. Das vollständig unmethylierte CpG 9 bei einigen Individuen basiert auf einem C/T SNP (rs10732516), der die erste Position des CpG-Dinukleotids betrifft.

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation.

NC – Normalkontrolle; mat – maternales Allel; pat – paternales Allel; del – Allel mit Deletion; WT – Wildtyp. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

Tabelle 8: Ergebnisse der Methylierungsanalysen der ICR1-Mikrodeletionsfamilien

	Individuum	Phänotyp	CTCF	# CpGs	Allel	# Einzelsequenzen	Ø Methylierung [%]			
Familie 2	II-5	Mutter	gesunde Trägerin	CTCF1	14	beide	2222	55,4		
	III-3	Patient	erkrankt		14	beide	2417	93,8		
	II-5	Mutter	gesunde Trägerin	CTCF4	16	mat WT	1275	2,4		
					21	pat Del	5609	92,1		
	Δ 1,8 kb (B6/B3)	III-3	Patient	erkrankt		21	mat Del	1220	95,4	
						16	pat WT	1285	96,3	
	II-5	Mutter	gesunde Trägerin	CTCF6	14	beide	2068	56,8		
	III-3	Patient	erkrankt			14	beide	1784	86,5	
Familie 3	II-1	Patient	erkrankt	CTCF1	14	beide	2144	95,1		
Δ 1,4 kb (B5/B3)	II-1	Patient	erkrankt	CTCF4	21	mat Del	3545	85,1		
						16	pat WT	2318	92,5	
	II-1	Patient	erkrankt	CTCF6	14	beide	3139	82,7		
Familie 4	II-1	Mutter	erkrankt	CTCF1	16	mat Del	2214	70,7		
						16	pat WT	1655	93,7	
	III-2	Patientin	erkrankt			16	mat Del	3006	93,4	
						16	pat WT	1218	93,9	
	Δ 1,8 kb (B6/B3)	II-1	Mutter	erkrankt	CTCF4	16	beide	1444	85,6	
		III-2	Patientin	erkrankt			16	beide	1454	96,5
		II-1	Mutter	erkrankt	CTCF5	14	beide	2159	91,6	
		III-2	Patientin	erkrankt			14	beide	2192	95,4
	II-1	Mutter	erkrankt	CTCF6	14	beide	3235	84,7		
	III-2	Patientin	erkrankt			14	beide	3170	89,7	
Familie 6	II-2	Mutter	erkrankt	CTCF1	14	beide	1919	89,6		
	III-1	Patient	erkrankt			14	beide	1726	95,7	
	II-2	Mutter	erkrankt	CTCF2	19	mat Del	707	81,4		
						20	pat WT	537	94,9	
	III-1	Patient	erkrankt			19	mat Del	926	89,1	
	Δ 1,8 kb (B5/B2)					20	pat WT	1107	95,8	
		II-2	Mutter	erkrankt	CTCF5	15	mat Del	3423	80,4	
							14	pat WT	1112	95,1
		III-1	Patient	erkrankt			15	mat Del	1576	94,5
						14	pat WT	929	94,8	
		II-2	Mutter	erkrankt	CTCF6	14	beide	1916	68,7	
		III-1	Patient	erkrankt			14	beide	1816	84,2
Familie 7	II-5	Mutter	gesund	CTCF1	14	beide	3293	71,4		
	III-2	Patient	erkrankt			14	beide	2433	68,0	
	II-5	Mutter	gesund	CTCF2	20	beide	810	68,8		
	III-2	Patient	erkrankt			20	beide	719	77,1	
	Δ 2,2 kb (B5/B1)	II-5	Mutter	gesund	CTCF6	19	mat Del	4922	4,0	
							14	pat WT	1697	95,3
	III-2	Patient	erkrankt			19	mat Del	1226	17,0	
						14	pat WT	3718	95,3	

Individuum Phänotyp			CTCF	# CpGs	Allel	# Einzelsequenzen	Ø Methylierung [%]		
Familie 8 Δ 2,2 kb (B5/B1)	I-1	Großvater	gesunder Träger	CTCF1	14	beide	2387	63,9	
	II-2	Mutter	gesunde Trägerin		14	beide	3766	52,8	
	II-3	Tante	gesunde Trägerin		14	beide	3747	50,5	
	III-1	Patientin erkrankt			14	beide	2345	72,0	
	I-1	Großvater	gesunder Träger	CTCF2	20	beide	905	53,6	
	II-2	Mutter	gesunde Trägerin		20	beide	854	49,6	
	II-3	Tante	gesunde Trägerin		20	beide	810	52,1	
	III-1	Patientin erkrankt			20	beide	1690	78,1	
	I-1	Großvater	gesunder Träger	CTCF6	19	mat Del	2537	0,8	
					14	pat WT	1561	94,7	
		II-2	Mutter		gesunde Trägerin	19	mat WT	2894	0,4
						14	pat Del	3044	88,7
II-3		Tante	gesunde Trägerin		19	mat WT	1346	0,4	
					14	pat Del	676	87,8	
III-1	Patientin erkrankt		19	mat Del	1003	33,9			
			14	pat WT	2002	93,6			

Die Tabelle gibt die Resultate der mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung gewonnenen Methylierungsuntersuchung, unterteilt in Familien, wider. Für die einzelnen Personen sind die Bezeichnungen aus den jeweiligen Stammbäumen sowie der Status der Personen im Hinblick auf die Mutation bzw. den Phänotyp angegeben. Weiterhin ist die Anzahl der pro Amplicon untersuchten CpG-Dinukleotiden angegeben. Die Schwankungen dieser Zahlen kommen aufgrund von unterschiedlichen Primerkonstellationen zustande, die der jeweiligen Deletion angepasst sind (Tabelle A6). Verändert nach Beygo et al. 2013a.

3.3.2 OCT-Bindestellen in der ICR1

Die ICR1-Region beinhaltet drei Bindestellen für OCT-Proteine, die in den *repeats* A1 und A2 sowie *upstream* von B7 lokalisiert sind (Abbildung 26). Bisher wurden in zwei Familien mit jeweils mehreren an BWS erkrankten Familienmitgliedern Mutationen in diesen Bindestellen beschrieben (Poole et al. 2012; Demars et al. 2010). Ähnlich wie die zuvor

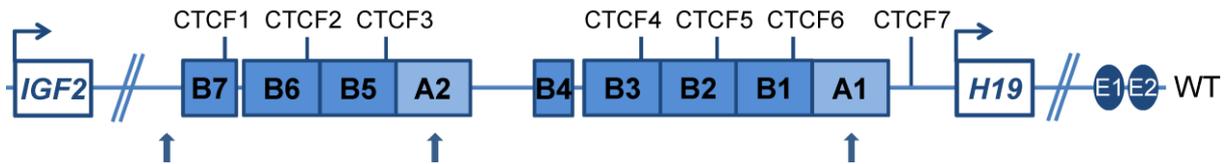


Abbildung 26: Übersicht der ICR1 mit OCT-Bindestellen

Die Abbildung zeigt die Organisation der ICR1 zwischen *IGF2* und *H19* mit Einordnung der OCT-Bindestellen (Pfeile) wie sie im Wildtyp (WT) vorzufinden ist in Centromer zu Telomer Orientierung.

CTCF1 bis 7 – CTCF-Bindestellen 1 bis 7; E1 und E2 – Enhancer. Ohne Maßstab. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

charakterisierten Mikrodeletionen, führen die Mutation in OCT-Bindestellen zu einer Hypermethylierung der ICR1, wenn sie auf dem normalerweise unmethylierten maternalen Allel auftreten. Kooperationspartner aus Norwegen (Gunnar Houge, Center for Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen and Department of Clinical Medicine, University of Bergen, Bergen, Norwegen) konnten eine weitere Familie identifizieren, in der Personen aus drei Generationen Träger einer Punktmutation

(hg19: chr11: g.2023019T>C) in der OCT-Bindestelle im *repeat* A2 sind (Abbildung 26). Diese Mutation wurde bereits von Demars et al. als ursächlich für BWS beschrieben (Demars et al. 2010).

Die Großmutter (I-1; Abbildung 27) ist gesunde Trägerin der Mutation in der OCT-Bindestelle, welche bei ihr auf dem methylierten paternalen Allel

liegt. Diese Mutation hat sie an ihre drei Töchter (II-1, II-3 und II-4) vererbt, die sie somit auf

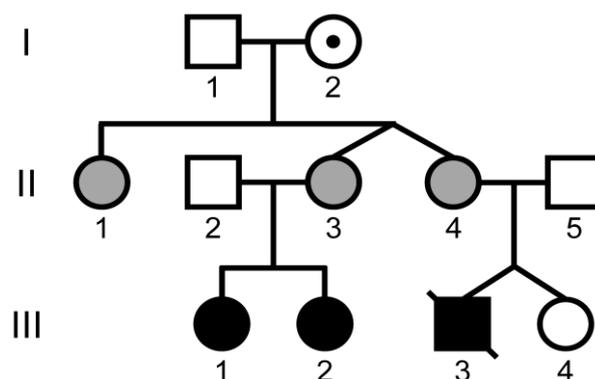


Abbildung 27: Stammbaum der Familie mit Punktmutation in einer der OCT-Bindestellen

Schwarzer Punkt – gesunde Trägerin der Mutation; grau – Großwuchs (> 96. Perzentile); schwarz – BWS. Aus Berland et al. 2013.

ihrem maternalen Allel tragen. Phänotypisch zeigen die drei Schwestern II-1, II-3 und II-4 einen Großwuchs oberhalb der 96. Perzentile (178, 185 bzw. 187 cm). Abgesehen von einer leichten Makroglossie bei II-1 und II-4 zeigt keine der drei Schwestern weitere zum phänotypischen Erscheinungsbild des Beckwith-Wiedemann-Syndroms passende Merkmale. Die beiden Kinder von II-3 (III-1 und III-2), sowie eines der Kinder von II-4 (III-3), haben BWS mit einigen klassischen Merkmalen wie Großwuchs, Makroglossie und Wilms-Tumore. Bei der gesunden dizygoten Zwillingschwester (III-4) lagen alle Werte im Normbereich. Keines der Kinder zeigte eine Körperasymmetrie oder neonatale Hypoglykämie (siehe Kapitel 2.1.6.4 und Berland et al. 2013).

Erste Untersuchungen mittels MS-MLPA, die in Norwegen durchgeführt wurden, zeigten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hypermethylierung in allen Mutationsträgern der zweiten und dritten Generation. Zur genaueren Bestimmung der Methylierung innerhalb der ICR1 wurden die beiden CTCF-Bindestellen 1 und 6 im Zuge dieser Dissertation mittels hochquantitativer Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 (CTCF1) und Abbildung 29 (CTCF6) dargestellt.

Sowohl bei CTCF1 als auch bei CTCF6 zeigten die gesunden Großeltern I-1 und I-2, die gesunden Väter II-2 und II-5 sowie die gesunde dizygoten Zwillingsstochter III-4 Methylierungslevel von ca. 50 %, wie bei einem geimprinteten Locus erwartet. Die normale Methylierung der Großmutter I-1 zeigt, dass die Mutation auf dem methylierten paternalen Allel keine Auswirkung auf die Methylierung des maternalen Allels hat.

Die drei Schwestern II-1, II-3 und II-4 wiesen bei CTCF1 eine starke Hypermethylierung mit 95,1, 93,3 bzw. 94,1 % auf. Ihre Kinder III-1, III-2 und III-3 zeigten ebenfalls eine starke Hypermethylierung mit ähnlichen Methylierungswerten (94,6, 90,5 bzw. 88,9 %). Bei CTCF6 war der Grad der Hypermethylierung in den zuvor genannten Individuen nicht ganz so hoch. Bei den drei Schwestern konnten hier Methylierungswerte von 80,9, 62,7 bzw. 73,6 % detektiert werden. In der dritten Generation war die Hypermethylierung im Vergleich zur jeweiligen Mutter stärker ausgeprägt. III-1 und III-2 zeigten 83,9 bzw. 72,7 % Methylierung an CTCF6, was einem Unterschied von ca. 10 - 20 Prozentpunkten im Vergleich zu ihrer Mutter (II-3, 62,7 %) entspricht. Bei III-3 (85,0 %) betrug der Unterschied ebenfalls ca. 10 Prozentpunkte (Mutter II-4: 73,6 %), so dass hier eine Zunahme der Methylierung über die Generationen hinweg vorzuliegen scheint. Dies korrespondiert auch mit einer Zunahme des Schweregrads des Phänotyps von Großwuchs in den Müttern zu BWS in den Kindern.

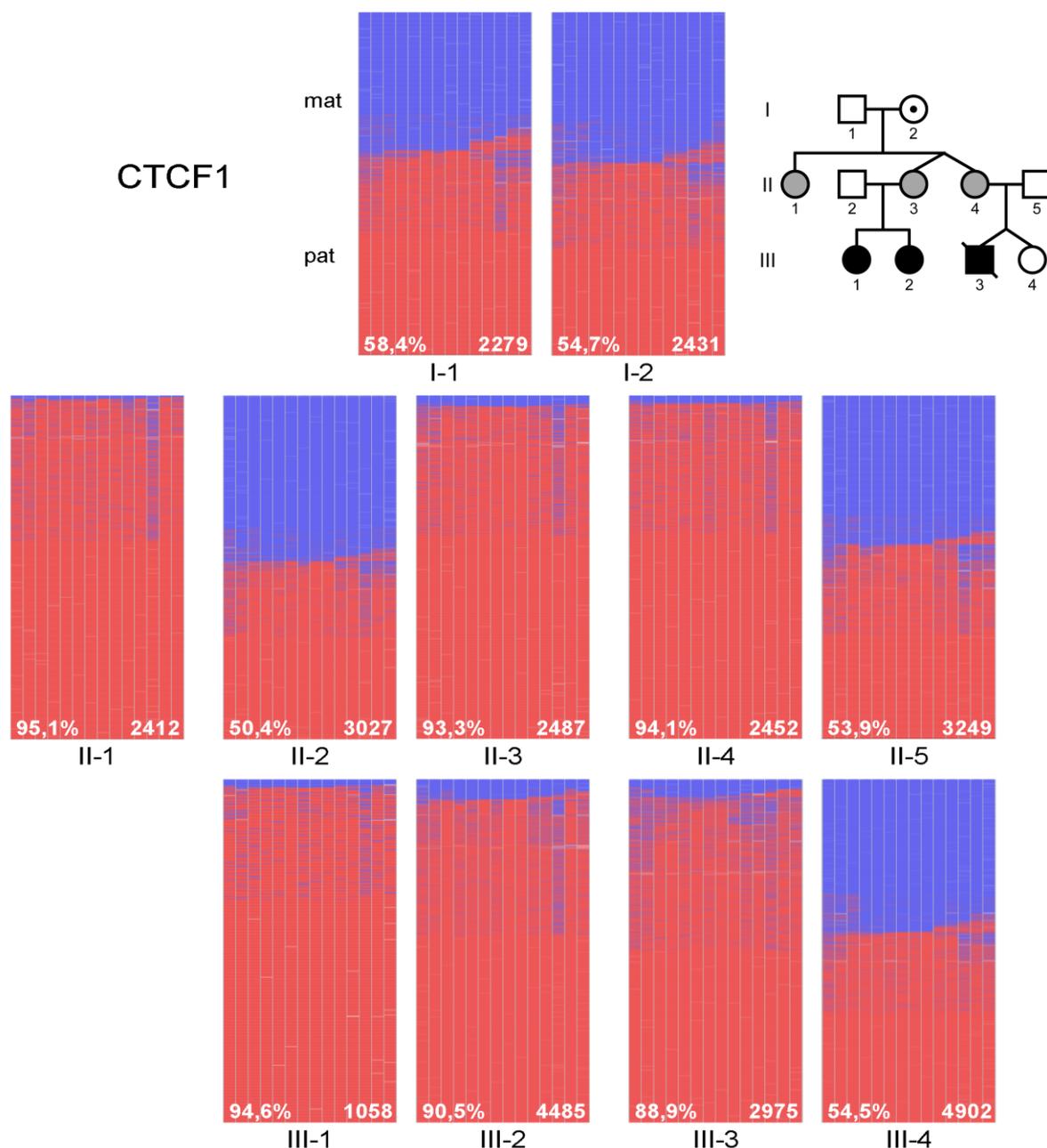


Abbildung 28: Ergebnisse der Methylierungsanalyse für die CTCF-Bindestelle 1

Die Abbildungen zeigen die Methylierung der verschiedenen Individuen der drei Generationen umfassenden Familie (siehe Stammbaum oben rechts) mit einer Punktmutation in einer OCT-Bindestelle. Die Individuen I-1 und I-2 (Großeltern), II-2 und II-5 (Väter der Kinder) sowie III-4 sind gesund und zeigen eine Methylierung um 50 %, was den Erwartungen an einen dem Imprinting unterliegenden Locus entspricht. Die Schwestern II-1, II-3 und II-4 sowie die drei an BWS erkrankten Kinder (III-1, III-2 und III-3) zeigen hingegen eine starke Hypermethylierung um 90 %.

Die Zahlen in der linken unteren Ecke zeigen die durchschnittliche Methylierung an, die Zahlen unten rechts die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen.

Blau – unmethyliert; rot – methyliert; weiß – fehlende Sequenzinformation; Spalte – CpG-Dinukleotid; Reihe – Einzelsequenz. Beim Stammbaum steht grau für Großwuchs, schwarz für BWS. Verändert nach Berland et al. 2013.

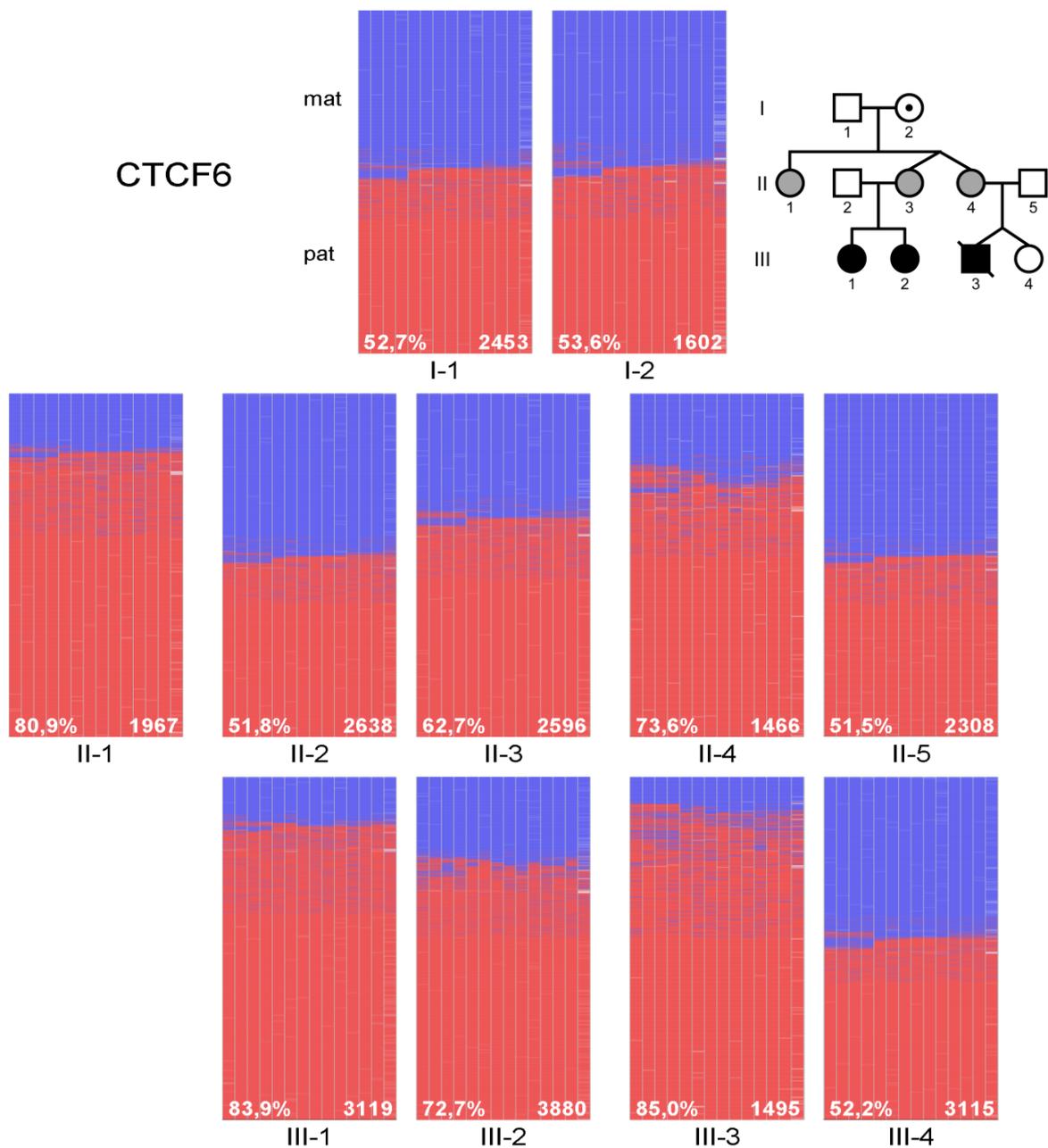


Abbildung 29: Ergebnisse der Methylierungsanalyse für die CTCF-Bindestelle 6

Die Abbildungen zeigen die Methylierung der verschiedenen Individuen der drei Generationen umfassenden Familie (siehe Stammbaum oben rechts) mit einer Punktmutation in einer OCT-Bindestelle. Die Individuen I-1 und I-2 (Großeltern), II-2 und II-5 (Väter der Kinder) sowie III-4 sind gesund und zeigen eine Methylierung um 50 %, was den Erwartungen an einen dem Imprinting unterliegenden Locus entspricht. Die Schwestern II-1, II-3 und II-4 zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hypermethylierung mit 62,7, 73,6 bzw. 80,9 %. Im Vergleich mit ihren Müttern zeigen die drei an BWS erkrankten Kinder (III-1, III-2 und III-3) eine stärkere Hypermethylierung mit 83,9 bzw. 72,7 % sowie 85,0 %.

Die Zahlen in der linken unteren Ecke zeigen die durchschnittliche Methylierung an, die Zahlen unten rechts die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen.

Blau – unmethyliert; rot – methyliert; weiß – fehlende Sequenzinformation; Spalte – CpG-Dinukleotid; Reihe – Einzelsequenz. Beim Stammbaum steht grau für Großwuchs, schwarz für BWS. Verändert nach Berland et al. 2013.

3.4 Mikrodeletionen in der geimprinteten Region auf Chromosom 14q32

Die geimprintete Region auf Chromosom 14q32 beinhaltet die paternal exprimierte Gene *DLK1* und *RTL1*, die maternal exprimierte Gene *MEG3* (alias *GTL2*), *RTL1as*, *MEG8* sowie ein snoRNA- und ein miRNA-Cluster. Das Imprinting wird durch zwei DMRs reguliert, die beide als ICRs der Region agieren (Abbildung 34). Die sogenannte IG-DMR (*intergenic* DMR) liegt zwischen *DLK1* und *MEG3*, die *MEG3*-DMR im Promotorbereich des *MEG3*-Gens. Beide DMRs sind auf dem maternalen Allel unmethyliert und auf dem paternalen Allel methyliert. Der Imprint der IG-DMR wird primär in der Keimbahn gesetzt, bei der *MEG3*-DMR hingegen erfolgt dies erst sekundär nach der Fertilisation.

Im Folgenden wurden Patienten mit upd(14)pat-Syndrom und deren Eltern untersucht und molekulargenetisch charakterisiert.

Patient 1

Patient 1 zeigte die klassischen phänotypischen Merkmale einer upd(14)pat mit u.a. einem kleinen, glockenförmigen Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen. Am Institut für Humangenetik in Lübeck wurde zunächst eine MS-PCR für die *MEG3*-DMR durchgeführt, die nur ein Produkt für das methylierte paternale Allel zeigte. Eine Mikrosatellitenanalyse auf Familienebene zeigte eine biparentale Vererbung, so dass beim Patienten eine uniparentale Disomie ausgeschlossen werden konnte. Der Phänotyp musste daher entweder auf eine Deletion oder eine Epimutation zurückzuführen sein. Die weiteren Analysen wurden am Institut für Humangenetik in Essen durchgeführt. Hier wurde von Frau Christina Lich eine MS-MLPA durchgeführt, die mehrere Sonden in der geimprinteten Region auf Chromosom 14q32 beinhaltet (SALSA MLPA Kit ME032-X1, MRC Holland). Die MS-MLPA bestätigte die Ergebnisse der MS-PCR für die *MEG3*-DMR und zeigte außerdem bei insgesamt neun Sonden eine Dosisreduktion von ~ 50 %, was indikativ für eine heterozygote Deletion ist. Diese neun Sonden lagen im Bereich der Gene *MEG3*, *RTL1* und einem Teil des miRNA-Clusters. Zusammengenommen mit dem Ergebnis der methylierungsspezifischen Sonden der MS-MLPA im Bereich der *MEG3*-DMR ergab sich daraus, dass die Deletion auf dem unmethylierten maternalen Allel liegen muss. Dies konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durch die Analyse mehrerer innerhalb der Deletion lokalisierter SNPs bestätigt werden (Abbildung 30).

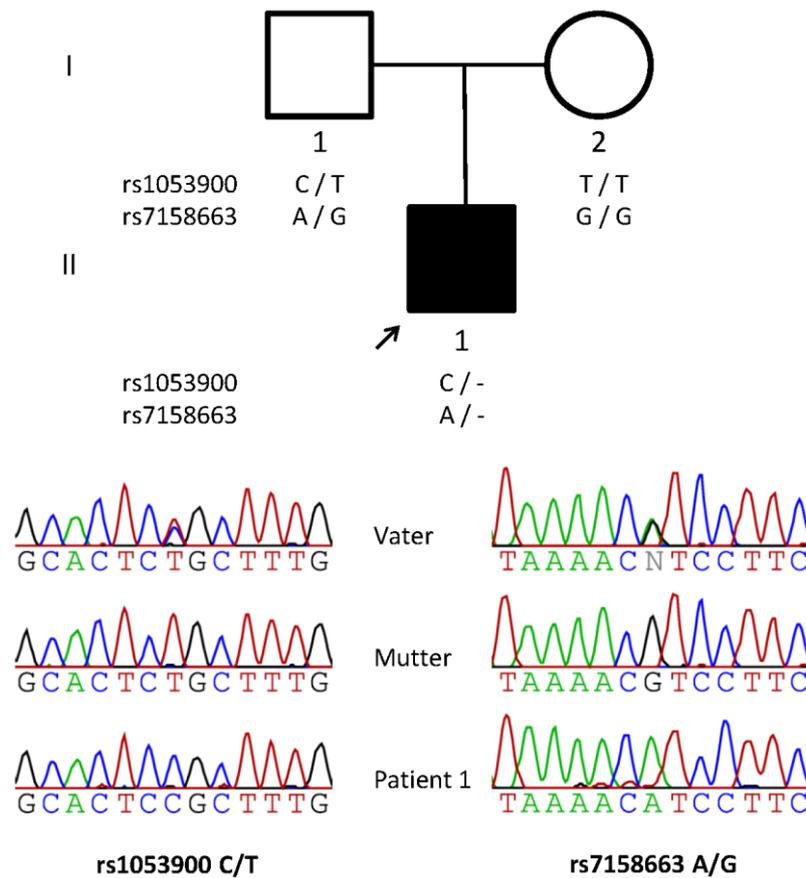


Abbildung 30: Stammbaum Patient 1 mit den Ergebnissen der Sequenzierung ausgewählter SNPs zur Bestimmung des deletionstragenden Allels

Die Abbildung zeigt im oberen Teil den Stammbaum der Familie von Patient 1 mit den Angaben der sequenzierten SNPs. Diese zeigen, dass beim Patienten nur das maternale Allel vorhanden ist. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der beiden SNPs rs1053900 und rs7158663 sind im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

durchgeführte Datenanalyse zeigte eine ca. 165 kb große Deletion im Bereich von *MEG3* bis zum 5' Ende des miRNA-Clusters an (Abbildung 31A). Zur exakten Charakterisierung der Bruchpunkte wurde eine longrange PCR etabliert und das Produkt des deletionstragenden Allels sequenziert (Abbildung 31B). Die Deletion hat eine Größe von 165,153 kb (chr14:101285913-101451066, hg19) und zeigte im Vergleich zur Referenzsequenz eine 6 bp große Insertion (TTCCCC) zwischen den Bruchpunkten. Insgesamt umfasste die Deletion die *MEG3*-DMR, die Gene *MEG3*, *RTL1*, *MEG8*, das gesamte snoRNA- sowie den Großteil des miRNA-Clusters (Übersicht in Abbildung 34). Im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Deletionen in der Region 14q32 ist bei Patient 1 die IG-DMR nicht betroffen

Bei der gesunden Mutter zeigte die MS-MLPA ein normales Ergebnis ohne Hinweis auf das Vorhandensein einer Deletion, so dass diese im Patienten entweder durch ein *de novo* Ereignis entstanden ist oder auf einem Keimbahnmosaik der Mutter beruht.

Um die Größe der Deletion genauer zu charakterisieren, wurde eine Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 Analyse im Biochip Labor von PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt. Die im Zuge der hier vorliegenden Arbeit

(Buiting et al. 2008; Kagami et al. 2008; Bena et al. 2010). Eine detaillierte Methylierungsanalyse der *MEG3*- und der IG-DMR erfolgte mittels Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior (siehe Kapitel 3.4.1).

