

# **Genomisches Imprinting und Imprintingkrankungen beim Menschen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Deniz Kanber**

aus Kaarst

Oktober 2009

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

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: ---

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2010

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Buiting K, **Kanber D**, Martin-Subero JJ, Lieb W, Terhal P, Albrecht B, Purmann S, Groß S, Lich C, Siebert R, Horsthemke B, Gillessen-Kaesbach G: Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum Mutat* 2008; **29**: 1141-1146.

**Kanber D**, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K : A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 582-590.

**Kanber D**, Buiting K, Zeschnigk M, Ludwig M, Horsthemke B: Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 22-29.

Poplinski A, Tüttelmann F, **Kanber D**, Horsthemke B, Gromoll J: Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl* 2009; in press.

**Kanber D**, Berulava T, Ammerpohl O, Mitter D, Richter J, Siebert R, Horsthemke B, Lohmann D, Buiting K: The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genetics*; under revision.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Genomisches Imprinting.....	1
1.1.1	DNA-Methylierung .....	2
1.1.2	Histonmodifikationen .....	4
1.1.3	Imprintauslöschung, -etablierung und –aufrechterhaltung .....	5
1.2	Uniparentale Disomien und Imprintingkrankungen .....	7
1.2.1	Das Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom.....	11
1.2.2	Das upd(14)mat Syndrom und upd(14)pat Syndrom.....	16
1.3	Imprinting und assistierte Reproduktion (ART).....	17
1.4	Zielsetzung.....	19
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material.....	20
2.1.1	Chemikalien.....	20
2.1.2	Standardlösungen.....	20
2.1.3	Medien .....	20
2.1.3.1	Medien für die Kultur von Bakterien .....	20
2.1.3.2	Medien für die Kultur von Zellen.....	21
2.1.4	Stämme und Zelllinien.....	21
2.1.4.1	Bakterienstamm .....	21
2.1.4.2	Zelllinie.....	21
2.1.5	Plasmide.....	21
2.1.6	Größenstandards .....	21
2.1.7	Enzyme .....	22
2.1.8	RNA und cDNA .....	22
2.1.9	Oligonukleotide .....	22
2.1.10	Patienten .....	23
2.1.10.1	Patienten mit atypischen Deletionen der 15q11q13 Region.....	23
2.1.10.2	Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp .....	23
2.1.10.3	Imprinting und assistierte Reproduktion (ART).....	24
2.1.10.3.1	ICSI-Kinder mit geringem Geburtsgewicht .....	24

2.1.10.3.2	Subfertile Patienten mit Methylierungsauffälligkeiten an den Loci <i>H19</i> und <i>MEST</i> .....	25
2.1.10.4	Patient mit einer generalisierten Imprintingstörung .....	25
2.1.10.5	Patienten mit Retinoblastom.....	26
2.2	Methoden .....	26
2.2.1	Arbeiten mit DNA .....	26
2.2.1.1	Isolierung von DNA aus peripherem Blut, LCLs und Mundschleimhaut.....	26
2.2.1.2	Präparation von Plasmid-DNA .....	27
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
2.2.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.1.5	Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	28
2.2.1.6	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	28
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung.....	29
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA.....	29
2.2.1.9	Restriktionsendonukleaseverdau .....	29
2.2.1.10	Klonierung .....	29
2.2.1.10.1	Vektor-DNA .....	29
2.2.1.10.2	Insert-DNA .....	30
2.2.1.10.3	Ligation.....	30
2.2.1.11	Bisulfitbehandlung von DNA .....	30
2.2.1.12	Sequence-based Quantitative Methylation Analysis (SeQMA).....	31
2.2.1.13	Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) .....	32
2.2.1.14	Methylspezifische-PCR (MS-PCR).....	33
2.2.2	Arbeiten mit RNA .....	33
2.2.2.1	Reverse Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA (RT-PCR).....	33
2.2.2.2	Amplifikation von cDNA-Enden (5'RACE).....	34
2.2.3	Bakterien.....	35
2.2.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	35
2.2.3.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	35
2.2.4	Zellkultur .....	36
2.2.4.1	Kultivierung der Zellen .....	36
2.2.4.2	Auftauen von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) .....	36
2.2.4.3	Einfrieren und Lagerung von LCLs.....	36
2.2.4.4	Inhibitor-Experimente mit LCLs .....	36

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Eingrenzung der PWS kritischen Region .....	38
3.1.1	Zytogenetische und molekulare Untersuchungen bei einer Patientin mit einer unbalancierten Translokation 45,X,der(X)t(X;15)(q28;q11.2) .....	40
3.1.2	Atypische Deletionen bei zwei Patienten mit Prader-Willi Syndrom .....	43
3.2	Das upd(14)mat Syndrom.....	45
3.3	Imprinting und assistierte Reproduktion (ART).....	48
3.3.1	Methylierungsanalysen bei ICSI-Kindern mit geringem Geburtsgewicht .....	48
3.3.2	Suche nach Mutationen im <i>CTCF</i> Gen bei subfertilen Männer .....	52
3.4	Abklärung einer familiären generalisierten Imprintingstörung .....	55
3.5	Methylierungs- und Expressionsanalysen am <i>RBI</i> Locus.....	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Die paternale Deletion der Gene <i>MKRN3</i> , <i>MAGEL2</i> und <i>NDN</i> führt nicht zum Prader-Willi Syndrom.....	67
4.2	Das upd(14)mat Syndrom.....	71
4.3	Imprinting und assistierte Reproduktion (ART).....	73
4.3.1	Methylierungsanalyse bei ICSI-Kindern mit geringem Geburtsgewicht .....	73
4.3.2	Suche nach Mutationen im <i>CTCF</i> Gen bei subfertilen Männer .....	77
4.4	Abklärung einer familiären generalisierten Imprintingstörung .....	78
4.5	Methylierungs- und Expressionsanalysen am <i>RBI</i> Locus.....	81
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>100</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ART	<i>assisted reproductive technology</i> ; assistierte Reproduktionstechnik
AS	Angelman Syndrom
AzadC	5-aza-2'-deoxycytidin
BisDNA	Bisulfit-behandelte DNA
bp	Basenpaar
BP	Bruchpunktregion
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
CDK	Cyclin-abhängig Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
cen	Centromer
cm	centimeter
COBRA	<i>combined bisulfite restriction analysis</i> ; kombinierte Bisulfitrestriktionsanalyse
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
CpG island	CG-reiche Region im Promotorbereich von Genen (>500 bp)
CVS	<i>Chorionic Villius Sampling</i> ; Chorionzottenbiopsie
del	Deletion
der(X)	derivatives X-Chromosom
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMT1	somatische Form der DNMT1
DNMT1O	Oocyten-spezifische Form der DNMT1
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	6-carboxyfluorescein
Fibrobl.	Fibroblasten
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS	<i>Fetal-Calf-Serum</i> ; fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
h	Stunde
HAT	Histonacetylase
HCl	Salzsäure

HDAT	Histondeacetylase
Hypom.	Hypomethylierung
IC	Imprinting Center
ICR	<i>Imprinting center control region</i> ; Imprintingcenterkontrollregion
ICSI	intracytoplasmatische Spermieninjektion
ID	Imprinting Defekt
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galaktosidase Gen
LB-Medium	Luria Broth Base-Medium
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LINES	<i>long interspersed nuclear elements</i> ; repetitive DNA-Sequenzen (4-10 kb)
LJ	Lebensjahr
M	mol/l
mat	maternal
Mb	Megabasenpaar
meth	methyliert
min	Minute
ml	Milliliter
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
Mock-behandelt	Schein-behandelt (hier: Wasserzugabe, da AzadC in Wasser gelöst wurde)
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
MSH	Mundschleimhaut
MS-MLPA	methylierungsspezifische MLPA
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
Mut.	Mutation
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
NK	Negativkontrolle
NP	Normalperson
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
p	<i>petit</i> ; kurzer Arm eines Chromosoms
P	Eltern
P	Patient
pat	paternal
pat	paternal

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PHPIB	Pseudohypoparathyroidismus Typ IB
PWS	Prader-Willi Syndrom
q	<i>queue</i> ; langer Arm eines Chromosoms
R	IUPAC-Code: Guanin-Rest oder Adenin-Rest
RACE	rapid cDNA end amplification
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach der reversen Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SeQMA	Sequence-based Quantitative Methylation Analysis
Seq-Primer	Sequenzierungsprimer
SINES	<i>short interspersed nuclear elements</i> ; repetitive DNA-Sequenzen (<500 bp)
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i> ; kleine nukleoläre RNA
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch
SRO	<i>smallest region of deletion overlap</i> , kleinster überlappender Deletionsbereich
SRS	Silver-Russell Syndrom
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
tel	Telomer
TI	Transkriptionelle Interferenz
Tm	Annealing Temperatur
TNDM	Transienter neonataler Diabetes mellitus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UCSC	University of California Santa Cruz, USA ( <a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a> )
unmeth	unmethyliert
UPD	uniparentale Disomie
Wobble	Mischung von verschiedenen Basen an einer Position
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Y	IUPAC-Code: Cytosin-Rest oder Thymin-Rest

## 1. Einleitung

### 1.1 Genomisches Imprinting

Genomisches Imprinting (Prägung) bezeichnet einen epigenetischen Prozess, bei dem bestimmte Gene oder Chromosomenabschnitte in der Keimbahn spezifisch markiert werden, so dass in somatischen Zellen entweder nur das väterliche oder nur das mütterliche Allel eines Gens aktiv ist. Infolgedessen sind das maternale und das paternale Genom funktionell verschieden und beide Genome für eine normale Embryonalentwicklung nötig. Genomisches Imprinting wurde erstmals 1984 durch Transplantationen von Zellkernen in der Maus entdeckt (Surani *et al.*, 1984; McGrath und Solter, 1984). Ein diploider maternaler Chromosomensatz (gynogenetisch) führt zwar zur Bildung eines Embryos, jedoch kommt es zu schweren Fehlbildungen der Embryonalhüllen. Ein diploider paternaler Chromosomensatz (androgenetisch) führt zu einer starken Ausbildung des Trophoblastengewebes, der Embryo jedoch ist stark retardiert und stirbt einige Tage nach der Implantation. Der maternale und paternale Beitrag für die Embryonalentwicklung scheint demnach unterschiedlich zu sein. Diese Experimente machten deutlich, dass für eine normale Embryonalentwicklung die Verschmelzung eines paternalen und maternalen Genoms eine Grundvoraussetzung ist. Die Beobachtungen bei diesen Experimenten werden auch beim Menschen gemacht. Es ist in seltenen Fällen möglich, dass der mütterliche Vorkern verloren geht und der männliche Chromosomensatz sich verdoppelt. Es beginnt die Zellteilung und es entsteht eine so genannte Blasenmole. Diese sind androgenetisch und weisen keine embryonalen Strukturen auf. Auch der umgekehrte Fall ist beim Menschen beobachtet worden. Eine spontane Aktivierung des Ovum führt zu gynogenetischen Embryonen, die sich zu benignen Ovarialteratomen entwickeln. In ihnen findet sich Gewebe aller drei Keimblätter, extraembryonale Strukturen fehlen jedoch gänzlich (Hall, 1990).

Die Ressourcenverteilung zwischen Fet und Mutter wird durch eine Vielzahl geprägter Gene kontrolliert. So fördern z.B. paternal exprimierte Gene das Wachstum des Feten, während maternal exprimierte Gene das Wachstum inhibieren. Dies unterstützt die von Moore und Haig 1991 aufgestellte Hypothese, dass Imprinting aus dem Konflikt beider Geschlechter entstanden ist. Sie besagt, dass, aufgrund der Tatsache, dass Männer ihre Gene über mehrere/verschiedene Frauen weitergeben können, Väter maximale Ressourcen aus der Mutter für ihren Nachwuchs ziehen möchten. Frauen hingegen können ihre Gene nur durch

eigene Schwangerschaften weitergeben. Daher möchten Mütter den Verbrauch ihrer Ressourcen niedrig halten, um weitere Schwangerschaften zu gewährleisten. Ein Beispiel hierfür liefert das Gen für den Wachstumsfaktor *Igf2* in der Maus. Das *Igf2* Gen wird ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert (DeChiara *et al.*, 1991), während das *Igf2r* Gen, das für einen Rezeptor für Igf2 codiert, der Igf2 abfängt, vom maternalen Allel exprimiert wird (Barlow *et al.*, 1991).

Es sind ~60 geprägte Gene für den Menschen bekannt (<http://www.geneimprint.com>). Schätzungsweise könnte es ~600 geprägte Gene in der Maus geben (Luedi *et al.*, 2005). Geprägte Gene treten oft gehäuft als Cluster in chromosomalen Regionen auf (Reik und Maher, 1997; Reik und Walter, 2001). Regulatorische Elemente, wie Imprinting Center (IC) (Buiting *et al.*, 1995), kontrollieren die Expression der Gene in einer solchen geprägten Domäne. Dadurch, dass die geprägte Region auf den elterlichen Chromosomen verschiedene Markierungen bzw. Prägungen trägt, können die beiden elterlichen Chromosomen unterschieden werden. Diese Prägung erfolgt durch DNA-Methylierung und Histonmodifikation.

### 1.1.1 DNA-Methylierung

Die erste beschriebene epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung des 5'-Kohlenstoffatoms des Cytosin-Restes eines CG-Dinukleotids, wobei ein 5-Methylcytosin entsteht (Bird *et al.*, 2002). Die DNA-Methylierungsmaschinerie setzt sich aus den DNA-Methyltransferasen (DNMTs), die für die *de novo* Methylierung und für die Aufrechterhaltung der Methylierung verantwortlich sind, und den Methylcytosin-bindenden Proteinen zusammen. Es scheint auch eine DNA-Demethylase zu existieren, die während der Embryonalentwicklung aktiv ist (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000). Der zugrunde liegende Mechanismus bzw. die zugrunde liegende enzymatische Aktivität ist bisher nicht genau bekannt. Untersuchungen beim Frosch geben erste Hinweise darauf, dass das Protein Gadd45a in Zusammenarbeit mit der DNA Reparatur bei der Demethylierung eine Rolle spielt. Es interagiert mit der DNA Reparatur Endonuclease XPG und katalysiert so die aktive DNA Demethylierung (Barreto *et al.*, 2007). Allerdings konnte für das humane GADD45A nicht gezeigt werden, dass es bei der aktiven Demethylierung eine Rolle spielt (Jin *et al.*, 2008). In zwei weiteren Arbeiten wird berichtet, dass der Demethylierungsprozess durch die DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B initiiert wird (Kangaspeska *et al.*, 2008;

Métivier *et al.*, 2008). In der Abwesenheit des Methyl donors S-Adenosyl-L-Methionin vermitteln DNMT3A und DNMT3B die oxidative Desaminierung am Cytosin C4. Ein Methylcytosin wird dabei in Thymin umgewandelt und es kommt zu der Basenfehlpaarung von Guanin:Thymin. Durch die Basenexcisionsreparatur-Maschinerie wird der Thymin-Rest entfernt und durch einen unmethylierten Cytosin-Rest ersetzt. Wie hoch die Effizienz der Desaminierung durch DNMT3A und DNMT3A wirklich ist und ob die Konzentrationen von S-Adenosyl-L-Methionin *in vivo* eingeschränkt sind bleibt jedoch ungeklärt.

DNA-Methylierung findet man vorzugsweise in repetitiven genomischen Regionen, wie Satelliten-DNA, LINES und SINES (Yoder *et al.*, 1997). Eine Ausnahme bilden CpG islands. Sie repräsentieren >500 bp große Regionen im Genom, die einen Gehalt von 55% an Guanin- und Cytosin-Resten aufweisen und bei denen der Quotient der beobachteten CG-Dinukleotide im Vergleich zu den erwarteten CG-Dinukleotiden bei mindestens 0,65 liegt (Takai und Jones, 2002). Solche CpG islands sind häufig mit Promotoren assoziiert und sind in der Regel unmethyliert. Ist ein CpG island mit einem Locus assoziiert, der dem genomischen Imprinting unterliegt, so ist dieses CpG island in der Regel elternspezifisch methyliert (auf dem einen Allel methyliert und auf dem anderen Allel unmethyliert). Die DNA-Methylierung verhindert die Transkription, indem sie z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert. Außerdem können Methylcytosin-bindende Proteine rekrutiert werden, die zu repressiven Histonmodifikationen führen.