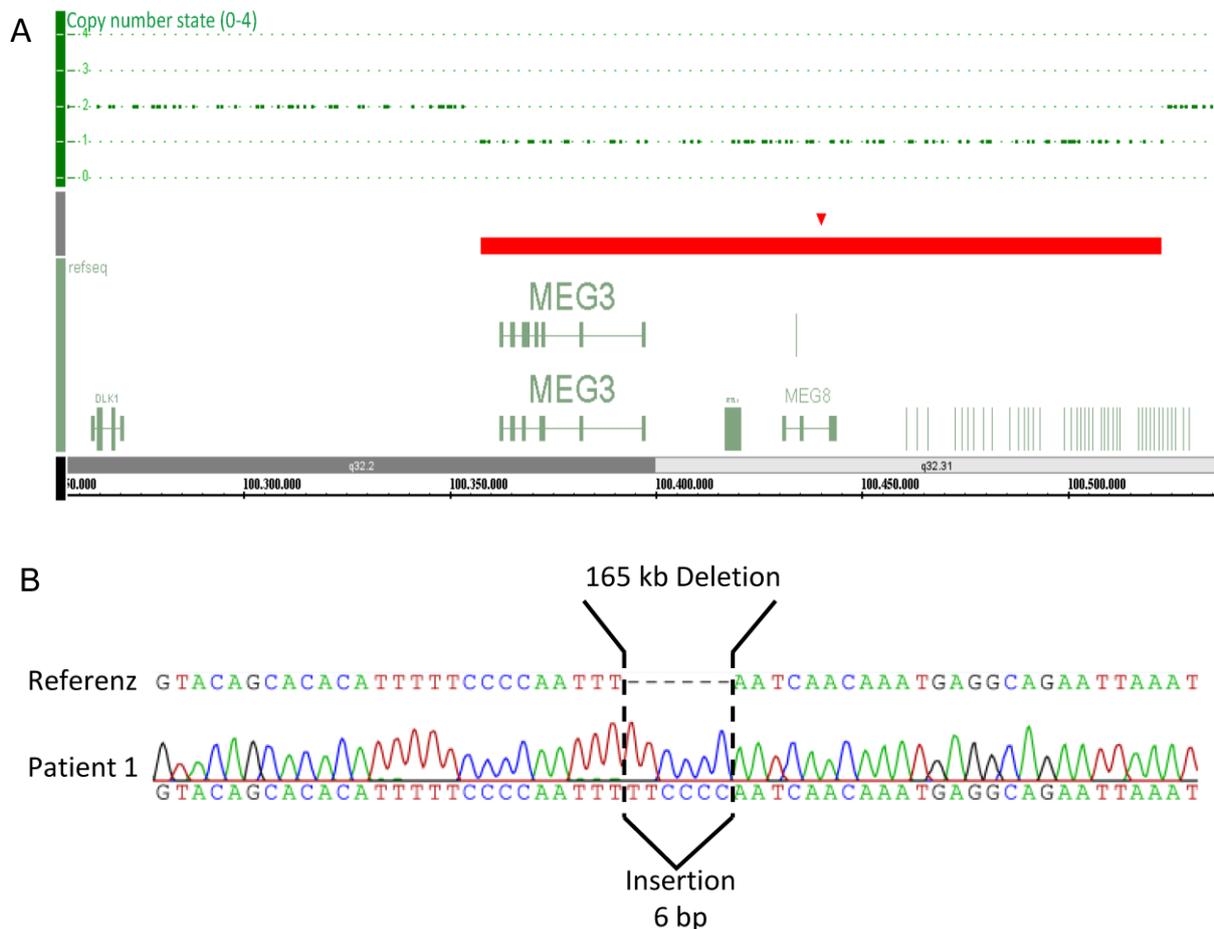


Abbildung 31: Auswertung der SNP Array Daten und Ergebnisse der Charakterisierung der Bruchpunkte mittels Sanger-Sequenzierung

Die Abbildung zeigt in (A) die mittels Affymetrix 6.0 SNP Array ermittelte Deletion. Der oberste Teil zeigt den sogenannten *copy number state* an, was der Anzahl der detektierten Kopien entspricht. Dies setzt sich aus den Daten der einzelnen Sonden des Arrays zusammen, die als Punkte dargestellt sind. Punkte auf der mit 2 gekennzeichneten Linie zeigen zwei Kopien und damit den Normalzustand für einen autosomalen Bereich an. Im Bereich der Deletion, die mittig mit einem roten Balken gekennzeichnet ist, zeigen die Sonden das Vorhandensein nur einer Kopie an. Im unteren Teil der Abbildung sind die in diesem Bereich lokalisierten Gene (nach RefSeq, hg18) verzeichnet. Darunter befinden sich die entsprechenden Angaben für Position und chromosomale Bande.

Teil (B) zeigt die Bruchpunkte der Deletion, die mittels Sanger-Sequenzierung des longrange PCR-Produktes ermittelt wurden. Im Vergleich mit der Referenzsequenz zeigte sich eine 6 bp große Insertion. Die Deletion selbst hatte eine Größe von 165,153 kb.

Teil (B) verändert aus Beygo et al. 2014.

Patienten 2 und 3

Patient 2 (II-3, Abbildung 32) zeigte, genau wie seine später geborene Schwester (Patientin 3, II-4), die phänotypischen Merkmale eines upd(14)pat-Syndroms inkl. der charakteristischen Thoraxdeformation (kleiner, glockenförmiger Thorax mit kleiderbügelartig geformten Rippen). Auch bei diesen Patienten zeigte eine zunächst durchgeführte Analyse mittels MS-PCR (Institut für Humangenetik Aachen) nur eine Bande für das methylierte paternale Allel. Eine uniparentale Disomie konnte durch die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse,

die eine biparentale Vererbung zeigte, ausgeschlossen werden. Der Anfangsverdacht war damit, wie schon beim zuvor beschriebenen Patienten 1, zunächst ebenfalls ein upd(14)pat-Syndrom aufgrund einer Epimutation oder Deletion. Aufgrund des familiären Auftretens wäre eine Epimutation ohne zugrunde liegende Sequenzveränderung jedoch recht unwahrscheinlich. Um zu überprüfen, ob eine Deletion vorliegt, wurde zunächst eine qPCR durchgeführt, die im Bereich *upstream* des *MEG3*-Promotors lag und eine normale Dosis zeigte. Die (später, nach Einführung des MS-MLPA Kits) von Frau Christina Lich (Institut für Humangenetik, Essen) bei den Patienten 2 und 3 durchgeführte Methylierungsanalyse für Chromosom 14 (SALSA MLPA KitME032-X1, MRC Holland) zeigte ebenfalls, dass ausschließlich das methylierte Allel der *MEG3*-DMR vorhanden war. Weiterhin zeigte die Gendosisanalyse per MLPA bei drei Sonden eine um ~ 50 % reduzierte Dosis, was auf eine heterozygot vorliegende Deletion hindeutet. Die Methylierung weist darauf hin, dass diese Deletion auf dem maternalen Allel liegen muss. Aufgrund der MLPA-Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit eine longrange PCR etabliert, um die Deletion zu verifizieren und die Bruchpunkte zu bestimmen. Die Sequenzierung des deletionstragenden Allels ergab, dass die Deletion eine Größe von 5,8 kb (5,823 kb; chr14:101291322-101297145, hg19) hat und die komplette *MEG3*-DMR sowie die Exons 1 bis 3 des *MEG3*-Gens umfasst, nicht jedoch die

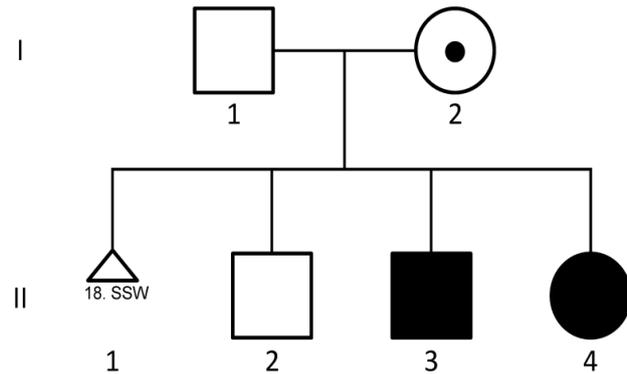


Abbildung 32: Stammbaum der Familie mit Deletion in 14q32

Der Stammbaum zeigt die Mitglieder der Familie. Die Mutter (I-2) ist gesunde Überträgerin der Deletion, die sie im Mosaik auf ihrem methylierten, paternalen Allel trägt. Zu II-1 sind keine Daten verfügbar. Patient 2 (II-3) und Patientin 3 (II-4) haben das upd(14)pat-Syndrom aufgrund der maternal ererbten Deletion. Aus Beygo et al. 2014.

IG-DMR (Abbildung 33, Übersicht in Abbildung 34). Die Deletion konnte mittels Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix), der am Institut für Humangenetik in Aachen durchgeführt wurde, mit Standardanalyseparametern nicht detektiert werden. Eine retrospektive Analyse der Daten zeigte, dass nur zwei Sonden innerhalb der Deletion lagen und damit eine Detektion der Deletion nicht möglich war.

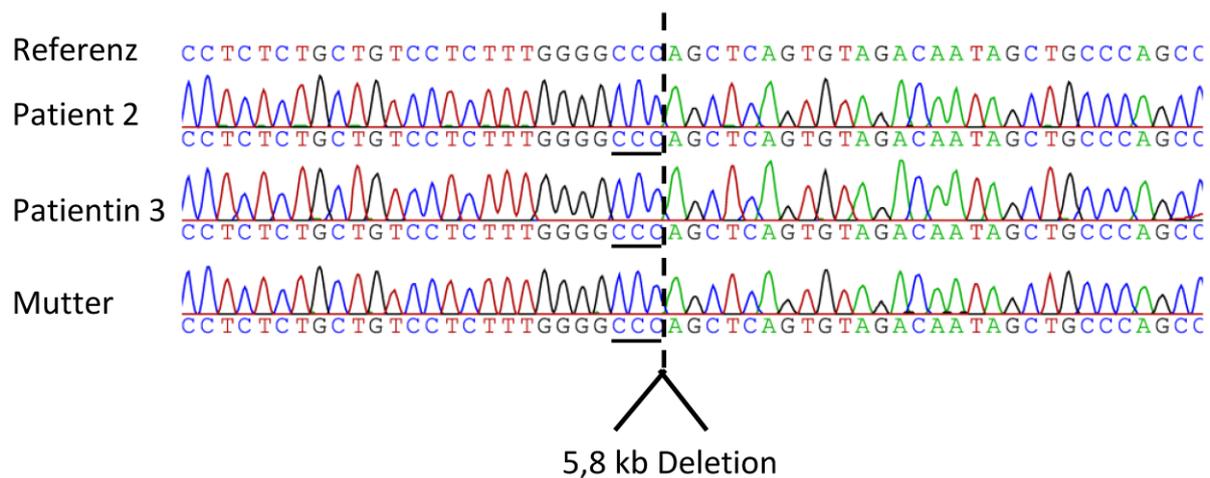


Abbildung 33: Ergebnis der Bruchpunktcharakterisierung bei den Patienten 2 und 3 sowie ihrer Mutter

Die Abbildung zeigt das Resultat der Sanger-Sequenzierung der longrange PCR. Oben ist zum Vergleich die Referenzsequenz abgebildet. Darunter folgen die Elektropherogramme für Patient 2, Patientin 3 und deren Mutter. Der Bruchpunkt ist durch die gestrichelte vertikale Linie gekennzeichnet. Die Größe der Deletion beträgt 5,823 kb. Die drei aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen (unterstrichen) können sowohl am 5'- als auch am 3'-Bruchpunkt der Deletion stehen. Verändert nach Beygo et al. 2014.

Bei der phänotypisch unauffälligen Mutter (I-2) wurde sowohl mittels MS-MLPA als auch durch longrange PCR das Vorhandensein der gleichen Deletion nachgewiesen. Bei der MLPA konnte dabei eine Dosisreduktion der drei Sonden von jeweils ~ 30 % beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Deletion hier im Mosaik vorliegt. Da die Methylierungsanalyse der MS-MLPA für die *MEG3*-DMR eine Methylierung von insgesamt ~ 36 % zeigte, deutete dies darauf hin, dass die Deletion bei ihr die paternale Kopie des Chromosoms 14 betrifft (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der MS-MLPA der Patienten 1 - 3 sowie der Mutter von P2 und 3

Proben ID	nt	Dosis			
		Patient 1	Patient 2	Patientin 3	Mutter P2&3
<i>DLK1</i> _L17777	283	0,976	0,905	0,888	1,048
<i>DLK1</i> _L18818	347	1,029	0,984	1,000	1,095
<i>MEG3</i> _up_L17766	172	0,953	0,952	1,008	1,086
<i>MEG3</i> _up_L17762	141	0,960	0,910	1,067	1,081
<i>MEG3</i> _up_L19613	382	1,051	1,054	0,918	0,973
<i>IG-DMR</i> _L17784	357	1,116	0,918	0,994	1,009
<i>IG-DMR</i> _L17767	177	1,029	0,953	1,046	1,022
<i>MEG3</i> _L18942	220	0,495	0,499	0,502	0,748
<i>MEG3</i> _L17779	328	0,491	0,482	0,533	0,750
<i>MEG3</i> _L17778	300	0,515	0,469	0,480	0,741
<i>MEG3</i> _L17783	373	0,473	0,891	0,912	1,062
<i>MEG3</i> _L17785	391	0,554	0,985	0,947	1,019
<i>RTL1</i> _L18868	424	0,490	0,900	0,841	1,027
<i>RTL1</i> _L18861	236	0,442	0,928	0,844	1,009
<i>RTL1</i> _L17782	340	0,541	0,967	0,973	1,071
<i>RTL1</i> _L18820	274	0,571	1,132	1,079	0,979
<i>MIR380</i> _L18862	247	0,994	0,933	0,892	1,060
<i>MIR380</i> _L18864	311	0,954	0,976	0,983	1,097
<i>MIR380</i> _L18865	319	0,934	0,952	1,004	1,030
<i>MIR380</i> _L18866	398	0,991	1,022	1,052	1,112
<i>MIR380</i> _L18867	414	1,127	1,102	1,134	0,936
Proben ID	nt	Methylierung			
<i>MEG3</i> _L18942	220	1,17 ↑	1,24 ↑	1,43 ↑	0,37 ↓
<i>MEG3</i> _L17778	300	1,21 ↑	1,17 ↑	1,26 ↑	0,35 ↓
<i>MEG3</i> _L17779	328	0,80 ↑	1,04 ↑	1,01 ↑	0,27 ↓

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der MS-MLPA für die drei untersuchten Patienten sowie die Mutter der Patienten 2 und 3 zusammen. Der obere Teil zeigt die Gendosis der 21 MLPA-Sonden in der Region 14q32 an, während der untere Teil die Methylierung an drei Positionen innerhalb der *MEG3*-DMR wiedergibt. Die Lage der Sonden ist in Abbildung 34 dargestellt.

Eine Gendosis von ~ 1,0 zeigt den Normalzustand mit zwei vorhandenen Allelen an, eine Gendosis von ~ 0,5 eine heterozygote Deletion. Die Sonden, die eine Deletion anzeigen (neun bei Patient 1, drei bei den Patienten 2 und 3) sind grau unterlegt. Bei ihrer Mutter liegen die Werte der Sonden bei ~ 0,7 was auf das Vorliegen der Deletion im Mosaik hindeutet.

Die Werte der drei methylierungsspezifische MLPA-Sonden zeigen bei allen Patienten eine erhöhte Methylierung der *MEG3*-DMR an (↑), was mit den Ergebnissen der MS-PCRs übereinstimmt. Bei einer gesunden Person wäre nur eines von zwei Allelen methyliert, was einem Methylierungswert von ~ 0,5 entspräche. Die Mutter der Patienten 2 und 3 zeigt mit ~ 0,3 eine weniger starke Methylierung in diesem Bereich (↓), was impliziert, dass die Deletion im Mosaik bei ihr auf dem methylierten paternalen Allel liegt. P2 und 3 – Patienten 2 und 3. Verändert nach Beygo et al. 2014.

3.4.1 Hochdurchsatz-Methylierungsanalyse der *MEG3*- und der IG-DMR

Zur quantitativen Untersuchung der Methylierung der *MEG3*- und der IG-DMR, wurde die Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior genutzt. Dabei wurde die Methylierung der beiden DMRs bei folgenden Proben (jeweils DNA aus Blut) untersucht: beim hier beschriebenen Patient 1 mit einem upd(14)pat-Syndrom aufgrund einer 165 kb großen Deletion auf dem maternalen Allel, den hier beschriebenen Patienten 2 und 3 mit einem upd(14)pat-Syndrom aufgrund der maternal ererbten 5,8 kb großen Deletion und ihrer phänotypisch unauffälligen Mutter, die die Deletion im Mosaik auf ihrem paternalen Allel trägt. Weiterhin wurden der gesunde Vater der Patienten 2 und 3 als Normalkontrolle sowie vier weitere, nicht verwandte Normalkontrollen untersucht. Außerdem wurde eine Patientin mit einer 4,3 kb großen Deletion auf dem maternalen Allel, die die *MEG3*-, aber nicht die IG-DMR betrifft (Kagami et al. 2010; Probe freundlicherweise von Andrew Green, Dublin, Irland zur Verfügung gestellt) sowie zum Vergleich jeweils ein Patient mit upd(14)pat und upd(14)mat analysiert.

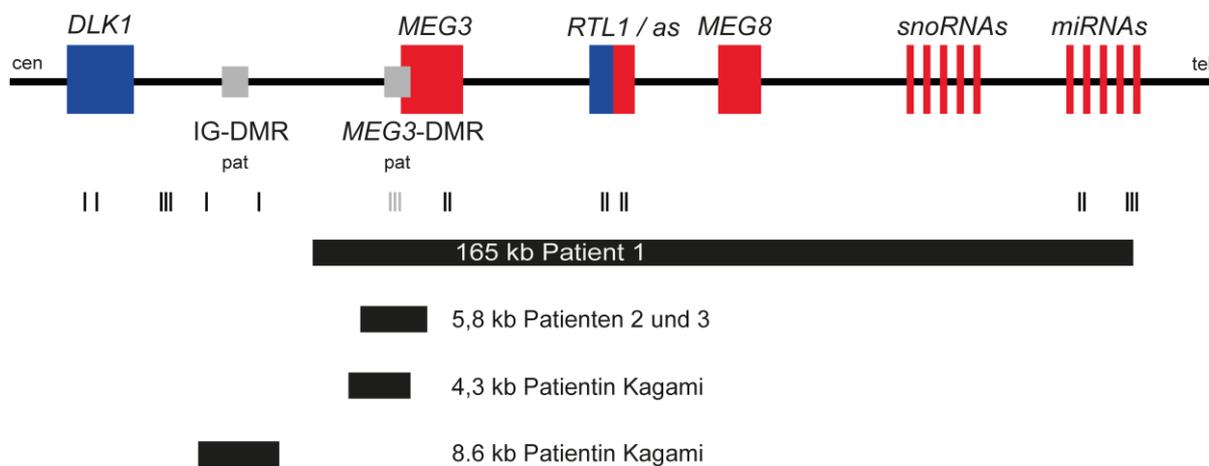


Abbildung 34: Übersicht der Region 14q32 mit Mikrodeletionen und MS-MLPA-Sonden

Die Darstellung zeigt die paternal (blau) und maternal (rot) exprimierte Gene der Region 14q32 zusammen mit der IG- und der *MEG3*-DMR, die beide als ICR fungieren (graue Kästchen, beide auf dem paternalen Allel (pat) methyliert) sowie den in der Region liegenden MS-MLPA-Sonden. Schwarze Striche stehen für MLPA-Sonden, die die Dosis wiedergeben; graue Striche für methylierungsspezifische MLPA-Sonden. Weiterhin sind die Deletionen der hier beschriebenen Patienten 1 (165 kb) sowie 2 und 3 (5,8 kb) abgebildet. Außerdem ist die 4,3 kb große Deletion der von Kagami et al. 2010 beschriebenen und hier ebenfalls untersuchten Patientin dargestellt, sowie die im gleichen Artikel beschriebene 8,6 kb große Deletion. Letztere führt, im Gegensatz zu den anderen hier abgebildeten Deletionen, zum Verlust der IG-DMR und nicht der *MEG3*-DMR. Ohne Maßstab. Verändert nach Beygo et al. 2014.

Die Methylierung wurde innerhalb der *MEG3*-DMR an 11, in der IG-DMR an 15 CpG-Dinukleotiden untersucht. Für die *MEG3*-DMR konnte bei den vier Normalkontrollen sowie dem gesunden Vater der Patienten 2 und 3 eine über alle analysierten CpGs einheitliche Methylierung von durchschnittlich ~ 50 % (Spanne von 50,0 - 54,2 %) beobachtet werden, wie bei einem dem Imprinting unterliegenden Locus erwartet. Beim Patienten mit upd(14)mat zeigte sich eine Restmethylierung von 8,2 %, was mit dem Vorliegen eines maternalen Imprints auf dem eigentlich methylierten paternalen Allel korrespondiert. Im umgekehrten Fall, der upd(14)pat, konnte eine fast vollständige Methylierung von 95,7 % ermittelt werden, was ebenfalls den Erwartungen entspricht. Alle drei hier untersuchten Patienten (Patienten 1 bis 3) sowie die bereits in der Literatur beschriebene Patientin (Patientin Kagami* in Abbildung 35; Patientin mit der 4,3 kb großen Deletion, bezeichnet als Patient 2 in Kagami et al. 2010) zeigten ähnlich hohe Methylierungslevel zwischen 91 und 97 % (Patient 1: 93,8 %, Patient 2: 97,0 %, Patientin 3: 97,6 %, Patientin Kagami*: 91,7 %; Abbildung 35). Dies entspricht ebenfalls den Erwartungen, da nur noch das methylierte paternale Allel vorhanden ist. Bei der Mutter der Patienten 2 und 3, die die Deletion im Mosaik auf dem methylierten paternalen Allel trägt, konnte eine Methylierung von 36,8 % ermittelt werden, was mit dem Ergebnis der MS-MLPA übereinstimmt (Tabelle 9).

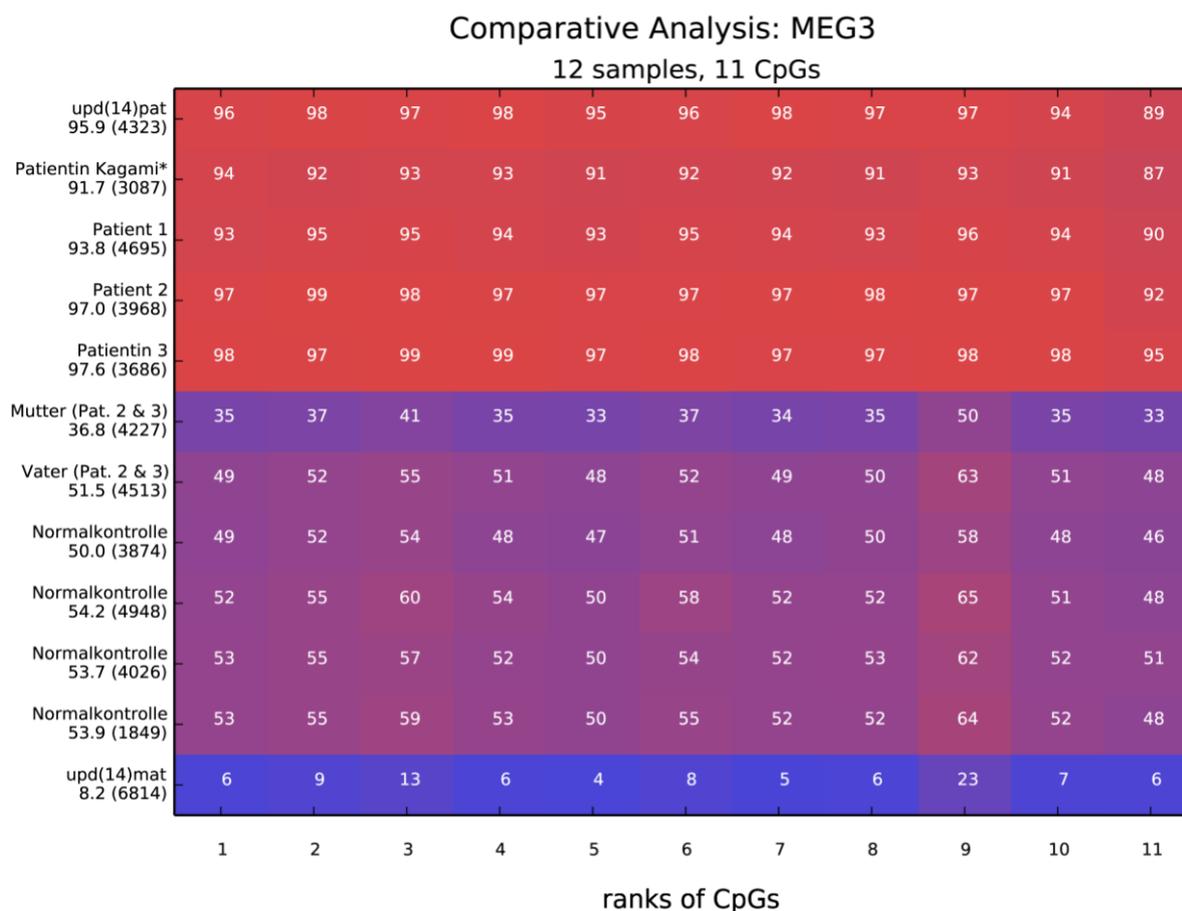


Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der Methylierungsergebnisse der *MEG3*-DMR

Die Abbildung fasst die mittels Hochdurchsatz-Bisulfitequenzierung gewonnenen Methylierungsdaten für die *MEG3*-DMR in Blut zusammen. Untersucht wurden die hier beschriebenen Patienten 1 - 3 mit Deletionen auf ihrem jeweiligen maternalen Allel, die Mutter der Patienten 2 und 3, die die Deletion im Mosaik auf ihrem paternalen Allel trägt, der Vater der Patienten 2 und 3, der als Normalkontrolle gewertet wird, vier weitere, nicht verwandte Normalkontrollen, ein weiterer Patient mit einer auf dem maternalen Allel lokalisierten Deletion der *MEG3*-DMR mit intakter IG-DMR (Patientin Kagami* mit der 4,3 kb großen Deletion aus Kagami et al. 2010) sowie zum Vergleich jeweils ein Patient mit upd(14)pat und upd(14)mat. Im Durchschnitt wurden 4168 Einzelsequenzen pro Probe analysiert.

Der Farbverlauf der *heatmap* zeigt den Grad der Methylierung an, wobei die Anzeige von blau (unmethyliert) über violett (~ 50 % Methylierung) zu rot (methyliert) verläuft. Jede Reihe steht für eine Probe, jede Spalte für eines der insgesamt 11 untersuchten CpG-Dinukleotide. Die Zahlen innerhalb der Quadrate geben die durchschnittliche Methylierung eines CpGs über alle analysierten Einzelsequenzen der jeweiligen Probe wieder. Die Zahlen unterhalb der Probenbezeichnung (linke Seite) geben die durchschnittliche Methylierung über das gesamte Amplicon sowie die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (in Klammern) an. Die Zahlen unterhalb der *heatmap* entsprechen der Nummer des jeweiligen CpGs.

Verändert nach Beygo et al. 2014.

Im Gegensatz zur *MEG3*-DMR zeigte sich bei der IG-DMR über die untersuchte Region mit 15 CpG-Dinukleotiden eine etwas uneinheitliche Verteilung der Methylierung. Im Durchschnitt lag sie bei den vier untersuchten Normalkontrollen sowie dem Vater der Patienten 2 und 3 zwischen 64,0 und 68,4 %. Nur bei drei der 15 analysierten CpGs zeigte sich eine differentielle Methylierung mit einem den Erwartungen an einen geimprinteten Locus entsprechenden Wert von ~ 50 % (Spanne 53,0 - 56,0 %; CpGs 6 - 8 Abbildung 36; Tabelle 10). Bei Betrachtung dieser drei CpGs zeigte sich für den Patienten mit einer upd(14)pat ein Methylierungswert von 90,3 %, während der Patient mit der upd(14)mat eine Restmethylierung von 9,7 % aufwies. Über die gesamte analysierte Region gesehen liegen die Werte hingegen bei 94,8 [upd(14)pat] bzw. 32,2 % [upd(14)mat]. Bei den hier untersuchten Patienten 1 bis 3 sowie der in der Literatur beschriebenen Patientin (Patientin Kagami* in Abbildung 36, Patientin mit der 4,3 kb großen Deletion aus Kagami et al. 2010) konnten Methylierungslevel zwischen 57,3 und 61,3 % für die CpGs 6 - 8 ermittelt werden, was in etwa im Bereich der Methylierungswerte der Normalkontrollen liegt. Für die Mutter der Patienten 2 und 3, welche die Deletion im Mosaik auf ihrem paternalen Allel trägt, ergab sich ebenfalls ein normaler Methylierungslevel von 58,3 % bei den CpGs 6 - 8. Bei Betrachtung der gesamten 15 CpGs zeigten interessanterweise alle Patienten an einzelnen, bestimmten CpG-Dinukleotiden (CpG 3, 11 und 14; Abbildung 36) eine leichte Hypermethylierung im Vergleich zu den Normalkontrollen.

Zusammengenommen zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen hochquantitativen Methylierungsergebnisse der *MEG3*- und der IG-DMR bei insgesamt vier Patienten, dass eine Deletion der *MEG3*-DMR auf dem unmethylierten und damit aktiven maternalen Allel im allgemeinen zu keiner Veränderung der Methylierung der IG-DMR führt, mit Ausnahme einzelner, ganz bestimmter CpG-Dinukleotide. Dass die Methylierung der IG-DMR durch die Deletion der *MEG3*-DMR nicht betroffen zu sein scheint, deckt sich mit Angaben aus der Literatur (Kagami et al. 2010), in der die Hypothese der hierarchischen Ordnung der beiden DMRs untereinander postuliert wurde. Diese Hypothese beruhte bisher nur auf der hier ebenfalls untersuchten Patientin mit der 4,3 kb Deletion (Patientin Kagami* in Abbildung 35 und 36; Kagami et al. 2010) sowie einer anderen Patientin, bei der die IG-DMR, nicht jedoch die *MEG3*-DMR deletiert ist (8,6 kb Deletion). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten stimmen mit den Ergebnissen von Kagami et al. (2010) überein.

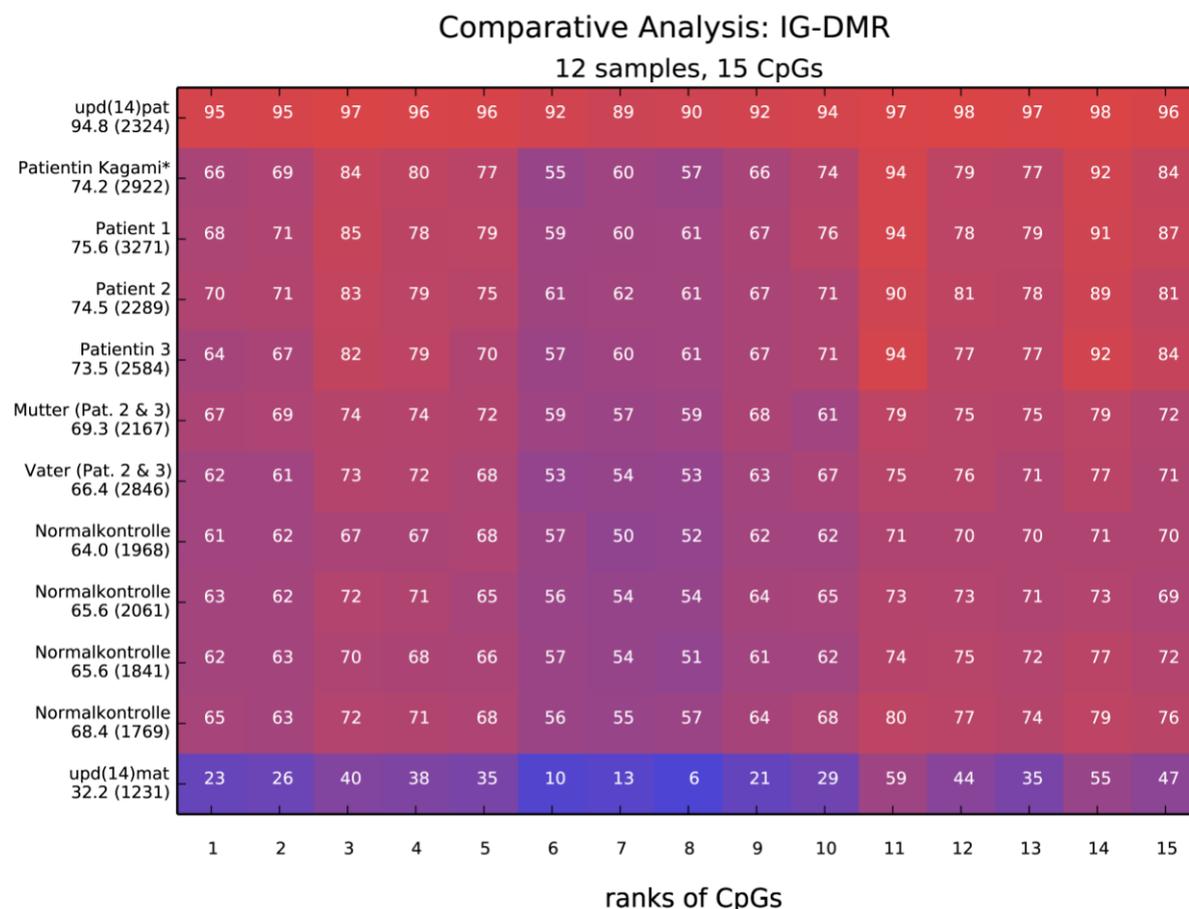


Abbildung 36: Vergleichende Darstellung der Methylierungsergebnisse der IG-DMR

Die Abbildung fasst die mittels Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung gewonnenen Methylierungsdaten für die IG-DMR in Blut zusammen. Untersucht wurden die hier beschriebenen Patienten 1 - 3 mit Deletionen auf ihrem jeweiligen maternalen Allel, die Mutter der Patienten 2 und 3, die die Deletion im Mosaik auf ihrem paternalen Allel trägt, der Vater der Patienten 2 und 3, der als Normalkontrolle gewertet wird, vier weitere, nicht verwandte Normalkontrollen, eine weitere Patientin mit einer auf dem maternalen Allel lokalisierten Deletion der *MEG3*-DMR mit intakter IG-DMR (Patientin Kagami* mit der 4,3 kb großen Deletion aus Kagami et al. 2010) sowie zum Vergleich jeweils ein Patient mit upd(14)pat und upd(14)mat. Im Durchschnitt wurden 2273 Einzelsequenzen pro Probe analysiert.