Die DNA-Methylierung stellt einen Mechanismus zur dauerhaften Ausschaltung von Genen und zur Erhaltung der Genomstabilität dar. Der große Anteil an repetitiver DNA könnte ansonsten zu illegitimen Rekombinationsereignissen führen, die wiederum zur Disregulation benachbarter Gene führen können (Robertson, 2005). Außerdem ist sie an differentiell methylierten Regionen (DMRs) ein regulatorischer Kontrollmechanismus für die allelspezifische Genexpression geprägter Gene. Sie gewährleistet also eine monoallelische Expression. Das Methylierungsmuster von Imprints wird in somatischen Zellen bei der Zellteilung originalgetreu auf die Tochterzelle übertragen. Fehler in der Auslöschung, der Etablierung oder aber der Aufrechterhaltung der Imprints können zu Imprintingdefekten führen (Horsthemke *et al.*, 2006).

Für die meisten DNA Methylierungsanalysen wird eine Bisulfitbehandlung der DNA durchgeführt. Dabei werden alle unmethylierten Cytosin-Reste desaminiert und somit in Uracil umgewandelt. Bei der anschließenden PCR wird das Uracil durch Thymin ersetzt. Methylierte Cytosine sind gegen diese chemische Umwandlung geschützt und verbleiben als

Cytosine. Die dadurch entstehenden spezifischen Sequenzunterschiede bei methylierten und nicht-methylierten Allelen können in der Sequenzanalyse genutzt werden.

### 1.1.2 Histonmodifikationen

Histone sind stark basische, positiv geladene Proteine und bilden das Grundgerüst der Chromosomen. Die positive Ladung dient dazu eine enge Bindung mit der negativ geladenen DNA eingehen zu können. Durch diese Bindung entstehen Nukleosomen.

Das Nukleosom bildet die Grundeinheit der Verpackung der DNA. Sein Kern besteht aus acht Histonen: jeweils zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Diese vier Histontypen bilden ein Histonoktamer, um die sich die doppelsträngige DNA windet.

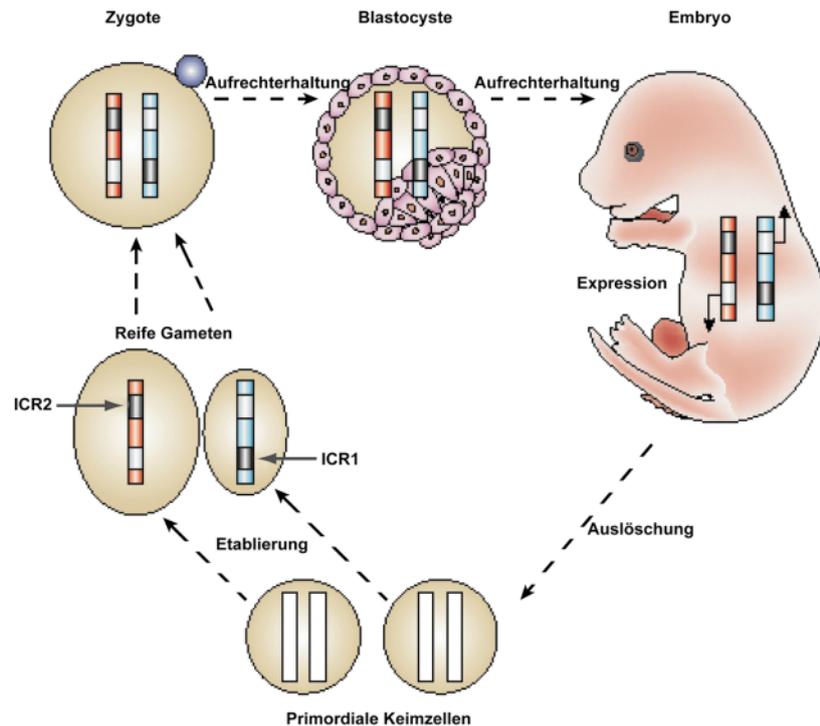
Die terminalen Bereiche der Histone ragen aus dem Nukleosom heraus und können auf diese Weise mit anderen Molekülen interagieren. Diese terminalen Bereiche unterliegen Modifikationen wie der Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und der ADP-Ribosylierung (Li, 2002; Strahl und Allis, 2000).

Die wichtigsten Histonmodifikationen sind die Acetylierung und die Methylierung. Die Histonacetylierung von Lysin-Resten, wie z.B. von Lysin 9 im Histon 3 (H3K9), geschieht durch Histonacetylasen (HAT). Dadurch verringert sich die Affinität zwischen Histon und DNA und die DNA wird leichter zugänglich für die RNA-Polymerase und für Transkriptionsfaktoren. Histonacetylierung findet man also an transkriptionsaktiven Bereichen. Histondeacetylasen (HDAT) bewirken den umgekehrten Effekt. Sie werden als Reaktion auf DNA-Methylierung mobilisiert (Li, 2002). An die methylierte DNA binden Methylcytosin-bindende Proteine wie z.B. MECP2. Dieses Protein formt einen Komplex mit HDATs und Sin3A (ein Co-Repressor Protein). Auf diese Weise wird eine Repression der Genexpression bewirkt. In diesem Fall sind die DNA-Methylierung und die Histonmodifikation eng miteinander verbunden. Weitere Beispiele für das Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histonmodifikation liefern die Methylcytosin-bindenden Proteine MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und Kaiso (Li, 2002).

Die Histonmethylierung von Lysin 4 im Histon 3 (H3K4) ist mit einer Aktivierung der Transkription assoziiert, während die Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 eine Repression der Transkription bewirkt (Jenuwein *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Imprintauslöschung, -etablierung und -aufrechterhaltung

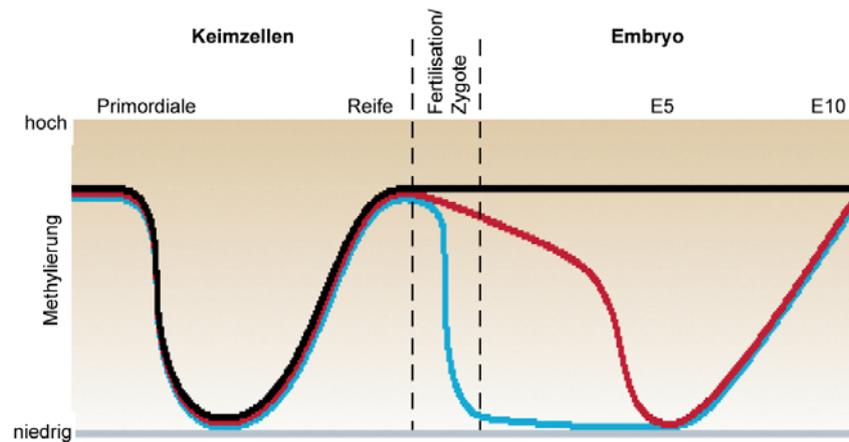
Die Etablierung von Imprints geschieht während der Keimzellentwicklung (Abb. 1.1.3.1). Dafür müssen zunächst alle vorhandenen spezifischen Imprints ausgelöscht werden (Abb. 1.1.3.2). Dies geschieht im Rahmen einer globalen Demethylierung und ist an Tag 12-13 der Keimzellentwicklung abgeschlossen (Reik und Walter, 2001). Bei der männlichen Keimzellentwicklung wurde beobachtet, dass die Genexpression von *CTCF* während der Auslöschung der Imprints hoch reguliert ist (Loukinov *et al.*, 2002). *CTCF* codiert für ein Zinkfingerprotein mit 11 Zinkfingerdomänen, mit denen eine DNA-Bindung erfolgen kann. Beaujean *et al.* (2004) brachten die kurze Isoform des MBD2 Proteins mit der Demethylierung des paternalen Genoms nach der Fertilisation in Zusammenhang. Interessanterweise ist die Expression dieser Isoform des MBD2 Proteins ebenfalls während der Spermatogenese hoch reguliert (Wawrzik *et al.*, 2009 doi:10.1038/ejhg.2009.83). Demnach stellen die Proteine CTCFL und MBD2 gute Kandidaten als epigenetische Reprogrammierungsfaktoren während der Spermatogenese dar. Nach der Auslöschung der Imprints erfolgt die geschlechtsspezifische Imprintetablierung. Der Zeitpunkt dieser Etablierung ist in beiden Geschlechtern unterschiedlich. In der weiblichen Keimbahn werden die Methylierungsprints postnatal während der Oocytenwachstumsphase (Meiose I Prophase I) etabliert. Dagegen findet die *de novo* Methylierung in der männlichen Keimbahn in den Pro spermatogonien vor der Meiose statt. Bourc'his *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die DNA-Methyltransferase Dnmt3L für die Etablierung von maternal methylierten Imprints während der Oogenese notwendig ist. Eine Dnmt3L Defizienz führte zu einer Hypomethylierung an maternal methylierten DMRs. Die globale Methylierung war durch die Dnmt3L Defizienz nicht betroffen. Die DNA-Methyltransferase Dnmt3a ist essentiell für die Etablierung von maternalen und paternalen Imprints (Kaneda *et al.*, 2004). Kato *et al.* (2007) konnten zeigen, dass Dnmt3a und Dnmt3b für die Etablierung von paternal methylierten Imprints während der Spermatogenese notwendig sind. Außerdem zeigten sie, dass beide DNA-Methyltransferasen auch für die Methylierung von SINES, LINES und Satelliten-DNA verantwortlich sind. Die allelspezifische Methylierung an den DMRs, die in der parentalen Keimbahn gesetzt wird, wird während der gesamten Embryonalentwicklung und auch im adulten Gewebe aufrechterhalten (Abb. 1.1.3.1).



**Abb. 1.1.3.1:** Imprintauslöschung, -etablierung und -aufrechterhaltung während der Keimzellentwicklung und Embryonalentwicklung. Die Imprintingkontrollregionen ICR1 (paternal methyliert) und ICR2 (maternal methyliert) in der chromosomalen Region 11p15 dienen hier als Beispiel. Im Embryo erfolgen die Aufrechterhaltung der Imprints und die elternspezifische Expression des jeweiligen unmethylierten Allels. In den primordialen Keimzellen werden die Imprints ausgelöscht und geschlechtsspezifisch neu etabliert. Die parentalen Chromosomen sind in rot (maternal) und blau (paternal) dargestellt. grau, methyliert; weiß, unmethyliert (modifiziert aus Reik und Walter, 2001).

Nach der Fertilisation findet eine globale Demethylierung beider elterlicher Genome statt (Abb. 1.1.3.2). Dabei werden aber alle geprägten Gene ausgespart. Durch welchen Mechanismus die geprägten Gene vor der globalen Demethylierung geschützt werden, ist bisher nicht genau bekannt. Nakamura *et al.* (2007) konnten zeigen, dass das Protein Dppa3 (Pgc7) einige geprägte Gene des maternalen Genoms vor der Demethylierung schützt. In Dppa3 (Pgc7) defizienten Zygoten wurde eine Demethylierung der maternal methylierten Loci *Peg1*, *Peg3* und *Peg10* detektiert. Allerdings waren die ebenfalls maternal methylierten Gene *Snrpn* und *Peg5* nicht betroffen. Der Mechanismus für den Schutz gegen die DNA Demethylierung durch Dppa3 (Pgc7) konnte nicht geklärt werden. Mayer *et al.* (2000) konnten zeigen, dass das paternale Genom innerhalb von acht Stunden aktiv demethyliert wird. Das maternale Genom dagegen wird graduell durch einen replikationsabhängigen Mechanismus ab dem Zwei-Zell-Stadium demethyliert (passive Demethylierung). Dies kommt dadurch zustande, dass zu diesem Zeitpunkt die DNA-Methyltransferase Dnmt1, die für die Aufrechterhaltung der Imprints verantwortlich ist, nicht im Nukleus lokalisiert ist. Erst im 8-Zell-Stadium befindet sich die Oocyten-spezifische Form von Dnmt1 (Dnmt1o) im

Nukleus und sorgt für die Aufrechterhaltung der Methylierung der geprägten Gene vom 8-Zell-Stadium zum 16-Zell-Stadium (Howell *et al.*, 2001; Toppings *et al.*, 2008). Danach werden die Imprints durch die somatische Form der Dnmt1 aufrechterhalten (Hirasawa *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 2008). Im Blastocystenstadium findet dann eine *de novo* Methylierung der nicht geprägten Gene durch die DNA-Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b statt.



**Abb. 1.1.3.2:** Reprogrammierung der Methylierungsmuster in der Keimbahn und im Embryo. In dieser Abbildung ist der Grad der Methylierung der methylierten (schwarz) und unmethylierten (grau) geprägten Gene während der Keimzell- und Embryonalentwicklung dargestellt. Außerdem wird der Grad der Methylierung von maternal (rot) und paternal (blau) nicht-geprägten Genen angezeigt. E, Tag der Embryonalentwicklung (modifiziert aus Reik und Walter, 2001).

## 1.2 Uniparentale Disomien und Imprintingkrankungen

Die uniparentale Disomie (UPD) beschreibt eine Situation, bei der beide Kopien eines Chromosomenpaares denselben elterlichen Ursprung haben (Engel *et al.*, 1980). Bei einer maternalen UPD7 [upd(7)mat] z.B. liegen demnach zwei Chromosomen 7 maternalen Ursprungs vor. Eine UPD kann durch Demaskierung einer heterozygoten Mutation eine autosomal rezessive Erkrankung bedingen oder aber eine Imprintingkrankung hervorrufen, da in diesem Fall die Dosis des allelspezifisch exprimierten Gens oder mehrerer geprägter Gene nicht mehr stimmt. Durch UPDs können demnach Gene identifiziert werden, die dem Imprinting unterliegen. Es gibt verschiedene Ursachen, die zu einer uniparentalen Disomie führen (Kotzot, 2008; Robinson, 2000). Eine Fehlverteilung der beiden Homologen eines bestimmten Chromosoms, z.B. Chromosom 15, in der weiblichen Keimbahn während der Meiose I oder Meiose II resultiert in einer für das Chromosom 15 disomen Oocyte. Die Befruchtung einer solchen disomen Oocyte mit einem normalen Spermium führt dann zu einer Trisomie 15. Dies ist nicht mit einer normalen Entwicklung vereinbar, daher kann es zu

einem Korrekturvorgang, der „Trisomy Rescue“ genannt wird, kommen. Dabei geht zufällig eines der dreifach vorliegenden Chromosomen 15 verloren. Ein Verlust des paternalen Chromosoms würde in diesem Fall zu einer maternalen uniparentalen Disomie führen (in 1/3 der Fälle). Geht hingegen eines der maternalen Chromosomen verloren, so liegt ein normaler Chromosomensatz vor (in 2/3 der Fälle). Eine Fehlverteilung in der Meiose I führt zu einer Heterodisomie. Eine Fehlverteilung in der Meiose II hingegen führt zu einer Isodisomie, d.h. dem Vorliegen zweier identischer mütterlicher Chromosomen, wenn vorher keine Rekombination zwischen den homologen Chromosomen stattgefunden hat.

Ein weiteres Beispiel für die Entstehung einer UPD ist die Befruchtung einer Oocyte, die für ein spezifisches Chromosom nullisom ist, durch ein normales Spermium. Dabei entsteht eine monosome Zygote und auch in diesem Fall kann es zu einem Korrekturvorgang, der „Monosomy Rescue“ genannt wird, kommen. Dabei wird das monosom vorliegende Chromosom dupliziert, was zu einer paternalen uniparentalen Isodisomie führt. Eine weitere Möglichkeit für eine uniparentale Disomie liefert die somatische Rekombination während der Mitose. Ein reziproker Austausch von Segmenten zwischen den Schwesterchromatid-Chromosomenpaaren führt zu Tochterzellen mit einer segmentalen paternalen Isodisomie und zu Tochterzellen mit einer segmentalen maternalen Isodisomie. In der Tabelle 1.2.1 sind uniparentale Disomien, die beim Menschen beobachtet werden und zu Imprintingkrankungen führen, aufgelistet.