Der Farbverlauf der *heatmap* zeigt den Grad der Methylierung an, wobei die Anzeige von blau (unmethyliert) über violett (~ 50 % Methylierung) zu rot (methyliert) verläuft. Jede Reihe steht für eine Probe, jede Spalte für eines der insgesamt 15 untersuchten CpG-Dinukleotide. Die Zahlen innerhalb der Quadrate geben die durchschnittliche Methylierung eines CpGs über alle analysierten Einzelsequenzen der jeweiligen Probe wieder. Die Zahlen unterhalb der Probenbezeichnung (linke Seite) geben die durchschnittliche Methylierung über das gesamte Amplicon sowie die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (in Klammern) an. Die Zahlen unterhalb der *heatmap* entsprechen der Nummer des jeweiligen CpGs.

Verändert nach Beygo et al. 2014.

Tabelle 10: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung der beiden DMRs auf Chromosom 14q32.

Probe	<i>MEG3</i> -DMR		IG-DMR		
	# Einzelsequenzen	Ø Methylierung [%]	# Einzelsequenzen	Ø Methylierung [%]	
				Gesamt	CpGs 6 - 8
upd(14)pat	4323	95,9	2324	94,8	90,3
Patientin Kagami*	3087	91,7	2922	74,2	57,3
Patient 1	4695	93,8	3271	75,6	60,0
Patient 2	3968	97,0	2289	74,5	61,3
Patientin 3	3686	97,6	2584	73,5	59,3
Mutter (Patienten 2 & 3)	4227	36,8	2167	69,3	58,3
Vater (Patienten 2 & 3)	4513	51,5	2846	66,4	53,3
Normalkontrolle	3874	50,0	1968	64,0	53,0
Normalkontrolle	4948	54,2	2061	65,6	54,7
Normalkontrolle	4026	53,7	1841	65,6	54,0
Normalkontrolle	1849	53,9	1769	68,4	56,0
upd(14)mat	6814	8,2	1231	32,2	9,7

Die Tabelle gibt die durchschnittliche Methylierung über alle analysierten Einzelsequenzen und CpGs wieder (*MEG3*-DMR: 11 CpGs; IG-DMR: 15 CpGs). Im Durchschnitt wurden 3220 Einzelsequenzen pro Probe analysiert (*MEG3*-DMR: 4168; IG-DMR: 2273).

* Patientin mit der 4,3 kb großen Deletion aus Kagami et al. 2010.

4. Diskussion

4.1 Genomweite Suche nach *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren mittels SNP-Arrays in PWS- und AS-Patienten mit einem Imprintingdefekt

Imprintingdefekte auf Chromosom 15q11q13 können durch eine primäre Epimutation ohne zugrunde liegende Sequenzveränderung oder sekundär z.B. durch eine IC-Deletion in *cis* bedingt sein. Dabei gehen IC-Deletionen (~ 10 %) mit einem Wiederholungsrisiko von 50 % einher, während primäre Epimutationen in der Regel (~ 90 %) sporadisch auftreten (Horsthemke 2010). Die Methylierungsdefekte bei primären IDs gehen dabei auf Fehler bei der Reprogrammierung des Imprints zurück. Bei PWS-Patienten scheint ein Fehler bei der Auslöschung des Methylierungsprints vorzuliegen, da bei allen informativen Familien gezeigt werden konnte, dass das großmütterliche Allel väterlicherseits betroffen ist (Buiting et al. 1998 und 2003). Bei AS-Patienten hingegen scheinen neben Fehlern bei der Neuetablierung des Imprints auch Fehler bei der Aufrechterhaltung kausal zu sein, da bei ca. der Hälfte der AS-Patienten Methylierungsdefekte im Mosaik vorliegen. Ein Teil der IDs geht wahrscheinlich auf stochastisch auftretende Fehler zurück, die möglicherweise durch eine Reihe von genetischen und Umweltfaktoren (SNPs, Haplotypen, Alter der Eltern, Folsäurelevel, prä- und postovulatorische Alterung von Oozyten, etc.) beeinflusst werden (Murrell et al. 2004; Zogel et al. 2006; Liang et al. 2008; Peters et al. 2010). Um *cis*- und *trans*-wirkende genetische Faktoren bei AS- und PWS-Patienten zu identifizieren, wurde mittels Affymetrix 6.0 SNP Array genomweit nach Kopienzahlveränderungen gesucht. Dabei konnten jedoch weder in *cis* noch in *trans* relevante Veränderungen detektiert werden. Auch zeigten sich bei keinem der Patienten Deletionen oder Duplikationen mit einer Größe über 1 Mb, welche am häufigsten mit einer pathogenen Wirkung assoziiert sind (Buysse et al. 2009; Gijbbers et al. 2011). Weiterhin konnten keine rekurrenten CNVs beobachtet werden mit Ausnahme von zwei CNVs auf Chromosom 15 (jeweils 20 kb) und einem CNV auf Chromosom 12, die jeweils bei zwei Patienten beobachtet werden konnten. Die CNVs liegen in Genwüsten bzw. sind mittlerweile als bekannte Varianten beschrieben und wurden daher als nicht relevant erachtet. Nur bei einem Patienten lagen zwei *de novo* Deletionen vor. Alle anderen untersuchten CNVs konnten auch bei den gesunden Eltern nachgewiesen werden. Die in diesen CNVs liegenden Gene stehen jedoch in keinem bekannten Zusammenhang mit epigenetischen Prozessen.

Mit der hier angewandten Methode können kleine Deletionen oder Punktmutationen in Genen oder Sequenzbindestellen nicht detektiert werden. Um solche Defekte in *cis* oder *trans* identifizieren zu können, müssten weitere Untersuchungen mit mittlerweile verfügbaren Methoden wie z.B. *whole exome* oder *whole genome sequencing* durchgeführt werden.

Deletionen oder Duplikationen in den nicht näher analysierten Genwüsten könnten – wie auch CNVs, die Gene enthalten – regulatorische Elemente, wie z.B. Enhancer, beinhalten, die auf weiter entfernt liegende Gene wirken. Solche Zusammenhänge lassen sich jedoch nur sehr schwer überprüfen und auch hier deutet der Mangel an rekurrenten CNVs darauf hin, dass die hier detektierten CNVs nicht im Zusammenhang mit Imprintingstörungen bei AS oder PWS stehen. Weiterhin könnte das Zusammenspiel von mehreren CNVs, auch unter dem Gesichtspunkt von unvollständiger Penetranz, variabler Expression oder äußeren Faktoren, eine Rolle bei der Ätiologie von IDs spielen (Gijsbers et al. 2011). Jedoch würde man in solch einem Fall ebenfalls rekurrente CNVs erwarten, auch wenn die Analyse solch komplexer Netzwerke nur sehr schwer zu bewerkstelligen ist.

Interessanterweise wurden bei Studien zu Multilocus-Imprintingdefekten keine Patienten mit AS oder PWS und einem solchen Defekt beschrieben und der *SNRPN*-Locus war nur in sehr seltenen Fällen mitbetroffen (Blik et al. 2009; Azzi et al. 2009; Court et al. 2013; Boonen et al. 2013; Poole et al. 2013; Eggermann et al. 2014b). Im Gegensatz dazu konnten bei BWS- und SRS-Patienten in ca. 10 - 20 % der Fälle ein Multilocus-Imprintingdefekt beobachtet werden (zusammengefasst in Eggermann et al. 2014b). Damit scheinen bei den neurogenetischen Imprintingerkrankungen AS und PWS andere *trans*-Faktoren involviert zu sein als bei BWS, SRS und TNDM, die mit einem veränderten Größenwachstum assoziiert sind. Es wäre auch möglich, dass die Methylierung an Chromosom 15q11q13 stabiler in Bezug auf Effekte in *trans* ist.

4.2 Suche nach neuen geimprinteten Genen

Methylierungsveränderungen an mehreren geimprinteten Loci wurden in den letzten Jahren bei einigen Patienten mit u.a. BWS oder SRS oder im Zusammenhang mit Mutationen in sogenannten *maternal effect* Genen bei den Müttern beschrieben (zusammengefasst in Azzi et al. 2009; siehe Kapitel 1.1.3). Eines dieser Gene ist *NLRP7*, bei dem homozygote und compound heterozygote Mutationen in der Mehrheit der Fälle zu rekurrenten biparentalen

Molschwangerschaften führen (Nguyen und Slim 2014). Dabei kommt es nur zur Entwicklung eines Trophoblasten, jedoch keines bzw. kaum embryonalen Gewebes. Nur in sehr seltenen Fällen werden Kinder lebend geboren.

Wir hatten die Möglichkeit einen Patienten mit Multilocus-Methylierungsdefekt zu untersuchen, bei dessen Mutter eine heterozygote Mutation in *NLRP7* beobachtet wurde (Caliebe et al. 2014). Diese Mutation wurde zuvor auch im heterozygoten Zustand als kausal beschrieben (Messaed et al. 2011), jedoch ist sie als Variante in der SNP-Datenbank (rs104895526, dbSNP build 141) und auch beim *1000 Genomes*-Projekt mit geringer Frequenz verzeichnet (www.1000genomes.org; Caliebe et al. 2014). Da auch die Großmutter diesen Basenaustausch trägt, ohne jedoch einen Phänotyp zu zeigen, ist eine Kausalität fraglich. Möglicherweise ist eine zusätzliche, bisher nicht beschriebene Veränderung in der Mutter beteiligt.

Erste molekulargenetische Untersuchungen in Blut des Patienten zeigten Methylierungsveränderungen an vielen geimprinteten Loci (Caliebe et al. 2014). Methylierungsdaten des 27k Arrays (Institut für Humangenetik Kiel) zeigten weitere Veränderungen auch an Loci, von denen nicht bekannt ist, ob sie dem Imprinting unterliegen. Erste Auswertungen dieser Daten führten zur Identifizierung des geimprinteten Locus *RBI* (Kanber et al. 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Pseudoprobandansatz durchgeführt, um das Ausmaß der Methylierungsstörung beim Patienten zu untersuchen, wobei bekannte geimprintete Loci nicht gewertet wurden. Dabei zeigte der Patient eine Vielzahl von Loci mit aberranter Methylierung, während beide Elternteile eine durchschnittliche Anzahl aberranter Loci aufwiesen. Das bedeutet, dass die Anhäufung von Methylierungsauffälligkeiten beim Patienten nicht auf seinen genetischen Hintergrund zurückzuführen ist, sondern dass bei ihm ein neu entstandener Multilocus-Methylierungsdefekt (MLMD) vorliegt, der an verschiedenen Genloci sowohl zu Hypo- als auch zu Hypermethylierung führt.

In dieser Arbeit wurden elf Kandidatengene in Bezug auf ihr Methylierungsmuster und eine allelspezifische Methylierung untersucht, um herauszufinden, ob es sich um bislang noch nicht bekannte geimprintete Gene handelt. Für das Gen *FAM50B* konnte gezeigt werden, dass in Blut eine allelspezifische Methylierung sowie eine monoallelische Expression vorliegt. Dies deckt sich mit Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigten, dass *FAM50B* in verschiedenen Geweben dem Imprinting unterliegt (Zhang et al. 2011a; Nakabayashi et al. 2011). Die anderen zehn Loci zeigten hingegen keine allelspezifische Methylierung.

Weitere acht Kandidatengene wurden von Frau Daniela Gritzan im Zuge ihrer medizinischen Dissertation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen untersucht. Auch bei diesen konnte keine allelspezifische Methylierung nachgewiesen werden (Beygo et al. 2013b). Basierend auf den Daten des MLMD-Patienten konnte unter den 85 Kandidatengenen damit nur *FAM50B* sowie bereits zuvor das *RBI*-Gen als geimprintet identifiziert werden (Kanber et al. 2009; Beygo et al. 2013b). Daher scheinen die meisten geimprinteten Gene zumindest in Blut bereits beschrieben worden zu sein. In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse anderer Studien. So wurden z.B. Expressionsunterschiede mittels SNP-Arrays untersucht, um monoallelisch exprimierte Gene zu identifizieren. Weiterhin wurden Methylierungsunterschiede bei Proben mit (genomweiten) UPDs analysiert. In den meisten Fällen führten diese Analysen nur zur Identifikation sehr weniger neuer geimprinteter Gene (Pollard et al. 2008; Nakabayashi et al. 2011; Court et al. 2014).

Insgesamt konnten bei den 18 untersuchten Genen ohne allelspezifische Methylierung teilweise recht variable Methylierungslevel in den untersuchten Bereichen beobachtet werden. Auch das Verteilungsmuster der Methylierung wies zum Teil recht große Unterschiede auf. Das in dieser Arbeit untersuchte Gen *ACTN3* z.B. zeigte zwischen den einzelnen CpG-Dinukleotiden recht große Methylierungsunterschiede (Abbildung 10). Solche Differenzen bergen Risiken bei Untersuchungsmethoden, die die Methylierung nur an einzelnen CpG-Dinukleotiden detektieren und somit ein verzerrtes Ergebnis liefern könnten.

Das ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Gen *TRPC3* hingegen zeigte nicht nur eine hohe interindividuelle Varianz, sondern teilweise auch eine unterschiedliche Verteilung der Methylierung über beide parentale Allele (Abbildung 9). Letzteres wurde bei keinem der anderen hier untersuchten Loci beobachtet. *TRPC3* wurde während meiner Arbeit als möglicherweise geimprintetes Kandidatengene identifiziert (Nakabayashi et al. 2011). Weitere Untersuchungen mittels Bisulfit-Klonierung zeigten, dass der Grad der Methylierung u.a. in Leukozyten vom Genotyp eines SNPs abhängig ist (rs13121031; Martin-Trujillo et al. 2011). Dabei wies das häufiger vorkommende Allel höhere Methylierungslevel auf. In den hier untersuchten acht Normalkontrollen konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Die Verteilung der Methylierung über die beiden Allele scheint zufällig und nicht an den Genotyp gekoppelt zu sein. Allerdings wurden die Methylierungsanalysen in der vorliegenden Arbeit und bei Martin-Trujillo et al. nicht am gleichen DNA-Strang untersucht (Martin-Trujillo et al. 2011). Eine ungleiche Methylierung der beiden DNA-Stränge könnte die Diskrepanz in den

Ergebnissen erklären, jedoch wurde solch ein Effekt bisher nur in sehr seltenen Fällen beschrieben (Lister et al. 2009; Jain et al. 2012). Wahrscheinlicher wäre ein zufälliger Effekt z.B. durch kleine Fallgruppen bei den untersuchten Normalkontrollen oder durch die verwendeten Untersuchungsmethoden, da die hier benutzte Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung quantitativ aussagekräftigere Ergebnisse liefert als Untersuchungen mittels konventioneller Bisulfit-Klonierung. Außerdem steht die Annahme einer variablen Methylierung im Einklang mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse in Blut von sechs Normalkontrollen, die ein Expressionsmuster von biallelisch bis fast monoallelisch aufwiesen. Auch bei Martin-Trujillo et al. wurde eine verschobene Expression beobachtet, allerdings wurde dabei nur eine Probe (aus fetalem Gehirn) untersucht (Martin-Trujillo et al. 2011).

Neben *TRPC3* zeigte auch das Gen *HKR1*, welches von Frau Daniela Gritzan untersucht wurde, eine hohe interindividuelle Varianz bezüglich der durchschnittlichen Methylierungslevel bei den untersuchten Normalkontrollen (Beygo et al. 2013b). Bei beiden Genen lagen die analysierten Regionen (fast) vollständig innerhalb eines vorhandenen CpG Islands im 5'-Bereich der Gene bzw. bestimmter Isoformen. Dies gilt auch für die meisten anderen Kandidatengene (acht der in dieser Arbeit beschriebenen elf Gene, sowie vier der acht von Frau Daniela Gritzan untersuchten Gene; Beygo et al. 2013b). CGIs in Promotorbereichen von Genen sind in der Regel unmethyliert, weil die jeweiligen Gene transkribiert werden. Abweichungen bei der Methylierung solcher CGIs wurden wiederholt bei verschiedenen Krebsarten beschrieben. Sie werden als Marker für die Diagnostik und als Hilfestellung bei der Ermittlung des erfolgversprechendsten Therapieansatzes herangezogen (Deaton und Bird 2011; Jones 2012; Stefansson und Esteller 2013). Weiterhin können interindividuelle Methylierungsunterschiede bei solchen Loci über die Beeinflussung der Genexpression z.B. eine Rolle bei der phänotypischen Varianz spielen (Turan et al. 2010). Dies gewinnt auch im Hinblick auf individualisierte Medizin und Therapieoptionen abseits der Onkologie immer mehr an Bedeutung. Die Pharmakogenomik beispielsweise befasst sich unter anderem mit Polymorphismen, die sich auf Katalyten oder Ziele von Medikamenten auswirken können. Wird bei den entsprechenden Genen z.B. die Expression durch variabel ausgeprägte Methylierung beeinflusst, könnte damit unter Umständen die unterschiedlich starke Wirkung von Medikamenten bei verschiedenen Personen oder Personengruppen erklärt werden (Evans und Johnson 2001; Heyn und Esteller 2012).

Die DNA-Methylierung kann von unterschiedlichen *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren beeinflusst werden. Dies kann z.B. das Geschlecht der untersuchten Personen oder der Genotyp eines vorhandenen SNPs sein (Boks et al. 2009; Zhang et al. 2011b; Tycko 2010; Gertz et al. 2011). Bei den insgesamt neunzehn untersuchten Genen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Methylierungslevel des jeweiligen Allels und dem Geschlecht der Normalkontrollen oder dem vorliegenden Genotyp festgestellt werden (Beygo et al. 2013b).

Eine Separierung der Allele beim Patienten war bei insgesamt vier Genen möglich (zwei wurden in dieser Arbeit, zwei von Frau Gritzan untersucht). In allen Fällen zeigte sich, dass beide parentale Allele im gleichen Ausmaß von den Methylierungsveränderungen (sowohl Hypo- als auch Hypermethylierung) betroffen sind. Vorangegangene Berichte bei Patienten mit Multilocus-Imprintingdefekten zeigten meist einen Verlust der Methylierung an den untersuchten methylierten Loci, wurden jedoch mittlerweile auch Fälle mit Hypermethylierung beschrieben (Mackay et al. 2006; Boonen et al. 2008; Demars et al. 2012; Court et al. 2013). Ähnliches gilt für die Methylierungsanalysen bei Molschwangerschaften, bei denen ebenfalls Veränderungen der Methylierung an multiplen geimprinteten Loci beschrieben wurden (Judson et al. 2002; El-Maari et al. 2003; Kou et al. 2008; Hayward et al. 2009; Fallahian et al. 2013). Aufgrund dieser Daten wurde zunächst angenommen, dass vor allem ein Defekt in *trans* zu einem Fehler bei der Imprint-Etablierung in der weiblichen Keimbahn führen würde. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass vor allem ein Defekt bei der postzygoten Aufrechterhaltung des Methylierungsprints vorliegt (Williams et al. 2010a; Eggermann et al. 2014b; Caliebe et al. 2014). Darauf weisen auch unsere Daten hin, die zeigen, dass beide parentalen Allele betroffen sind. Weiterhin zeigen unsere Daten, dass die Methylierung auch an einer Reihe von nicht geimprinteten Loci gestört ist, was bei vorherigen Studien nicht untersucht wurde (Court et al. 2013; Nguyen und Slim 2014).

In Bezug auf den hier untersuchten MLMD-Patienten konnten die mittels 27k Array ermittelten aberranten Methylierungslevel mit der hier etablierten und angewendeten quantitativen Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung bestätigt werden. Das Ausmaß der Methylierungsveränderungen (sowohl als Hypo- als auch Hypermethylierung) war an den untersuchten Loci unterschiedlich stark ausgeprägt. Warum dies so ist und warum gerade diese Loci betroffen sind, kann nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Faktoren könnten Gemeinsamkeiten in Bezug auf vorhandene Sequenzelemente oder Bindestellen sein.

Auch ein stochastischer Effekt wäre denkbar. Hinweise darauf liefern *trans*-Faktoren wie *ZFP57* oder *TRIM28*, bei denen Mutationen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Methylierungsstörungen an einer unterschiedlichen Anzahl von Loci führen können (Li et al. 2008; Mackay et al. 2008; Quenneville et al. 2012). Es sind jedoch bis heute nicht alle Faktoren, die bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Methylierung beteiligt sind, identifiziert oder ihre Interaktionen abschließend geklärt (Seisenberger et al. 2013).

Bisher wurde kein ähnlich stark von Methylierungsveränderungen betroffener Patient beschrieben. Bei den erwähnten Patienten mit multiplen Imprintingdefekten und den Molschwangerschaften von Müttern mit *NLRP7*-Mutationen wurden meist nur wenige, in der Regel geimprintete Loci untersucht. Dies hängt u.a. auch mit der limitierten DNA-Menge und den technischen Möglichkeiten zusammen. In Zukunft könnte die Anwendung von Untersuchungsmethoden wie z.B. 450k Methylierungsarrays oder *whole genome bisulfite sequencing* weitere Erkenntnisse hinsichtlich des Ausmaßes an Methylierungsveränderungen erbringen.

4.3 Sekundäre Epimutationen der ICR1 auf Chromosom 11p15.5 bei BWS-Patienten

Hypermethylierungen der ICR1 in der geimprinteten Region auf Chromosom 11p15.5 führen zum Großwuchs-assoziierten Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Neben den meist sporadisch auftretenden primären Epimutationen kann eine Hypermethylierung auch durch sekundäre Epimutationen wie Mikrodeletionen oder Punktmutationen von OCT-Bindestellen innerhalb der ICR1 hervorgerufen werden. In diesen Fällen kann es zu einem familiären Auftreten von BWS kommen. Sowohl die Mikrodeletionen als auch die Punktmutationen führen nur dann zur Ausprägung eines BWS Phänotyps, wenn sie auf dem maternalen Allel liegen. Daher ist eine detaillierte Aufklärung der molekularen Ursache sehr wichtig, um eine genaue Aussage über das Wiederholungsrisiko, auch im Hinblick auf eine verminderte Penetranz bestimmter Aberrationen, treffen zu können.

4.3.1 Mikrodeletionen der ICR1 und der Einfluss der räumlichen Organisation der verbliebenen CTCF-Bindestellen

Die ICR1 reguliert die reziproke Expression von *IGF2* und *H19*. Sie fungiert dabei, in Abhängigkeit der Bindung von CTCF, als Isolator. Die Bindung von CTCF selbst ist dabei

nur auf dem unmethylierten maternalen Allel möglich und notwendig, um diesen Status aufrecht zu erhalten (Kanduri et al. 2000; Holmgren et al. 2001; Schoenherr et al. 2003; Bartolomei 2009). Verschiedene in der Literatur beschriebene Mikrodeletionen der ICR1 führen zum Verlust von einer oder mehreren CTCF-Bindestellen und, wenn sie auf dem maternalen Allel liegen, meist zur Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen und BWS. Die Mehrheit dieser Deletionen weist dabei eine Größe von 1,4 oder 1,8 kb auf, deletiert eine bzw. zwei CTCF-Bindestellen und geht mit einer starken Hypermethylierung und einer vollständigen Penetranz des BWS-Phänotyps einher (Sparago et al. 2004 und 2007; Cerrato et al. 2005; De Crescenzo et al. 2011; Demars et al. 2011). Bislang sind nur zwei Familien beschrieben, bei denen eine 2,2 kb große Deletion vorlag. Bei der ersten dieser Familien konnten mittels Bisulfit-Klonierung keine Methylierungsveränderungen detektiert werden und es lag eine unvollständige Penetranz vor. Es wurde daher spekuliert, dass ein '*second hit*' notwendig sei, um BWS hervorzurufen (Prawitt et al. 2005a). In der zweiten Familie hingegen zeigten alle Mitglieder mit der Deletion auf dem maternalen Allel den BWS-Phänotyp sowie eine moderat ausgeprägte Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen (Demars et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine weitere Familie mit einer 2,2 kb großen Mikrodeletion innerhalb der ICR1 identifiziert und molekulargenetisch charakterisiert werden (Familie 8). Auf der Nukleotidebene war diese Deletion identisch mit einer zuvor beschriebenen Deletion (Prawitt et al. 2005a). Bei der Indexpatientin (Familie 8) konnte mittels hochquantitativer Methylierungsanalyse eine leichte Hypermethylierung der ICR1 detektiert werden (Abbildung 24, 25 und A2). Diese war – ähnlich wie bei Demars et al. beschrieben – ausreichend, um den BWS-Phänotyp mit klassischen Merkmalen hervorzurufen (Demars et al. 2011). Interessanterweise trug ihr gesunder Großvater die Deletion ebenfalls auf seinem maternalen Allel. Bei ihm konnte jedoch eine normale Methylierung beobachtet werden, so dass in dieser Familie eine verminderte Penetranz vorliegt. Weiterhin wurden hochquantitative Methylierungsanalysen bei zwei Mitgliedern der bereits zuvor beschriebenen Familie 7 durchgeführt (Prawitt et al. 2005a). Beim hier untersuchten Patienten konnte dabei eine leichte Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen des maternalen Allels detektiert werden, die zuvor mit der weniger sensitiven Bisulfit-Klonierung nicht nachweisbar war (Prawitt et al. 2005a; Abbildung 24, 25 und A2). Bei der phänotypisch unauffälligen Mutter zeigte die ICR1, trotz der auf dem maternalen Allel vorliegenden Deletion, auch in der hochquantitativen Analyse eine normale Methylierung. Zuvor in einem der betroffenen

Patienten der Familie 7 bei einer FISH-Analyse eine Duplikation von *IGF2* festgestellt (III-1; Prawitt et al. 2005a). Mittels MLPA konnte in dieser Arbeit weder bei dem hier untersuchten Patienten (III-2 Familie 7) noch bei Mitgliedern von Familie 8 eine Duplikation nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass kein '*second hit*' notwendig ist, um den BWS-Phänotyp hervorzurufen, sondern dass eine leichte Hypermethylierung der ICR1 ausreicht. Dabei scheint die bei den Familien mit der 2,2 kb großen Deletion beobachtete Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen auf einem stochastischen Effekt zu beruhen, der im Einklang mit der bei beiden Familien beobachteten verminderten Penetranz steht.

Um den Einfluss unterschiedlicher Mikrodeletionen auf die Methylierung der ICR1 näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit vier weitere Familien mit verschiedenen Deletionen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersucht (Familie 2, 4 und 6 mit 1,8 kb großen Deletionen und Familie 3 mit einer 1,4 kb großen Deletion). Die Ergebnisse zeigten, wie erwartet, dass bei allen betroffenen Familienmitgliedern eine starke Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen vorliegt (Tabelle 8 und Abbildung 25), was vorherige mittels Bisulfit-Klonierung erhaltene Ergebnisse bestätigt (Sparago et al. 2004 und 2007; Cerrato et al. 2005; De Crescenzo et al. 2011). Bereits 2005 postulierten Cerrato et al. die Hypothese, dass die unterschiedlich stark ausgeprägte Hypermethylierung der 1,4, 1,8 und 2,2 kb großen Deletionen mit der räumlichen Anordnung der jeweils verbliebenen CTCF-Bindestellen in Zusammenhang steht (Cerrato et al. 2005). Diese Anordnung spiegelt sich in der zweigeteilten Organisation der ICR1 wider, bei der jeweils drei CTCF-Bindestellen räumlich nah beieinander liegen. Deletionen die zum Verlust dieser räumlichen Anordnung führen, wie die 1,4 und 1,8 kb großen Deletionen, gehen mit einer stark ausgeprägten Hypermethylierung und vollständiger Penetranz einher (Abbildung 19). Diese Deletionen führen zum Verlust von einer bzw. zwei CTCF-Bindestellen, so dass ein großer Block mit CTCF-Bindestellen an die Stelle von zwei kleineren Blöcken tritt. Bei den drei bisher beschriebenen 2,2 kb großen Deletionen sind jeweils drei CTCF-Bindestellen deletiert, so dass im Endeffekt eine Gruppe mit drei räumlich korrekt zueinander angeordneten CTCF-Bindestellen verbleibt. Diese Anordnung scheint für die Bindung von CTCF und damit der Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands des maternalen Allels ausreichend bzw. notwendig zu sein. Die Ergebnisse von *in vitro enhancer blocking assays* und *chromatin immunoprecipitation assays* (ChIP) zur CTCF Bindung unterstützen diese

Annahme (Beygo et al. 2013a). Der *enhancer blocking assay* zeigte, dass die 1,4 und 1,8 kb große Deletionen die Isolator-Funktion der ICR1 stark reduzieren bzw. inhibieren. Bei der 2,2 kb Deletion hingegen war dieser Effekt nur in sehr geringem Ausmaß zu beobachten. Gleiches gilt auch für eine 0,8 kb große Deletion, die zwar auch zum Verlust von zwei CTCF-Bindestellen führt, jedoch eine Dreiergruppe intakt lässt, sowie für Mutationen der OCT-Bindestelle im A2 *repeat*. Eine Deletion dieses *repeats* hingegen führte zu einem ähnlich starken Effekt wie die 1,4 und 1,8 kb Deletionen, da auch in diesem Fall die räumliche Anordnung der Dreiergruppen der CTCF-Bindestellen verändert war. Diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme überein, dass die räumliche Anordnung der CTCF-Bindestellen entscheidend für ihre Funktion ist. Außerdem zeigen sie, dass die Größe einer Deletion allein keinen Einfluss auf die Isolator-Funktion hat. Ein ähnliches Bild zeigten die Ergebnisse der ChIP-Assays. Die Bindung von CTCF an die ICR1 mit der 2,2 kb Deletion war nur leicht beeinträchtigt, wie auch für die 0,8 kb Deletion und die OCT-Mutationen, während die 1,8 und 1,4 kb Deletionen sowie die Deletion von A2 die CTCF-Bindung stark inhibierten, bzw. die Bindung nur selten möglich war.