**Tabelle 1.2.1** Uniparentale Disomien und die damit assoziierten Imprintingkrankungen.

UPD	Imprintingkrankung	Phänotyp
upd(6)pat	Transienter neonataler Diabetes mellitus	Transienter neonataler Diabetes mellitus, intrauterine Wachstumsretardierung, Makroglossie
upd(7)mat	Silver-Russell Syndrom	Prä- und postnatale Wachstumsretardierung, faziale Dysmorphien, dreieckige Gesichtsform
upd(11p15)pat	Beckwith-Wiedemann Syndrom	Prä- und postnataler Großwuchs, Makroglossie, faziale Dysmorphien, Risiko für Tumore
upd(14)mat	upd(14)mat Syndrom	Kleinwuchs, Hypotonie, Adipositas, kleine Hände und Füße, vorzeitige Pubertät
upd(14)pat	upd(14)pat Syndrom	Schwere Entwicklungsverzögerung, Wachstumsretardierung, Abdominaldefekte, Muskel- und Skelettauffälligkeiten
upd(15)pat	Angelman Syndrom	Schwere mentale Retardierung, Ataxie, Krampfanfälle, keine Sprachentwicklung, Mikrozephalie, häufige Lachanfalle
upd(15)mat	Prader-Willi Syndrom	Kleinwuchs, Hypotonie, Hyperphagie, Adipositas, Hypogonadismus, mentale Retardierung, kleine Hände und Füße
upd(20q)pat	Pseudohypoparathyroidismus Typ IB	Resistenz gegenüber Parathyroidhormonen (PTH)

Die in der Tabelle aufgelisteten Imprintingkrankungen können auch andere Ursachen als nur die uniparentale Disomie haben. Dazu gehören *de novo* Deletionen der entsprechenden chromosomalen Region oder aber Imprintingfehler der jeweiligen geprägten Genen.

Bei Patienten mit Transientem neonatalen Diabetes mellitus (TNDM) liegt eine Hyperglykämie in den ersten Lebensmonaten vor. Außerdem weist ein Teil dieser Patienten eine intrauterine Wachstumsretardierung und eine Makroglossie auf. TNDM wird durch eine aberrante Expression des *PLAGL1* Gens, das in 6q24 lokalisiert ist, hervorgerufen. Das *PLAGL1* Gen ist auf dem maternalen Chromosom 6 methyliert und auf dem paternalen Chromosom unmethyliert. Die Expression erfolgt ausschließlich vom paternalen Allel. Durch eine paternale uniparentale Disomie des Chromosom 6 oder aber eine Epimutation im

*PLAGL1* Gen sind beide Allele des Gens hypomethyliert, was zu einer Überexpression von *PLAGL1* führt.

Das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) ist ein Großwuchssyndrom und wird durch eine segmentale paternale uniparentale Disomie des Chromosom 11 (~20%), eine Mutation im maternal exprimierten *CDKN1C* Gen (5% – 15%) oder eine Epimutation in 11p15 hervorgerufen (Blik *et al.*, 2001; Diaz-Meyer *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005). In der chromosomalen Region 11p15 gibt es zwei Imprintingkontrollregionen (ICR1 und ICR2). Bei ~5% der Patienten mit BWS ist die ICR1 betroffen, während bei ~60% dieser Patienten die ICR2 betroffen ist. Über die ICR1 wird die Expression der Gene *IGF2* und *H19* reguliert. Die ICR1 befindet sich zwischen den beiden Genen und kontrolliert den Zugang von zwei Enhancer-Elementen, die downstream von *H19* liegen und von beiden Genen genutzt werden. Auf dem maternalen Chromosom 11 liegt die ICR1 unmethyliert vor und das Isolator-Protein CTCF kann binden. Dadurch können die Enhancer-Elemente nicht mehr mit dem *IGF2* Promotor wechselwirken, sondern es kommt zu einer Wechselwirkung mit dem *H19* Promotor und *H19* wird exprimiert. Auf dem paternalen Chromosom 11 sind die ICR1 und der *H19* Promotor methyliert und das Wachstumsfaktorgen *IGF2* wird exprimiert, da CTCF nicht binden kann und die Enhancer-Elemente mit dem *IGF2* Promotor interagieren (Hark *et al.*, 2000; Ohlsson *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2004). CTCF (CCCTC-binding factor) ist ein 11-Zinkfingerprotein, das ein wichtiger Regulator der geprägten Genexpression ist. Es ist ein Chromatin-Isolator, der den Zugang von entfernten Enhancern zu Promotoren reguliert und nur an unmethylierte Allele binden kann. Bei Patienten mit BWS und einer Epimutation gleicht das mütterliche Chromosom 11 epigenetisch dem väterlichen Chromosom 11, was zu einer Überexpression von *IGF2* führt. *H19* wird in diesem Fall nicht exprimiert. Die ICR2 kontrolliert die Expression der Gene *KCNQ1*, *CDKN1C* und *KCNQ1OT1*. Auf dem maternalen Chromosom 11 ist diese Region methyliert und *KCNQ1* und *CDKN1C* werden exprimiert. Auf dem paternalen Chromosom ist die ICR2 unmethyliert und nur *KCNQ1OT1* wird exprimiert. Bei Patienten mit BWS liegt diese Region hypomethyliert vor und es kommt zu einer Überexpression von *KCNQ1OT1*, während die maternal exprimierten Gene *KCNQ1* und *CDKN1C* nicht exprimiert werden. Klinische Merkmale des BWS sind ein übermäßiges prä- und postnatales Wachstum, eine Makroglossie, eine Nabelhernie, relativ große Organe, Hypergonadismus und eine Tumorneigung (z.B. Wilms-Tumor).

Das Silver-Russell Syndrom (SRS) ist ein Kleinwuchssyndrom und eine heterogene Erkrankung. In ~10% der Patienten mit SRS liegt eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 7 vor (Eggermann *et al.*, 1997). Diese Patienten haben meist einen milderen

Phänotyp (Hannula *et al.*, 2001). In mehr als 50% der Patienten mit SRS findet man eine Hypomethylierung der Imprintingkontrollregion ICR1 auf dem paternalen Chromosom 11 (Gicquel *et al.*, 2005; Eggermann *et al.*, 2006). Bei den restlichen Patienten mit SRS kann die Ursache nicht genau geklärt werden. Wie schon oben beschrieben reguliert die ICR1 die Expression der Gene *IGF2* und *H19*. Durch die Hypomethylierung der ICR1 kommt es zu einer Überexpression von *H19*, während *IGF2* dann nicht exprimiert wird – es liegt der reziproke Fall zu BWS vor. Phänotypische Merkmale sind eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung mit typischen Dysmorphien, ein asymmetrischer Kleinwuchs und eine dreieckige Gesichtsform.

Bei Patienten mit Pseudohypoparathyroidismus Typ IB (PHPIB) wird eine Resistenz gegenüber Parathyroidhormonen (PTH) beobachtet (Bastepe *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005b). Diese Erkrankung wird durch eine paternale uniparentale Disomie des Chromosom 20 bzw. eine paternale Isodisomie des Chromosom 20q oder einem Imprintingdefekt am *GNAS* Locus hervorgerufen (Liu *et al.*, 2005b). Der *GNAS* Locus befindet sich in der chromosomalen Region 20q13 und beinhaltet vier geprägte Transkripte. Drei davon werden paternal exprimiert (*GNAS Exon 1A*, *GNASXL*, *NESPAS*) und eins wird maternal exprimiert (*NESP*) (Liu *et al.*, 2005ab; Bastepe und Jüppner, 2005). Patienten mit Pseudohypoparathyroidismus Typ IB zeigen eine Hypomethylierung am *GNAS Exon 1A* Locus. Zusätzlich kann eine Hypomethylierung am *GNASXL* und/oder *NESPAS* Locus beobachtet werden.

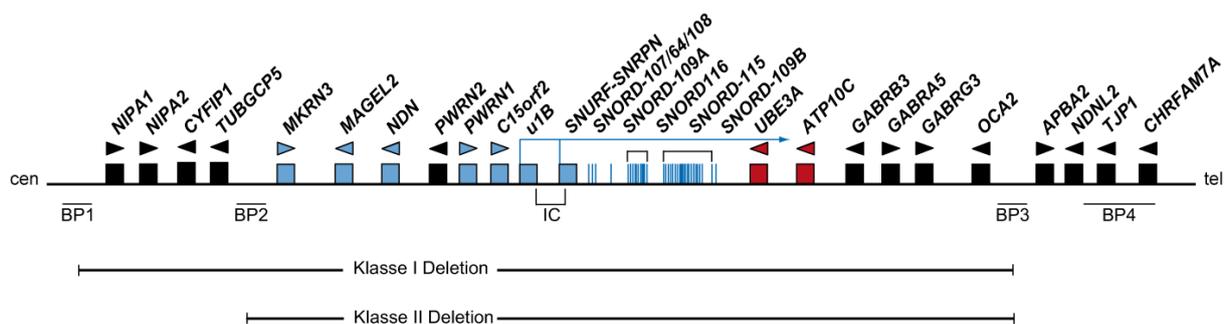
### 1.2.1 Das Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom

Das Prader-Willi Syndrom (PWS) und das Angelman Syndrom (AS) sind distinkte neurogenetische Erkrankungen, die auf einen Funktionsverlust der geprägten Genen in der chromosomalen Region 15q11q13 zurückzuführen sind. Klinische Merkmale für AS sind eine schwere mentale Retardierung, eine Ataxie, Krampfanfälle, eine fehlende aktive Sprache, eine Mikrozephalie und ein freundliches Wesen (Williams *et al.*, 1995). Die klinischen Merkmale beim Prader-Willi Syndrom (PWS) sind eine neonatale muskuläre Hypotonie, Fütterungsprobleme, Hyperphagie und Adipositas beginnend im frühem Kindesalter, Hypogonadismus, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, Schlafapnoen, Verhaltensauffälligkeiten und eine milde bis moderate mentale Retardierung.

Die molekulargenetischen Ursachen für beide Erkrankungen sind eine *de novo* Deletion der 15q11q13 Region, eine uniparentale Disomie des Chromosom 15 oder ein Imprintingdefekt.

Das AS kann auch durch einen Defekt im *UBE3A* Gen (Einzelgendefekt) hervorgerufen werden.

Eine ~5-6 Mb *de novo* Deletion auf Chromosom 15 [del(15)(q11q13)], welche die gesamte geprägte Domäne plus weitere nicht geprägte Gene beinhaltet, wird bei den meisten Patienten mit PWS und AS (70%) beobachtet. Bei Patienten mit PWS trägt das paternale Chromosom 15 die Deletion und bei Patienten mit AS das maternale Chromosom 15. In der Regel werden zwei verschiedene Klassen von Deletionen unterschieden, Klasse I und Klasse II Deletionen (Abb. 1.2.1.1). Bei beiden Klassen liegen die distalen Bruchpunkte im Bruchpunktcluster BP3, das zwischen dem *OCA2* Gen und dem *APBA2* Gen liegt. Klasse I Deletionen werden bei 30 – 40% der Patienten gefunden. Der proximale Bruchpunkt liegt im Bruchpunktcluster BP1, der centromerisch zu *NIPA1* lokalisiert ist. Klasse II Deletionen liegen bei 60 – 70% der Patienten vor. Hier befindet sich der proximale Bruchpunkt im Bruchpunktcluster BP2, das centromerisch zu *MRKN3* liegt (Knoll *et al.*, 1990; Kuwano *et al.*, 1992; Mutirangura *et al.*, 1993; Christian *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1999; Chai *et al.*, 2003). Da die Bruchpunkte in duplizierten Sequenzabschnitten liegen, kann es zu ungleichen Crossing-Over zwischen zwei homologen Chromosomen 15 (interchromosomal) oder zwischen verschiedenen Regionen eines Chromosom 15 (intrachromosomal) während der Meiose kommen. Dies hat die typischen Deletionen zur Folge (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 1999).



**Abb. 1.2.1.1:** Schematischer Überblick der chromosomalen Region 15q11-q13. Paternal exprimierte Gene sind blau dargestellt - snoRNA-Gene sind als Striche dargestellt. Maternal exprimierte Gene sind rot und biallelisch exprimierte Gene sind schwarz dargestellt. Die Transkriptionsrichtung wird durch Pfeile oberhalb der Gene angezeigt. BP, Bruchpunktregion; IC, Imprinting Center; cen, Centromer; tel, Telomer. Nicht maßstabsgetreu.

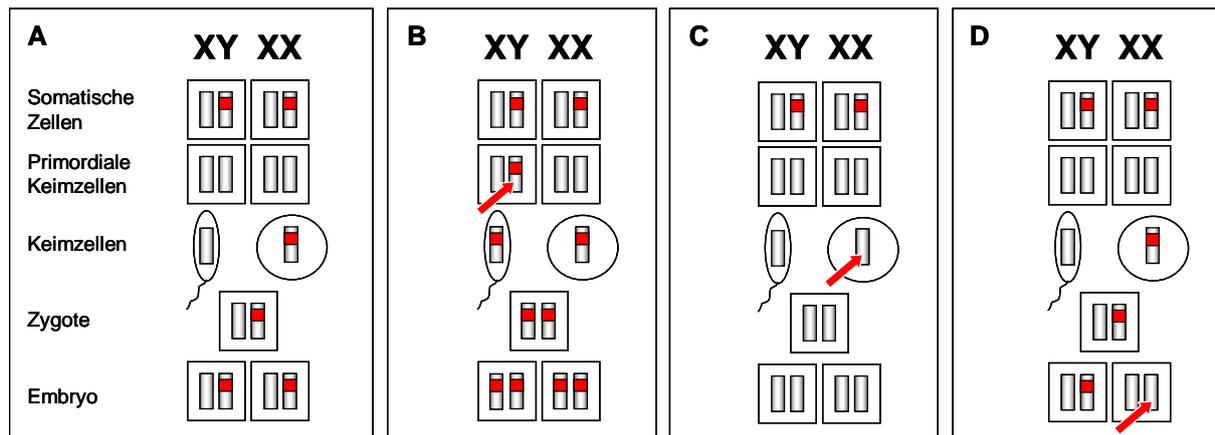
Eine weitere molekulargenetische Ursache für PWS und AS, die bei ~30% der Patienten mit PWS und bei ~3% der Patienten mit AS beobachtet wird, ist eine uniparentale Disomie des Chromosom 15. Bei Patienten mit PWS liegt eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 15 [upd(15)mat] vor. Bei Patienten mit AS liegt eine paternale uniparentale Disomie des Chromosom 15 [upd(15)pat] vor.

Bei 10% der Patienten mit AS liegt eine Mutation im *UBE3A* Gen auf dem mütterlichen Chromosom vor. Das *UBE3A* Gen wird im Gehirn monoallelisch vom mütterlichen Chromosom exprimiert. Es wird vermutet, dass diese monoallelische Expression durch die Transkription von *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense reguliert wird (Runte *et al.*, 2001). Bei ~20% der Patienten mit AS ist die molekulargenetische Ursache nicht bekannt (Horsthemke und Buiting, 2006).

In etwa 1% der Patienten mit PWS und etwa 4% der Patienten mit AS ist die molekulargenetische Ursache ein Imprintingdefekt. Diese Patienten haben scheinbar normale Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch trägt bei Patienten mit PWS das paternale Chromosom eine maternale Prägung, während bei Patienten mit AS das maternale Chromosom 15 ein paternales Methylierungsmuster aufweist. Bei einigen dieser Patienten sind die inkorrekten Imprints Folge einer Mikrodeletion, die das Imprinting Center (IC) betrifft (Buiting *et al.*, 1995). Das IC reguliert in *cis* die Chromatinstruktur, die DNA-Methylierung und die Genexpression der geprägten Gene in der chromosomalen Region 15q11q13. Es setzt sich zusammen aus dem AS-SRO und dem PWS-SRO. Der AS-SRO ist der kleinste überlappende Deletionsbereich (SRO: „smallest region of deletion overlap“) und wurde in Patienten mit AS mit einem Imprintingdefekt und einer IC-Deletion identifiziert. Er umfasst 880 bp und liegt 35 kb stromaufwärts vom *SNURF-SNRPN* Exon 1 (Buiting *et al.*, 2003). Umgekehrt führten IC-Deletionen bei Patienten mit PWS zur Identifizierung des PWS-SRO, der 4,1 kb umfasst und mit dem *SNURF-SNRPN* Promotor und Exon 1 überlappt. Der AS-SRO ist nötig für die Etablierung des maternalen Imprints in der weiblichen Keimbahn (Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002). Der PWS-SRO hingegen wird für die post-zygotische Aufrechterhaltung des paternalen Imprints benötigt (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Eine Deletion des PWS-SRO hat keinen Effekt, wenn sie über die weibliche Keimbahn vererbt werden. Wird diese Deletion jedoch über die männliche Keimbahn vererbt, so führt dies zu PWS. Der umgekehrte Fall trifft für den AS-SRO zu. Eine Deletion des AS-SRO hat keinen Effekt, wenn sie durch die männliche Keimbahn vererbt wird. Eine Vererbung durch die weibliche Keimbahn jedoch führt zu AS (Buiting *et al.*, 1995).

Bei ~90% der Patienten mit PWS und AS mit einem Imprintingdefekt handelt es sich um primäre Epimutationen (Buiting *et al.*, 2003). Bei Patienten mit PWS stammt das paternale Chromosom 15 mit dem Imprintingdefekt immer von der Großmutter väterlicherseits (Buiting *et al.*, 2003). Dies lässt auf einen Fehler in der Imprintauslöschung während der Spermatogenese schließen (Abb. 1.2.1.2). Bei Patienten mit AS hingegen kann das maternale Chromosom 15 mit dem Imprintingdefekt sowohl von dem Großvater als auch von der

Großmutter mütterlicherseits stammen. Dies lässt auf einen Fehler in der Imprintetablierung während der Oogenese oder aber auf einen Fehler in der Imprintaufrechterhaltung schließen (Abb. 1.2.1.2). Mehr als 30% der Patienten mit AS und einer primären Epimutation stellen ein somatisches Mosaik dar (Nazlican *et al.*, 2004), das vermutlich durch einen Fehler bei der Imprintaufrechterhaltung entsteht. Bei Patienten mit PWS werden somatische Mosaikbeobachtungen selten beobachtet.



**Abb. 1.2.1.2:** Genomisches Imprinting und Imprintingdefekte. Zur Vereinfachung sind nur ein Chromosomenpaar und der maternale Methylierungsimprint (roter Streifen) dargestellt. (A) In somatischen Zellen trägt das maternale Chromosom einen maternalen Imprint. Dieser wird in den primordialen Keimzellen ausgelöscht, in den Oozyten neu etabliert und in der Zygote und im Embryo aufrechterhalten. Imprintingdefekte (durch rote Pfeile markiert) können durch Fehler bei der Auslöschung (B), bei der Etablierung (C) oder bei der Aufrechterhaltung (D) des Imprints entstehen (Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Horsthemke).

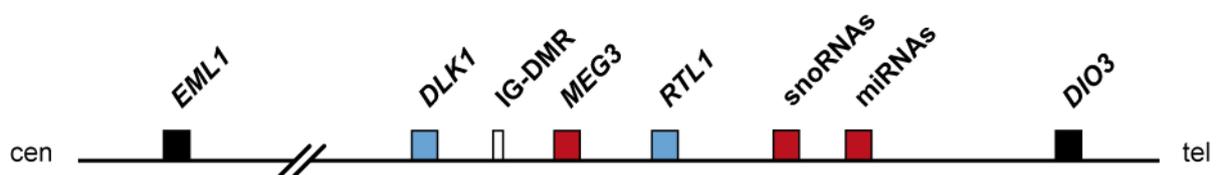
Alle drei molekulargenetischen Defekte (*de novo* Deletion, uniparentale Disomie und Imprintingdefekt) führen zu einem Funktionsverlust der paternal exprimierten Gene *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN* und mehr als 70 C/D Box snoRNA Gene (Abb. 1.2.1.1). Das *SNURF-SNRPN* Gen dient als Wirtsgen für die snoRNA Gene. Es gibt zwei snoRNA Cluster (das *SNORD115* Cluster und das *SNORD116* Cluster), drei einzelne snoRNA Gene (*SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*) und ein snoRNA Gen, das in zwei Kopien vorhanden ist (*SNORD109A* und *SNORD109B*). Durch ihre Lokalisation in *SNURF-SNRPN* werden sie paternal exprimiert. SnoRNAs codieren nicht für Proteine und sind 60 bis 300 Nukleotide lang (Kiss, 2002). Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der posttranskriptionellen Modifikation von Nukleotiden der ribosomalen RNA. Aufgrund ihrer Sequenzmotive unterscheidet man zwei Gruppen: C/D Box snoRNAs und H/ACA Box snoRNAs. Die C/D Box snoRNAs sind für die 2'-O-Ribose-Methylierung zuständig, während die H/ACA Box snoRNAs die Pseudouridinylierung vermitteln. Die snoRNAs in der PWS Region gehören zur Gruppe der C/D Box snoRNAs und sind möglicherweise an der Modifikation von mRNAs beteiligt, da sie keine komplementäre Sequenz zu ribosomaler

RNA aufweisen. Kürzlich wurden zwei weitere Gene zwischen *NDN* und *C15orf2* identifiziert: *PWRN1* und *PWRN2* (Buiting *et al.* 2007). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass *PWRN1* einen neuen alternativen Startpunkt des *SNURF-SNRPN* Gens darstellt (Wawrzik *et al.*, 2009 doi:10.1038/ejhg.2009.83).

Bei Patienten mit PWS konnte bislang kein Einzelgendefekt nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass das Prader-Willi Syndrom durch Verlust oder Inaktivierung mehrerer paternal exprimierter Gene entsteht (contiguous gene syndrome) (Nicholls *et al.*, 1998). Welche Gene genau zum PWS Phänotypen beitragen ist nicht bekannt. Balancierte Translokationen und atypische Deletionen können dabei helfen, Aufschluss darüber zu geben. Patienten mit einer paternal vererbten Deletion des *SNORD115* Gencluster sind phänotypisch unauffällig, daher ist eine Rolle dieses Clusters für den PWS Phänotyp unwahrscheinlich (Hamabe *et al.*, 1991; Bürger *et al.*, 2002; Runte *et al.*, 2005). Bis jetzt wurden sechs Fälle mit einem typischen PWS oder PWS-ähnlichen Phänotypen mit einer balancierten Translokation berichtet (Sun *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999; Wirth *et al.*, 2001; Schule *et al.*, 2005). Bei allen ist der *SNURF-SNRPN* Locus betroffen. Zwei Bruchpunkte liegen in Intron 2 und zerreißen das *SNURF-SNRPN* Gen. Die anderen Bruchpunkte liegen in Exon 17 (in einem Fall) oder in Exon 20 im 3'UTR der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit. In allen Fällen hat die Translokation keinen Effekt auf die Methylierung des *SNURF-SNRPN* Locus oder auf die Expression der stromaufwärts liegenden Gene. Allerdings ist die Expression der C/D Box snoRNA Gene (SNORDs) durch die Translokation betroffen. In drei der Patienten konnte ein Verlust der Expression der *SNORD116* Gene nachgewiesen werden (Wirth *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2002; Schule *et al.*, 2005). In der Publikation von Sahoo *et al.* (2008) wird ein Patient mit Makrosomie und einigen Merkmalen eines PWS beschrieben, der eine *de novo* Deletion des paternalen *SNORD119A*, *SNORD116* Genclusters und einen Teil des *SNORD115* Genclusters aufweist. In einer weiteren Publikation wird über einen Patienten mit einem typischen PWS berichtet, der ebenfalls für *SNORD116* und außerdem für *SNURF-SNRPN* deletiert ist (de Smith *et al.*, 2009). Somit könnte das *SNORD116* Gencluster eine wichtige Rolle in der Ätiologie bei PWS spielen.

### 1.2.2 Das upd(14)mat Syndrom und upd(14)pat Syndrom

Eine upd(14)mat ist charakterisiert durch eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, muskuläre Hypotonie, Entwicklungsverzögerungen, kleine Hände und Füße, eine frühzeitig beginnende Pubertät und Adipositas. Die phänotypischen Merkmale einer upd(14)mat überlappen mit denen, die man bei PWS beobachtet. Die klinischen Merkmale einer upd(14)pat sind ein Polyhydramnion, Brust- und Abdominaldefekte, Wachstumsretardierung, schwere Entwicklungsverzögerungen und faziale Abnormalitäten (Temple *et al.*, 1991; Pentao *et al.*, 1992; Antonarakis *et al.*, 1993). Die phänotypischen Merkmale einer upd(14)mat und einer upd(14)pat sind auf die Störung der allelspezifischen Expression eines dem Imprinting unterliegenden Genclusters in der chromosomalen Region 14q32 zurückzuführen. Diese 1 Mb große geprägte Domäne in 14q32 beinhaltet sowohl paternal exprimierte Gene wie *DLK1* und *RTL1* als auch maternal exprimierte Gene wie *MEG3*, *RTLAs*, *MEG8*, eine Vielzahl von C/D Box snoRNAs und microRNAs (Wylie *et al.*, 2000; Charlier *et al.*, 2001; Cavaille *et al.*, 2002; Seitz *et al.*, 2004) (Abb. 1.2.2.1). Obwohl für die Maus gezeigt werden konnte, dass *Dio3* paternal exprimiert wird (Tsai *et al.*, 2002), konnte bislang für das humane *DIO3* keine allelspezifische Expression nachgewiesen werden.



**Abb. 1.2.2.1:** Schematischer Überblick der chromosomalen Region 14q32.2. Paternal exprimierte Gene sind blau dargestellt. Maternal exprimierte Gene sind rot und biallelisch exprimierte Gene sind schwarz dargestellt. Die snoRNA- und microRNA-Gene sind maternal exprimiert und rot dargestellt. cen, Centromer; tel, Telomer. In dieser Region sind zwei differentiell methylierte Regionen (DMRs) vorhanden: IG-DMR und die Promotorregion des *MEG3* Gens (*MEG3* DMR, nicht eingezeichnet). Nicht maßstabsgetreu.

Eine differentiell methylierte Region zwischen *DLK1* und *MEG3* (IG-DMR) dient als Imprinting Kontrollregion für die *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne (Lin *et al.*, 2003). Die IG-DMR sowie die *MEG3* DMR (in der Promotorregion des *MEG3* Gens) sind auf dem paternalen Chromosom 14 methyliert und auf dem maternalen Chromosom unmethyliert. In Mäusen führt eine maternal vererbte Deletion der IG-DMR zu einer aberranten Methylierung, einer aberranten Genexpression und zu einem ähnlichen Phänotyp, der bei Patienten mit einer upd(14)pat beobachtet wird. Eine paternale Transmission der Deletion führt zu keinem Imprintingdefekt (Lin *et al.*, 2003). Eine segmentale upd(14)pat der 14q Region führt zum

upd(14)pat Phänotyp (Coveler *et al.*, 2002; Kagami *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen machen das geprägte *DLK1-MEG3-DIO3* Gencluster zur kritischen Region für upd(14)pat. Bislang wurden drei Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp und einer paternalen Deletion in der *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne und vier Patienten mit einem upd(14)pat Phänotyp und einer maternalen Deletion in der *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne berichtet. Diese Patienten zeigten eine Abwesenheit des methylierten bzw. unmethylierten Allels für den *DLK1/MEG3* Locus (Kagami *et al.*, 2008). Im Jahr 2007 beschrieb Temple *et al.* den ersten Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp und einem Imprintingdefekt (Temple *et al.*, 2007). Dieser Patient hat eine primäre Epimutation und zeigt das Methylierungsmuster für eine upd(14)mat (IG-DMR und *MEG3* DMR sind unmethyliert) aber eine biparentale Herkunft der Chromosomen 14. Diese Daten machen das geprägte *DLK1-MEG3-DIO3* Gencluster zur kritischen Region für den Phänotyp der upd(14)mat und upd(14)pat.

### 1.3 Imprinting und assistierte Reproduktion (ART)

Kinder, die durch *in vitro* Fertilisation (IVF) mit oder ohne intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugt worden sind, haben im Vergleich zu natürlich gezeugten Kindern häufig ein geringes Geburtsgewicht, ein erhöhtes Risiko für Abnormalitäten der Geschlechtschromosomen, für Malformationen und möglicherweise auch für Imprintingdefekte (Sutcliffe *et al.*, 2007).

Geprägte Gene werden nur von einem der parental Allele exprimiert und kontrollieren die Ressourcenverteilung zwischen Fet und Mutter (Miozzo *et al.*, 2002; Constanica *et al.*, 2004). Paternal exprimierte Gene wie *IGF2*, *KCNQ1OT1*, *PLAGL1*, *MEST* und *PEG3* fördern das fetale Wachstum, während maternal exprimierte Gene wie *MEG3* und *CDKN1C* das Wachstum des Feten inhibieren. Seltene Großwuchssyndrome bei Mensch und Tier werden durch den Verlust maternal exprimierter Gene (*CDKN1C* beim Beckwith-Wiedemann Syndrom und *IGF2R* bei Tieren mit Großwuchssyndrom) (Young *et al.*, 2001; Diaz-Meyer *et al.*, 2003) oder aber durch die zusätzliche maternale Expression von eigentlich nur paternal exprimierten Genen (*IGF2* in BWS) (Reik *et al.*, 1995) hervorgerufen. Im Gegensatz dazu findet man eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung bei einer reduzierten paternalen Expression des *IGF2* Gens (Silver-Russell Syndrom) (Gicquel *et al.*, 2005; Zeschnigk *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es durchaus möglich ist, dass die Disregulation von geprägten Genen zu einem niedrigen Geburtsgewicht bei ICSI-Kindern führen kann.

In den letzten Jahren wurde die Beobachtung gemacht, dass das Risiko für Imprintingfehler nach ART erhöht sein könnte. Cox *et al.* (2002) und Orstavik *et al.* (2003) berichteten über drei Patienten mit AS und Imprintingdefekt, die nach ICSI gezeugt wurden, und dass ICSI mit einer erhöhten Suszeptibilität für Imprintingfehler assoziiert sein könnte (Cox *et al.*, 2002; Orstavik *et al.*, 2003). Auch andere Studien, in denen Patienten mit BWS untersucht wurden, geben Hinweise darauf, dass das Risiko für BWS und damit für Imprintingdefekte nach ART erhöht ist (Maher *et al.*, 2003; DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Halliday *et al.*, 2004).

Die Ursache für das erhöhte Risiko für Imprintingdefekte nach ART ist nicht bekannt. Tierexperimente zeigen, dass die *in vitro* Kultivierung der Gameten und Embryonen zum Verlust von Imprints führen kann (Khosla *et al.*, 2001). Auch die Superovulation der Oocyten kann zu aberranten Imprints führen (Sato *et al.*, 2007). Es ist auch möglich, dass die gefundenen Epimutationen nach ART mit den Fertilitätsproblemen der Eltern (Vater oder Mutter) zusammenhängen. Es gibt mehrere Publikationen, in denen über eine aberrante Methylierung in Spermien von infertilen Männern mit Oligozoospermie berichtet wird (Marques *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2008). Es wurden u.a. Fehler in der Methylierung am *IGF2/H19*, *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus gefunden. Während die paternal unmethylierten Loci *KCNQ1OT1* und *MEST* eine Hypermethylierung aufweisen, ist der paternal methylierte *IGF2/H19* Locus unmethyliert. Es scheint sich hier um einen Fehler in der Maschinerie der Imprintauslöschung und der Imprintetablierung zu handeln. Das würde das Risiko inkorrekte Imprints an ihre Nachkommen zu vererben erhöhen (Kobayashi *et al.*, 2007). Es ist also durchaus möglich, dass ein erhöhtes Risiko für Imprintingdefekte nach ART mit den Fertilitätsproblemen der Paare assoziiert ist.

## 1.4 Zielsetzung

Bislang ging man davon aus, dass der Funktionsverlust mehrerer paternal exprimierter Gene der 15q11q13 Region (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN*, 76 snoRNA Gene) für die vollständige Ausprägung des PWS notwendig ist, da Einzelgendefekte nicht gefunden wurden. Seltene, atypische Aberrationen des Chromosom 15 könnten helfen herauszufinden, welche der in 15q11q13 lokalisierten Gene für das PWS relevant sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher die Bruchpunkte zweier Patienten mit allen klinischen Merkmalen eines PWS, aber einer atypischen Deletion, bei der die Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* nicht betroffen sind, genauer kartiert werden. Ebenso sollen die Translokationsbruchpunkte einer Patientin mit einer unbalancierten X;15-Translokation, bei der in der PWS-Region genau diese drei Gene deletiert sind, bestimmt werden. Diese Patientin weist nur wenige Zeichen eines PWS auf. Außerdem sollen der Methylierungsstatus und die Expression der PWS Gene für alle drei Patienten untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es den ersten Hinweis darauf, dass ein upd(14)mat Phänotyp auch durch eine primäre Epimutation am *DLK1/MEG3* Locus verursacht werden kann (Temple *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit soll für sieben Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp, bei denen eine upd(14)mat ausgeschlossen worden war, geklärt werden, ob sie eine primäre Epimutation in der *DLK/MEG3* Region haben.