Damit zeigen sowohl die *in vivo* Methylierungsanalyse als auch die *in vitro* Untersuchungen, dass die Auswirkungen von ICR1-Mikrodeletionen auf der räumlichen Anordnung der verbliebenen CTCF-Bindestellen beruhen. Eine genaue Charakterisierung von Deletionen ist daher notwendig, um genauere Aussagen über Wiederholungsrisiken, auch im Hinblick auf unvollständige Penetranz, zu ermöglichen.

4.3.2 Auswirkungen von Punktmutationen der OCT-Bindestellen

Innerhalb der ICR1 sind drei OCT4/SOX2-Bindemotive (OCT-Bindestellen) lokalisiert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass, ähnlich wie für CTCF, eine Bindung an diesen Stellen erforderlich ist, um den unmethylierten Status des maternalen Allels aufrechtzuerhalten (Hori et al. 2002; Zimmerman et al. 2013; Sakaguchi et al. 2013). Bisher konnten in drei Familien Punktmutationen in der im A2-*repeat* gelegenen OCT-Bindestelle identifiziert werden (Demars et al. 2010; Poole et al. 2012; Higashimoto et al. 2013). Lagen diese Mutationen auf dem maternalen Allel, waren sie in den meisten beschriebenen Fällen ausreichend, um eine Hypermethylierung der ICR1 und einen BWS-Phänotyp hervorzurufen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere Familie, bei der drei Schwestern Trägerinnen einer Punktmutation sind, charakterisiert werden (Berland et al. 2013). Die Mutation, die sie

von ihrer gesunden Mutter ererbt haben, führte phänotypisch nur zu einem Großwuchs oberhalb der 96. Perzentile. In der dritten Generation hingegen zeigten drei von vier Kindern einen klassischen BWS-Phänotyp. Die Mitglieder dieser Familie wurden daher im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels Hochdurchsatz-Bisulfidsequenzierung untersucht, um eventuelle subtile Unterschiede in der Methylierung, die mit der unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps korrelieren, detektieren zu können. Die drei großgewachsenen Schwestern zeigten dabei eine leichte bis moderate Hypermethylierung (Abbildung 28 und 29). Bei ihren Kindern hingegen konnte eine im Vergleich zur jeweiligen Mutter gesteigerte Hypermethylierung beobachtet werden. Wie auch schon bei zwei Familien mit ICR1-Mikrodeletionen (Familie 4 und 6) konnte hier damit über zwei Generationen hinweg eine Zunahme der Methylierung des maternalen Allels beobachtet werden (Beygo et al. 2013a; siehe Kapitel 3.3.2). Dies könnte ein Hinweis auf eine Art von epigenetischen Transgenerationen- oder 'Gedächtniseffekt' sein. Allerdings müssten mehr Familien mit betroffenen Individuen in mehreren aufeinanderfolgenden Generationen auf subtile Methylierungsunterschiede untersucht werden, um eine genauere Aussage treffen zu können. Weiterhin ist es möglich, dass es sich um ein zufälliges Ereignis oder einen '*ascertainment bias*' (Rekrutierungseffekt) handelt.

Ein Effekt der Mutation in *trans*, der die Reprogrammierung der Methylierungsprints in der mütterlichen Keimbahn beeinflusst, kann aufgrund der gesunden Zwillingsschwester eines betroffenen Patienten in der dritten Generation (III-4) ausgeschlossen werden. Sie hat von ihrer Mutter das (groß)väterliche Allel ohne Mutation geerbt, welches eine normale Methylierung zeigt. Damit konnte der Imprint des ursprünglich methylierten paternalen Allels in der Keimbahn der Mutter korrekt gesetzt und das Allel komplett demethyliert werden. Neben der Möglichkeit, dass die Mutation in *cis* Auswirkungen auf die Auslöschung des Methylierungsprints in der Keimbahn haben könnte, scheint ein postzygoter Effekt bei der Aufrechterhaltung, auch aufgrund des Mosaikstatus in allen untersuchten Individuen, wahrscheinlicher zu sein. Weiterhin konnten Szabo und Kollegen zeigen, dass in Mäusen mit Mutationen in allen vier CTCF-Bindestellen der Imprint in den Oozyten korrekt gesetzt wird (Szabo et al. 2004). Im Zusammenhang mit OCT-Bindestellen wurden kürzlich ähnliche Ergebnisse veröffentlicht, bei denen Mäuse mit Mutationen in beiden OCT-Bindestellen untersucht wurden (Zimmerman et al. 2013). Die Methylierungslevel in den mittels Bisulfid-Klonierung und anschließender Sequenzierung untersuchten Oozyten von Mäusen mit Mutationen der OCT-Bindestellen waren z.T. leicht erhöht, während in Blastozysten keine

Methylierung nachweisbar war. Die Autoren schlossen daraus, dass die Hypermethylierung des maternalen ICR1-Allels postzygot nach der Implantation erfolgt. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch Untersuchungen an primordialen Keimzellen, die auch nach mehr als zwei Wochen [18 dpc (*dies post coitum*)] den normalen unmethylierten Status auf dem mutationstragenden maternalen Allel aufwiesen. Dies zeigt, dass die Auslöschung des Methylierungsimprints auch auf dem mutationstragenden Allel korrekt stattfindet. Diese Untersuchungen deuten ebenfalls daraufhin, dass Mutationen/Deletionen in *cis* die postzygote Aufrechterhaltung des unmethylierten Status des maternalen Allels negativ beeinflussen.

Im Allgemeinen ist auch ein zufälliger Effekt möglich, da die drei Schwestern selbst eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hypermethylierung aufweisen. Der Transgenerationeneffekt könnte jedoch auch durch sekundäre Faktoren wie z.B. Histonmodifikationen, bedingt sein, die durch die Defekte in *cis* beeinflusst werden. Hinweise auf die Existenz solcher Faktoren gaben Methylierungsanalysen bei Mäusen, die zeigen konnten, dass die Methylierung der beiden parentalen Allele während der Spermatogenese und des Oozytenwachstums zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt (Davis et al. 1999 und 2000; Lucifero et al. 2004). Da die Methylierungsimprints zuvor ausgelöscht wurden, müssen das maternale und das paternale Allel andere Modifikationen tragen, die eine Unterscheidung ermöglichen und sich auf die Etablierung der Imprints auswirken.

4.4 Neu identifizierte Deletionen innerhalb der geimprinteten Region 14q32 stützen die Hypothese einer hierarchischen Interaktion von *MEG3*- und IG-DMR

Das upd(14)pat-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die durch eine paternale uniparentale Disomie, eine Epimutation oder eine Deletion des entsprechenden Allels der geimprinteten Region auf Chromosom 14q32 hervorgerufen werden kann. Deletionen sind bisher nur in einigen wenigen Fällen beschrieben worden, von denen die meisten alle geimprinteten Gene auf 14q32 sowie beide DMRs betreffen. Sowohl die *MEG3*- als auch die IG-DMR wirkt als ICR und der Verlust einer DMR ist ausreichend, um einen Phänotyp hervorzurufen. Im Jahr 2010 beschrieben Kagami und Kollegen zwei weitere Patientinnen mit sehr kleinen Mikrodeletionen. Bei einer Patientin mit einer 8,6 kb großen Deletion ist ausschließlich die IG-DMR betroffen, während bei einer weiteren Patientin mit einer 4,3 kb großen Deletion die *MEG3*- jedoch nicht die IG-DMR deletiert ist. Nur die Deletion der IG-DMR führt dabei zu einer Beeinflussung der Methylierung der *MEG3*-DMR (Hypermethylierung). Daher

postulierten Kagami und Kollegen, dass beide DMRs funktionell unterschiedliche Eigenschaften haben und sie in einer 'hierarchischen' Form interagieren, bei der die IG-DMR über der *MEG3*-DMR steht (Kagami et al. 2010). Im Einklang damit steht, dass die Methylierung der IG-DMR bereits in der Keimbahn gesetzt wird, während sie an der *MEG3*-DMR erst sekundär nach der Fertilisation erworben wird (Takada et al. 2002; Geuns et al. 2007). Weiterhin konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Deletion der IG-DMR nach maternaler Transmission zu einem schweren Phänotyp, ähnlich dem des upd(14)pat-Syndroms, mit u.a. kleiderbügelartig geformten Rippen und früher embryonaler Letalität sowie einer Hypermethylierung der *MEG3*-DMR führt (Lin et al. 2003; Lin et al. 2007; da Rocha et al. 2008). Ein mit den hier beschriebenen Deletionen vergleichbares Mausmodell, bei dem ausschließlich die *Meg3*-DMR deletiert ist, wurde bisher nicht publiziert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten zwei weitere Fälle mit unterschiedlich großen Deletionen innerhalb der geimprinteten Region auf 14q32 identifiziert und molekulargenetisch untersucht werden. Patient 1 trägt eine 165 kb große *de novo* Deletion auf seinem maternalen Allel. In einem weiteren Fall konnte bei zwei Geschwistern (Patienten 2 und 3) eine maternal ererbte Deletion mit einer Größe von 5,8 kb identifiziert werden. Ihre Mutter trägt die Deletion im Mosaik auf ihrem methylierten paternalen Allel und ist phänotypisch unauffällig. Beide Deletionen betreffen die *MEG3*-DMR jedoch nicht die IG-DMR.

Um die Hypothese von Kagami et al. zu überprüfen, wurden beide DMRs mittels hochquantitativer Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung in unseren Patienten 1 bis 3 sowie einer von Kagami et al. beschriebenen Patientin mit einer 4,3 kb großen Deletion untersucht (Kagami et al. 2010). Wie erwartet zeigte sich hierbei für die *MEG3*-DMR, dass bei allen Patienten ausschließlich nahezu vollständig methylierte Sequenzen vom paternalen Allel vorhanden waren. Die Analyse der IG-DMR zeigte im Allgemeinen keine Veränderung der Methylierung. Damit scheint auch bei den beiden hier beschriebenen Deletionen die *MEG3*-DMR bzw. ihr Verlust die Methylierung der IG-DMR nicht wesentlich zu beeinflussen. Dies stützt die von Kagami et al. postulierte Hypothese der hierarchischen Interaktion der beiden DMRs auf 14q32 (Kagami et al. 2010).

Die Methylierungsanalyse der IG-DMR zeigte nur bei drei der 15 untersuchten CpGs eine Methylierung im Bereich der für einen geimprinteten Locus erwarteten ~ 50 % (CpGs 6 - 8), während die anderen CpGs höhere Methylierungslevel aufwiesen (Abbildung 36 und

Tabelle 10). Auch bei der hier untersuchten Probe eines Patienten mit upd(14)mat konnte an den anderen CpGs eine höhere Methylierung beobachtet werden (durchschnittlich 32 %; CpGs 6 - 8: 9,7 %). Dies stimmt mit zuvor beschriebenen Daten eines weiteren upd(14)mat-Patienten überein, die mittels Bisulfit-Klonierung und Sequenzierung gewonnen wurden (Kagami et al. 2010). Die abweichenden Methylierungslevel liegen wahrscheinlich darin begründet, dass das maternale Allel nicht in allen Zellen komplett unmethyliert ist.

Interessanterweise zeigte die Analyse bei allen untersuchten Patienten, einschließlich der zuvor von Kagami et al. beschriebenen Patientin mit der 4,3 kb Deletion, leichte Methylierungsveränderungen (Hypermethylierung) an einigen bestimmten CpG-Dinukleotiden (CpG 3, 11 und 14). Bei den untersuchten Normalkontrollen waren solche Veränderungen hingegen nicht zu beobachten. Dass solche leichten Unterschiede in der Methylierung bei vorherigen Untersuchungen nicht beobachtet werden konnten, liegt wahrscheinlich in der angewandten Methode begründet. Bei der Bisulfit-Klonierung werden in der Regel 10 - 20 Klone sequenziert. Im Gegensatz dazu wurden bei der in dieser Arbeit verwendeten hochquantitativen Bisulfitsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior im Durchschnitt 3220 Einzelsequenzen pro Probe analysiert (Tabelle 10), womit auch geringfügige Veränderungen der Methylierung detektiert werden können.

Die leichte Hypermethylierung der CpGs 3, 11 und 14 weist darauf hin, dass die hier untersuchten Deletionen durch den Verlust der *MEG3*-DMR oder evtl. anderer regulatorischer Elemente in unmittelbarer Nähe auf dem maternalen Allel scheinbar doch einen leichten Einfluss auf die Methylierung der IG-DMR haben könnten. Dieser ist jedoch auf wenige, spezifische CpGs begrenzt. Welche Auswirkungen diese punktuell veränderte Methylierung haben könnte, lässt sich jedoch nicht sagen, u.a. auch deshalb, weil bisher keine phänotypischen Unterschiede zwischen Patienten mit einem upd(14)pat-Syndrom aufgrund von unterschiedlichen molekulargenetischen Ursachen beschrieben wurden (Hoffmann und Heller 2011).

Die Mutter der Patienten 2 und 3 trägt die 5,8 kb große Deletion, die die *MEG3*-DMR, nicht jedoch die IG-DMR umfasst, im Mosaik auf ihrem methylierten paternalen Allel und ist phänotypisch unauffällig. Die verminderte Expression der normalerweise vom paternalen Allel exprimierten Gene *DLK1* und *RTL1* wurde mit den phänotypischen Merkmalen des upd(14)mat-Syndroms in Verbindung gebracht (Kagami et al. 2008; Ogata et al 2008). Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von phänotypischen Merkmalen in diesem Fall könnte daher sein, dass die 5,8 kb Deletion mit der *MEG3*-DMR keine *cis*-regulatorischen Elemente

auf dem paternalen Allel betrifft, die sich auf die Expression von *DLKI* auswirken könnten. Weiterhin könnte der Mosaikstatus der Deletion eine Rolle spielen, so dass der Anteil der Zellen mit der Deletion zu gering ist bzw. in bestimmten Gewebetypen zu gering ist, um einen Einfluss auf die phänotypischen Merkmale auszuüben.

Der Fall der hier untersuchten Familie mit zwei betroffenen Patienten zeigt zudem, dass auch bei Nutzung verschiedener molekulargenetischer Untersuchungsmethoden gerade kleine Deletionen nicht immer leicht zu detektieren sind. Im vorliegenden Fall wurde nach der auffälligen MS-PCR der *MEG3*-DMR und biparentaler Vererbung (MSA) eine Gendosisanalyse mittels qPCR durchgeführt. Da qPCRs nur für punktuelle Bereiche Ergebnisse liefern können und die untersuchte Region in diesem Fall 0,6 kb centromerisch zum proximalen Bruchpunkt der Deletion lag, verfehlte sie die Deletion und erbrachte ein normales Ergebnis (Beygo et al. 2014). Weiterhin wurde ein Affymetrix 6.0 SNP Array genutzt, der bei Standardanalyseparametern kein auffälliges Ergebnis zeigte. Wie sich später herausstellte, lagen nur zwei Sonden im deletierten Bereich. Erst nach Einführung der MS-MLPA, die Sonden im Bereich des *MEG3*-Gens und der *MEG3*-DMR beinhaltet, war eine Detektion der Deletion möglich. Dennoch lässt sich auch mit dieser Methode nicht ausschließen, dass ähnliche Defekte übersehen werden können.

Damit hebt der Fall dieser Familie nochmals hervor, dass die molekulargenetische Diagnostik immer weiter verbessert und dem aktuellen Kenntnisstand der möglichen Ursachen angepasst werden muss.

Zusammengenommen konnten in dieser Arbeit zwei weitere Deletionen, die die geimprintete Region 14q32 betreffen, identifiziert und molekulargenetisch charakterisiert werden. Die gewonnenen hochquantitativen Methylierungsdaten unterstützen die zuvor postulierte Hypothese einer hierarchischen Interaktion der IG-DMR mit der ihr untergeordneten *MEG3*-DMR (Kagami et al. 2010) und liefern weitere Erkenntnisse über die heterogene Struktur der Methylierung an der IG-DMR.

5. Zusammenfassung

Genomisches Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, der zu einer monoallelischen elternspezifischen Expression bestimmter Gene führt. Die Prägung dieser Gene findet bereits in der jeweiligen elterlichen Keimbahn statt. Fehler bei diesem Prozess können zu Veränderungen von Genexpressionsmustern und somit zu Imprintingkrankungen wie Angelman- oder Prader-Willi-Syndrom, Beckwith-Wiedemann- oder upd(14)pat-Syndrom führen. Die Rolle von *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren bei diesen Prozessen ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher patientenbezogene Ansätze verfolgt, um z.B. epigenetische Regulationsmechanismen näher zu untersuchen. Dabei wurde unter anderem die hier etablierte Methode der hochquantitativen DNA-Methylierungsanalyse genutzt.

Ein Kollektiv von AS- und PWS-Patienten mit Imprintingdefekt wurde mittels Affymetrix SNP Array 6.0 genomweit auf Kopienzahlveränderungen untersucht. Es konnten dabei jedoch keine relevanten Veränderungen in *cis* oder in *trans* beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, ein Kind mit multiplen Imprintingdefekten zu untersuchen. Erste Analysen zeigten, dass der Patient eine Häufung aberranter DNA-Methylierung an geimprinteten und nicht geimprinteten Loci aufweist. Elf Kandidatengene wurden mittels der hier etablierten hochquantitativen Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung auf dem Roche/454 GS Junior näher untersucht. Nur das Gen *FAM50B* wies dabei eine allelspezifische Methylierung auf. Außerdem konnte bei zwei hier untersuchten Genen (*TSPO* und *CHP2*) durch Trennung der Allele beim Patienten gezeigt werden, dass beide parentalen Allele von den Methylierungsveränderungen betroffen sind. Dies weist darauf hin, dass es zu einem Fehler bei der Aufrechterhaltung der Methylierungsimprints gekommen ist.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit bei einer BWS-Patientin mit einer Hypermethylierung der ICR1 auf Chromosom 11p15.5 eine Deletion in *cis* identifiziert und molekulargenetisch charakterisiert werden. Die 2,2 kb große Deletion führt zum Verlust von drei der sechs CTCF-Bindestellen innerhalb der ICR1 und konnte auch bei drei gesunden Familienmitgliedern nachgewiesen werden. Bei dieser und fünf weiteren Familien mit unterschiedlichen ICR1-Mikrodeletionen wurden Methylierungsanalysen mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die 2,2 kb große Deletion mit einer leichten Hypermethylierung der verbliebenen CTCF-Bindestellen oder auch einer normalen Methylierung einhergeht. Bei Patienten mit 1,4 und 1,8 kb großen Deletionen, die zum Verlust von einer oder zwei CTCF-Bindestellen führten, zeigte sich

hingegen eine starke Hypermethylierung. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Methylierungsanalyse sowie weiterer *in vitro* Untersuchungen, stützen die zuvor postulierte These, dass die räumliche Anordnung der verbliebenen CTCF-Bindestellen die Bindung von CTCF und damit die Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands des maternalen Allels beeinflusst.

Bei einer weiteren Familie mit BWS aufgrund einer Punktmutation einer der OCT4-Bindestellen innerhalb der ICR1 wurde die Methylierung mittels hochquantitativer Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Grad der Hypermethylierung über die Generationen hinweg zunimmt und mit der phänotypischen Ausprägung korreliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei zwei Patienten mit upd(14)pat-Syndrom Deletionen in der chromosomalen Region 14q32 mit einer Größe von 165 bzw. 5,8 kb identifiziert werden. Beide Deletionen führen dabei zum Verlust der *MEG3*-DMR, während die IG-DMR intakt bleibt. Die 5,8 kb große Deletion konnte auch bei einer ebenfalls betroffenen Schwester und der phänotypisch unauffälligen Mutter beobachtet werden, die diese Deletion im Mosaik auf ihrem paternalen Allel trägt. Wie erwartet konnten mittels Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung bei allen Patienten nur methylierte Einzelsequenzen der *MEG3*-DMR detektiert werden. Bei der Mutter konnten aufgrund des Mosaikstatus der Deletion im Verhältnis weniger Einzelsequenzen vom methylierten paternalen Allel detektiert werden als vom unmethylierten maternalen Allel. Die IG-DMR hingegen zeigte, mit Ausnahme einiger bestimmter CpG-Dinukleotide, eine größtenteils normale Methylierung. Die hier gewonnenen Ergebnisse stützen die zuvor postulierte Hypothese der hierarchischen Interaktion der IG-DMR mit der ihr untergeordneten *MEG3*-DMR und liefern weitere Erkenntnisse über die heterogene Struktur der Methylierung an der IG-DMR.

6. Literatur

- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. 1999. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65(2):370-86.
- Angelman H. 1965. 'Puppet' Children A Report on Three Cases. *Developmental Medicine & Child Neurology* 7(6):681-8.
- Azzi S, Abi Habib W, Netchine I. 2014. Beckwith-Wiedemann and Russell-Silver Syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21(1):30-8.
- 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. 2009. 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* 18(24):4724-33.
- Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N. 1991. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349(6304):84-7.
- Bartolomei MS. 2009. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev* 23(18):2124-33.
- Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. 2011. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7).
- Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351(6322):153-5.
- Beckwith JB. 1969. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* 2:188-96.
- Begemann M, Spengler S, Kanber D, Haake A, Baudis M, Leisten I, Binder G, Markus S, Rupperecht T, Segerer H, Fricke-Otto S, Muhlenberg R, Siebert R, Buiting K, Eggermann T. 2011. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet* 80(1):83-8.
- Bell AC, Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405(6785):482-5.
- Bena F, Gimelli S, Migliavacca E, Brun-Druc N, Buiting K, Antonarakis SE, Sharp AJ. 2010. A recurrent 14q32.2 microdeletion mediated by expanded TGG repeats. *Hum Mol Genet* 19(10):1967-73.
- Berland S, Appelback M, Bruland O, Beygo J, Buiting K, Mackay DJ, Karen Temple I, Houge G. 2013. Evidence for anticipation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 21(12):1344-8.
- Bestor TH. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9(16):2395-402.
- 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. 2013a. 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* 22(3):544-57.
- Beygo J, Ammerpohl O, Gritzan D, Heitmann M, Rademacher K, Richter J, Caliebe A, Siebert R, Horsthemke B, Buiting K. 2013b. Deep bisulfite sequencing of aberrantly methylated Loci in a patient with multiple methylation defects. *PLoS One* 8(10):e76953.
- 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. 2014. Novel deletions affecting the MEG3-DMR provide further evidence for a hierarchical regulation of imprinting in 14q32. *Eur J Hum Genet*.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. *Epigenomics* 1(1):177-200.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1):6-21.
- Bird AP. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321(6067):209-13.
- Blik J, Gicquel C, Maas S, Gaston V, Le Bouc Y, Mannens M. 2004. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *J Pediatr* 145(6):796-9.
- Blik J, Verde G, Callaway J, Maas SM, De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Russo S, Ferraiuolo S, Rinaldi MM, Fischetto R, Lalatta F, Giordano L, Ferrari P, Cubellis MV, Larizza L, Temple IK, Mannens MM, Mackay DJ, Riccio A. 2009. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 17(5):611-9.
- Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalonde M, Muscatelli F. 1999. The human MAGEL2 gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* 8(13):2497-505.
- Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA. 2009. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 4(8):e6767.
- Boonen SE, Mackay DJ, Hahnemann JM, Docherty L, Gronskov K, Lehmann A, Larsen LG, Haemers AP, Kockaerts Y, Dooms L, Vu DC, Ngoc CT, Nguyen PB, Kordonouri O, Sundberg F, Dayanikli P, Puthi V, Acerini C, Massoud AF, Tumer Z, Temple IK. 2013. Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care* 36(3):505-12.
- Buiting K. 2010. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(3):365-76.
- Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcolm S, Horsthemke B. 2001. Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 68(5):1290-4.
- Buiting K, Cassidy SB, Driscoll DJ, Gillessen-Kaesbach G, Kanber D, Tauber M, Schwinger E, Horsthemke B. 2014a. Clinical utility gene card for: Prader-Willi Syndrome. *Eur J Hum Genet*.

- Buiting K, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Gillessen-Kaesbach G, Kanber D, Schwinger E, Williams C, Horsthemke B. 2014b. Clinical utility gene card for: Angelman Syndrome. *Eur J Hum Genet*.
- Buiting K, Di Donato N, Beygo J, Bens S, von der Hagen M, Hackmann K, Horsthemke B. 2014c. Clinical phenotypes of MAGEL2 mutations and deletions. *Orphanet J Rare Dis* 9:40.
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J, Nothen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AM, Halley DJ, Schrandt-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls RD, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, Van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. 1998a. Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 63(1):170-80.
- Buiting K, Greger V, Brownstein BH, Mohr RM, Voiculescu I, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B. 1992. A putative gene family in 15q11-13 and 16p11.2: possible implications for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5457-61.
- Buiting K, Gross S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B. 1998b. Expressed copies of the MN7 (D15F37) gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* 81(3-4):247-53.
- Buiting K, Gross S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B. 2003. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 72(3):571-7.
- Buiting K, Kanber D, Martin-Subero JI, Lieb W, Terhal P, Albrecht B, Purmann S, Gross S, Lich C, Siebert R, Horsthemke B, Gillessen-Kaesbach G. 2008. Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum Mutat* 29(9):1141-6.
- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B. 1999. A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* 105(6):665-6.
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. 1995. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9(4):395-400.
- Butler MG. 2009. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* 26(9-10):477-86.
- Butler MG, Palmer CG. 1983. Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* 1(8336):1285-6.
- Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. 2009. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* 52(6):398-403.
- Caliebe A, Richter J, Ammerpohl O, Kanber D, Beygo J, Bens S, Haake A, Juttner E, Korn B, Mackay DJ, Martin-Subero JI, Nagel I, Sebire NJ, Seidmann L, Vater I, von Kaisenberg CS, Temple IK, Horsthemke B, Buiting K, Siebert R. 2014. A familial disorder of altered DNA-methylation. *J Med Genet* 51(6):407-12.

- Cassidy SB, Driscoll DJ. 2009. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 17(1):3-13.
- Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. 2012. Prader-Willi syndrome. *Genet Med* 14(1):10-26.
- Cattanach BM. 1986. Parental origin effects in mice. *J Embryol Exp Morphol* 97 Suppl:137-50.
- Cattanach BM, Kirk M. 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315(6019):496-8.
- Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A. 2000. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26):14311-6.
- Cavaille J, Seitz H, Paulsen M, Ferguson-Smith AC, Bachellerie JP. 2002. Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Hum Mol Genet* 11(13):1527-38.
- Cedar H, Bergman Y. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10(5):295-304.
- Cerrato F, Sparago A, Farina L, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. 2005. Microdeletion and IGF2 loss of imprinting in a cascade causing Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumor - Reply. *Nature Genetics* 37(8):786-7.
- Cerrato F, Sparago A, Verde G, De Crescenzo A, Citro V, Cubellis MV, Rinaldi MM, Boccuto L, Neri G, Magnani C, D'Angelo P, Collini P, Perotti D, Sebastio G, Maher ER, Riccio A. 2008. Different mechanisms cause imprinting defects at the IGF2/H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumour. *Hum Mol Genet* 17(10):1427-35.
- Chai JH, Locke DP, Grealley JM, Knoll JH, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler EE, Nicholls RD. 2003. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* 73(4):898-925.
- Charlier C, Segers K, Wagenaar D, Karim L, Berghmans S, Jaillon O, Shay T, Weissenbach J, Cockett N, Gyapay G, Georges M. 2001. Human-ovine comparative sequencing of a 250-kb imprinted domain encompassing the callipyge (clpg) locus and identification of six imprinted transcripts: DLK1, DAT, GTL2, PEG11, antiPEG11, and MEG8. *Genome Res* 11(5):850-62.
- Choufani S, Shuman C, Weksberg R. 2010. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(3):343-54.
- Choufani S, Shuman C, Weksberg R. 2013. Molecular findings in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C(2):131-40.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. 1999. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 8(6):1025-37.
- Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T. 2009. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461(7262):415-8.

- Clopper CJ, Pearson ES. 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26:404-13.
- Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, Bowdin SC, Riccio A, Sebastio G, Blik J, Schofield PN, Reik W, Macdonald F, Maher ER. 2005. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 13(9):1025-32.
- Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, Garin I, Iglesias-Platas I, Salafsky I, Guitart M, Perez de Nanclares G, Lapunzina P, Monk D. 2013. Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum Mutat* 34(4):595-602.
- Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon 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. 2014. 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* 24(4):554-69.
- da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC. 2008. Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet* 24(6):306-16.
- Dagli A, Buiting K, Williams CA. 2012. Molecular and Clinical Aspects of Angelman Syndrome. *Mol Syndromol* 2(3-5):100-12.
- Dan B. 2009. Angelman syndrome: current understanding and research prospects. *Epilepsia* 50(11):2331-9.
- Davis TL, Trasler JM, Moss SB, Yang GJ, Bartolomei MS. 1999. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 58(1):18-28.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 9(19):2885-94.
- Davison AC, Hinkley DV. 1997. Bootstrap methods and their application. Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- De Crescenzo A, Coppola F, Falco P, Bernardo I, Ausanio G, Cerrato F, Falco L, Riccio A. 2011. A novel microdeletion in the IGF2/H19 imprinting centre region defines a recurrent mutation mechanism in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Med Genet* 54(4):e451-4.
- de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GS, O'Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AI. 2009. A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* 18(17):3257-65.
- Dean W. 2014. DNA methylation and demethylation: a pathway to gametogenesis and development. *Mol Reprod Dev* 81(2):113-25.
- Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25(10):1010-22.

- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64(4):849-59.
- Demars J, Gicquel C. 2012. Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. *Clin Genet* 81(4):350-61.
- Demars J, Rossignol S, Netchine I, Lee KS, Shmela M, Faivre L, Weill J, Odent S, Azzi S, Callier P, Lucas J, Dubourg C, Andrieux J, Le Bouc Y, El-Osta A, Gicquel C. 2011. New insights into the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Hum Mutat* 32(10):1171-82.
- Demars J, Shmela ME, Rossignol S, Okabe J, Netchine I, Azzi S, Cabrol S, Le Caignec C, David A, Le Bouc Y, El-Osta A, Gicquel C. 2010. Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet* 19(5):803-14.
- Deveault C, Qian JH, Chebaro W, Ao A, Gilbert L, Mehio A, Khan R, Tan SL, Wischmeijer A, Coullin P, Xie X, Slim R. 2009. NLRP7 mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation. *Hum Mol Genet* 18(5):888-97.
- Dindot SV, Person R, Strivens M, Garcia R, Beaudet AL. 2009. Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res* 19(8):1374-83.
- Duenez-Guzman EA, Haig D. 2014. The evolution of reproduction-related NLRP genes. *J Mol Evol* 78(3-4):194-201.
- Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T. 2010. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 18(11):1196-201.
- Dupont C, Armant DR, Brenner CA. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27(5):351-7.
- Edwards CA, Ferguson-Smith AC. 2007. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* 19(3):281-9.
- Eggermann T, Algar E, Lapunzina P, Mackay D, Maher ER, Mannens M, Netchine I, Prawitt D, Riccio A, Temple IK, Weksberg R. 2014a. Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur J Hum Genet* 22(3).
- Eggermann T, Buiting K, Temple IK. 2011a. Clinical utility gene card for: Silver-Russell syndrome. *Eur J Hum Genet* 19(3).
- Eggermann T, Eggermann K, Schonherr N. 2008. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 24(4):195-204.
- Eggermann T, Heilsberg AK, Bens S, Siebert R, Beygo J, Buiting K, Begemann M, Soellner L. 2014b. Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: an urgent need for multi-locus testing. *J Mol Med (Berl)*.
- Eggermann T, Leisten I, Binder G, Begemann M, Spengler S. 2011b. Disturbed methylation at multiple imprinted loci: an increasing observation in imprinting disorders. *Epigenomics* 3(5):625-37.