Kinder, die nach assistierter Reproduktion (ART) geboren werden, haben häufig ein niedriges Geburtsgewicht und ein erhöhtes Risiko für angeborene Fehlbildungen und bestimmte genetische Syndrome. Es gilt als wahrscheinlich, dass epigenetische Veränderungen bei allen drei Problemfeldern eine Rolle spielen. Im Rahmen des Projektes sollen Kinder, die durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugt wurden und ein niedriges Geburtsgewicht hatten, auf Epimutationen (fehlerhaftes Methylierungsmuster) in elternspezifisch geprägten Genen untersucht werden. Da epigenetische Veränderungen aber auch eine bedeutende Ursache für Infertilität sein könnten, soll ebenfalls untersucht werden, ob Mutationen in Genen, die epigenetische Prozesse vermitteln, häufiger in subfertilen Individuen zu finden sind.

Bei einem Kind mit geringem Geburtsgewicht und multiplen Fehlbildungen sowie zwei weiteren Feten dieser Familie wurden an mehreren Loci Imprintingfehler identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Imprintingfehler systematisch untersucht werden. Dieser Patient scheint eine generalisierte Imprintingstörung zu haben und könnte dazu beitragen neue geprägte Gene zu identifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg), Roche (Mannheim) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen.

#### 2.1.2 Standardlösungen

6x DNA Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA

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

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8  
1 mM EDTA

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

#### 2.1.3 Medien

##### 2.1.3.1 Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium (für 1l): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

LB-Platten: 12 g/l Bacto-Agar (Difco) in LB-Medium

Ampicillin: Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$

X-Gal: Endkonzentration 32  $\mu\text{g/ml}$

### 2.1.3.2 Medien für die Kultur von Zellen

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (GIBCO)

Mycoplex<sup>TM</sup> Fötale Kälberserum (FKS) (PAA)

Pen Strep (GIBCO)

### 2.1.4 Stämme und Zelllinien

#### 2.1.4.1 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F', endA1, hsdR17, ( $r_k^- m_k^+$ ), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, ( $\Phi$ 80dlacD(lacZ)M15)

#### 2.1.4.2 Zelllinien

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) von Patienten mit Retinoblastom und einer seltenen Variante in Exon 9 bzw. Exon 3 des *RBI* Gens. Die Zelllinien wurden in Aachen im Institut für Humangenetik angelegt. Dafür wurden Lymphozyten aus peripherem Blut der Patienten mit dem Epstein Barr Virus infiziert und somit immortalisiert.

### 2.1.5 Plasmide

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Promega)

### 2.1.6 Größenstandards

DNA-Größenmarker: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)  
pUC19 DNA/*Msp*I (Fermentas)

GeneScan-LIZ 500 Size Standard (Applied Biosystems)

GeneScan-ROX 500 Size Standard (Applied Biosystems)

### **2.1.7 Enzyme**

#### Restriktionsendonukleasen:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### weitere Enzyme:

*AmpliTaq* Gold Polymerase (Roche)

Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech)

GoTaq Green Master Mix (Promega)

Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche)

HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen)

T4 DNA Ligase (Promega)

### **2.1.8 RNA und cDNA**

Placenta (Clontech)

Fetal brain (Clontech)

Uterus (Clontech)

Prostate (Clontech)

Lung (Clontech)

Kidney (Clontech)

Heart (Clontech)

Skeletal muscle (Clontech)

Human Testis Marathon-Ready cDNA (Clontech)

Human Fetal Brain Marathon-Ready cDNA (Clontech)

### **2.1.9 Oligonukleotide**

siehe Anhang

### **2.1.10 Patienten**

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission des Essener Uniklinikums genehmigt.

#### **2.1.10.1 Patienten mit atypischen Deletionen der 15q11q13 Region**

Die klinische Diagnose der hier beschriebenen Patienten wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt. Eine Zusammenfassung der klinischen Daten ist in Tabelle 3.1.1 im Ergebnis-Teil zu finden. Detaillierte klinische Daten sind in Kanber *et al.* nachzulesen (Kanber *et al.*, 2008).

##### **Patientin 1**

Die Patientin 1 hat eine unbalancierte Translokation [Karyotyp 45,X,der(X)t(X;15)(q28;q11.2)]. Bei dieser Patientin bestand der Verdacht auf PWS, der jedoch nicht bestätigt werden konnte.

##### **Patient 2**

Bei dem Patienten 2 mit PWS konnte mittels MLPA eine atypische Deletion des chromosomalen Bereichs 15q11-q13 nachgewiesen werden.

##### **Patientin 3**

Bei der Patientin 3 mit PWS konnte mittels MLPA eine atypische Deletion des chromosomalen Bereichs 15q11-q13 nachgewiesen werden.

#### **2.1.10.2 Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp**

##### **Patientin 1**

Die wichtigsten klinischen Daten von Patientin 1 sind prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Hypotonie, Fütterungsprobleme nach der Geburt, Adipositas beginnend mit dem sechsten Lebensjahr, kleine Hände, vorzeitige Pubertät, leichte mentale Retardierung und gehäufte Tumorentwicklung.

#### Patient 2

Die wichtigsten klinischen Daten von Patient 2 sind geringes Geburtsgewicht, Hypotonie, Fütterungsprobleme nach der Geburt, Adipositas beginnend mit dem fünften Lebensjahr, leichte mentale Retardierung, kleine Hände und Füße, vorzeitige Pubertät und ein akzeleriertes Knochenalter.

#### Patientin 3

Die wichtigsten klinischen Daten von Patientin 3 sind prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Hypotonie, Fütterungsprobleme nach der Geburt, vorzeitige Pubertät und Entwicklungsverzögerung.

#### Patient 4

Die wichtigsten klinischen Daten von Patient 4 sind Wachstumsretardierung während der Kindheit, vorzeitige Pubertät, Adipositas beginnend mit der Pubertät und normale mentale Entwicklung.

#### Patientin 5

Die wichtigsten klinischen Daten von Patientin 5 sind Fütterungsprobleme nach der Geburt, Hypotonie, Adipositas und eine vorzeitige Pubertät.

#### Patientin 6

Die wichtigsten klinischen Daten von Patientin 6 sind Hypotonie, Adipositas, kleine Hände und Füße und eine vorzeitige Pubertät.

#### Patientin 7

Die Patientin 7 wurde mit folgenden klinischen Merkmalen im Institut für Humangenetik in Essen vorgestellt: Adipositas und vorzeitige Pubertät.

### **2.1.10.3 Imprinting und assistierte Reproduktion**

#### **2.1.10.3.1 ICSI-Kinder mit geringem Geburtsgewicht**

In einer prospektiven Studie über intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mit 2.055 Geburten kamen 60 Kinder mit einem zu geringen Geburtsgewicht auf die Welt. Es wurden

38 dieser Familien, die sich zuvor damit einverstanden erklärt hatten noch mal kontaktiert zu werden, angeschrieben. Es stellten sich insgesamt 19 Elternpaare dazu bereit Mundschleimhautabstriche von sich und ihren Kindern einzusenden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kinder zwischen 4 und 7 Jahre alt. Die Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht und Geburtsgröße sind in Tabelle 2.1.10.3.1.1 angegeben. Als Kontrollgruppe dienten Mundschleimhautabstriche von 29 gleichaltrigen, spontan empfangenen Kindern mit normalem Geburtsgewicht.

**Tabelle 2.1.10.3.1.1** Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht und Geburtsgröße der 19 untersuchten ICSI-Kinder.

Sample	1	2	3	4	11	12	13	14	21	22	23	24	31	32	33	34	41	42	43
Schwangerschaftswoche	38	40	39	36	37	38	33	38	/	38	38	40	36	25	39	36	37	35	38
Geburtsgewicht (g)	2120	2240	2400	2070	2200	2250	1400	2200	2270	2490	2360	2450	1990	510	2440	1635	1810	1650	2170
Geburtsgröße (cm)	45	45	46	44	45	46	40,5	48	/	46	47	48	43	30	49	44,5	43	40	46

### 2.1.10.3.2 Subfertile Patienten mit Methylierungsauffälligkeiten an den Loci *H19* und *MEST*

Es wurden 20 subfertile Männer mit Methylierungsauffälligkeiten an *H19* (Hypomethylierung) und/oder *MEST* (Hypermethylierung) auf Sequenzvarianten im *CTCF* Gen untersucht (Tabelle 3.3.2.1). Die Analysen wurden an DNA aus Blut durchgeführt.

### 2.1.10.4 Patient mit einer generalisierten Imprintingstörung

DNA aus folgenden Gewebe des Indexpatienten standen zur Verfügung:

Peripherem Blut, LCL, Fibroblasten und Mundschleimhaut

Außerdem stand DNA aus peripherem Blut der Eltern und DNA von zwei Feten der Familie (DNA aus Muskelgewebe (Fet 1) und CVS-Material (Fet 2)) zur Verfügung.

### **2.1.10.5 Patienten mit Retinoblastom**

Für die Methylierungsanalysen wurden Patienten mit Retinoblastom und einer maternalen oder paternalen Deletion des gesamten *RBI* Gens untersucht.

Für Expressionsanalysen wurden lymphoblastoide Zelllinien (LCL) von Patienten mit Retinoblastom und einer seltenen exprimierten Variante im *RBI* Gen untersucht.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.1.1 Isolierung von DNA aus peripherem Blut, LCLs und Mundschleimhaut**

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut und LCL wurde die FlexiGene-Methode (Qiagen) angewandt. Zur Präparation von genomischer DNA aus Mundschleimhaut wurde die automatisierte Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation angewandt.

##### DNA-Präparation mit FlexiGene (Blut)

Zu 7.5 ml FG1-Puffer wurden 3 ml EDTA-Blut gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1,5 ml mit Protease versetzter FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 1,5 ml 100%iges Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und der Ansatz für 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 2000 g, wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min an der Luft getrocknet und in 300 µl FG3-Puffer 1 h im 65°C Thermomixer (850 rpm) und anschließend bei RT über Nacht auf dem Roller gelöst.

##### DNA-Präparation mit FlexiGene (LCL)

Die Zellen wurden nach der Ernte in 500 µl PBS aufgenommen und bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml FG1-Puffer resuspendiert und danach für

10 min auf den Roller gelegt (ab und zu invertieren). Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (10 min, 3000 g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 500 µl mit Protease versetzter FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 56°C und 850 rpm im Thermomixer inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 700 µl 100%iges Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und anschließend mit einem Glashaken herausgefischt. Es folgte ein Waschriff in 400 µl 70% Ethanol (Glashaken mit DNA in Eppi mit 70% Ethanol tauchen). Dann wurde die DNA an der Luft getrocknet und in 100 µl FG3-Puffer 1 h im 65°C Thermomixer (850 rpm) und anschließend bei RT über Nacht auf dem Roller gelöst.

#### DNA-Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation (Mundschleimhaut)

Die Präparation von DNA mit der BioRobot EZ1 Workstation von Qiagen funktioniert vollautomatisch und nach dem Prinzip der magnetischen Trennung. Die einzelnen Schritte sind hier kurz zusammengefasst: Die Zellen werden mit Proteinase K aufgeschlossen und mit magnetischen Partikeln gemischt, an die die DNA bindet. Durch ein magnetisches Feld werden die Partikel mit der DNA von dem Rest abgetrennt. Nach einem Waschriff wird das magnetische Feld abgestellt und die DNA eluiert.

#### **2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA**

Für die analytische Präparation von Plasmid-DNA wurden je 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer Bakterienkolonie über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (4 min, 2600 g) und das Pellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen lysiert. Dann wurden 300 µl Puffer P3 (3 M KOAc, pH 5,5) zugegeben und 15 min bei 10300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl 100%igem Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min, 16000 g). Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um im größeren Maßstab reine Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden 250 ml Bakteriensuspension sedimentiert und die

Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die DNA wurde in 200 – 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente aus genomischer DNA, Bisulfit-behandelter DNA und Plasmid-DNA amplifiziert. Standardmäßig wurde die *AmpliTaq*<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1 x Polymerasepuffer, jeweils 0,4 - 0,8 µM Primer, 150 - 225 µM dNTPs, 1 – 1,25 U Polymerase und 100 – 200 ng Matrizen DNA. Das Endvolumen betrug 25 µl. Es wurden in der Regel 35 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 20 sec, die Primer-Anlagerung für 20 sec, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den T<sub>m</sub>-Werten der Primer war und die Verlängerung bei 72°C. Die Verlängerungszeit richtete sich nach der Größe des Amplifikats. Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 10 min bei 95°C eingefügt, nach dem letzten Zyklus eine Verlängerungsphase von 7 min bei 72°C. Für die verschiedenen Ansätze und PCR-Programme siehe Anhang.

### **2.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde entweder das Multiscreen Filtration System (Millipore) oder Microcon (Millipore) benutzt und nach Vorschrift des Herstellers verfahren.

### **2.2.1.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Minigele mit 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 – 120 Volt. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards.

### **2.2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

### **2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung**

Die genaue Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurden die Absorptionen im Spektrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies) ermittelt. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA, bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Der Quotient aus der  $OD_{260}$  und der  $OD_{280}$  ist ein Grad für die Reinheit der Lösung. Er beträgt für reine DNA 1,8 und für reine RNA 2,0.

### **2.2.1.8 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 1 min bei 96°C durchgeführt. Im Anschluss daran wurden 25 Zyklen wie folgt durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C für 10 sec, die Primer-Anlagerung bei 50 - 60°C (abhängig von dem  $T_m$ -Wert des Primers) für 5 sec und die Elongation bei 60°C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Sephadex Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit den Programmen "Sequencing Analysis" (Applied Biosystems) oder "DNA Star" (Lasergene).

### **2.2.1.9 Restriktionsendonukleaseverdau**

Für analytische und präparative Zwecke wurden 1 – 3  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 10 – 20 U Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  für 2 h bei 37°C (*EcoRI*) verdaut.

### **2.2.1.10 Klonierung**

#### **2.2.1.10.1 Vektor-DNA**

Die Klonierungen erfolgten mit dem pGEM-T Easy Vektor Kit (Promega) und dem dazugehörigen Puffer nach Anleitung des Herstellers.

### 2.2.1.10.2 Insert-DNA

Die DNA-Fragmente, die für die Klonierung eingesetzt wurden, wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe der Microcon-Methode bzw. dem Multiscreen Filtration System (Millipore) (2.2.1.4) oder aus dem Agarosegel mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt (2.2.1.6).

### 2.2.1.10.3 Ligation

Für das pGEM-T Easy Vektor System wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation wurde mit 3 Units T4 DNA Ligase (Promega) in 1x Ligasepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 10% Polyethylenglycol) angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.2.1.11 Bisulfitbehandlung von DNA

Durch die Bisulfitbehandlung werden nicht-methylierte Cytosine deaminiert und in Uracil umgewandelt. Bei der anschließenden PCR wird das Uracil durch Thymin ersetzt. Methylierte Cytosine sind gegen diese chemische Umwandlung geschützt und verbleiben als Cytosine. Die dadurch entstehenden spezifischen Sequenzunterschiede bei methylierten und nicht-methylierten Allelen können in der Sequenzanalyse genutzt werden.