- El-Maarri O, Seoud M, Coullin P, Herbiniaux U, Oldenburg J, Rouleau G, Slim R. 2003. Maternal alleles acquiring paternal methylation patterns in biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 12(12):1405-13.
- Engel E. 1980. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6(2):137-43.
- Engel E. 2006. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* 14(11):1158-69.
- Evans WE, Johnson JA. 2001. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:9-39.
- Fallahian M, Sebire NJ, Savage PM, Seckl MJ, Fisher RA. 2013. Mutations in NLRP7 and KHDC3L confer a complete hydatidiform mole phenotype on digynic triploid conceptions. *Hum Mutat* 34(2):301-8.
- Färber C, Gross S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B. 2000. Identification of a testis-specific gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* 65(2):174-83.
- Fazzari MJ, Grealley JM. 2004. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5(6):446-55.
- Feil R, Berger F. 2007. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet* 23(4):192-9.
- Ferguson-Smith AC. 2011. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet* 12(8):565-75.
- Ferguson-Smith AC, Cattanaach BM, Barton SC, Beechey CV, Surani MA. 1991. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* 351(6328):667-70.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473(7347):398-402.
- Frevel MA, Sowerby SJ, Petersen GB, Reeve AE. 1999. Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms tumor. *J Biol Chem* 274(41):29331-40.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196(2):261-82.
- Gertz J, Varley KE, Reddy TE, Bowling KM, Pauli F, Parker SL, Kucera KS, Willard HF, Myers RM. 2011. Analysis of DNA methylation in a three-generation family reveals widespread genetic influence on epigenetic regulation. *PLoS Genet* 7(8):e1002228.
- Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. 2007. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet* 15(3):352-61.
- Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. 2011. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res* 135(3-4):222-7.
- Gillissen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B. 1999. A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and

- ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* 7(6):638-44.
- Girardot M, Feil R, Lleres D. 2013. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics* 5(6):715-28.
- Goll MG, Bestor TH. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481-514.
- Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1609):20110328.
- Haig D. 1997. Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proc Biol Sci* 264(1388):1657-62.
- Hall JG. 1990. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 46(5):857-73.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405(6785):486-9.
- 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. 2009. Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. *Hum Mutat* 30(5):E629-39.
- Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehense V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C. 1991. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 351(6328):665-7.
- Heyn H, Esteller M. 2012. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 13(10):679-92.
- Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. 2013. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*.
- Hoffmann K, Heller R. 2011. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(1):77-100.
- Holmgren C, Kanduri C, Dell G, Ward A, Mukhopadhyaya R, Kanduri M, Lobanenkova V, Ohlsson R. 2001. CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr Biol* 11(14):1128-30.
- Hore TA, Rapkins RW, Graves JA. 2007. Construction and evolution of imprinted loci in mammals. *Trends Genet* 23(9):440-8.
- Hori N, Nakano H, Takeuchi T, Kato H, Hamaguchi S, Oshimura M, Sato K. 2002. A dyad oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region. *J Biol Chem* 277(31):27960-7.
- Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz TC, Shirayoshi Y, Oshimura M. 2000. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 9(14):2075-83.
- Horsthemke B. 2010. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(3):321-8.

- Horsthemke B. 2014. In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J Pathol* 232(5):485-7.
- Horsthemke B, Buiting K. 2006. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 113(1-4):292-9.
- Horsthemke B, Buiting K. 2008. Genomic imprinting and imprinting defects in humans. *Adv Genet* 61:225-46.
- Horsthemke B, Wagstaff J. 2008. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A(16):2041-52.
- Hosoki K, Ogata T, Kagami M, Tanaka T, Saitoh S. 2008. Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 16(8):1019-23.
- Ideraabdullah FY, Bartolomei MS. 2011. ZFP57: KAPturing DNA methylation at imprinted loci. *Mol Cell* 44(3):341-2.
- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS. 2008. Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res* 647(1-2):77-85.
- Illingworth RS, Bird AP. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 583(11):1713-20.
- Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. 2013. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril* 99(3):607-15.
- Irving MD, Buiting K, Kanber D, Donaghue C, Schulz R, Offiah A, Mohammed SN, Oakey RJ. 2010. Segmental paternal uniparental disomy (patUPD) of 14q32 with abnormal methylation elicits the characteristic features of complete patUPD14. *Am J Med Genet A* 152A(8):1942-50.
- Jacob KJ, Robinson WP, Lefebvre L. 2013. Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth. *Clin Genet* 84(4):326-34.
- Jain S, Chen S, Chang KC, Lin YJ, Hu CT, Boldbaatar B, Hamilton JP, Lin SY, Chang TT, Chen SH, Song W, Meltzer SJ, Block TM, Su YH. 2012. Impact of the location of CpG methylation within the GSTP1 gene on its specificity as a DNA marker for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7(4):e35789.
- Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. 2000. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 10(5):597-610.
- Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD. 1999. The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* 8(3):533-42.
- Jinno Y, Sengoku K, Nakao M, Tamate K, Miyamoto T, Matsuzaka T, Sutcliffe JS, Anan T, Takuma N, Nishiwaki K, Ikeda Y, Ishimaru T, Ishikawa M, Niikawa N. 1996. Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum Mol Genet* 5(8):1155-61.
- Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13(7):484-92.

- Jones PA, Liang G. 2009. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10(11):805-11.
- Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD. 1999. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 8(5):783-93.
- Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT. 2002. A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 416(6880):539-42.
- Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. 2010. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 6(6):e1000992.
- Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. 2008. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 40(2):237-42.
- Kanber D, Buiting K, Zeschnigk M, Ludwig M, Horsthemke B. 2009. Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *Eur J Hum Genet* 17(1):22-9.
- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R, Lobanenkov VV. 2000. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* 10(14):853-6.
- Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, Morita S, Yamada K, Ito M, Ferguson-Smith AC, Kono T. 2007. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat Biotechnol* 25(9):1045-50.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. 1997. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15(1):70-3.
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalonde M, Latt SA. 1989b. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32(2):285-90.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H. 2004. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428(6985):860-4.
- Kotzot D. 1999. Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet* 82(3):265-74.
- Kotzot D. 2001. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet* 38(8):497-507.
- Kotzot D. 2008. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* 45(9):545-56.
- Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Mehes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, et al. 1995. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 4(4):583-7.

- Kou YC, Shao L, Peng HH, Rosetta R, del Gaudio D, Wagner AF, Al-Hussaini TK, Van den Veyver IB. 2008. A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles. *Mol Hum Reprod* 14(1):33-40.
- Kufer TA, Sansonetti PJ. 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* 12(2):121-8.
- Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28):10684-9.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. 1997. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 15(2):181-5.
- Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. 2008. A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 15(4):547-57.
- Liang XW, Zhu JQ, Miao YL, Liu JH, Wei L, Lu SS, Hou Y, Schatten H, Lu KH, Sun QY. 2008. Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 371(1):16-21.
- Lighten AD, Hardy K, Winston RM, Moore GE. 1997. IGF2 is parentally imprinted in human preimplantation embryos. *Nat Genet* 15(2):122-3.
- Lin SP, Coan P, da Rocha ST, Seitz H, Cavaille J, Teng PW, Takada S, Ferguson-Smith AC. 2007. Differential regulation of imprinting in the murine embryo and placenta by the *Dlk1-Dio3* imprinting control region. *Development* 134(2):417-26.
- Lin SP, Youngson N, Takada S, Seitz H, Reik W, Paulsen M, Cavaille J, Ferguson-Smith AC. 2003. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet* 35(1):97-102.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462(7271):315-22.
- Lubinsky M, Herrmann J, Kosseff AL, Opitz JM. 1974. Letter: Autosomal-dominant sex-dependent transmission of the Wiedemann-Beckwith syndrome. *Lancet* 1(7863):932.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13(8):839-49.
- Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ. 2007. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res* 17(12):1723-30.
- Lutsik P, Feuerbach L, Arand J, Lengauer T, Walter J, Bock C. 2011. BiQ Analyzer HT: locus-specific analysis of DNA methylation by high-throughput bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue):W551-6.
- MacDonald HR, Wevrick R. 1997. The *necdin* gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* 6(11):1873-8.

- MacDonald WA, Mann MR. 2014. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev* 81(2):126-40.
- Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. 2008. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 40(8):949-51.
- Mahadevan S, Wen S, Balasa A, Fruhman G, Mateus J, Wagner A, Al-Hussaini T, Van den Veyver IB. 2013. No evidence for mutations in NLRP7 and KHDC3L in women with androgenetic hydatidiform moles. *Prenat Diagn* 33(13):1242-7.
- Maher ER, Reik W. 2000. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 105(3):247-52.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ, Pembrey ME. 1991. Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* 337(8743):694-7.
- Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Coto E, Corral-Juan M, San Nicolas H, Corral J, Volpini V, Matilla-Duenas A, Monk D. 2011. Genotype of an individual single nucleotide polymorphism regulates DNA methylation at the TRPC3 alternative promoter. *Epigenetics* 6(10):1236-41.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. 1995. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9(6):650-62.
- Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP. 1996. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7):3026-30.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. 1997. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 15(1):74-7.
- McGrath J, Solter D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37(1):179-83.
- Merkenschlager M, Odom DT. 2013. CTCF and cohesin: linking gene regulatory elements with their targets. *Cell* 152(6):1285-97.
- Messaed C, Chebaro W, Di Roberto RB, Rittore C, Cheung A, Arseneau J, Schneider A, Chen MF, Bernishke K, Surti U, Hoffner L, Sauthier P, Buckett W, Qian J, Lau NM, Bagga R, Engert JC, Coullin P, Touitou I, Slim R. 2011. NLRP7 in the spectrum of reproductive wastage: rare non-synonymous variants confer genetic susceptibility to recurrent reproductive wastage. *J Med Genet* 48(8):540-8.
- Meyer E, Lim D, Pasha S, Tee LJ, Rahman F, Yates JR, Woods CG, Reik W, Maher ER. 2009. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet* 5(3):e1000423.
- Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP, Oshimura M. 1999. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum Mol Genet* 8(7):1209-17.

- Mitter D, Buiting K, von Eggeling F, Kuechler A, Liehr T, Mau-Holzmann UA, Prott EC, Wieczorek D, Gillessen-Kaesbach G. 2006. Is there a higher incidence of maternal uniparental disomy 14 [upd(14)mat]? Detection of 10 new patients by methylation-specific PCR. *Am J Med Genet A* 140(19):2039-49.
- Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, Shiroishi T, Nomura M, Aisaka K, Kohda T, Surani MA, Kaneko-Ishino T, Ishino F. 2000. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells* 5(3):211-20.
- Moglabey YB, Kircheisen R, Seoud M, El Mogharbel N, Van den Veyver I, Slim R. 1999. Genetic mapping of a maternal locus responsible for familial hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 8(4):667-71.
- Moore T, Haig D. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7(2):45-9.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
- 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. 2006. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 38(3):300-2.
- Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W. 2004. An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 13(2):247-55.
- Naik S, Temple IK. 2010. Coat hanger appearances of the ribs: a useful diagnostic marker of paternal uniparental disomy of chromosome 14. *Arch Dis Child* 95(11):909.
- Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D. 2011. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 20(16):3188-97.
- Nativio R, Sparago A, Ito Y, Weksberg R, Riccio A, Murrell A. 2011. Disruption of genomic neighbourhood at the imprinted IGF2-H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Hum Mol Genet* 20(7):1363-74.
- Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B. 2004. Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* 13(21):2547-55.
- Neumann LC, Feiner N, Meyer A, Buiting K, Horsthemke B. 2014. The imprinted NPAP1 gene in the Prader-Willi syndrome region belongs to a POM121-related family of retrogenes. *Genome Biol Evol*.
- Nguyen NM, Slim R. 2014. Genetics and Epigenetics of Recurrent Hydatidiform Moles: Basic Science and Genetic Counselling. *Curr Obstet Gynecol Rep* 3:55-64.
- Nicholls RD, Knepper JL. 2001. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:153-75.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. 1989. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342(6247):281-5.

- North BV, Curtis D, Sham PC. 2002. A note on the calculation of empirical P values from Monte Carlo procedures. *Am J Hum Genet* 71(2):439-41.
- Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. 2008. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 3(4):181-7.
- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD. 1999a. Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* 64(2):385-96.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD. 1999b. Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 64(2):397-413.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99(3):247-57.
- 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. 2011. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am J Hum Genet* 89(3):451-8.
- Peng H, Chang B, Lu C, Su J, Wu Y, Lv P, Wang Y, Liu J, Zhang B, Quan F, Guo Z, Zhang Y. 2012. Nlrp2, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS One* 7(1):e30344.
- Pentao L, Lewis RA, Ledbetter DH, Patel PI, Lupski JR. 1992. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 14: association with autosomal recessive rod monochromacy. *Am J Hum Genet* 50(4):690-9.
- Peters SU, Bird LM, Kimonis V, Glaze DG, Shinawi LM, Bichell TJ, Barbieri-Welge R, Nespeca M, Anselm I, Waisbren S, Sanborn E, Sun Q, O'Brien WE, Beaudet AL, Bacino CA. 2010. Double-blind therapeutic trial in Angelman syndrome using betaine and folic acid. *Am J Med Genet A* 152A(8):1994-2001.
- Phillips JE, Corces VG. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137(7):1194-211.
- Pollard KS, Serre D, Wang X, Tao H, Grundberg E, Hudson TJ, Clark AG, Frazer K. 2008. A genome-wide approach to identifying novel-imprinted genes. *Hum Genet* 122(6):625-34.
- Poole RL, Docherty LE, Al Sayegh A, Caliebe A, Turner C, Baple E, Wakeling E, Harrison L, Lehmann A, Temple IK, Mackay DJ. 2013. Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am J Med Genet A* 161(9):2174-82.
- Poole RL, Leith DJ, Docherty LE, Shmela ME, Gicquel C, Splitt M, Temple IK, Mackay DJ. 2012. Beckwith-Wiedemann syndrome caused by maternally inherited mutation of an OCT-binding motif in the IGF2/H19-imprinting control region, ICR1. *Eur J Hum Genet* 20(2):240-3.
- Prader A, Labhart A, Willi H. 1956. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 86:1260-1.

- Prawitt D, Enklaar T, Gartner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Lausch E, Schmidtke P, Reutzel D, Fees S, Lucito R, Korzon M, Brozek I, Limon J, Housman DE, Pelletier J, Zabel B. 2005a. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11):4085-90.
- Prawitt D, Enklaar T, Gartner-Rupprecht B, Spangenberg C, Lausch E, Reutzel D, Fees S, Korzon M, Brozek I, Limon J, Housman DE, Pelletier J, Zabel B. 2005b. Microdeletion and IGF2 loss of imprinting in a cascade causing Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumor. *Nat Genet* 37(8):785-6; author reply 6-7.
- Prickett AR, Oakey RJ. 2012. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. *Mol Genet Genomics* 287(8):621-30.
- Qian J, Cheng Q, Murdoch S, Xu C, Jin F, Chebaro W, Zhang X, Gao H, Zhu Y, Slim R, Xie X. 2011. The genetics of recurrent hydatidiform moles in China: correlations between NLRP7 mutations, molar genotypes and reproductive outcomes. *Mol Hum Reprod* 17(10):612-9.
- Qian J, Deveault C, Bagga R, Xie X, Slim R. 2007. Women heterozygous for NLRP7/NLRP7 mutations are at risk for reproductive wastage: report of two novel mutations. *Hum Mutat* 28(7):741.
- Quenneville S, Turelli P, Bojkowska K, Raclot C, Offner S, Kapopoulou A, Trono D. 2012. The KRAB-ZFP/KAP1 system contributes to the early embryonic establishment of site-specific DNA methylation patterns maintained during development. *Cell Rep* 2(4):766-73.
- Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, Baglivo I, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A, Trono D. 2011. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 44(3):361-72.
- Rachmilewitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, de Groot N, Hochberg A. 1992. Parental imprinting of the human H19 gene. *FEBS Lett* 309(1):25-8.
- Rahmann S, Beygo J, Kanber D, Martin M, Horsthemke B, Buiting K. 2013. Amplifyer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing. *PeerJ PrePrints* 1.
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362(6422):747-9.
- Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. 2010. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet* 11:70.
- Reddy R, Akoury E, Phuong Nguyen NM, Abdul-Rahman OA, Dery C, Gupta N, Daley WP, Ao A, Landolsi H, Ann Fisher R, Touitou I, Slim R. 2013. Report of four new patients with protein-truncating mutations in C6orf221/KHDC3L and colocalization with NLRP7. *Eur J Hum Genet* 21(9):957-64.
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532):1089-93.
- Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2(1):21-32.
- Renfree MB, Hore TA, Shaw G, Graves JA, Pask AJ. 2009. Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10:241-62.

- Renfree MB, Suzuki S, Kaneko-Ishino T. 2013. The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1609):20120151.
- Robinson WP. 2000. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* 22(5):452-9.
- Ronan A, Buiting K, Dudding T. 2008. Atypical Angelman syndrome with macrocephaly due to a familial imprinting center deletion. *Am J Med Genet A* 146A(1):78-82.
- Runte M, Farber C, Lich C, Zeschnigk M, Buchholz T, Smith A, Van Maldergem L, Burger J, Muscatelli F, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B, Buiting K. 2001a. Comprehensive methylation analysis in typical and atypical PWS and AS patients with normal biparental chromosomes 15. *Eur J Hum Genet* 9(7):519-26.
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K. 2001b. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* 10(23):2687-700.
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. 2004. SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 114(6):553-61.
- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL. 2008. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 40(6):719-21.
- Sakaguchi R, Okamura E, Matsuzaki H, Fukamizu A, Tanimoto K. 2013. Sox-Oct motifs contribute to maintenance of the unmethylated H19 ICR in YAC transgenic mice. *Hum Mol Genet* 22(22):4627-37.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7.
- Sasaki H, Matsui Y. 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 9(2):129-40.
- Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM. 2003. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* 33(1):66-9.
- Searle AG, Beechey CV. 1978. Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet Cell Genet* 20(1-6):282-303.
- Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. 2013. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1609):20110330.
- Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaille J. 2004. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res* 14(9):1741-8.
- Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, Smallwood AC, Joyce JA, Schofield PN, Reik W, Nicholls RD, Weksberg R, Driscoll DJ, Maher ER, Shows TB, Higgins MJ. 1999. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14):8064-9.

- Soejima H, Higashimoto K. 2013. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet* 58(7):402-9.
- Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. 2004. Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 36(9):958-60.
- Sparago A, Russo S, Cerrato F, Ferraiuolo S, Castorina P, Selicorni A, Schwienbacher C, Negrini M, Ferrero GB, Silengo MC, Anichini C, Larizza L, Riccio A. 2007. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet* 16(3):254-64.
- Stefansson OA, Esteller M. 2013. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *Am J Pathol* 183(4):1052-63.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308(5959):548-50.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1986. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 45(1):127-36.
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL. 1994. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 8(1):52-8.
- Szabo PE, Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR. 2004. Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24(11):4791-800.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324(5929):930-5.
- Takada S, Paulsen M, Tevendale M, Tsai CE, Kelsey G, Cattanach BM, Ferguson-Smith AC. 2002. Epigenetic analysis of the Dlk1-Gtl2 imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with Igf2-H19. *Hum Mol Genet* 11(1):77-86.
- Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, Thayer MJ, Jones PA. 2001. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet* 10(23):2619-26.
- Takai D, Jones PA. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3740-5.
- Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. 1991. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 28(8):511-4.
- Temple IK, Shrubbs V, Lever M, Bullman H, Mackay DJ. 2007. Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet* 44(10):637-40.
- Tian X, Pascal G, Monget P. 2009. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 9:202.

- Tsugu A, Sakai K, Dirks PB, Jung S, Weksberg R, Fei YL, Mondal S, Ivanchuk S, Ackerley C, Hamel PA, Rutka JT. 2000. Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* 157(3):919-32.
- Tucker KL, Beard C, Dausmann J, Jackson-Grusby L, Laird PW, Lei H, Li E, Jaenisch R. 1996. Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. *Genes Dev* 10(8):1008-20.
- Turan N, Katari S, Coutifaris C, Sapienza C. 2010. Explaining inter-individual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? *Epigenetics* 5(1):16-9.
- Tycko B. 2010. Allele-specific DNA methylation: beyond imprinting. *Hum Mol Genet* 19(R2):R210-20.
- Ulker V, Gurkan H, Tozkir H, Karaman V, Ozgur H, Numanoglu C, Gedikbasi A, Akbayir O, Uyguner ZO. 2013. Novel NLRP7 mutations in familial recurrent hydatidiform mole: are NLRP7 mutations a risk for recurrent reproductive wastage? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 170(1):188-92.
- Wang JC, Passage MB, Yen PH, Shapiro LJ, Mohandas TK. 1991. Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 Robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet* 48(6):1069-74.
- Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, Yang L, Li G, Ci W, Li W, Zhou Q, Aluru N, Tang F, He C, Huang X, Liu J. 2014. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* 157(4):979-91.
- Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. 2010. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 18(1):8-14.
- Weksberg R, Shuman C, Smith AC. 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137C(1):12-23.
- Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A. 2005. Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 13(3):273-7.
- Wiedemann HR. 1969. [The EMG-syndrome: exomphalos, macroglossia, gigantism and disturbed carbohydrate metabolism]. *Z Kinderheilkd* 106(3):171-85.
- Wilkins JF, Haig D. 2003. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet* 4(5):359-68.
- Williams D, Hodgetts V, Gupta J. 2010a. Recurrent hydatidiform moles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 150(1):3-7.
- Williams CA, Driscoll DJ, Dagli AI. 2010b. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genet Med* 12(7):385-95.
- Williams K, Christensen J, Helin K. 2012. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 13(1):28-35.
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K. 2001. A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 10(3):201-10.

- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2:241.
- Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL. 2000. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res* 10(11):1711-8.
- Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. 2010. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(3):329-34.
- Zeschnigk M, Albrecht B, Buiting K, Kanber D, Eggermann T, Binder G, Gromoll J, Prott EC, Seland S, Horsthemke B. 2008. IGF2/H19 hypomethylation in Silver-Russell syndrome and isolated hemihypoplasia. *Eur J Hum Genet* 16(3):328-34.
- Zeschnigk M, Martin M, Betzl G, Kalbe A, Sirsch C, Buiting K, Gross S, Fritzilas E, Frey B, Rahmann S, Horsthemke B. 2009. Massive parallel bisulfite sequencing of CG-rich DNA fragments reveals that methylation of many X-chromosomal CpG islands in female blood DNA is incomplete. *Hum Mol Genet* 18(8):1439-48.
- Zhang A, Skaar DA, Li Y, Huang D, Price TM, Murphy SK, Jirtle RL. 2011a. Novel retrotransposed imprinted locus identified at human 6p25. *Nucleic Acids Res* 39(13):5388-400.
- Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, Vishwanatha JK, Santella RM, Morabia A. 2011b. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics* 6(5):623-9.
- Zhang P, Dixon M, Zucchelli M, Hambiliki F, Levkov L, Hovatta O, Kere J. 2008. Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development. *PLoS One* 3(7):e2755.
- Zimmerman DL, Boddy CS, Schoenherr CS. 2013. Oct4/Sox2 binding sites contribute to maintaining hypomethylation of the maternal igf2/h19 imprinting control region. *PLoS One* 8(12):e81962.
- Zogel C, Bohringer S, Gross S, Varon R, Buiting K, Horsthemke B. 2006. Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 14(6):752-8.

7. Anhang

Tabelle A1: Primersequenzen und PCR Bedingungen der im Hinblick auf allelspezifische Methylierung hin untersuchten Gene

Locus		Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe (tw. inkl. tag)	Annealing Temp.	Zyklen und Taq	Re-PCR
<i>ACTN3</i>	genomisch	ACTN3_F_DNA	AGGGCACTATGAGGCCATT	300 bp	62 °C	-	-
		ACTN3_R_DNA	AAGGACAGGGATGACACCAC				
	Bisulfit	ACTN3_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGGGAGATTTGGGTTTTTTTA	321 bp	TD 61→54 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		ACTN3_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TACCCTACCCTCTCCTAAAATCATA				
<i>CCDC19</i>	genomisch	-	-	-	-	-	-
	Bisulfit	CCDC19_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGAAAATTGTGATTTGGGTTAG	455 bp	TD 61→54 °C	35 HST	2-step* 38 cycles
		CCDC19_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-ACACAAAAAACCCATCTAAAATTCT				
<i>CHP2</i>	genomisch	CHP2_F_DNA	CAGCCTCCACCACGTAATAAT	227 bp	60 °C	-	-
		CHP2_R_DNA	GAGCTCCAGACTGGGAATGA				
	Bisulfit	CHP2_Bis_F	CTTGCTTCCTGGCACGAG- TTTTTAAAGTGTTGGGATTATAGGTATG	358 bp	TD 61→54 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		CHP2_Bis_R	CAGGAAACAGCTATGAC-AACAACAAAACTCTTATTTACCAC				
<i>ECEL1</i>	genomisch	ECEL1_F_DNA	TCCATGGCTCTCACACATTG	195 bp	60 °C	-	-
		ECEL1_R_DNA	AGACAGCCTGGCCCTAATG				
	Bisulfit	ECEL1_Bis_F	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GTAGGGGTTTTAAGGAGGATAA	377 bp	TD 54→47 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		ECEL1_Bis_R	CAGGAAACAGCTATGAC-AACCACCTAACAATAAAAC				
<i>FAM50B⁺</i>	genomisch	FAM50B_F_DNA	CTCCTGTTTTACGCTGTGG	223 bp	62 °C	-	-
		FAM50B_R_DNA	AGTGGTGCGCAGGTAATGTT				
	Bisulfit	FAM50B_F_Bis nested M [#]	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GAAATAGGAAGTGGAGGTGGAT	358 bp	TD 57→50 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		FAM50B_R_rev_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-AAAAAAAAATTAACAAAAACAAAC				
	Expression	FAM50B_F_cDNA	AGTGTGCCACCTGGATTTG	214 bp	TD 66→59 °C	-	-
	FAM50B_R_cDNA	TGAGGCATGGGGGTTTAATA					
<i>GAL3ST1</i>	genomisch	GAL3ST1_F_DNA	TTGTTGGGGTCCAAAGAGAG	398 bp	60 °C	-	-
		GAL3ST1_R_DNA	CATGCACAAAGGGAAACTCA				
	Bisulfit	GAL3ST1_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-AGTTTGTTTTGGGTTTTTTGTAGG	427 bp	TD 61→54 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		GAL3ST1_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-AAACAAAAAACACACTCACCTC				
<i>HOXB6</i>	genomisch	HOXB6_F_DNA	AGCAGAGCTCCTGTGGAGAG	275 bp	60 °C	-	-
		HOXB6_R_DNA	ATCGCTGGATTCAACCACTC				
	Bisulfit	HOXB6_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG- AAAAATATTAAGAGGTTGGAGTTTTGA	419 bp	TD 65→58 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		HOXB6_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-AAAACCCCTTCCCAACTATAC				

Locus		Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe (tw. inkl. tag)	Annealing Temp.	Zyklen und Taq	Re-PCR
<i>POU3F1</i>	genomisch	POU3F1_F_DNA	AAGTCCGGGCAAACCTCTAGC	300 bp	60 °C	-	-
		POU3F1_R_DNA	GGGGTTCCAGAAGGAGAAGA				
	Bisulfit	POU3F1_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGGTATTGAGGTTTAGGTGAGTAT	457 bp	TD 65→58 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		POU3F1_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TTTCAACAACCTCCAAACAAATC				
<i>TRPC3</i>	genomisch	TRPC3_F_CpG55_DNA	TAGGTCCATGGAGGGAAGC	788 bp	TD 66→59 °C	-	-
		TRPC3_R_CpG55_DNA	GCGCAAAGCTTACCTTGAAC				
		TRPC3_F_DNA	CCCTGGACTTTGAGTTACCC	185 bp	TD 61→54 °C	-	-
		TRPC3_R_DNA	TGCTCGTTCAAACTTTGGTT				
	Bisulfit	TRPC3_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GTTTATGGAGGGAAGTTTATTTTTTG	334 bp	58 °C	38 HST	2-step 35 cycles
		TRPC3_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-AATTCTCCTTCTTAAACAACAACCTC				
	Expression	TRPC3_F_cDNA	ATGCTGCTTTTACCCTGTAG	449 bp	TD 61→54 °C	-	-
		TRPC3_R_cDNA	TGAGTTAGACTGAGTGAAGAG				
<i>TSPO</i>	genomisch	TSPO_F_DNA	GGGAGGGAAAACCTTGACA	370 bp	60 °C	-	-
		TSPO_R_DNA	CTTCTTTGCAAGGGGTAGGG				
	Bisulfit	TSPO_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-AGGGAAAATTTGGATAATTTTGTTA	378 bp	TD 61→54 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		TSPO_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-CAAACAAATCCCAAAAACCTACTC				
<i>ZNF710</i>	genomisch	ZNF710_F_DNA	TGTGACCAACTTTGCTTTGG	214 bp	62 °C	-	-
		ZNF710_R_DNA	CCTCCAACCTCCAGAACACC				
	Bisulfit	ZNF710_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-TTATGAATAATTGATTTTTTTTTGG	441 bp	TD 65→58 °C	35 HST	TD 62→55 °C
		ZNF710_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TTAAACAACCTATTAACAAAACCCT				

Die Tabelle fasst die verwendeten Primer für die Suche nach neuen geimprinteten Genen zusammen. Primer für genomische DNA wurden verwendet, um Normalkontrollen zu identifizieren, die heterozygot für die analysierten SNPs sind. Primer für Bisulfit-behandelte DNA wurden zur Generierung der Bisulfit *Amplicon libraries* für die Methylierungsanalysen auf dem Roche/454 GS Junior verwendet. Es sind die jeweiligen Primersequenzen sowie die Größe der Produkte (bei den Bisulfit Primern inklusive der 35 bp langen *tags*; vor dem Bindestrich in der Sequenz) und die verwendeten PCR Bedingungen angegeben. PCRs an genomischer DNA wurden standardmäßig mit der AmpliTaq Gold und dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Protokoll mit 35 Zyklen durchgeführt. Für die jeweiligen Sequenzreaktionen wurden die hier angegebenen Annealing Temperaturen verwendet. Die Re-PCR zur Erstellung der Bisulfit *Amplicon Libraries* wurde standardmäßig mit der HotStarTaq (Qiagen; HST) durchgeführt. TD – Touchdown PCR; * Verwendung der AmpliTaq Gold; + Bei *FAM50B* wurden in der Methylierungsanalyse jeweils die ersten beiden und das letzte CpG nicht berücksichtigt, um die Gesamtqualität der Analyse zu erhöhen; # Primersequenzen übernommen aus Zhang et al. 2011a.