Für die Bisulfitbehandlung wurden 2 µg DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Denaturierung der DNA wurden 5,5 µl 3 M NaOH dazugegeben. Der Ansatz wurde zuerst 15 min bei 37°C und danach 2 min bei 95°C im vorgeheizten Heizblock inkubiert. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Für die Bisulfit-Lösung wurden 8,5 g Natrium Bisulfit in 15 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 0,9 ml 50 mM Hydrochinon und 1 ml 10 N NaOH (pH 5,0 – 5,3) wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 20 ml aufgefüllt. Zu der denaturierten DNA wurden 500 µl der Bisulfit-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht bei 50°C im Dunkeln inkubiert. Für die Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA wurde das Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die bisulfitbehandelte und aufgereinigte DNA wurde mit 5,5 µl 3 M NaOH 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 55 µl 6 M NH<sub>4</sub>OAc, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 350 µl Ethanol (100%) zugegeben und die DNA durch die Zentrifugation für 20 min bei 16000 g präzipitiert. Das

Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.1.12 Sequence-based Quantitative Methylation Analysis (SeQMA)**

Mittels SeQMA kann der Grad der Methylierung aller CG-Dinukleotide (CpG) in einer gegebenen Sequenz bestimmt werden. Hierzu wurde die genomische DNA Bisulfit-behandelt. Dabei werden alle unmethylierten Cytosin-Reste in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosin-Reste unverändert bleiben. Dies resultiert in spezifischen Sequenzunterschieden. An der Bisulfit-behandelten DNA wurde eine PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt (2.2.1.6). Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Produkte (2.2.1.8). Die Sequenzierungsprodukte wurden, nachdem 1 µl des GeneScan-LIZ 500 Size Standard (Applied Biosystems) hinzugefügt worden war, mittels ABIprism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer und der GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) analysiert. Durch den Vergleich der Peak-Flächen von Thymin-Resten an CG-Dinukleotid-Positionen mit den Peak-Flächen von genomischen Thymin-Resten an Kontroll-Positionen (keine CG-Dinukleotide) kann der Grad der Methylierung bestimmt werden. Thymin-Reste, die in der Originalsequenz vorhanden sind, haben eine invariable Peak-Höhe und -Fläche, wohingegen die Peak-Höhe und -Fläche von Thymin-Resten an CG-Dinukleotid-Positionen variabel sind, da sie nach der Bisulfitbehandlung abhängig vom Methylierungsstatus sind.

Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurde 1 µl Bisulfit-behandelte DNA eingesetzt. Die Produkte wurden aus dem Agarosegel mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt (2.2.1.6) und anschließend sequenziert (2.2.1.8). Um die Sequenzierungsergebnisse zu verbessern wurden Primer mit „tag“ verwendet, die Cytosin-Reste und Guanin-Reste enthalten, die in einer Bisulfit-behandelten DNA unterrepräsentiert sind. Die Sequenzierung erfolgte mit dem „forward-tag“ Primer. Nachdem 1 µl des GeneScan-LIZ 500 Size Standard (Applied Biosystems) zu den Sequenzierungsprodukten hinzugefügt worden war, wurden die Produkte einer Fragmentlängenanalyse mit dem ABIprism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer unterzogen und anschließend mit der GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) analysiert.

Die Rohdaten aller CG-Dinukleotide (Peak-Fläche eines Thymin-Restes an einem CG-Dinukleotid - entstanden nach der Bisulfitbehandlung) wurden aus der GeneScan Software

exportiert. Die relative Peak-Fläche (RPA) für jedes CG-Dinukleotid wurde bestimmt, indem die Ratio der Peak-Fäche des jeweiligen CG-Dinukleotids gegen die Summe der Peak-Flächen benachbarter Kontroll-Peaks (Thymin-Reste an nicht-CG-Dinukleotiden) berechnet wurde ( $\text{Peak-Fläche CpG} / \Sigma \text{ Fläche Kontroll-Peaks} = \text{RPA}$ ). Um einen Normalwert zu definieren, wurde für jeden CpG-Peak der Mittelwert der RPA von fünf Standard DNA Proben gebildet. Diese Proben stammen von gesunden Individuen mit normalen Methylierungsmustern. Jede RPA wurde gegen den berechneten Mittelwert der RPA gerechnet, um einen Prozentwert zu erhalten, der als RPA ratio bezeichnet wurde ( $\text{RPA} / \text{Mittelwert der RPA} = \text{RPA ratio}$ ). Die RPA ratio entspricht einer 50%igen Methylierung ( $\text{RPA ratio} * 50\%$ ). Für die Bestimmung des Methylierungsstatus der Patienten-Proben wurden die RPAs und RPA ratios auf dieselbe Weise berechnet (die RPAs wurden gegen die Mittelwerte der RPAs gerechnet). Danach wurden die RPA ratios gemittelt, um die RPA ratio N für jede Probe zu bestimmen. Der erhaltene Wert (N-Value) zeigt den Grad der „Nicht-Methylierung“ an und damit den Grad der Methylierung. Wie von Dikow *et al.* (2007) vorgeschlagen, zeigen N-Values  $> 0,6$  eine Hypomethylierung an, während N-Values  $< 0,4$  eine Hypermethylierung anzeigen (Dikow *et al.*, 2007). Werte zwischen 0,4 und 0,6 liegen im Normalbereich (normale Methylierung).

Der Grad der Methylierung in den Standard DNA Proben an den verschiedenen untersuchten Loci wurde auf 50% gesetzt. Daher erhalten wir im Vergleich mit den Patienten-Proben (ICSI-Proben) relative Werte für den Grad der Methylierung und können Methylierungsauffälligkeiten entdecken.

### **2.2.1.13 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)**

Um die Ergebnisse der SeQMA zu bestätigen, wurde die COBRA durchgeführt. Die PCR Produkte für *KCNQ1OT1* and *MEST* wurden mit dem Restriktionsenzym *Bst*UI verdaut, das nur an der entsprechenden Restriktionsstelle schneidet, an der die Ausgangs-DNA vor der Bisulfitbehandlung methyliert war.

Die PCR Produkte wurden aus dem Agarosegel mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt (2.2.1.6). Anschließend erfolgten die Restriktion und die Auftrennung in einem 3%igen Agarosegel. Es wurden 150 ng PCR Produkt für den Restriktionsansatz (20  $\mu$ l Ansatz) eingesetzt, der 2 Stunden bei 60°C inkubiert wurde.

#### 2.2.1.14 Methylspezifische-PCR (MS-PCR)

Für die methylspezifische-PCR (MS-PCR) wurden Primer-Sets verwendet, die aus zwei Primerpaaren bestanden. Die Reverse-Primer wurden an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM<sup>TM</sup>) versehen. Ein Primerpaar war spezifisch für das unmethylierte Allel und das andere Paar war spezifisch für das methylierte Allel. Die Produktgröße der Primerpaare unterschied sich um einige Basenpaare, daher konnten die Produkte mittels Fragmentlängenanalyse aufgetrennt werden. Alternativ wurden auch Primer-Sets, bestehend aus drei Primern, verwendet. Hier war der erste Primer spezifisch für das unmethylierte Allel, der zweite Primer spezifisch für das methylierte Allel und der dritte Primer konnte für beide Reaktionen benutzt werden und hatte an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM<sup>TM</sup>) gebunden (Common-Primer). Die PCR-Produkte wurden mit dem ABIprism 3100 Genetic Analyzer und der GeneScan Analysis Software sowie dem Programm Genotyper (Applied Biosystems) analysiert.

Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurde 1 µl Bisulfit-behandelte DNA eingesetzt. Alternativ zur *AmpliTaq* Gold Polymerase (Roche) wurde auch das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet.

### 2.2.2 Arbeiten mit RNA

#### 2.2.2.1 Reverse Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)

##### RT-Reaktion

In diesem ersten Schritt wurde die RNA durch die Reverse Transkriptase mit Hilfe von random Hexameren in cDNA umgeschrieben. Es wurden dafür die Reagenzien des GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Kits (Applied Biosystems) benutzt. Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription umfasste 20 µl und wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen angesetzt. Er setzte sich wie folgt zusammen: 150-200 ng RNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1 mM dNTPs, 1 Unit RNase Inhibitor, 2,5 Units Reverse Transkriptase, 2,5 µM random Hexamere, 1x Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3)). Die Reaktion wird in vier Schritten durchgeführt: 10 min 21°C, 15 min 42°C, 5 min 99°C und 5 min 5°C.

## PCR

An der cDNA wurde anschließend eine PCR durchgeführt, bei der spezifische Primer eingesetzt wurden. In der Regel wurden in neuen Reaktionsgefäßen parallel 50 µl PCR-Ansätze angesetzt. Dabei wurden für den einen Ansatz Primer für das interessierende Fragment eingesetzt und für den zweiten Ansatz Primer für ein ubiquitär exprimiertes Gen (*β-Aktin*), um die Integrität der RNA zu prüfen. Die PCR bestand für gewöhnlich aus folgenden Komponenten: 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10x PCR Puffer, 0,5 µl (5 U/µl) AmpliTaq-Polymerase, je 20 pmol 5'- und 3'-Primer und Wasser (weitere Ansätze siehe Anhang). Von dem RT-Ansatz wurden je 10 µl zu den vorbereiteten PCR Ansätzen pipettiert. Es wurden zusätzlich noch zwei Kontrollreaktionen für die RT-PCR durchgeführt. Bei der RT-Reaktion wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, aber mit RNA angesetzt, der bei fehlendem PCR-Produkt eine DNA-Kontamination ausschließt. Zum Ausschluss einer Kontamination der PCR-Reaktionslösung wurde ein zweiter Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase und ohne RNA angesetzt. Die PCR-Primer für *β-Aktin* liegen in Exon 4 bzw. Exon 5 des *β-Aktin* Gens und amplifizieren ein 493 bp umfassendes RT-PCR Produkt (Buiting *et al.*, 2001).

Alternativ wurde auch das Advantage cDNA Polymerase Mix Kit (Clontech) verwendet, um die cDNA (Anhang 7.5) zu amplifizieren.

### **2.2.2.2 Amplifikation von cDNA-Enden (5'- RACE)**

Bei der Methode der RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) werden an einer mRNA die Sequenzabschnitte zwischen der bekannten internen Sequenz und dem unbekanntem 5'- bzw. 3'-Ende amplifiziert. Zunächst wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und dann erfolgt im Falle der 5'-RACE das Poly(A)-Tailing mit Hilfe der Terminalen Transferase (Roche). Hierbei wird an das 3'-Ende der cDNA ein Poly(A)-Schwanz angehängt. Dadurch können die Enden der mRNA in einer PCR mit einem spezifischen Primer für den Poly(A)-Schwanz (Oligo dT-anchor primer) und einem genspezifischen Primer amplifiziert werden. Für die RACE wurde das 5'/3' RACE Kit (2nd Generation, Roche) verwendet. Es wurde, mit Ausnahme des ersten Schrittes, nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die cDNA Synthese (erster Schritt) wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert. Es wurde der eigene RT-Ansatz angesetzt bzw. verwendet (2.2.2.1).

### 2.2.3 Bakterien

#### 2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1982) hergestellt. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurde in 10 ml b-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6, mit KOH eingestellt) bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen eines OD<sub>550</sub>-Wertes von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 1250 g und 4°C sedimentiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 5,8, mit 0.2 M HAc einstellen) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1250 g und 4°C sedimentiert und das Pellet in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 6,5, mit KOH eingestellt) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100  $\mu$ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Es wurden 5  $\mu$ l eines Ligationsansatzes zu 50  $\mu$ l kompetenten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C, dann wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450  $\mu$ l LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 150  $\mu$ l und 350  $\mu$ l der Kultur wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.2.4 Zellkultur**

### **2.2.4.1 Kultivierung der Zellen**

Die LCLs wurden in Brutschränken bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor der Benutzung sterilisiert.

### **2.2.4.2 Auftauen von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs)**

Die eingefrorene Kultur wurde aus dem flüssigen Stickstoff möglichst schnell aufgetaut, mit 9 ml Kulturmedium (37°C) gemischt, in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und dann für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 8 ml Kulturmedium (37°C) versetzt, in eine große Gewebekulturflasche überführt und mindestens über eine Woche im Brutschrank inkubiert bzw. hochgezogen. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und bei zu dichter Zellzahl wurden die Zellen gesplittet.

### **2.2.4.3 Einfrieren und Lagerung von LCLs**

Zum Einfrieren von LCLs wurde die Kultur in ein 15 ml Probenröhrchen gegeben und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium (37°C) aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann erneut bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in X ml „Einfriermedium“ (8 ml Kulturmedium, 1 ml DMSO, 1 ml FKS) resuspendiert - die Zelldichte sollte dabei 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml betragen. Ein Aliquot von 1 ml der Suspension wurde für mindestens 4 Stunden bei -80°C gekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.4.4 Inhibitor-Experimente mit LCLs**

Um herauszufinden welche Wirkung die Demethylierung des CpG 85 auf die Expression des *RBI* Gens hat, wurden LCLs mit einem Methyltransferase-Inhibitor behandelt. Die

Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (AzadC (Sigma)) erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Chiurazzi *et al.* (Chiurazzi *et al.*, 1999).

Die Zellen wurden gezählt, gesplittet und in einer Anfangskonzentration von  $2,5-3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Im Zuge eines täglichen Mediumwechsels wurde den Zellen eine tägliche Dosis von AzadC (0,5  $\mu$ M) verabreicht. Als Kontrollen wurden Kulturen mit identischem Volumen an Wasser (Lösungsmittel für AzadC) behandelt. Die Zellen wurden nach 96 Stunden geerntet und die DNA und RNA noch am selben Tag isoliert.

Für die Ernte wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. 500  $\mu$ l wurden für die DNA Isolierung und 500  $\mu$ l für die RNA Isolierung eingesetzt.

Es wurde eine 10 mM AzadC-Stocklösung frisch angesetzt, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Jeden Tag wurde ein frisches Aliquot AzadC aufgetaut und verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Eingrenzung der PWS kritischen Region

Das Prader-Willi Syndrom (PWS) ist eine neurogenetische Erkrankung und wird durch eine ~5 Mbp Deletion 15q11q13, eine maternale uniparentale Disomie 15 oder einen Imprintingfehler verursacht. Bislang ging man davon aus, dass der Funktionsverlust mehrerer paternal exprimierter Gene in dieser Region (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN*, 76 snoRNA Gene) für die vollständige Ausprägung der Erkrankung notwendig ist, da Einzelgendefekte nicht gefunden wurden. Seltene, atypische Aberrationen des Chromosom 15 könnten helfen herauszufinden, welche der in 15q11q13 lokalisierten Gene für das PWS relevant sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Patienten mit solchen seltenen Aberrationen untersucht: eine Patientin mit einer unbalancierten  $t(X;15)(q28;q11.2)$  und zwei Patienten mit PWS und einer atypischen Deletion in 15q11q13. In der Tabelle 3.1.1 sind die klinischen Daten dieser drei Patienten aufgeführt.

Tabelle 3.1.1 Klinische Daten der drei Patienten.