Aus Beygo et al. 2013b.

Tabelle A2: Primer zur Bruchpunktcharakterisierung der Mikrodeletion in der ICR1 bei Familie 8

Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe	PCR Bedingungen
H19_Del_F_longrange	CCTCTATCTAATGACACGCTGTACTC	6678 bp (WT)	#
H19_Del_R_longrange	GACTCAGGAAATACTCCGGAAATAC		
H19_nDNArev*	GGGCTGTCCTTAGACGGAGT	-	60 °C

WT – Wildtyp; # Expand Long Range dNTPack (Roche); * Primer aus Zeschnigk et al. 2008 für die Sequenzierung verwendet. Aus Beygo et al. 2013a.

Tabelle A3: Primer und PCR Bedingungen der Analysen in der chromosomalen Region 14q32

Locus	Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe (ggf. inkl. tag)	PCR Bedingungen
Patient 1	Longrange_F2	GTGGTTAAATGACAGCGTCTTACTT	- (WT)	#
	Longrange_R2	TCGTATCGTTTCCATATCTTTCACT		
	Seq_R2	ATACTTGGCCAATGCTTCCA	-	60 °C
Patienten 2 und 3	Longrange_F1	GGCTCCTTAGGGACCATCTT	8.800 bp (WT)	#
	Longrange_R1	CAGCCTCTTCCTTCGACAAG		
	Seq_F1	GACCTGACGGTCAATGTTCA	-	60 °C
	Seq_R1	TGGTAAAAGCTCCTGCCAGT	-	60 °C
<i>MEG3</i> *	GTL2_G3_F2- tag	CTTGCTTCCTGGCAGAG- AAGAGGGAATAGTTTTGAGATTTTT	246 bp	60 °C 40 Zyklen HST
	GTL2_G3_R2 - M13	CAGGAAACAGCTATGAC- TAACCCCTCACTAACCTTATCACA		
<i>IG-DMR</i> *	IG-DMR-Ftag	CTTGCTTCCTGGCAGAG- GTTTATTGGGTTGGGTTTTGTTAG	302 bp	55 °C 45 Zyklen HST
	IG-DMR- RM13	CAGGAAACAGCTATGAC- ACCAATTACAATACCACAAAATTAC		

Die Tabelle fasst die Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die Analysen der Patienten mit einem upd(14)pat-Syndrom aufgrund von Deletionen zusammen.

Primer deren Namen mit 'Seq' starten wurden nur für die Sequenzierung der jeweiligen Deletion genutzt. Die Annealing Temperatur für die Sequenzreaktion ist in der Spalte 'PCR Bedingungen' angegeben. Aufgrund der Größe der Deletion bei Patient 1 könnte bei einer Normalkontrolle kein PCR-Produkt generiert werden (Größe ~ 165 kb).

Die longrange PCRs wurden mit dem Expand Long Range dNTPack (Roche) durchgeführt. Die jeweiligen Bedingungen sind in Kapitel 2.2.4 beschrieben. In beiden Fällen wurde dem PCR-Reaktionsansatz 6 % DMSO zugesetzt und für das PCR-Protokoll eine Elongationszeit von 9 min gewählt.

Die Bisulfite *Amplicon libraries* für *MEG3* und die IG-DMR wurden mit der HotStarTaq (Qiagen; HST) und einem Standard PCR-Protokoll durchgeführt. Bei den Re-PCRs wurde ebenfalls die HST verwendet, zusammen mit dem 2-step Protokoll (35 Zyklen).

WT – Wildtyp; # Expand Long Range dNTPack (Roche); * Primer aus Buiting et al. 2008. Aus Beygo et al. 2014.

Tabelle A4: Nähere Angaben zu den CNVs größer 100 kb mit Daten und Sequenzen zu qPCRs und Ergebnissen.

		Sample	Loss/ Gain	Chr	Gene	Produkt- größe	UPL Sonde Nr.	Primer			Ergebnis		
								Name	Sequenz	Tm [°C]			
1	PWS	PWS23	Loss	2	Ja (<i>ST6GAL2</i>)							CNVs in DGV über gesamte Region bekannt	
2	AS	AS45	Gain	2	Ja (<i>LOC84931; GLI2</i>)	62 bp	30	F_AS45_gain_GLI2_chr2	ctgggctctgatggcatt	59		Nicht bestätigt	
								R_AS45_gain_GLI2_chr2	ccattcatggcttgctcct	60			
3	AS	D7	Gain	2	Ja (<i>SPOPL, NXPH2, YYIP2</i>)							CNVs in DGV bekannt (gesamt Region und Teile)	
4	PWS	D1	Gain	3	Ja (<i>RBM6</i>)							CNVs in DGV über gesamte Region bekannt	
5	PWS	PWS38	Gain	3	Genwüste							Als nicht relevant erachtet	
6	AS	F41	Loss	3	Ja (<i>FILIP1L, CMSS1</i>)							Nicht ausreichend Eltern- Material vorhanden	
7	AS	AS71	Gain	4	Ja (<i>ADD1, MFSD10, NOPI4 (-AS1), GRK4, HTT (-AS)</i>)							CNVs in DGV bekannt (gesamt Region und Teile)	
8	PWS	A1	Loss	5	Ja (<i>LOC729506</i>)	60 bp	2	F_A1_loss_chr5	gggactaaggatctaccccaga	60		Bestätigt	Paternal erbt
								R_A1_loss_chr5	gcattttgtcatcatgtgtctt	59			
9	AS	E36	Gain	5	Ja (<i>RAI14</i>)							CNVs in DGV bekannt (gesamt Region und Teile)	
10	PWS	PWS52	Loss	5	Genwüste							Als nicht relevant erachtet	
11	PWS	D1	Gain	5	Genwüste							Als nicht relevant erachtet	
12	AS	D4	Gain	6	Ja (<i>UHRF1BP1, TAF11, ANKSA1A</i>)	61 bp	39	F_D4_AS_UHRF1BP1_gain	catgaggaaacatggttga	59		Bestätigt	Mat- oder paternal erbt
								R_D4_AS_UHRF1BP1_gain	tactgtccagctgcctcc	60			
13	AS	AS59	Loss	6	Genwüste							Als nicht relevant erachtet	
14	AS	F47	Loss	7	Ja (<i>BALAP2L1</i>)							Kein Material der Eltern vorhanden	
15	AS	AS53	Gain	7	Ja (<i>PTPRN2</i>)	60 bp	4	F_AS53_chr7_PTPRN2_gain	cccaccaggcagcataga	60		Bestätigt	Maternal erbt
								R_AS53_chr7_PTPRN2_gain	ctgctgctcatcaaggaac	60			
16	AS	AS60	Gain	9	Ja (<i>SLC44A1, FSD1L</i>)	62 bp	9	F_AS60_chr9_FSD1L_gain	atgaggcctgtaattgtg	59		Bestätigt	Paternal erbt
								R_AS60_chr9_FSD1L_gain	gtctgcacaggaatctcag	59			

		Sample	Loss/ Gain	Chr	Gene	Produkt- größe	UPL Sonde Nr.	Primer			Ergebnis	
								Name	Sequenz	Tm [°C]		
17	AS	AS72	Gain	10	Ja (<i>LOC100507127</i>)	89 bp	52	F_AS72_chr10_gain_LOC100	ccctcactagctgtgacaacc	59	Bestätigt	Maternal ererb
								R_AS72_chr10_gain_LOC100	ccttacttgggagtggttgg	60		
18	PWS	PWS36	Gain	10	Genwüste						Als nicht relevant erachtet	
19	AS	E33	Gain	12	Ja (<i>ACACB</i>)	72 bp	20	F_E33_ACAB_gain_chr12	accccttctgtgttgcag	60	Bestätigt	Paternal ererb
								R_E33_ACAB_gain_chr12	gctccggaagttagggttt	59		
20	AS	AS33	Gain	12	Ja (<i>ACAD10, ALDH2, C12orf47, MAPKAPK5</i>)						Nicht ausreichend Material der Eltern vorhanden	
21	AS	AS46	Gain	12	Ja (<i>ACAD10, ALDH2, C12orf47, MAPKAPK5</i>)	72 bp	5	F_AS46_gain_Ch12_MAPKAPK5	gtgttcagctggaaagctat	59	Bestätigt	Maternal ererb
								R_AS46_gain_Ch12_MAPKAPK5	ctcaggtagctggcagcaa	59		
22	AS	AS59	Gain	15	Ja (<i>RASGRP1, C15orf53</i>)	60 bp	25	F_AS59_chr15_RASGPR_gain	ttgccagaaagtgaggatttc	59	Bestätigt	Maternal ererb
								R_AS59_chr15_RASGPR_gain	aagaggagacagacatagctcca	59		
23	PWS	PWS24	Gain	15	Ja (<i>LRRC28</i>)						CNVs in DGV über gesamte Region bekannt	
24	AS	F42	Loss	16	Genwüste						Als nicht relevant erachtet	
25	AS	AS45	Loss	17	Ja (<i>CACNG4, CACNG1, HELZ</i>)						CNVs in DGV bekannt (gesamte Region und Teile)	
26	PWS	PWS52	Gain	18	Ja (<i>PARD6G, LOC100130522</i>)	75 bp	4	F_PWS52_PARD6G_gain	tcagcctgtctgcagtgg	59	Bestätigt	Paternal ererb
								R_PWS52_PARD6G_gain	cagtcacctgtcccatac	60		
27	AS	AS45	Loss	19	Ja (<i>LOC100289333, ZNF44</i>)	92 bp	47	F_AS45_ZNF44_UPL47_loss	ggaaagcctcagtctctcag	59	Bestätigt	De novo
								R_AS45_ZNF44_UPL47_loss	aatgcttcccacattccat	59		
28	PWS	B2	Gain	19	Ja (<i>CYP4F22, CYP4F8, CYP4F3</i>)	73 bp	31	F_B2_PWS_CYP4F8_gain	ccacattccagtgtctga	59	Nicht bestätigt	
								R_B2_PWS_CYP4F8_gain	gctaaaggaagtccacag	59		

		Sample	Loss/ Gain	Chr	Gene	Produkt- größe	UPL Sonde Nr.	Primer			Ergebnis	
								Name	Sequenz	Tm [°C]		
29	PWS	PWS36	Loss	19	Ja (<i>TDRD12</i> , <i>SLC7A9</i> , <i>CEP89</i>)						Nicht mehr ausreichend Material vorhanden - Patient verstorben	
30	PWS	B2	Loss	21	Genwüste						Als nicht relevant erachtet	
31	AS	E34	Gain	21	Ja (<i>ITSN1</i> , <i>ATP50</i> , <i>LINC00649</i> , <i>LOC400863</i>)	60 bp	6	F_ITSN1_E34_gain	ctgccacctttctctgacc	59	Nicht bestätigt	
								R_ITSN1_E34_gain	tcattcaccaagatgggatataca	60		
32	PWS	A6	Gain	21	Ja (<i>DSCR4</i> , <i>DSCR8</i> , <i>DSCR10</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>LOC102724678</i> , <i>ERG</i>)						Kein Material der Eltern vorhanden	
33	AS	AS45	Loss	22	Ja (<i>GRAP2</i> , <i>FAM83F</i> , <i>TNTC6B</i>)	60 bp	8	F_FAM83F_AS45_UPL8_loss	ctcaaagcccattgtctgtc	59	Bestätigt	De novo
								R_FAM83F_AS45_UPL8_loss	acatggatgtggaggacac	60		

Die Tabelle fasst die manuell erhobenen Daten zum Gengehalt der einzelnen Regionen sowie die Daten der qPCRs und deren Ergebnisse zusammen.

UPL – *universal probe library* Roche; Tm - Schmelztemperatur der Primer.

Tabelle A5: Referenzen der qPCR-Analysen

	Primer	Sequenz 5' → 3'	Größe	UPL Sonde Nr.
AS-SRO2 ⁺	For	AGCGAAGCTCAGACATCATTG	74 bp	-
	Rev	CAAACCTTTAACAGCAGCTGACCTA		
	Sonde	6FAM-ATAGCTATTGCTTTGTGTCTGTGTT-Tamra		
TRPS1 Exon 7*	TRPS1qPCR11	CAAACAACGGTGAGCAGATT	67 bp	63
	TRPS1qPCR12	CCTGAAGTGCCTCTGGGTTA		

⁺ Aus Ronan et al. 2008; * Assay freundlicher Weise von Dr. Hermann-Josef Lüdecke (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. UPL – *universal probe library* Roche.

Tabelle A6: Primer und PCR Bedingungen für die Methylierungsanalyse der CTCF-Bindestellen 1 bis 6 der ICR1 auf 11p15.5

Locus / CTCF	Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe (inkl. tag)	Annealing Temp.	Zyklen und Taq
H19-CTCF1	CTCF1_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GTATTTTGGAGGTTTTTATTAG	301 bp	56 °C	40 HST
	CTCF1_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TATCTATCTCTAACAACCCCTC			
H19-CTCF2	CTCF2_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG-AGGTGTTTTAGTTTTTGGATGATA	357 bp	56 °C	40 HST
	CTCF2_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TCCCATAAAATATTCTATCCCTCACTA			
H19-CTCF3	CTCF3_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGGAGATGAGATATTTTGGTGATAATG	302 bp	50 °C	50 HST
	3CTCF-H19-RM13	CAGGAAACAGCTATGAC-CCCCATCCAAAAAAACTTAAAC			
H19-CTCF4	CTCF4_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-TATAGGGTTTTTGGTAGGTTTA	301 bp	56 °C	40 HST
	CTCF4_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-CCATAAAATATCCTATCCCTAATA			
	CTCF4_R_Bis_Wob	CAGGAAACAGCTATGAC-CCATAAWTATCCTATCCCTAATA			
H19-CTCF5	CTCF5_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-TTTAGGGTGAGATTTTTTTTG	321 bp	56 °C	40 HST
	CTCF5_R_Bis*	CAGGAAACAGCTATGAC-TCCCATAAAATATCCTATACCTC			
H19-CTCF6	H19-in-Ftag [#]	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGTAYGGAATTGGTTGTAGTTGTGG	204 bp	59 °C	40 HST
	H19-CTCF-RM13 [#]	CAGGAAACAGCTATGAC-ATATCCTATCCCAAATAACCCC			
Familie 2	CTCF2_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG-AGGTGTTTTAGTTTTTGGATGATA	355 bp	TD 61 → 54 °C	35 HST
	CTCF4_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-CCATAAAATATCCTATCCCTAATA			
Familie 3	CTCF3_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GGGAGATGAGATATTTTGGTGATAATG	383 bp	TD 63 → 56 °C	35 HST
	CTCF4_R_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-CCATAAAATATCCTATCCCTAATA			
Familie 4	CTCF1_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GTATTTTGGAGGTTTTTATTAG	389 bp	TD 61 → 54 °C	35 HST
	R_Fam4_WT_CTCF1_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC-TCCCCAAACATCTCTCCA			
	CTCF1_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GTATTTTGGAGGTTTTTATTAG	414 bp	TD 61 → 54 °C	35 HST
	R_Fusion_Fam4_B3	CAGGAAACAGCTATGAC-ATCCAAAAATAAAAACACTTCAC			
	CTCF4_F_Bis_klein	CTTGCTTCCTGGCACGAG-GAGGTTTTTTTTTAGTTTTATTA	391 bp	56 °C	40 HST
	CTCF4_R_Bis_groß	CAGGAAACAGCTATGAC-AAACCCTACAAAAAAATCTCACC			

Locus / CTCF	Primer ID	Primersequenz 5' → 3'	Größe (inkl. tag)	Annealing Temp.	Zyklen und Taq
Familie 6	F_CTCF5_Wob_W T_Fam6_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG- TTTAYGGGGTTATTAGGG	477 bp	TD 65 → 58 °C	35 HST
	CTCF5_R_Bis*	CAGGAAACAGCTATGAC- TCCCATAAATATCCTATACCTC			
	F_Fusion_Fam6_B6	CTTGCTTCCTGGCACGAG- GGGGTAGTGAGGGATAGA	470 bp	TD 57 → 50 °C	35 HST
	CTCF5_R_Bis*	CAGGAAACAGCTATGAC- TCCCATAAATATCCTATACCTC			
	CTCF2_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG- AGGTGTTTTAGTTTTTTGGATGATA	434 bp	TD 57 → 50 °C	35 HST
	R_Fam6_CTCF2_ WT_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC- TTATCAYCAAATATCTCATC			
	CTCF2_F_Bis*	CTTGCTTCCTGGCACGAG- AGGTGTTTTAGTTTTTTGGATGATA	497 bp	TD 61 → 54 °C	35 HST
	R_Del_Fam6_ CTCF2_B2_Bis	CAGGAAACAGCTATGAC- AAAAAATCTCACCTAAAACCA			
Familien 7 und 8	CTCF3_F_Bis	CTTGCTTCCTGGCACGAG- GGGAGATGAGATATTTTGGTGATAATG	377 bp	TD 63 → 56 °C	35 HST
	H19-CTCF-RM13 [#]	CAGGAAACAGCTATGAC- ATATCCTATTCCCAAATAACCCC			

Die Tabelle fasst die verwendeten Primer für die sechs CTCF-Bindestellen (CTCF1 - 6) sowie die deletionsüberspannenden Primer für die verschiedenen untersuchten Familien zusammen. Weiterhin sind Angaben zur Größe der Produkte inklusive des jeweils angegebenen *tags* (erster Teil der Primersequenz bis zum Trennstrich) und den verwendeten PCR-Bedingungen angegeben. Die Re-PCR wurde Standardmäßig mit dem *2-step* Protokoll (40 Zyklen) und der HotStarTaq (Qiagen; HST) durchgeführt.

TD – Touchdown PCR; * Takai et al. 2001; [#] Kanber et al. 2009. Aus Beygo et al. 2013a.

Tabelle A7: Auflistung der verwendeten MID Primer zur Generierung der *Amplicon libraries* für den Roche /454 GS Junior

Primer ID	Primersequenz 5' → 3'
AutMID1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGACGAGTGCGT CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGACGCTCGACA CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGACGCACTC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGAGACGCACTC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGAGCACTGTAG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGATCAGACACG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGATCAGACACG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGATATCGCGAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGATATCGCGAG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCGTGTCTCTA CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID7	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCGTGTCTCTA CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCTCGCGTGT CCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID8	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCTCGCGTGT CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTAGTATCAGC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID9	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTAGTATCAGC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTCTCTATGCG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID10	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTCTCTATGCG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTGATACGTCT CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID11	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTGATACGTCT CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTACTGAGCTA CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID12	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTACTGAGCTA CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCATAGTAGTG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID13	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCATAGTAGTG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCGAGAGATAC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID14	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCGAGAGATAC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGATACGACGTA CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID15	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGATACGACGTA CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTCACGTA CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID16	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTCACGTA CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCGTCTAGTAC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID17	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCGTCTAGTAC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID18	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTCTACGTAGC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID18	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTCTACGTAGC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID19	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTGTACTACTC CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID19	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTGTACTACTC CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID20	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGACTACAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID20	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGACGACTACAG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID21	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGCGTAGACTAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID21	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGCGTAGACTAG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID22	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTACGAGTATG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID22	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTACGAGTATG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID23	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTACTCTCGTG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID23	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTACTCTCGTG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID24	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTAGAGACGAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID24	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTAGAGACGAG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID25	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGTCGTGCTCG CTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID25	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAGTCGTGCTCG CAGGAAACAGCTATGAC
AutMID26	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACATACGCGT CTTGCTTCCTGGCACGAG

Primer ID	Primersequenz 5' → 3'
ButMID26	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACATACGCGTCAGGAAACAGCTATGAC
AutMID27	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCGAGTATCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID27	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCGAGTATCAGGAAACAGCTATGAC
AutMID28	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTACTATGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID28	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTACTATGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID29	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTGTACAGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID29	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTGTACAGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID30	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID30	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACTATACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID31	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCGTCTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID31	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCGTCTCTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID32	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTACGCTATCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID32	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTACGCTATCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID33	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATAGAGTACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID33	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATAGAGTACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID34	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACGCTACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID34	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACGCTACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID35	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTAGACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID35	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGTAGACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID36	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGACGTGACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID36	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGACGTGACTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID37	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACACGTGATCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID37	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACACGTGATCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID38	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGTGTAGATCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID38	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGTGTAGATCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID39	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGATCACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID39	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCGATCACGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID40	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTATACTATCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID40	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTATACTATCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID41	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGACGTATGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID41	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGACGTATGTCTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID42	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTCGAGAGACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID42	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTCGAGAGACTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID43	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGATCGTATACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID43	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGATCGTATACTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID44	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGCAGTACGACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID44	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGCAGTACGACTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID45	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTACGCTCTACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID45	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTACGCTCTACTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID46	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCACGCGAGACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID46	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCACGCGAGACTTGCTTCCTGGCACGAG
AutMID47	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTACACGACTTGCTTCCTGGCACGAG
ButMID47	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTACACGACTTGCTTCCTGGCACGAG

Die MID-Primer setzen sich (von 5' nach 3') aus dem A- bzw. B-Primer (Roche), der 4 bp langen Key-Sequenz (blau; Roche), dem MID (*multiplex identifier*; rot; Roche) und dem tag zusammen.

Die Primer zu MID23 wurden nach den ersten Anwendungen nicht weiter benutzt, da sie in mehreren Re-PCRs eine schlechtere Performance gezeigt hatten.

Die MID-Sequenzen wurden aus dem Fluidigm User Guide 'Access Array™ System for 454 Sequencing Platform' ausgewählt.

Tabelle A8: Übersicht der auf Chromosom 15 beobachteten CNVs (> 20 kb, > 10 Marker, Überlappung mit bekannten CNVs < 10 %)

		Sample	Copy Number State	Loss/Gain	Chr	Cytoband_Start_Pos	Cytoband_End_Pos	Size (kb)	# Markers	Avg_Dist_Between_Markers (kb)	% CNV_Overlap	Start_Linear_Position	End_Linear_Position	Start_Marker	End_Marker
		<i>MKRN3</i>			15						0	23810454	23813166		
		<i>SNRPN</i>			15						0	25068794	25223729		
		<i>SNORD116</i>			15	Start <i>SNORD116-1</i>				Ende <i>SNORD116-29</i>		25296623	25351751		
		<i>UBE3A</i>			15						0	25582396	25684175		
		<i>ATP10A</i>			15						0	25923860	26108349		
1	PWS	D1	1	Loss	15	q14	q14	35	22	2	0	36499803	36534556	SNP_A-8681639	SNP_A-4299039
2	AS	AS59	3	Gain	15	q14	q14	425	353	1	0	38812249	39237156	CN_694024	CN_696224
3	PWS	C21	1	Loss	15	q15.1	q15.1	20	17	1	0	42186482	42206039	SNP_A-8598046	CN_674656
4	PWS	D1	1	Loss	15	q15.1	q15.1	20	17	1	0	42186482	42206039	SNP_A-8598046	CN_674656
5	PWS	B4	4	Gain	15	q21.2	q21.2	22	11	2	0	52335722	52357448	CN_687836	CN_687843
6	PWS	D1	3	Gain	15	q22.2	q22.2	30	30	1	0	61840103	61870381	SNP_A-8606418	CN_701256
7	AS	F47	1	Loss	15	q22.2	q22.2	28	21	1	5	62700576	62728532	CN_705626	SNP_A-1795701
8	PWS	D1	1	Loss	15	q22.2	q22.2	20	17	1	0	63292446	63312428	SNP_A-8402338	SNP_A-8541978
9	PWS	PWS24	1	Loss	15	q22.2	q22.2	28	23	1	0	63292446	63320649	SNP_A-8402338	CN_709922
10	PWS	C21	1	Loss	15	q22.31	q22.31	78	35	2	0	63868809	63947106	CN_123721	CN_712146
11	PWS	C21	3	Gain	15	q22.32	q22.33	25	33	1	0	67277434	67302834	SNP_A-8384328	SNP_A-4290419
12	PWS	D1	3	Gain	15	q25.3	q25.3	44	25	2	0	85541508	85585157	CN_710406	SNP_A-2313058
13	PWS	D1	1	Loss	15	q26.1	q26.1	29	32	1	0	89388092	89416973	SNP_A-8493305	SNP_A-8295464
14	PWS	C22	1	Loss	15	q26.1	q26.1	31	28	1	0	91754350	91785697	SNP_A-8653944	CN_708349
15	PWS	PWS24	1	Loss	15	q26.1	q26.1	24	14	2	0	93399895	93424341	SNP_A-8412781	SNP_A-8318340
16	PWS	C21	1	Loss	15	q26.1	q26.1	21	17	1	0	93681985	93702668	SNP_A-8358023	CN_721423
17	PWS	PWS24	3	Gain	15	q26.3	q26.3	109	74	1	1	99837102	99946569	CN_719438	SNP_A-1928167

Die Tabelle gibt die Daten für die CNVs mit folgenden Parametern wieder: Größe der CNVs 20 kb oder mehr, mindestens 10 Marker und eine Überlappung mit bekannten CNVs von maximal 10 %. Die Analyse wurde mit der GTC Software durchgeführt. Die Positionsangaben beruhen auf hg19. Der angezeigte Wert für die Überlappung mit bekannten CNVs ergibt sich aus dem annotation file na32 von Affymetrix, der Mitte 2011 veröffentlicht wurde.

Der *copy number state* gibt an, wie oft die beschriebene Region vorliegt, wobei 2 dem normalen Zustand mit zwei Kopien entspricht. Demnach läge bei 0 eine homozygote Deletion vor, bei 1 eine heterozygote Deletion, 3 zeigt eine heterozygote Duplikation an und alles darüber würde für mehr als 3 vorliegende Kopien der Region sprechen.

Loss steht für eine Deletion, Gain für eine Duplikation; Chr – Chromosom; Pos – Position; Avg_Dist Between Markers (kb) – beschreibt die durchschnittliche Distanz zwischen zwei Markern innerhalb des angezeigten CNVs; % CNV_Overlap – gibt den prozentualen Anteil des CNVs an, der mit bekannten CNVs überlappt (basierend auf dem Annotation file na32 von Affymetrix); SNP_A-... – Affymetrix ID eines SNP Markers; CN_... – Affymetrix ID eines Kopienzahl (*copy number*) Markers.

Tabelle A9: Übersicht der CNVs mit einer Größe von über 100 kb bei einer maximalen Überlappung mit bekannten CNVs von 10 %

		Sample	Copy Number State	Loss/Gain	Chr	Cytoband_Start_Pos	Cytoband_End_Pos	Size (kb)	# Markers	Avg_Dist Between Markers (kb)	% CNV_Overlap	Start_Linear_Position	End_Linear_Position	Start_Marker	End_Marker
1	PWS	PWS23	1	Loss	2	q12.2	q12.2	111	86	1	6	107341236	107451812	CN_810000	CN_812072
2	AS	AS45	3	Gain	2	q14.2	q14.2	111	89	1	4	121598699	121709536	SNP_A-1848902	SNP_A-2140948
3	AS	D7	3	Gain	2	q22.1	q22.1	560	316	2	4	139107013	139666760	CN_801996	CN_806279
4	PWS	D1	3	Gain	3	p21.31	p21.31	111	50	2	0	49978765	50089790	CN_1046407	CN_012968
5	PWS	PWS38	3	Gain	3	p14.1	p14.1	118	113	1	0	67210546	67328279	CN_1040027	SNP_A-1900184
6	AS	F41	1	Loss	3	q12.1	q12.1	243	122	2	2	99660754	99903769	CN_950473	CN_952684
7	AS	AS71	3	Gain	4	p16.3	p16.3	294	180	2	9	2906453	3200276	SNP_A-2095981	CN_1064738
8	PWS	A1	1	Loss	5	p15.31	p15.31	212	166	1	7	8164750	8377003	SNP_A-2063204	SNP_A-2246597
9	AS	E36	3	Gain	5	p13.2	p13.2	285	211	1	0	34412257	34697639	CN_1145638	CN_1145721
10	PWS	PWS52	1	Loss	5	q21.3	q21.3	155	70	2	0	105412482	105567716	CN_1092751	CN_1092808
11	PWS	D1	3	Gain	5	q34	q34	109	80	1	0	162524977	162633608	SNP_A-1799347	SNP_A-8318780
12	AS	D4	3	Gain	6	p21.31	p21.31	140	83	2	0	34751052	34891129	CN_1184347	CN_1186486
13	AS	AS59	1	Loss	6	q21	q21	375	292	1	1	113445416	113820639	CN_1165098	SNP_A-8461695
14	AS	F47	1	Loss	7	q21.3	q22.1	111	56	2	0	97929407	98040788	CN_1225873	CN_1225906
15	AS	AS53	3	Gain	7	q36.3	q36.3	148	64	2	0	158237611	158385584	CN_1212985	SNP_A-8704058
16	AS	AS60	3	Gain	9	q31.1	q31.2	124	74	2	0	108124363	108248712	CN_1327914	SNP_A-8282645
17	AS	AS72	3	Gain	10	p14	p14	168	163	1	10	6677520	6845780	SNP_A-1824539	SNP_A-4205875
18	PWS	PWS36	3	Gain	10	q26.2	q26.2	141	108	1	0	128391771	128532782	SNP_A-8398738	SNP_A-2001561
19	AS	E33	3	Gain	12	q24.11	q24.11	115	87	1	9	109549579	109664207	SNP_A-1903984	CN_567063
20	AS	AS33	3	Gain	12	q24.12	q24.13	132	49	3	0	112182245	112314335	SNP_A-8591096	SNP_A-4207258
21	AS	AS46	3	Gain	12	q24.12	q24.13	132	50	3	0	112182245	112314702	SNP_A-8591096	CN_582183
22	AS	AS59	3	Gain	15	q14	q14	425	353	1	0	38812249	39237156	CN_694024	CN_696224

		Sample	Copy Number State	Loss/Gain	Chr	Cytoband_Start_Pos	Cytoband_End_Pos	Size (kb)	# Markers	Avg_Dist Between Markers (kb)	% CNV_Overlap	Start_Linear_Position	End_Linear_Position	Start_Marker	End_Marker
23	PWS	PWS24	3	Gain	15	q26.3	q26.3	109	74	1	1	99837102	99946569	CN_719438	SNP_A-1928167
24	AS	F42	1	Loss	16	q23.1	q23.1	153	209	1	3	77547568	77700449	SNP_A-1850811	SNP_A-8497329
25	AS	AS45	1	Loss	17	q23.3	q23.3	155	63	2	0	62394910	62550284	CN_737473	CN_737555
26	PWS	PWS52	3	Gain	18	q23	q23	117	68	2	3	77898549	78015057	CN_797776	SNP_A-8448011
27	AS	AS45	1	Loss	19	p13.2	p13.2	114	50	2	0	12311029	12425369	CN_786957	CN_789039
28	PWS	B2	3	Gain	19	p13.12	p13.12	100	63	2	8	15653371	15753423	CN_771687	SNP_A-4259822
29	PWS	PWS36	1	Loss	19	q13.11	q13.11	171	110	2	5	33249108	33419754	SNP_A-8364745	CN_787321
30	PWS	B2	1	Loss	21	q21.3	q21.3	164	161	1	0	29677776	29841906	CN_906313	SNP_A-2017503
31	AS	E34	3	Gain	21	q22.11	q22.11	142	123	1	5	35204558	35346305	CN_878199	SNP_A-2018364
32	PWS	A6	3	Gain	21	q22.13	q22.2	334	221	2	3	39408975	39742979	SNP_A-4270558	CN_882767
33	AS	AS45	1	Loss	22	q13.1	q13.1	334	180	2	4	40317563	40651727	CN_933162	CN_935341

Die Tabelle gibt die CNVs mit einer Größe über 100 kb für alle Chromosome mit Ausnahme der Gonosomen an. Die Positionsangaben beziehen sich auf hg19.