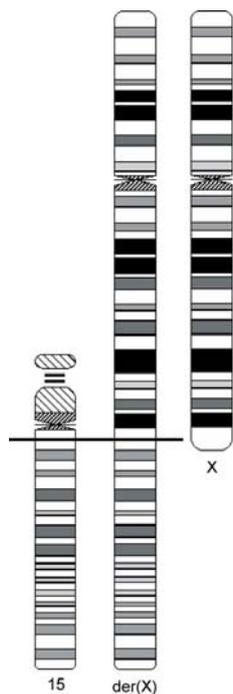
<u>Klinische Merkmale des PWS</u>	Patientin 1 t(X;15)	Patient 2	Patientin 3
Hauptkriterien*			
<b>Muskelhypotonie</b>	-	+	+
<b>Fütterungsprobleme</b>	-	+	+
<b>Adipositas</b> (mit Beginn zwischen 12. LM und 6. LJ)	+	+	+
<b>Hyperphagie</b>	-	+	+
<b>Hypogonadismus</b> (Hypoplasie der Genitalien, Infertilität, verzögerte Pubertät)	-	+	+
<b>Mentale Retardierung</b>	+	+	+
<b>Faziale Auffälligkeiten</b> (schmaler bifrontaler Durchmesser, mandelförmige Augen, nach unten gerichtete Mundwinkel)	-	+	+
Nebenkriterien*			
<b>Verhaltensauffälligkeiten</b>	-	+	+
<b>Schlafstörungen / Schlafapnoe</b>	-	n.b.	+
<b>Kleinwuchs</b>	-	+	(+)
<b>Hypopigmentierung</b>	-	-	-
<b>Kleine Hände / kleine Füße</b>	- / -	(+) / +	+ / -
<b>Zäher Speichel</b>	-	+	+
<b>„Skin picking“</b>	-	-	+
<b>Wenig fetale Kindsbewegung</b>	-	+	+
<b>Artikulationsstörung</b>	-	+	+
<b>Esotropie / Myopie</b>	- / n.b.	- / -	(+) / -
Unterstützende Merkmale			
<b>Hohe Schmerzgrenze</b>	+	n.b.	n.b.
<u>PWS atypische Merkmale</u>			
<b>Normales Geburtsgewicht</b>	+	-	-
<b>Hemiplegie</b>	+	-	-
<b>Absencen</b>	+	(+)	-
<b>Pubertas praecox vera</b>	+	-	-
<b>Fortgeschrittenes Knochenalter</b>	+	-	-
<b>Großwuchs</b>	+	-	-

+ vorhanden, - nicht vorhanden, n.b. nicht berichtet

\*Consensus diagnostic criteria for PWS (Holm *et al.*, 1993)

### 3.1.1 Zytogenetische und molekulare Untersuchungen bei einer Patientin mit einer unbalancierten Translokation 45,X,der(X)t(X;15)(q28;q11.2)

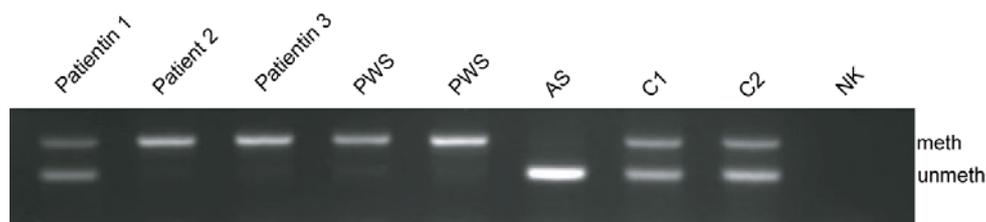
Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Giltay und Herrn Hochstenbach vom Institut für medizinische Genetik in Utrecht (Niederlande). Dort erfolgte die zytogenetische Analyse, die zeigte, dass ein *de novo* 45,X,der(X)t(X;15)(q28;q11.2) Karyotyp vorliegt (Abb. 3.1.1.1).



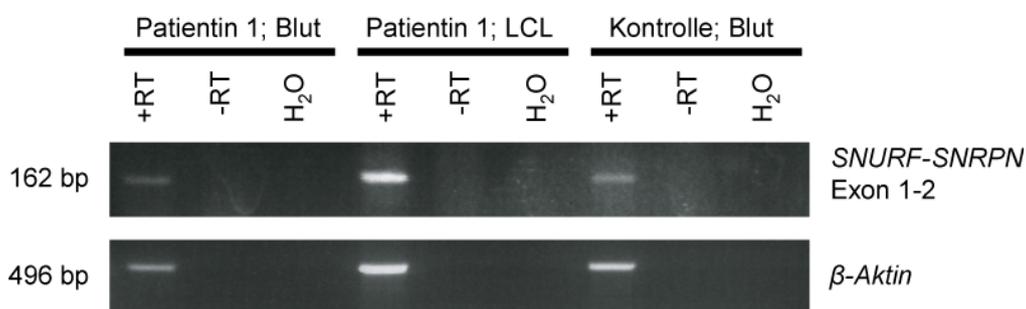
**Abb. 3.1.1.1:** Schematische Darstellung des Ergebnisses der zytogenetischen Analyse der Translokation bei Patientin 1. Von links nach rechts: normales Chromosom 15, der(X) und X Chromosom. Die Translokation in 15q11 und Xq28 ist durch die horizontale Linie angedeutet.

Eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zeigte, dass die Patientin monosom für die chromosomalen Regionen 15pter-15q11.2 und Xq28-qter ist. Demnach hat die Patientin eine unbalancierte Translokation. Außerdem konnte in Utrecht gezeigt werden, dass das derivative X-Chromosom (der(X)) paternalen Ursprungs ist und in allen analysierten Zellen spätreplizierend ist und somit das inaktivierte X-Chromosom darstellt. Um herauszufinden, ob sich die X-Inaktivierung in den autosomalen Bereich des der(X) Chromosoms ausbreitet, was eine Inaktivierung der Gene in 15q11q13 zur Folge haben würde, wurde die Methylierung und die Expression des *SNURF-SNRPN* Locus in unserem Institut in Essen untersucht. Eine methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) zeigte ein normales Methylierungsmuster für diesen Locus (Abb. 3.1.1.2). Die Expressionsanalyse mittels Reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) zeigte eine nicht reduzierte *SNRPN* Expression (Abb. 3.1.1.3). Da eine unbalancierte Translokation eine Deletion zur Folge hat, wurden die Deletionsbruchpunkte für Chromosom 15 mit einer Gendosisanalyse mittels MLPA bei der Routinediagnostik von

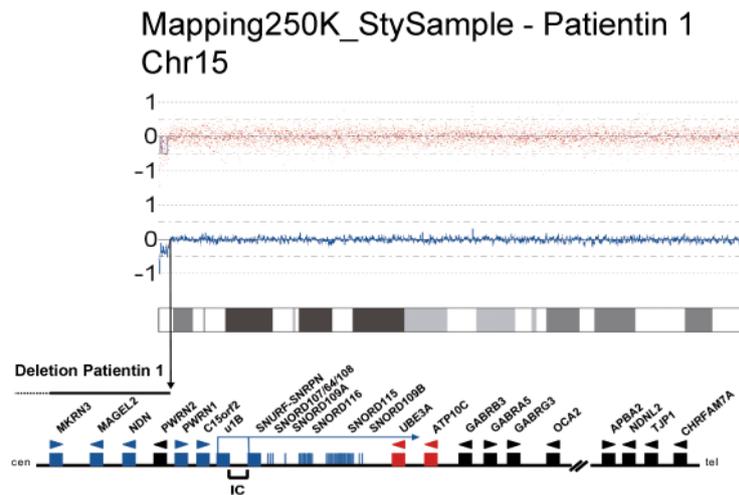
Frau Christina Lich vorkartiert. Diese Analyse zeigte, dass die Deletion in der PWS kritischen Region zwischen *NDN*, das deletiert ist, und *SNRPN*, das nicht deletiert ist, liegt. Um die Bruchpunkte in 15q11 und Xq28 genauer zu kartieren, wurde eine SNP Array Analyse (GeneChip Human Mapping 250K Sty array) bei Herrn PD Dr. Klein-Hitpass (Institut für Zellbiologie in Essen) in Auftrag gegeben. Auf diese Weise konnte der Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 15 zwischen *PWRN2* und *PWRN1*, einer Region für die ein komplexes Duplikationsmuster kürzlich beschrieben wurde (Buiting *et al.*, 2007), kartiert werden (Abb. 3.1.1.4). Der telomerische Bruchpunkt in Xq liegt zwischen rs479901 und *DXS1108* und beinhaltet 4 Gene der Pseudoautosomalen Region 2: *SPRY3*, *VAMP7* (*SYBL1*), *IL9R* und *CXYorf1* (*WASH6P*) (Abb. 3.1.1.5). Da auf dem SNP-Chip der letzte telomerische SNP rs672932 (chrX: 154,569,169 bp, UCSC, hg18) nicht informativ war, wurden die Daten der Mikrosatellitenanalyse hinzugezogen.



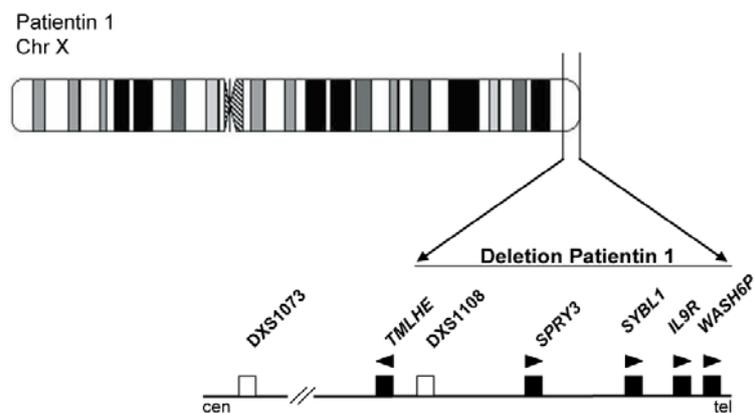
**Abb. 3.1.1.2:** Methylierungsanalyse am *SNRPN* Locus mittels MS-PCR. Patientin 1 zeigt ein normales Methylierungsmuster für *SNRPN*, während Patient 2 und Patientin 3 das für PWS typische Methylierungsmuster aufweisen. PWS, Patient mit Prader-Willi Syndrom; AS, Patient mit Angelman Syndrom; C, Normalperson; NK, Negativkontrolle



**Abb. 3.1.1.3:** Expressionsanalyse an RNA aus Blut und aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von Patientin 1 für Exon 1-2 des *SNURF-SNRPN* Locus. Verglichen mit der Kontrollprobe und dem RT-PCR-Produkt für den  $\beta$ -*Aktin* Locus ist die *SNURF-SNRPN* Expression bei Patientin 1 nicht reduziert.



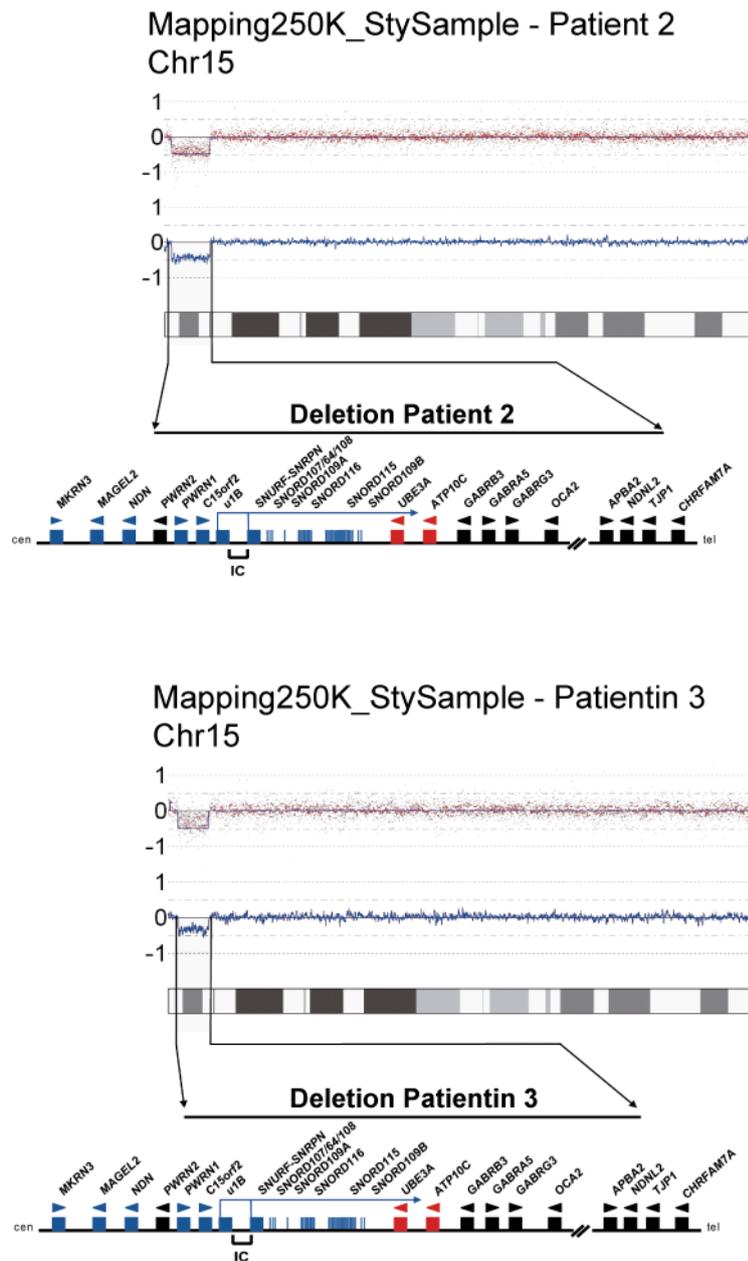
**Abb. 3.1.1.4:** Graphische Darstellung des SNP Array (GeneChip Human Mapping 250 K Sty array, Affimetrix) Ergebnisses für Chromosom 15 für Patientin 1. Die Abbildung wurde mit Hilfe von CNAG (Copy Number Analyzer for GeneChip, Nannya. Y. *et al.*, 2005) angefertigt. Die roten Punkte (Punktwolke) im oberen Teil der Abbildung repräsentieren die Rohdaten für jeden einzelnen SNP, die blaue Kurve in der Punktwolke zeigt die „copy number“-Schätzung, die mit dem Hidden Markow Model berechnet wurde. Die blaue Kurve in der Mitte der Abbildung repräsentiert die Rohdaten für die „copy number“ basierend auf dem Mittelwert von zehn aufeinanderfolgenden SNPs. Die cytogenetische Bande für Chromosom 15 ist darunter abgebildet. Die Deletionsbruchpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Deletionsbereich ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Rote Kästchen, maternal exprimierte Gene; blaue Kästchen, paternal exprimierte Gene; snoRNA Gene sind als blaue Striche dargestellt; schwarze Kästchen, biparental exprimierte Gene; cen, Centromer; tel, Telomer.



**Abb. 3.1.1.5:** Schematische Darstellung des Ergebnisses der SNP Array Analyse für Chromosom X für Patientin 1. Die Deletionsbruchpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Deletionsbereich ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Schwarze Kästchen, biparental exprimierte Gene; weiße Kästchen, STS-Marker

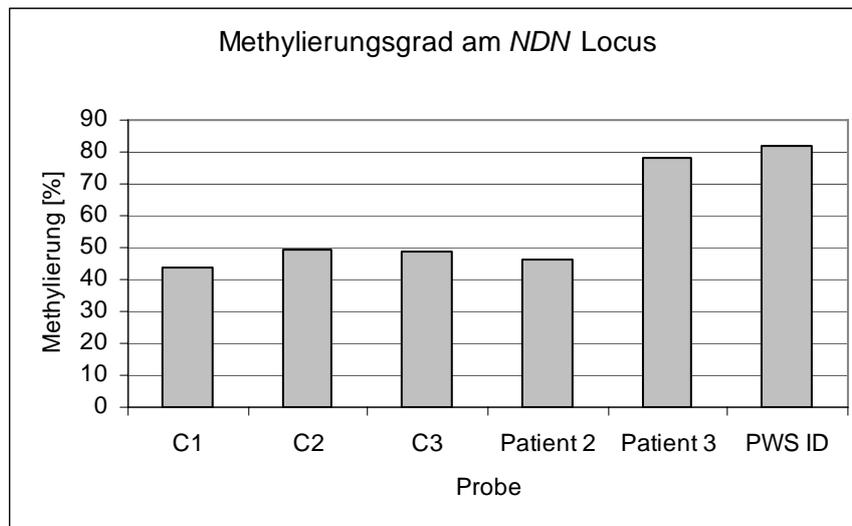
### 3.1.2 Atypische Deletionen bei zwei Patienten mit Prader-Willi Syndrom (PWS)

Bei einer Gendosisanalyse mittels MLPA (während der Routinediagnostik von Frau Christina Lich durchgeführt) wurde eine atypische Deletion bei zwei Patienten mit PWS identifiziert. Diese Patienten wiesen die für PWS typischen phänotypischen Merkmale auf (Tabelle 3.1.1). Bei beiden Patienten sind die Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* nicht deletiert. Das *APBA2* Gen in 15q13 ist bei beiden Patienten von der Deletion mit betroffen, was darauf hinweist, dass der telomerische Bruchpunkt distal von BP3 liegt. Mit der SNP Array Analyse (GeneChip Human Mapping 250K Sty array), die von Herrn PD Dr. Klein-Hitpass (Institut für Zellbiologie in Essen) durchgeführt wurde, konnten die Bruchpunkte genauer kartiert werden. Der zentromerische Bruchpunkt bei Patient 2 liegt zwischen den SNPs rs1524842 und rs2140005 (chr15: 21,505,342 - 21,560,381 bp, UCSC, hg18), etwa 22-77 kb distal zu *NDN*. Bei Patientin 3 liegt der centromerische Bruchpunkt im *PWRNI* Gen zwischen den SNPs rs7496441 und rs12717748 (chr15: 22,278,324 – 22,339,434 bp, UCSC, hg18), etwa 800-850 kb distal zu *NDN*. Der telomerische Bruchpunkt beider Patienten liegt im BP4. Bei Patient 2 liegt der Bruchpunkt distal zu *TJPI* zwischen Bruchpunkt rs6492918 und rs2046362 (chr15: 28,083,156 – 28,723,577 bp, UCSC, hg18), wohingegen der telomerische Bruchpunkt bei Patientin 3 zwischen den Genen *NDNL2* und *TJPI* liegt (rs509639 und rs817957, chr15: 27,338,756 – 27,410,092 bp, UCSC, hg18) (Abb. 3.1.2.1).