Tabelle A10: Ergebnisse der qPCRs

		Sample	Loss/ Gain	Chr	Normalisiertes Verhältnis						Referenz	Ergebnis	
					P	M	V	NC1	NC2	NC3			
1	AS	AS45	Gain	2	0,9586	0,8675	0,9128	1,000	0,9412	0,8861	TRPSI	Nicht bestätigt	
2	PWS	A1	Loss	5	0,405	2,054	0,3999	1,000	0,9753	-	TRPSI	Bestätigt	paternal ererbt
3	AS	D4	Gain	6	1,442	1,526	1,328	1,000	1,0040	0,9702	TRPSI	Bestätigt	Mat- oder paternal ererbt
4	AS	AS53	Gain	7	1,645	1,284	0,8732	1,000	0,8714	-	TRPSI	Bestätigt	Maternal ererbt
5	AS	AS60	Gain	9	1,380	0,9511	1,589	1,000	0,8454	-	TRPSI	Bestätigt	Paternal ererbt
6	AS	AS72	Gain	10	1,235*	1,278	0,9735	1,000	0,8982	0,9229	TRPSI	Bestätigt	Maternal ererbt
7	AS	E33	Gain	12	1,483	0,8756	1,286	1,000	0,8799	0,8739	TRPSI	Bestätigt	Paternal ererbt
8	AS	AS46	Gain	12	1,872	1,788	1,072	1,000	0,8503	1,180	TRPSI	Bestätigt	Maternal ererbt
9	AS	AS59	Gain	15	1,347	1,276	0,7169	1,000	0,8899	-	TRPSI	Bestätigt	Maternal ererbt
10	PWS	PWS52	Gain	18	1,316	0,9370	1,736	1,000	0,9168	0,9517	TRPSI	Bestätigt	Paternal ererbt
11	AS	AS45	Loss	19	0,6318	0,8668	0,7771	1,000	0,8846	1,068 +1,0150 ⁺	TRPSI	Bestätigt	<i>De novo</i>
12	PWS	B2	Gain	19	0,9912	1,003	-	1,000	0,9833	0,9440	TRPSI	Nicht bestätigt	
13	AS	E34	Gain	21	0,9401	0,8911	0,9616	1,000	0,9895	-	ASSRO2	Nicht bestätigt	
14	AS	AS45	Loss	22	0,6563	0,9332	0,8204	1,000	0,9644	1,130 +1,237 ⁺	TRPSI	Bestätigt	<i>De novo</i>

Die Tabelle zeigt die detaillierten Ergebnisse der qPCRs mit den normalisierten Werten. Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler[®] Software der Firma Roche. Alle Reaktionen wurden als Duplikate bzw. Triplikate durchgeführt, deren Werte von der Software entsprechend gemittelt wurden. Die Normal-kontrolle 1 (NC1) wurde immer als 1,000 gesetzt und alle anderen Werte darauf normalisiert. Werte zwischen 0,75 und 1,25 wurden als normaler, diploider Zustand erachtet. Werte unter 0,75 wurden als Deletion, oberhalb von 1,25 als Duplikation gewertet.

*Aufgrund der sehr ähnlichen Werte von Patient und Mutter wurde diese Duplikation trotz geringer Unterschreitung des Grenzwertes beim Patienten als bestätigt und maternal ererbt angesehen. ; ⁺ Bei diesen beiden Proben wurde eine zusätzliche, vierte Normalkontrolle mitgeführt.

Tabelle A11: Auflistung der CpG-Dinukleotide mit auffälliger Methylierung im Patienten nach Pseudoprobandenansatz

TargetID	SYMBOL	CHR	MAPINFO	P	NC																				Ø	Min	Max
					M	V	a	b	c	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	s	t			
cg12024906	<i>HKR1</i>	19	42517519	0,02	0,25	0,39	0,67	0,42	0,32	0,64	0,54	0,54	0,44	0,41	0,29	0,54	0,53	0,23	0,47	0,56	0,31	0,40	0,48	0,43	0,44	0,23	0,67
cg26372517	<i>TFAP2E</i>	1	35811746	0,04	0,28	0,22	0,49	0,53	0,34	0,44	0,25	0,15	0,25	0,32	0,42	0,31	0,47	0,31	0,34	0,41	0,27	0,36	0,27	0,31	0,34	0,15	0,53
cg12759554	<i>NAPIL5</i>	4	89837660	0,05	0,54	0,51	0,55	0,58	0,57	0,62	0,56	0,60	0,58	0,64	0,58	0,61	0,59	0,55	0,64	0,62	0,66	0,62	0,65	0,60	0,59	0,51	0,66
cg03641225	<i>DIRAS3</i>	1	68285127	0,06	0,34	0,33	0,32	0,40	0,36	0,54	0,39	0,32	0,25	0,41	0,27	0,42	0,52	0,27	0,32	0,47	0,44	0,48	0,37	0,48	0,39	0,25	0,54
cg15915418	<i>TLE1</i>	9	83493421	0,07	0,11	0,45	0,09	0,07	0,08	0,46	0,48	0,05	0,08	0,51	0,06	0,56	0,50	0,07	0,50	0,46	0,49	0,09	0,53	0,56	0,31	0,05	0,56
cg14918082	<i>KCNAB3</i>	17	7773962	0,06	0,89	0,79	0,86	0,86	0,85	0,88	0,84	0,69	0,90	0,85	0,93	0,73	0,93	0,88	0,84	0,90	0,88	0,94	0,81	0,89	0,86	0,69	0,94
cg16153267	<i>RBI</i>	13	47791969	0,07	0,43	0,41	0,44	0,47	0,42	0,55	0,50	0,39	0,50	0,45	0,59	0,50	0,51	0,45	0,47	0,61	0,63	0,53	0,47	0,48	0,49	0,39	0,63
cg18481241	<i>RBI</i>	13	47791728	0,08	0,55	0,53	0,57	0,64	0,54	0,56	0,47	0,61	0,47	0,55	0,65	0,58	0,57	0,54	0,52	0,68	0,68	0,54	0,61	0,64	0,57	0,47	0,68
cg03085377	<i>RBI</i>	13	47791377	0,07	0,48	0,49	0,40	0,38	0,48	0,49	0,48	0,46	0,49	0,45	0,54	0,47	0,49	0,46	0,60	0,58	0,50	0,53	0,47	0,48	0,49	0,38	0,60
cg03933322	<i>CSAD</i>	12	51860404	0,07	0,10	0,06	0,07	0,28	0,49	0,48	0,48	0,36	0,40	0,47	0,51	0,50	0,45	0,37	0,44	0,48	0,42	0,43	0,47	0,43	0,38	0,06	0,51
cg14920846	<i>NAVI</i>	1	199884832	0,08	0,55	0,49	0,45	0,40	0,67	0,51	0,58	0,49	0,88	0,57	0,43	0,33	0,44	0,59	0,58	0,64	0,67	0,64	0,68	0,47	0,55	0,33	0,88
cg13431205	<i>RBI</i>	13	47791175	0,08	0,48	0,49	0,55	0,59	0,52	0,56	0,61	0,52	0,59	0,64	0,63	0,59	0,55	0,55	0,68	0,66	0,57	0,56	0,65	0,62	0,58	0,48	0,68
cg01026744	<i>NAPIL5</i>	4	89838076	0,09	0,65	0,65	0,76	0,07	0,73	0,75	0,76	0,78	0,05	0,74	0,73	0,70	0,69	0,72	0,76	0,73	0,75	0,74	0,74	0,74	0,66	0,05	0,78
cg19254235	<i>RBI</i>	13	47793174	0,12	0,41	0,42	0,42	0,51	0,47	0,42	0,46	0,49	0,47	0,57	0,51	0,43	0,45	0,53	0,47	0,54	0,46	0,43	0,46	0,50	0,47	0,41	0,57
cg25350411	<i>PLAGL1</i>	6	144370610	0,10	0,55	0,53	0,48	0,45	0,50	0,52	0,44	0,49	0,55	0,54	0,50	0,50	0,55	0,48	0,46	0,45	0,57	0,56	0,49	0,54	0,51	0,44	0,57
cg09118625	<i>DIRAS3</i>	1	68285559	0,10	0,72	0,74	0,77	0,88	0,67	0,85	0,72	0,76	0,74	0,80	0,68	0,74	0,86	0,66		0,88	0,81	0,85	0,82	0,84	0,78	0,66	0,88
cg25780543	<i>HTR5A</i>	7	154493703	0,10	0,27	0,30	0,26	0,35	0,35	0,39	0,37	0,44	0,13	0,23	0,28	0,45	0,53	0,47	0,45	0,43	0,43	0,43	0,46	0,44	0,37	0,13	0,53
cg17791651	<i>POU3F1</i>	1	38286076	0,11	0,51	0,64	0,64	0,63	0,65	0,63	0,55	0,53	0,70	0,70	0,61	0,56	0,61	0,53	0,72	0,63	0,59	0,62	0,59	0,61	0,61	0,51	0,72
cg13870494	<i>MAMDC2</i>	9	71848178	0,12	0,68	0,73	0,71	0,76	0,78	0,79	0,77	0,84	0,71	0,78	0,78	0,80	0,79	0,75	0,75	0,74	0,80	0,75	0,80	0,80	0,77	0,68	0,84
cg11465163	<i>DIRAS3</i>	1	68288681	0,12	0,47	0,46	0,53	0,49	0,55	0,50	0,52	0,49	0,48	0,49	0,49	0,60	0,46	0,57	0,48	0,54	0,54	0,51	0,58	0,44	0,51	0,44	0,60
cg17895149	<i>PLAGL1</i>	6	144371522	0,12	0,61	0,58	0,69	0,57	0,54	0,66	0,55	0,65	0,66	0,59	0,64	0,64	0,63	0,69	0,69	0,66	0,65	0,73	0,61	0,68	0,64	0,54	0,73
cg10784813	<i>SOCS1</i>	16	11256179	0,14	0,57	0,52	0,68	0,56	0,69	0,69	0,50	0,40	0,59	0,66	0,59	0,60	0,61	0,60	0,74	0,57	0,52	0,75	0,57	0,63	0,60	0,40	0,75
cg06191076	<i>DIRAS3</i>	1	68289051	0,13	0,50	0,49	0,53	0,61	0,60	0,56	0,50	0,54	0,49	0,54	0,53	0,52	0,56	0,50	0,49	0,56	0,52	0,53	0,54	0,61	0,54	0,49	0,61
cg20831708	<i>SEC31B</i>	10	102269363	0,14	0,51	0,56	0,63	0,50	0,59	0,71	0,59	0,40	0,76	0,36	0,69	0,56	0,74	0,57	0,64	0,60	0,53	0,76	0,49	0,71	0,60	0,36	0,76
cg07880715	<i>RBI</i>	13	47793479	0,14	0,57	0,58	0,61	0,55	0,62	0,64	0,62	0,60	0,67	0,70	0,71	0,64	0,59	0,57	0,67	0,70	0,70	0,75	0,67	0,61	0,64	0,55	0,75
cg22901840	<i>DIRAS3</i>	1	68285365	0,12	0,68	0,69	0,69	0,72	0,58	0,78	0,64	0,61	0,71	0,75	0,63	0,66	0,83	0,58	0,80	0,77	0,74	0,70	0,73	0,77	0,70	0,58	0,83
cg21808053	<i>DIRAS3</i>	1	68285651	0,14	0,47	0,48	0,41	0,56	0,44	0,47	0,44	0,50	0,38	0,53	0,46	0,53	0,58	0,38	0,61	0,58	0,63	0,52	0,51	0,51	0,50	0,38	0,63

147

Anhang

148

TargetID	SYMBOL	CHR	MAPINFO	P	M	V	NC																				Ø	Min	Max
							a	b	c	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	s	t					
cg24871743	<i>DIRAS3</i>	1	68285238	0,15	0,49	0,59	0,47	0,61	0,40	0,45	0,55	0,47	0,46	0,54	0,43	0,46	0,71	0,51	0,39	0,57	0,58	0,40	0,66	0,65	0,52	0,39	0,71		
cg05392265	<i>DIRAS3</i>	1	68289041	0,15	0,52	0,51	0,54	0,60	0,59	0,59	0,60	0,58	0,58	0,61	0,61	0,50	0,56	0,55	0,58	0,61	0,59	0,61	0,62	0,55	0,58	0,50	0,62		
cg02849695	<i>CCDC19</i>	1	158136584	0,16	0,44	0,44	0,53	0,49	0,47	0,63	0,36	0,41	0,58	0,42	0,47	0,43	0,46	0,47	0,45	0,54	0,48	0,36	0,38	0,46	0,46	0,36	0,63		
cg25836301	<i>MEG3</i>	14	100362059	0,18	0,53	0,52	0,52	0,61	0,54	0,52	0,48	0,58	0,54	0,50	0,59	0,54	0,53	0,51	0,57	0,53	0,59	0,58	0,56	0,58	0,55	0,48	0,61		
cg22500004	<i>DIRAS3</i>	1	68288860	0,17	0,55	0,55	0,54	0,60	0,58	0,58	0,60	0,59	0,66	0,60	0,60	0,57	0,58	0,58	0,61	0,64	0,55	0,55	0,56	0,58	0,58	0,54	0,66		
cg00059930	<i>RBI</i>	13	47792383	0,16	0,61	0,51	0,76	0,73	0,66	0,82	0,70	0,67	0,77	0,74	0,75	0,70	0,68	0,69	0,80	0,77	0,78	0,69	0,66	0,73	0,71	0,51	0,82		
cg01570885	<i>FAM50B</i>	6	3794271	0,19	0,55	0,48	0,49	0,50	0,54	0,46	0,51	0,47	0,55	0,53	0,52	0,50	0,51	0,47	0,49	0,50	0,51	0,54	0,54	0,54	0,51	0,46	0,55		
cg16848873	<i>HOXB6</i>	17	44037307	0,20	0,59	0,37	0,67	0,50	0,48	0,75	0,62	0,50	0,71	0,66	0,56	0,46	0,57	0,63	0,62	0,54	0,78	0,44	0,57	0,34	0,57	0,34	0,78		
cg19427472	<i>RBI</i>	13	47790949	0,19	0,77	0,74	0,73	0,81	0,73	0,78	0,73	0,79	0,84	0,78	0,84	0,80	0,82	0,79	0,85	0,76	0,82	0,79	0,82	0,79	0,79	0,73	0,85		
cg16492735	<i>PEG10</i>	7	94124144	0,20	0,48	0,46	0,51	0,55	0,43	0,43	0,44	0,51	0,52	0,51	0,53	0,56	0,54	0,46	0,52	0,52	0,49	0,50	0,51	0,54	0,50	0,43	0,56		
cg16148270	<i>DIRAS3</i>	1	68289053	0,19	0,59	0,59	0,68	0,74	0,67	0,72	0,64	0,71	0,46	0,76	0,66	0,65	0,69	0,62	0,73	0,71	0,63	0,67	0,72	0,67	0,67	0,46	0,76		
cg14893161	<i>FLJ32569</i>	1	204085874	0,20	0,14	0,20	0,58	0,85	0,89	0,59	0,34	0,65	0,24	0,58	0,92	0,26	0,61	0,56	0,40	0,57	0,49	0,56	0,51	0,27	0,51	0,14	0,92		
cg13697378	<i>DIRAS3</i>	1	68285433	0,20	0,59	0,63	0,66	0,74	0,65	0,78	0,61	0,63	0,66	0,69	0,61	0,66	0,79	0,63	0,72	0,73	0,72	0,70	0,72	0,73	0,68	0,59	0,79		
cg18533225	<i>KLHDC7B</i>	22	49333679	0,22	0,64	0,65	0,73	0,60	0,64	0,73	0,59	0,74	0,56	0,60	0,65	0,69	0,61	0,65	0,64	0,75	0,58	0,65	0,68	0,71	0,65	0,56	0,75		
cg19728382	<i>STC2</i>	5	172689882	0,22	0,48	0,56	0,54	0,56	0,59	0,60	0,55	0,49	0,53	0,64	0,54	0,60	0,46	0,44	0,59	0,63	0,63	0,58	0,57	0,59	0,56	0,44	0,64		
cg13828758	<i>NDN</i>	15	21483466	0,22	0,50	0,52	0,61	0,61	0,56	0,66	0,59	0,58	0,68	0,64	0,62	0,62	0,65	0,54	0,71	0,55	0,55	0,66	0,57	0,56	0,60	0,50	0,71		
cg02489552	<i>CCDC105</i>	19	14982531	0,22	0,52	0,59	0,63	0,62	0,56	0,70	0,58	0,61	0,55	0,56	0,54	0,55	0,58	0,49	0,67	0,64	0,67	0,57	0,66	0,67	0,60	0,49	0,70		
cg03336167	<i>SLC22A18</i>	11	2887571	0,24	0,52	0,59	0,70	0,67	0,83	0,66	0,56	0,44	0,76	0,71	0,64	0,65	0,77	0,64	0,74	0,64	0,78	0,82	0,61	0,70	0,67	0,44	0,83		
cg18474934	<i>TRPC3</i>	4	123073415	0,24	0,53	0,52	0,63	0,66	0,63	0,61	0,60	0,66	0,53	0,67	0,52	0,67	0,41	0,67	0,78	0,64	0,65	0,64	0,77	0,68	0,62	0,41	0,78		
cg02317907	<i>DIRAS3</i>	1	68288376	0,27	0,57	0,58	0,57	0,66	0,61	0,59	0,60	0,56	0,60	0,62	0,59	0,60	0,62	0,63	0,67	0,61	0,61	0,67	0,69	0,65	0,61	0,56	0,69		
cg18506672	<i>SNURF</i>	15	22751346	0,29	0,54	0,49	0,53	0,46	0,59	0,60	0,64	0,71	0,43	0,62	0,60	0,64	0,56	0,58	0,53	0,55	0,61	0,59	0,61	0,64	0,58	0,43	0,71		
cg25431974	<i>ECELI</i>	2	233061180	0,28	0,75	0,72	0,75	0,85	0,76	0,76	0,72	0,77	0,80	0,80	0,56	0,75	0,75	0,76	0,83	0,77	0,86	0,80	0,74	0,75	0,76	0,56	0,86		
cg08263357	<i>PLAGL1</i>	6	144371473	0,27	0,71	0,72	0,77	0,60	0,78	0,79	0,74	0,81	0,86	0,76	0,68	0,80	0,77	0,80	0,84	0,77	0,79	0,79	0,75	0,75	0,76	0,60	0,86		
cg05711886	<i>MEG3</i>	14	100362433	0,29	0,59	0,60	0,68	0,77	0,62	0,68	0,58	0,67	0,65	0,64	0,62	0,63	0,63	0,59	0,67	0,67	0,64	0,70	0,70	0,67	0,65	0,58	0,77		
cg16488522	<i>KRT25C</i>	17	36193658	0,31	0,60	0,33	0,68	0,67	0,75	0,71	0,74	0,72	0,73	0,76	0,75	0,70	0,77	0,62	0,62	0,65	0,71	0,67	0,68	0,60	0,67	0,33	0,77		
cg01185080	<i>ZNF710</i>	15	88344817	0,29	0,56	0,61	0,62	0,54	0,63	0,70	0,67	0,58	0,75	0,71	0,61	0,66	0,73	0,56	0,76	0,65	0,49	0,66	0,63	0,63	0,64	0,49	0,76		
cg21745164	<i>CHP2</i>	16	23672805	0,31	0,59	0,65	0,62	0,69	0,59	0,74	0,59	0,62	0,64	0,58	0,58	0,61	0,71	0,72	0,68	0,57	0,56	0,69	0,58	0,67	0,63	0,56	0,74		
cg08012287	<i>ACTN3</i>	11	66071874	0,32	0,69	0,71	0,70	0,75	0,71	0,65	0,73	0,70	0,80	0,71	0,67	0,73	0,71	0,72	0,81	0,77	0,72	0,68	0,71	0,75	0,72	0,65	0,81		

Anhang

149

TargetID	SYMBOL	CHR	MAPINFO	P	M	V	NC																				Ø	Min	Max
							a	b	c	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	s	t					
cg07077459	<i>PLAGL1</i>	6	144370745	0,33	0,73	0,71	0,81	0,86	0,84	0,85	0,81	0,87	0,90	0,89	0,80	0,86	0,81	0,81	0,91	0,82	0,83	0,85	0,85	0,79	0,83	0,71	0,91		
cg17769238	<i>H19</i>	11	1976144	0,33	0,60	0,59	0,63	0,62	0,63	0,63	0,65	0,63	0,69	0,71	0,68	0,64	0,62	0,62	0,66	0,62	0,66	0,65	0,61	0,60	0,64	0,59	0,71		
cg08471713	<i>MEOX1</i>	17	39094419	0,35	0,51	0,49	0,58	0,45	0,47	0,62	0,53	0,86	0,54	0,80	0,66	0,94	0,58	0,86	0,47	0,92	0,52	0,84	0,51	0,66	0,64	0,45	0,94		
cg15373285	<i>MEG3</i>	14	100362843	0,33	0,61	0,60	0,64	0,69	0,72	0,71	0,69	0,65	0,70	0,72	0,69	0,70	0,70	0,67	0,73	0,65	0,73	0,72	0,69	0,71	0,69	0,60	0,73		
cg16003238	<i>PUNC</i>	15	63457929	0,34	0,60	0,64	0,70	0,64	0,67	0,61	0,69	0,58	0,73	0,79	0,57	0,66	0,66	0,64	0,72	0,76	0,74	0,57	0,71	0,62	0,67	0,57	0,79		
cg27182551	<i>RBI</i>	13	47790552	0,38	0,83	0,83	0,84	0,87	0,88	0,84	0,78	0,79	0,90	0,88	0,87	0,89	0,89	0,88	0,89	0,89	0,81	0,91	0,85	0,89	0,86	0,78	0,91		
cg00702231	<i>PLAGL1</i>	6	144371166	0,37	0,72	0,69	0,78	0,87	0,77	0,81	0,82	0,89	0,90	0,83	0,81	0,87	0,86	0,79	0,88	0,78	0,87	0,84	0,85	0,82	0,82	0,69	0,90		
cg00343092	<i>TSPO</i>	22	41877918	0,38	0,12	0,05	0,02	0,04	0,03	0,04	0,08	0,04	0,02	0,06	0,05	0,07	0,02	0,07	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,06	0,05	0,02	0,12		
cg09307264	<i>INCA1</i>	17	4843005	0,39	0,68	0,65	0,74	0,66	0,66	0,79	0,60	0,64	0,62	0,73	0,69	0,67	0,69	0,69	0,68	0,71	0,70	0,71	0,73	0,80	0,69	0,60	0,80		
cg12757684	<i>PLAGL1</i>	6	144371178	0,36	0,63	0,62	0,70	0,73	0,68	0,72	0,68	0,74	0,77	0,66	0,76	0,75	0,68	0,69	0,78	0,68	0,74	0,69	0,72	0,69	0,70	0,62	0,78		
cg21755709	<i>C21orf124</i>	21	43973826	0,41	0,61	0,67	0,62	0,52	0,71	0,75	0,70	0,75	0,66	0,65	0,72	0,74	0,72	0,74	0,69	0,73	0,74	0,70	0,72	0,77	0,69	0,52	0,77		
cg15534366	<i>CDH4</i>	20	59259602	0,37	0,73	0,67	0,65	0,65	0,76	0,80	0,78	0,59	0,65	0,73	0,72	0,64	0,63	0,73	0,62	0,65	0,71	0,65	0,73	0,74	0,69	0,59	0,80		
cg22378065	<i>PLAGL1</i>	6	144370865	0,39	0,67	0,65	0,73	0,78	0,76	0,77	0,73	0,85	0,81	0,75	0,76	0,80	0,79	0,71	0,85	0,79	0,73	0,79	0,75	0,77	0,76	0,65	0,85		
cg18433380	<i>NNAT</i>	20	35582608	0,37	0,63	0,65	0,78	0,78	0,68	0,69	0,79	0,62	0,70	0,70	0,66	0,82	0,71	0,67	0,64	0,63	0,72	0,71	0,76	0,67	0,70	0,62	0,82		
cg05294455	<i>MYL4</i>	17	42641608	0,38	0,70	0,66	0,70	0,77	0,68	0,69	0,65	0,68	0,75	0,72	0,83	0,69	0,76	0,75	0,79	0,67	0,70	0,78	0,73	0,75	0,72	0,65	0,83		
cg02932167	<i>ECEL1</i>	2	233061195	0,41	0,72	0,67	0,70	0,80	0,71	0,72	0,76	0,77	0,76	0,78	0,73	0,65	0,74	0,72	0,83	0,74	0,80	0,78	0,74	0,75	0,74	0,65	0,83		
cg25167447	<i>NAVI</i>	1	199883665	0,40	0,66	0,63	0,73	0,66	0,81	0,81	0,79	0,61	0,70	0,87	0,82	0,84	0,82	0,85	0,69	0,81	0,78	0,82	0,81	0,82	0,77	0,61	0,87		
cg11213150	<i>ANGPTL2</i>	9	128924278	0,40	0,70	0,67	0,70	0,69	0,66	0,71	0,58	0,72	0,73	0,71	0,56	0,62	0,63	0,73	0,74	0,71	0,74	0,73	0,67	0,67	0,68	0,56	0,74		
cg08835688	<i>GRB10</i>	7	50817425	0,40	0,67	0,65	0,70	0,74	0,67	0,72	0,70	0,80	0,78	0,70	0,70	0,70	0,78	0,69	0,79	0,69	0,69	0,75	0,72	0,66	0,71	0,65	0,80		
cg20028470	<i>UCN</i>	2	27384333	0,40	0,61	0,60	0,75	0,71	0,63	0,77	0,66	0,60	0,57	0,61	0,71	0,67	0,72	0,68	0,67	0,73	0,74	0,72	0,72	0,74	0,68	0,57	0,77		
cg09022808	<i>GAL3ST1</i>	22	29290857	0,42	0,71	0,66	0,72	0,76	0,74	0,69	0,71	0,83	0,71	0,76	0,81	0,73	0,74	0,80	0,72	0,81	0,71	0,79	0,79	0,79	0,75	0,66	0,83		
cg22463915	<i>EEF1A2</i>	20	61601704	0,43	0,64	0,62	0,80	0,56	0,57	0,77	0,82	0,72	0,71	0,80	0,59	0,76	0,64	0,68	0,86	0,78	0,75	0,63	0,75	0,81	0,71	0,56	0,86		
cg22298088	<i>NNAT</i>	20	35582274	0,42	0,63	0,68	0,75	0,79	0,75	0,68	0,77	0,68	0,72	0,66	0,74	0,79	0,66	0,71	0,74	0,70	0,69	0,70	0,74	0,73	0,72	0,63	0,79		
cg17980508	<i>IFI44L</i>	1	78858301	0,43	0,19	0,21	0,14	0,14	0,15	0,16	0,15	0,10	0,16	0,12	0,11	0,14	0,10	0,11	0,13	0,11	0,11	0,06	0,11	0,15	0,13	0,06	0,21		
cg04463638	<i>CLDN5</i>	22	17892712	0,46	0,76	0,75	0,73	0,82	0,74	0,76	0,79	0,83	0,74	0,78	0,78	0,73	0,82	0,80	0,76	0,75	0,73	0,78	0,82	0,75	0,77	0,73	0,83		
cg03399459	<i>ANXA8</i>	10	47217088	0,46	0,82	0,45	0,81	0,82	0,84	0,85	0,80	0,85	0,81	0,86	0,82	0,84	0,86	0,86	0,88	0,81	0,83	0,84	0,83	0,81	0,81	0,45	0,88		
cg04726200	<i>SLC22A18</i>	11	2887061	0,47	0,74	0,77	0,89	0,87	0,84	0,81	0,83	0,72	0,87	0,80	0,72	0,72	0,81	0,82	0,85	0,71	0,79	0,92	0,78	0,76	0,80	0,71	0,92		
cg26954174	<i>CARD15</i>	16	49288314	0,46	0,14	0,11	0,11	0,11	0,12	0,14	0,12	0,15	0,08	0,13	0,16	0,13	0,13	0,13	0,19	0,07	0,17	0,12	0,08	0,13	0,12	0,07	0,19		

Anhang

TargetID	SYMBOL	CHR	MAPINFO	P	NC																			Ø	Min	Max	
					M	V	a	b	c	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	s				t
cg19264571	<i>APCDD1</i>	18	10444085	0,49	0,81	0,83	0,87	0,85	0,86	0,89	0,88	0,80	0,93	0,88	0,77	0,90	0,86	0,89	0,92	0,88	0,88	0,86	0,88	0,86	0,87	0,77	0,93
cg01143454	<i>C20orf141</i>	20	2743601	0,48	0,12	0,13	0,10	0,14	0,09	0,14	0,14	0,11	0,08	0,10	0,19	0,11	0,06	0,08	0,10	0,07	0,09	0,07	0,09	0,10	0,10	0,06	0,19
cg05379350	<i>GITI</i>	17	24941283	0,48	0,24	0,17	0,13	0,12	0,16	0,12	0,21	0,17	0,05	0,17	0,20	0,23	0,20	0,17	0,12	0,17	0,19	0,13	0,20	0,17	0,17	0,05	0,24
cg18895972	<i>PELO</i>	5	52118143	0,49	0,33	0,30	0,20	0,13	0,14	0,13	0,17	0,25	0,13	0,14	0,19	0,17	0,13	0,18	0,08	0,17	0,17	0,17	0,14	0,24	0,18	0,08	0,33
cg21988465	<i>GNAS</i>	20	56862672	0,46	0,73	0,67	0,77	0,67	0,75	0,77	0,69	0,79	0,71	0,79	0,71	0,82	0,76	0,72	0,83	0,72	0,80	0,76	0,78	0,74	0,75	0,67	0,83
cg21450627	<i>PSD4</i>	2	113647311	0,48	0,82	0,44	0,85	0,90	0,87	0,90	0,87	0,92	0,91	0,89	0,90	0,03	0,89	0,85	0,92	0,85	0,86	0,90	0,87	0,84	0,81	0,03	0,92
cg27371741	<i>TDGF1</i>	3	46594162	0,49	0,52	0,73	0,82	0,59	0,85	0,81	0,83	0,72	0,71	0,80	0,83	0,86	0,85	0,83	0,74	0,76	0,84	0,83	0,86	0,81	0,78	0,52	0,86
cg01420388	<i>FBXO2</i>	1	11636841	0,50	0,76	0,80	0,83	0,89	0,70	0,84	0,83	0,85	0,86	0,84	0,82	0,88	0,91	0,87	0,94	0,91	0,78	0,80	0,87	0,84	0,84	0,70	0,94
cg00660989	<i>BTBD5</i>	14	44502266	0,50	0,31	0,24	0,15	0,16	0,28	0,18	0,34	0,18	0,07	0,17	0,17	0,35	0,10	0,27	0,22	0,14	0,16	0,22	0,22	0,18	0,20	0,07	0,35
cg06800962	<i>TM4SF1</i>	3	150578719	0,56	0,30	0,30	0,18	0,27	0,17	0,15	0,21	0,16	0,12	0,21	0,19	0,21	0,19	0,19	0,22	0,16	0,16	0,16	0,19	0,23	0,20	0,12	0,30
cg26955850	<i>OXT</i>	20	3000345	0,52	0,31	0,34	0,17	0,15	0,18	0,33	0,25	0,23	0,11	0,24	0,22	0,16	0,21	0,19	0,26	0,15	0,23	0,21	0,26	0,21	0,22	0,11	0,34
cg17465304	<i>KIF12</i>	9	115901263	0,53	0,82	0,79	0,80	0,89	0,87	0,86	0,89	0,81	0,90	0,86	0,85	0,77	0,85	0,88	0,96	0,81	0,83	0,83	0,81	0,87	0,85	0,77	0,96
cg09971811	<i>CST7</i>	20	24878099	0,54	0,14	0,16	0,14	0,17	0,16	0,28	0,16	0,33	0,12	0,24	0,27	0,31	0,26	0,40	0,10	0,27	0,18	0,14	0,23	0,31	0,22	0,10	0,40
cg21476940	<i>ITLN1</i>	1	159121578	0,51	0,24	0,22	0,19	0,24	0,17	0,08	0,18	0,12	0,22	0,11	0,18	0,11	0,08	0,16	0,14	0,18	0,14	0,16	0,14	0,07	0,16	0,07	0,24
cg26394940	<i>FLJI0945</i>	22	44828125	0,55	0,16	0,18	0,05	0,10	0,06	0,08	0,24	0,08	0,03	0,10	0,06	0,15	0,05	0,12	0,12	0,08	0,10	0,06	0,09	0,08	0,10	0,03	0,24
cg07922606	<i>HIST1H3E</i>	6	26333368	0,55	0,95	0,93	0,98	0,96	0,98	0,98	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,95	0,97	0,93	0,98
cg22858288	<i>SLC22A18</i>	11	2886898	0,57	0,84	0,88	0,90	0,82	0,92	0,88	0,88	0,84	0,92	0,89	0,78	0,82	0,90	0,91	0,94	0,84	0,88	0,92	0,85	0,91	0,88	0,78	0,94
cg13105904	<i>KIAA0323</i>	14	23969884	0,57	0,44	0,33	0,18	0,48	0,11	0,18	0,12	0,10	0,04	0,20	0,35	0,13	0,15	0,15	0,03	0,43	0,08	0,07	0,41	0,37	0,22	0,03	0,48
cg08872742	<i>CDH5</i>	16	64957821	0,57	0,25	0,28	0,24	0,20	0,23	0,26	0,25	0,38	0,17	0,29	0,33	0,23	0,22	0,30	0,18	0,27	0,28	0,23	0,24	0,27	0,26	0,17	0,38
cg26799474	<i>CASP8</i>	2	201807196	0,57	0,26	0,15	0,16	0,15	0,21	0,20	0,15	0,12	0,16	0,17	0,21	0,18	0,18	0,15	0,15	0,19	0,12	0,23	0,21	0,15	0,17	0,12	0,26
cg20392764	<i>ASCL2</i>	11	2249693	0,57	0,84	0,83	0,86	0,92	0,85	0,89	0,93	0,88	0,94	0,90	0,79	0,93	0,85	0,87	0,96	0,88	0,87	0,91	0,89	0,91	0,88	0,79	0,96
cg01739167	<i>CHRNE</i>	17	4747123	0,60	0,30	0,27	0,26	0,17	0,29	0,20	0,22	0,25	0,17	0,20	0,22	0,26	0,32	0,26	0,12	0,29	0,23	0,32	0,27	0,20	0,24	0,12	0,32
cg19497444	<i>SLC22A18</i>	11	2887370	0,60	0,84	0,88	0,95	0,92	0,92	0,89	0,92	0,87	0,95	0,91	0,91	0,89	0,92	0,93	0,92	0,86	0,89	0,95	0,91	0,91	0,91	0,84	0,95
cg03427831	<i>MTHFR</i>	1	11790040	0,60	0,33	0,29	0,25	0,23	0,31	0,29	0,27	0,31	0,28	0,27	0,33	0,31	0,37	0,35	0,21	0,34	0,23	0,31	0,29	0,28	0,29	0,21	0,37
cg22038738	<i>PLAT</i>	8	42183830	0,63	0,74	0,88	0,93	0,94	0,91	0,90	0,93	0,96	0,96	0,94	0,95	0,93	0,91	0,93	0,95	0,81	0,92	0,94	0,94	0,94	0,92	0,74	0,96
cg11314684	<i>AKT3</i>	1	242072911	0,62	0,41	0,27	0,20	0,17	0,20	0,20	0,37	0,30	0,33	0,27	0,29	0,19	0,21	0,28	0,32	0,22	0,19	0,28	0,20	0,29	0,26	0,17	0,41
cg17421623	<i>KTELC1</i>	3	120670260	0,59	0,23	0,18	0,27	0,23	0,30	0,30	0,24	0,28	0,21	0,19	0,18	0,23	0,26	0,32	0,14	0,24	0,23	0,15	0,28	0,19	0,23	0,14	0,32
cg02789485	<i>MGC39497</i>	12	74069695	0,61	0,26	0,32	0,28	0,18	0,29	0,29	0,22	0,26	0,16	0,25	0,23	0,20	0,27	0,19	0,25	0,22	0,21	0,20	0,33	0,24	0,24	0,16	0,33

TargetID	SYMBOL	CHR	MAPINFO	P	M	V	NC																Ø	Min	Max		
							a	b	c	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q				s	t
cg22730004	<i>SPTA1</i>	1	156923342	0,65	0,39	0,31	0,11	0,19	0,09	0,11	0,22	0,20	0,09	0,16	0,14	0,11	0,16	0,21	0,12	0,10	0,18	0,07	0,20	0,17	0,17	0,07	0,39
cg02337447	<i>SCO1</i>	17	10542757	0,64	0,44	0,35	0,27	0,28	0,31	0,41	0,34	0,30	0,27	0,22	0,31	0,30	0,25	0,34	0,27	0,42	0,30	0,29	0,29	0,31	0,31	0,22	0,44
cg08090640	<i>IFI35</i>	17	38412815	0,66	0,33	0,25	0,18	0,23	0,26	0,19	0,26	0,40	0,18	0,33	0,25	0,31	0,25	0,34	0,18	0,23	0,25	0,35	0,27	0,31	0,27	0,18	0,40
cg25025243	<i>GSTP1</i>	11	67106810	0,69	0,45	0,50	0,36	0,43	0,36	0,32	0,28	0,34	0,27	0,36	0,26	0,42	0,39	0,38	0,23	0,26	0,44	0,31	0,26	0,48	0,35	0,23	0,50
cg25538571	<i>FLJ46365</i>	8	49665263	0,70	0,43	0,37	0,29	0,27	0,42	0,32	0,39	0,47	0,34	0,40	0,39	0,35	0,34	0,38	0,36	0,42	0,40	0,38	0,44	0,41	0,38	0,27	0,47
cg04123409	<i>SDS</i>	12	112326000	0,72	0,39	0,32	0,25	0,47	0,35	0,32	0,32	0,25	0,16	0,49	0,28	0,30	0,25	0,28	0,23	0,37	0,24	0,34	0,31	0,42	0,32	0,16	0,49
cg23771661	<i>B3GNT3</i>	19	17766332	0,70	0,33	0,31	0,26	0,35	0,37	0,45	0,24	0,48	0,28	0,62	0,28	0,44	0,31	0,24	0,22	0,40	0,33	0,25	0,32	0,57	0,35	0,22	0,62
cg08598221	<i>SNTB1</i>	8	121894110	0,71	0,33	0,39	0,30	0,23	0,38	0,32	0,36	0,34	0,26	0,38	0,28	0,28	0,37	0,32	0,25	0,28	0,27	0,26	0,44	0,29	0,32	0,23	0,44
cg19118077	<i>AKRIC3</i>	10	5127178	0,75	0,15	0,18	0,15	0,10	0,08	0,07	0,10	0,10	0,08	0,07	0,12	0,11	0,08	0,12	0,10	0,08	0,10	0,08	0,09	0,09	0,10	0,07	0,18
cg05767404	<i>C1orf150</i>	1	245779214	0,74	0,43	0,38	0,18	0,13	0,23	0,18	0,29	0,21	0,25	0,21	0,10	0,16	0,14	0,12	0,16	0,18	0,32	0,25	0,43	0,10	0,22	0,10	0,43
cg01820374	<i>LAG3</i>	12	6752344	0,76	0,41	0,34	0,37	0,44	0,53	0,31	0,46	0,43	0,23	0,44	0,43	0,51	0,42	0,46	0,36	0,37	0,52	0,38	0,50	0,62	0,43	0,23	0,62
cg02829654	<i>LYST</i>	1	234113562	0,79	0,48	0,33	0,31	0,24	0,50	0,41	0,54	0,31	0,33	0,42	0,43	0,49	0,42	0,47	0,36	0,48	0,44	0,37	0,53	0,48	0,42	0,24	0,54
cg13302154	<i>MGP</i>	12	14930699	0,74	0,41	0,37	0,27	0,35	0,28	0,33	0,32	0,34	0,39	0,36	0,43	0,23	0,35	0,31	0,26	0,26	0,33	0,19	0,32	0,37	0,32	0,19	0,43
cg07408456	<i>PGLYRP2</i>	19	15451532	0,76	0,52	0,45	0,43		0,42	0,43	0,43	0,56	0,31	0,60	0,55	0,45	0,46	0,42	0,32	0,38	0,39	0,38	0,50	0,54	0,45	0,31	0,60
cg22919728	<i>CHST13</i>	3	127725180	0,78	0,45	0,36	0,39	0,13	0,35	0,27	0,39	0,35	0,25	0,50	0,54	0,42	0,30	0,45	0,34	0,30	0,39	0,13	0,41	0,34	0,35	0,13	0,54
cg21448423	<i>ACOT11</i>	1	54786544	0,76	0,52	0,43	0,36	0,33	0,34	0,50	0,36	0,36	0,26	0,40	0,39	0,55	0,57	0,45	0,12	0,45	0,29	0,49	0,45	0,39	0,40	0,12	0,57
cg19832721	<i>KIAA1267</i>	17	41605643	0,74	0,55	0,49	0,33	0,63	0,61	0,39	0,38	0,38	0,39	0,71	0,58	0,36	0,52	0,54	0,40	0,43	0,43	0,34	0,42	0,40	0,47	0,33	0,71
cg24821554	<i>GUCY1B2</i>	13	50537954	0,80	0,26	0,26	0,29	0,19	0,34	0,32	0,40	0,49	0,20	0,39	0,40	0,30	0,41	0,33	0,28	0,48	0,44	0,24	0,45	0,35	0,34	0,19	0,49
cg13406950	<i>GBP1</i>	1	89303252	0,82	0,19	0,18	0,20	0,15	0,23	0,24	0,22	0,21	0,12	0,17	0,25	0,38	0,22	0,19	0,14	0,31	0,21	0,24	0,31	0,36	0,23	0,12	0,38
cg09809672	<i>EDARADD</i>	1	234624305	0,86	0,55	0,53	0,46	0,33	0,41	0,41	0,53	0,55	0,37	0,52	0,45	0,60	0,43	0,60	0,32	0,47	0,61	0,41	0,65	0,45	0,48	0,32	0,65
cg16744741	<i>PRKG2</i>	4	82345049	0,92	0,40	0,43	0,45	0,28	0,40	0,35	0,36	0,45	0,23	0,39	0,50	0,42	0,36	0,48	0,27	0,32	0,48	0,40	0,41	0,42	0,39	0,23	0,50

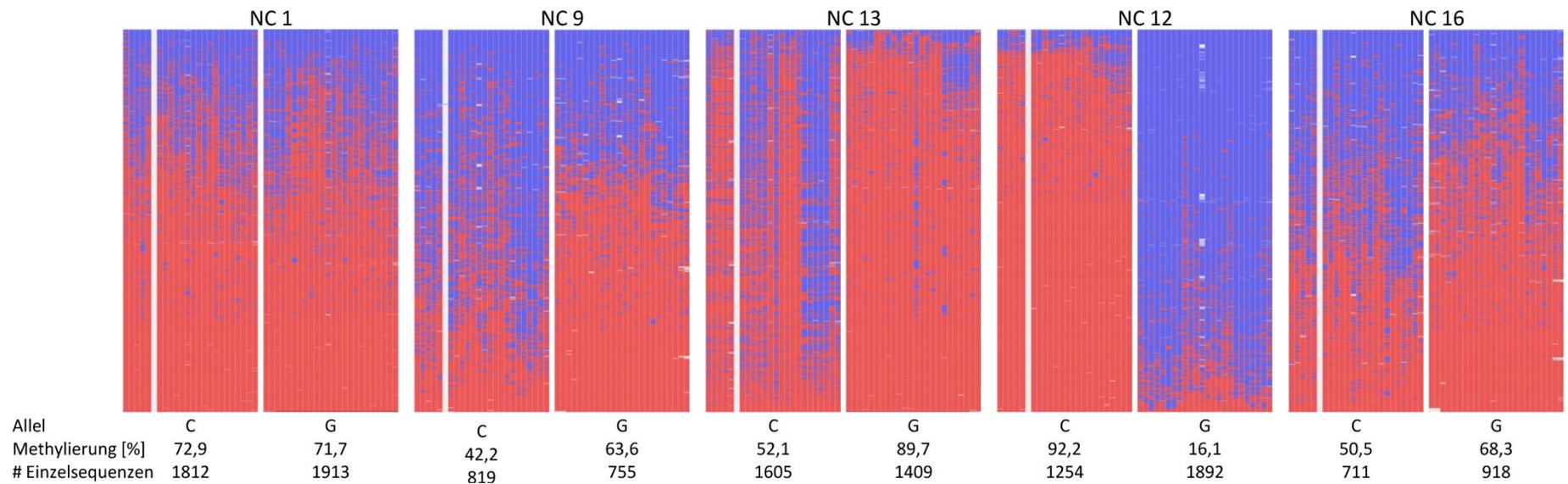
151

Die Tabelle zeigt die β -Werte des 27k Arrays für CpGs mit auffälliger Methylierung beim Patienten (Grenzwert $\geq \beta$ -Werte). Geimprintete Gene sind in rot dargestellt. Die Farbgebung der β -Werte geht von unmethyliert (grün) über hemimethyliert (schwarz) zu methyliert (rot). P – Patient; M – Mutter; V – Vater; NC – Normalkontrolle. Aus Beygo et al. 2013b.

Tabelle A12: Auflistung der für Methylierungs- und Expressionsanalysen verwendeten SNPs

Gen	rs Nummer SNP	
	Methylierung	Expression
<i>ACTN3</i>	rs17496586	
<i>CCDC19</i>	rs2494486	
<i>CHP2 (LOC63928)</i>	rs152041	
<i>ECEL1</i>	rs2742073	
<i>FAM50B</i>	rs2239713	rs6597007
<i>GAL3ST1</i>	rs42932	
<i>HOXB6</i>	rs11079830	
<i>POU3F1</i>	rs7555037	
<i>TRPC3</i>	rs13121031	rs11732666
<i>TSPO (BZRP)</i>	rs138908	
<i>ZNF710</i>	rs28549175	
	rs113033620	

Aus Beygo et al. 2013b.



153

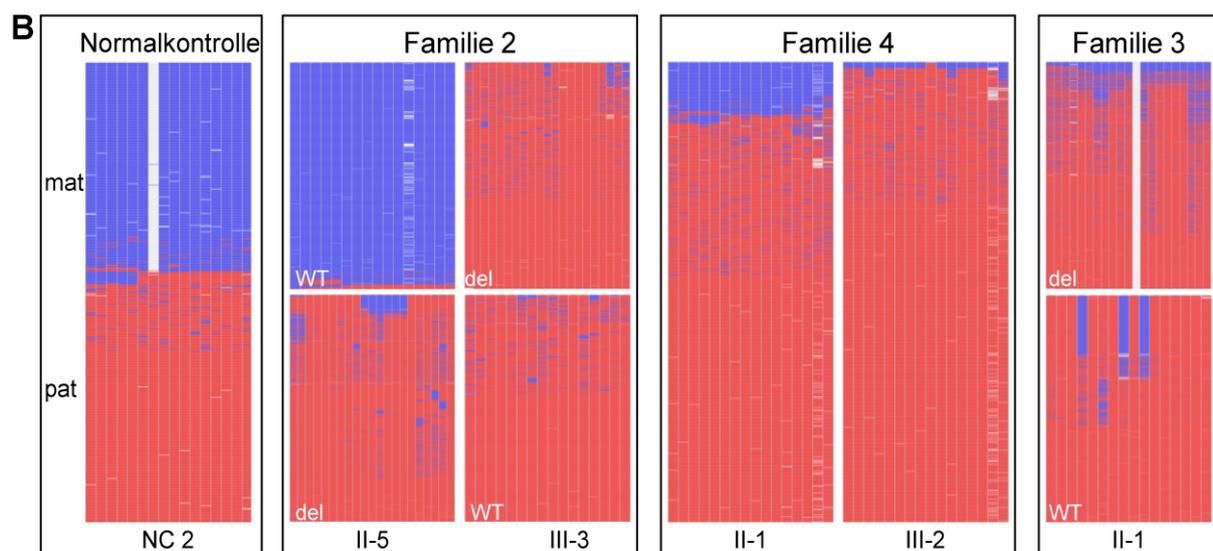
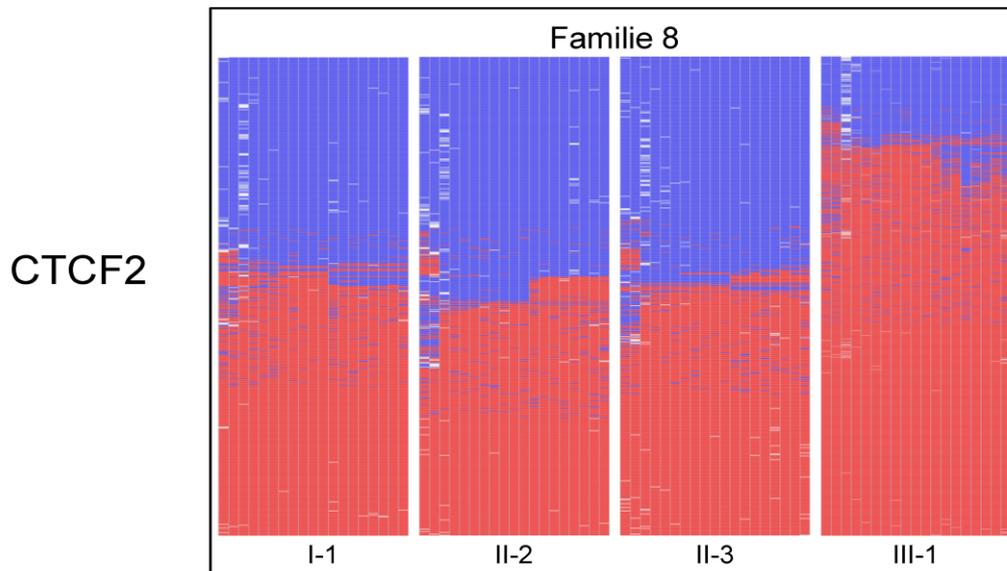
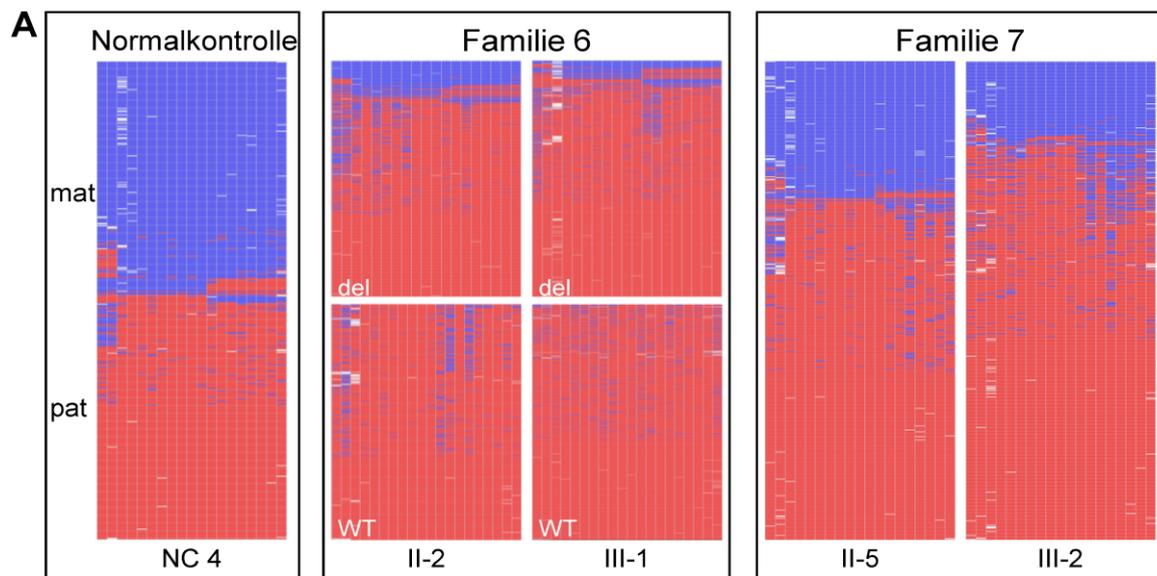
Abbildung A1: Methylierungsergebnisse für *TRCP3* nach Trennung der Einzelsequenzen nach Allelen

Die Abbildung zeigt die Methylierungsergebnisse für *TRCP3* nach Allelauftrennung für die fünf Normalkontrollen (NC), die für einen SNP (rs13121031) informativ sind. Der SNP führt zum Verlust des CpG-Dinukleotids an CpG 6, so dass die Verteilung der Methylierung über die beiden parental Allele hier abgelesen werden kann. Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht, soweit nicht anders angegeben für fehlende Sequenzinformation. Verändert nach Beygo et al. 2013b.

Tabelle A13: Ergebnisse der Methylierungsanalysen der CTCF-Bindestellen 1 bis 6 (ICR1) von jeweils sechs Normalkontrollen

	# CpGs	Proben ID	# Einzelsequenzen	Ø Methylierung [%]	SD	
CTCF1	14	NC 1	1053	57,4	54,65	2,76
		NC 2	1774	52,8		
		NC 3	1263	54,0		
		NC 4	810	50,9		
		NC 5	2075	54,6		
		NC 6	2027	58,2		
CTCF2	19	NC 1	966	53,6	54,90	4,32
		NC 2	1198	49,0		
		NC 3	1932	58,5		
		NC 4	1988	55,8		
		NC 5	2541	51,8		
		NC 6	1968	60,7		
CTCF3	10	NC 1	1626	45,1	47,90	2,92
		NC 2	1984	51,4		
		NC 3	1138	44,8		
		NC 4	2099	48,1		
		NC 5	1722	51,3		
		NC 6	2135	46,7		
CTCF4	16	NC 1	1168	56,4	52,33	3,41
		NC 2	879	53,3		
		NC 3	1425	50,8		
		NC 4	3741	55,6		
		NC 5	1377	50,5		
		NC 6	1076	47,4		
CTCF5	14	NC 1	2286	50,9	54,22	3,18
		NC 2	782	53,4		
		NC 3	2285	54,6		
		NC 4	1016	50,7		
		NC 5	822	58,0		
		NC 6	3198	57,7		
CTCF6	14	NC 1	1206	51,0	53,43	3,63
		NC 2	907	53,6		
		NC 3	1499	53,9		
		NC 4	740	50,1		
		NC 5	2793	60,2		
		NC 6	1762	51,8		
Durchschnitt (gerundet)			1646	52,91	3,98	

Die Tabelle beinhaltet die Daten der Methylierungsuntersuchungen der sechs Normalkontrollen pro CTCF-Bindestelle. Die Anzahl der CpG-Dinukleotide, die pro Amplicon untersucht wurden, ist in Spalte 2 verzeichnet. Die durchschnittliche Methylierung bezieht sich auf alle Einzelsequenzen pro Probe und Amplicon. In der vorletzten Spalte ist die durchschnittliche Methylierung der sechs Normalkontrollen pro CTCF-Bindestelle eingetragen. Die Standardabweichung (SD) gilt ebenfalls pro CTCF-Bindestelle. In der untersten Zeile sind die Durchschnittswerte der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen, der Methylierung und der SD verzeichnet. Verändert nach Beygo et al. 2013a.



CTCF4

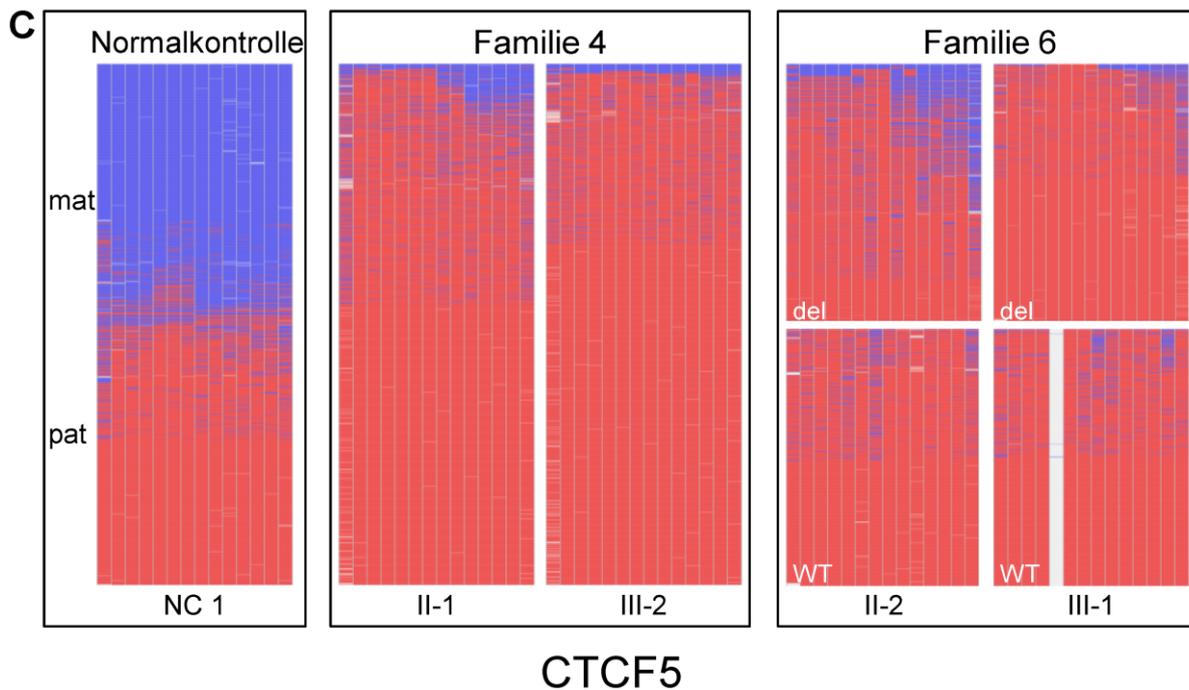


Abbildung A2: Methylierungsergebnisse der Hochdurchsatz-Bisulfitsequenzierung der CTCF-Bindestellen 2, 4 und 5 (A, B und C)

Die Abbildungen zeigen die Methylierungsergebnisse für drei CTCF-Bindestellen für jeweils alle untersuchten Individuen sowie einer Normalkontrolle (NC) zum Vergleich. Die Bezeichnungen der einzelnen Personen sind den jeweiligen Stammbäumen entnommen. Die Methylierungswerte in % und die Anzahl der analysierten Einzelsequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

(A) Ergebnisse der Methylierungsanalyse bei Mutter und Patient von Familie 6 für CTCF2. Die Allele konnten getrennt amplifiziert werden.

(B) Ergebnisse der Methylierungsanalysen für CTCF4. Bei den Familien 2 und 4 wurden jeweils Mutter und Patient untersucht. Die getrennte Amplifikation der Allele war bei Familie 2 und 3 möglich. NC 2 und II-1 aus Familie 3 sind heterozygot für einen SNP (rs2525883 A/G) der das CpG-Dinukleotid 7 betrifft, was zu fehlender Sequenzinformation an dieser Position führt.

(C) Ergebnisse der Methylierungsanalyse von CTCF5. Es wurden jeweils Mutter und Patient der Familien 4 und 6 untersucht. Bei Familie 6 war zudem die getrennte Amplifikation der Allele möglich. Der Patient III-1 der Familie 6 ist heterozygot für einen SNP (rs11042170 A/G) der das CpG-Dinukleotid 5 betrifft, was ebenfalls zu fehlender Sequenzinformation an dieser Position führt.

Jede Linie entspricht einer Einzelsequenz, jede Spalte einem CpG-Dinukleotid. Blau symbolisiert unmethylierte CpGs, rot methylierte. Weiß steht für fehlende Sequenzinformation, soweit nicht durch einen SNP bedingt.

NC – Normalkontrolle; mat – maternales Allel; pat – paternales Allel; del – Allel mit Deletion; WT – Wildtyp. Verändert nach Beygo et al. 2013a.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die auf vielfältige Art und Weise zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Mein **herzlicher Dank** gilt vor allem:

Herrn **Prof. Dr. Bernhard Horsthemke** für die Möglichkeit die Dissertation am Institut für Humangenetik anzufertigen, für das sehr interessante Forschungsprojekt, die wissenschaftliche Betreuung, für die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit sowie die Gelegenheit an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen.

Frau **Dr. Karin Buiting** für die engagierte Betreuung, die vielen Antworten und guten Ratschläge, für die wissenschaftlichen Diskussionen, für ihre Hilfe und großzügige Unterstützung, ihre Geduld und die großartige Zusammenarbeit und wundervolle Atmosphäre.

Frau **Melanie Heitmann** für ihre erstklassige technische Unterstützung, ihre Geduld und ihre freundliche Art alle neuen Aufgaben anzunehmen.

Meinen Labornachbarn **Lisa Neumann, Laura Steenpaß** und **Christian Grosser** für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die anregenden Diskussionen und für die immer 'offenen Ohren'.

Allen Mitarbeitern des Instituts (jetzigen und ehemaligen), vor allem **Dani, Hannah, Helena, Jana, Nicki** sowie **Katrin, Deniz, Saskia** und **Tea**, für die schöne Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Allen **Kollaborationspartnern**, insbesondere vom BMBF Netzwerk für Imprinting-Erkrankungen, für die gute und konstruktive Zusammenarbeit.

Meinen **Freunden**, vor allem **Gudrun**, für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch.

Meiner **Mutter** für ihre uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Methylierungsanalysen und Charakterisierung von epigenetischen Regulationselementen bei Imprintingkrankungen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jasmin Beygo befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/
Mitglied der Universität Duisburg-Essen
(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin
(Jasmin Beygo)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin
(Jasmin Beygo)