**Abb. 3.1.2.1:** Graphische Darstellung des SNP Array (GeneChip Human Mapping 250 K Sty array, Affimetrix) Ergebnisses für Chromosom 15 für Patient 2 und Patientin 3. Im oberen Teil der Abbildungen für Patient 2 und Patientin 3 ist das Ergebnis der Arrays dargestellt. Diese wurden mit Hilfe von CNAG (Copy Number Analyzer for GeneChip, Nannya. Y. *et al.*, 2005) angefertigt. Die roten Punkte (Punktwolke) repräsentieren die Rohdaten für jeden einzelnen SNP, die blaue Kurve in der Punktwolke zeigt die „copy number“-Schätzung, die mit dem Hidden Markov Model berechnet wurde. Die blaue Kurve in der Mitte der jeweiligen Abbildung repräsentiert die Rohdaten für die „copy number“ basierend auf dem Mittelwert von zehn aufeinanderfolgenden SNPs. Die cytogenetische Bande für Chromosom 15 ist darunter abgebildet. Die Deletionsbruchpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Deletionsbereich ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Rote Kästchen, maternal exprimierte Gene; blaue Kästchen, paternal exprimierte Gene; snoRNA Gene sind als blaue Striche dargestellt; schwarze Kästchen, biparental exprimierte Gene; cen, Centromer; tel, Telomer.

Interessanterweise zeigt Patient 2 in der Methylierungsanalyse mittels MLPA ein normales Methylierungsmuster, obwohl die Deletion das IC umfasst. Typischerweise liegen die zum Bruckpunkt centromerisch gelegenen Gene bei Patienten mit einer Imprinting Centre (IC) Deletion methyliert vor. Somit sind diese Gene stumm geschaltet und werden nicht exprimiert. Patientin 3 zeigt genau dieses Methylierungsmuster für *NDN*. Die Ergebnisse der MLPA konnten mittels Sequence-based Quantitative Methylation Analysis (SeQMA) bestätigt werden (Abb. 3.1.2.2).



**Abb. 3.1.2.2:** Methylierungsanalyse des *NDN* Locus mittels SeQMA. Die Patientin 3 weist eine Hypermethylierung am *NDN* Locus auf, das das typische Methylierungsmuster für PWS darstellt. Der Patient 2 hingegen zeigt ein normales Methylierungsmuster für *NDN*.

### 3.2 Das upd(14)mat Syndrom

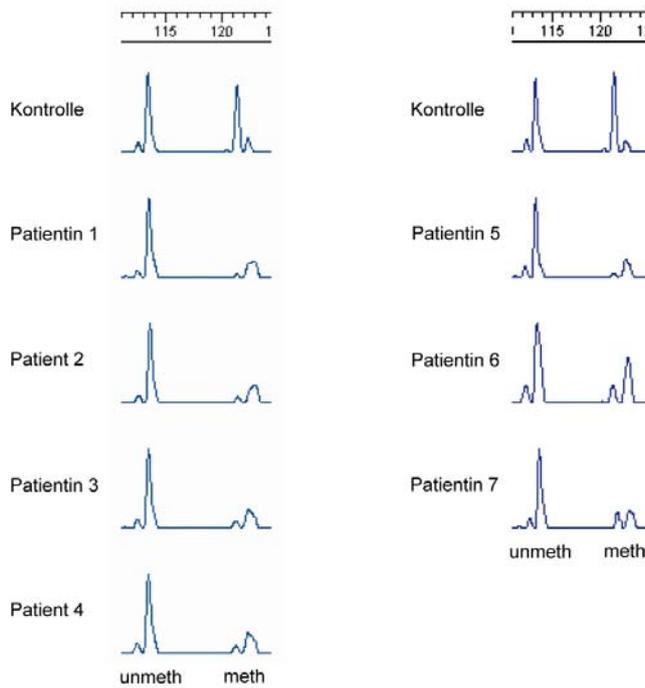
Der Phänotyp einer upd(14)mat hat viele Gemeinsamkeiten mit dem PWS Phänotyp. Überlappende Merkmale sind z.B. ein geringes Geburtsgewicht, Hypotonie, Fütterungsprobleme nach der Geburt, Adipositas und kleine Hände und Füße. Dieser Phänotyp wurde auch bei einem Patienten mit einer Epimutation am *DLK1/MEG3* Locus auf Chromosom 14 beobachtet (Temple *et al.*, 2007). Es scheint also, dass dieser Locus für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Für diesen Teil der Arbeit wurden zunächst vier Patienten untersucht. Bei zwei Patienten (Patientin 1, Patient 2), deren Material aus Lübeck zugesandt worden war, sollte eine upd(14)mat ausgeschlossen werden. Bei zwei weiteren Patienten aus Essen (Patientin 3 und Patient 4) mit unbestätigtem Verdacht auf PWS sollte geklärt werden, ob sie das upd(14)mat Syndrom haben.

Eine upd(14)mat wurde bei Vorarbeiten für alle vier Patienten ausgeschlossen. Mittels Mikrosatellitenanalyse für Chromosom 14, die von Frau Christina Lich durchgeführt wurden, konnte bei allen vier Patienten gezeigt werden, dass sie Allele biparentaler Herkunft haben.

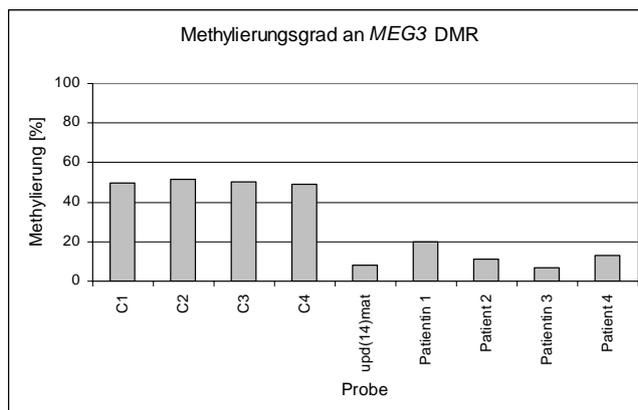
Eine Methylierungsanalyse mittels MS-PCR für die *MEG3* IG-DMR ergab, dass alle vier Patienten eine Hypomethylierung aufweisen – ihnen fehlt das methylierte Allel (Abb. 3.2.1). Dies ist das typische Methylierungsmuster, das bei Patienten mit upd(14)mat zu beobachten ist. Um die Ergebnisse der MS-PCR zu verifizieren, wurde der Methylierungsstatus mittels SeQMA untersucht. Dafür wurden sieben CG-Dinukleotide in der *MEG3* DMR und drei CG-Dinukleotide in der IG-DMR, die zwischen *DLKI* und *MEG3* liegt, untersucht. Der Grad der Methylierung an beiden untersuchten Regionen bei den vier Patienten entspricht dem der Patienten mit einer upd(14)mat und unterscheidet sich deutlich von dem Methylierungsgrad, der in gesunden Individuen beobachtet wird (Abb. 3.2.2).

Nach dieser ersten Analyse erhielt ich drei weitere Patienten (Patientin 5, 6 und 7). Bei Patientin 5 und 6 war der klinische Verdacht auf eine upd(14)mat sehr stark, aber Vorarbeiten mittels Mikrosatellitenanalyse (durchgeführt von Frau Christina Lich) schlossen für beide Patientinnen eine UPD aus. Für die Patientin 5 wurde Material aus den USA zugeschickt und für die Patientin 6 aus Lübeck. Die Patientin 7 wurde mit klinischen Merkmalen wie Adipositas, Hypotonie und vorzeitiger Pubertät im Institut für Humangenetik in Essen vorgestellt. Vorarbeiten mittels Mikrosatellitenanalyse schlossen eine UPD aus.

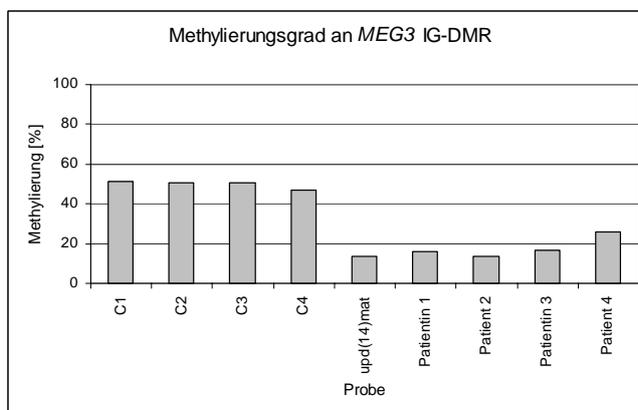
Für alle drei Patientinnen wurde die Methylierung an der *MEG3* DMR und *MEG3* IG-DMR untersucht. Alle drei Patientinnen zeigten eine Hypomethylierung an beiden untersuchten Regionen (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1:** Methylierungsanalyse der *MEG3* IG-DMR mittels MS-PCR. Im Gegensatz zu der Kontrolle weisen die Patientin 1-7 eine Hypomethylierung dieser Region auf (es ist allerdings noch ein Rest des methylierten Allels vorhanden). Das Methylierungsmuster entspricht dem eines Patienten mit upd(14)mat.



**Abb. 3.2.2:** Methylierungsanalyse des *MEG3* Locus mittels SeQMA. Auf dem oberen Diagramm ist der Methylierungsgrad an der *MEG3* DMR dargestellt. Die Patientin 1-4 zeigen eine deutliche Hypomethylierung, die auch bei Patienten mit einer upd(14)mat zu beobachten ist. Auf dem unteren Diagramm ist das Ergebnis der SeQMA an der IG-DMR gezeigt. Auch hier zeigen die Patientin 1-4 dasselbe Methylierungsmuster wie der Patient mit der upd(14)mat, wohingegen die Kontrollen (C1-C4) einen Methylierungsgrad von ca. 50% aufweisen.



Da die beobachtete Methylierungsauffälligkeit auch durch eine Deletion hervorgerufen werden kann, wurden die Patienten mittels Real Time PCR, die von Frau Stephanie Groß durchgeführt wurde, untersucht, um eine Deletion der *MEG3* DMR auszuschließen. Die Patienten 1, 2 und 4-7 zeigten bei dieser Untersuchung eine normale Dosis. Bei Patientin 3 konnte eine Deletion dieser Region nachgewiesen werden. Um die Deletion genauer zu kartieren, wurde eine Array CGH (Human Genome CGH Microarray 244A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) in Kiel in Auftrag gegeben. Dabei wurde festgestellt, dass die Deletion einen Bereich von ~1Mb umfasst. Unter anderem sind die paternal exprimierten Gene *DLK1* und *RTL1*, die IG-DMR und die maternal exprimierten Gene *MEG3*, die snoRNAs und ein Teil der miRNAs deletiert. Die Deletion umfasst 14 weitere nicht geprägte Gene (*LOC341965*, *RPS2P3*, *EVL*, *MIRN342*, *DEGS2*, *YY1*, *SLC25A29*, *MIRN345*, *C14orf68*, *WARS*, *NDUFB3P4*, *WDR25*, *KIAA1446* und *C14orf70*). Dies könnte den schweren Phänotyp und die mentale Retardierung, die sehr untypisch für den upd(14)mat Phänotyp ist, bei Patientin 3 erklären.

### **3.3 Imprinting und assistierte Reproduktion (ART)**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Kinder, die durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugt wurden und ein niedriges Geburtsgewicht hatten (das Geburtsgewicht lag unter der dritten Perzentile), auf Methylierungsauffälligkeiten in elternspezifisch geprägten Genen untersucht werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob Mutationen im *CTCF* Gen häufiger in subfertilen Individuen zu finden sind.

#### **3.3.1 Methylierungsanalysen bei ICSI-Kindern mit geringem Geburtsgewicht**

Obwohl Kinder nach assistierter Reproduktion (ART) häufiger ein niedriges Geburtsgewicht im Vergleich zu natürlich gezeugten Kindern haben, ist der Grund für diese Assoziation unklar. Daher soll hier geklärt werden, ob ICSI-Kinder mit geringem Geburtsgewicht eine Epimutation (fehlerhaftes Methylierungsmuster) in einem elternspezifisch geprägten Gen haben, das an der Kontrolle des fetalen Wachstums beteiligt ist.

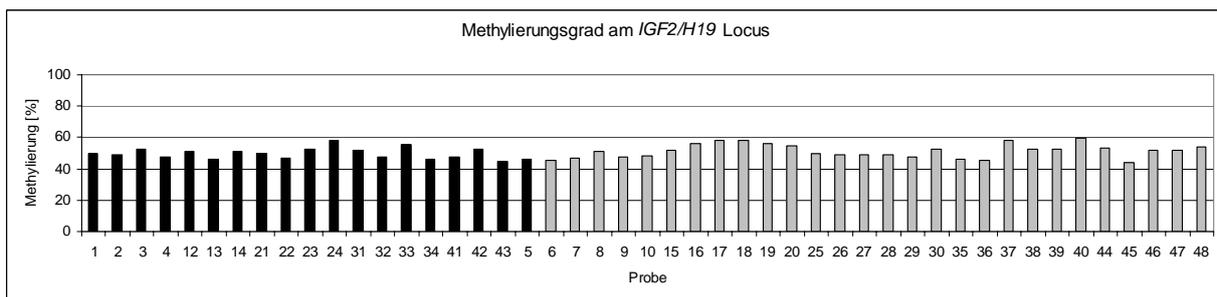
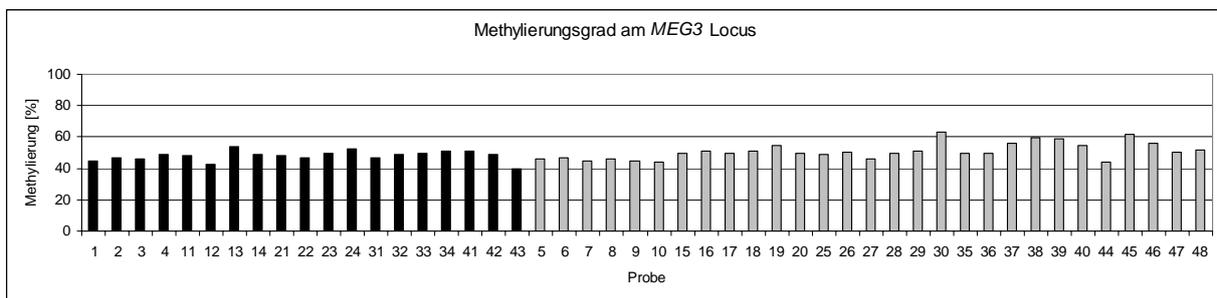
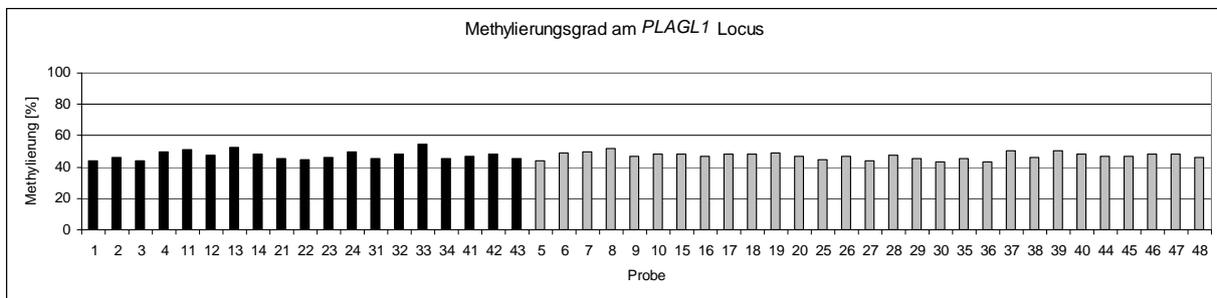
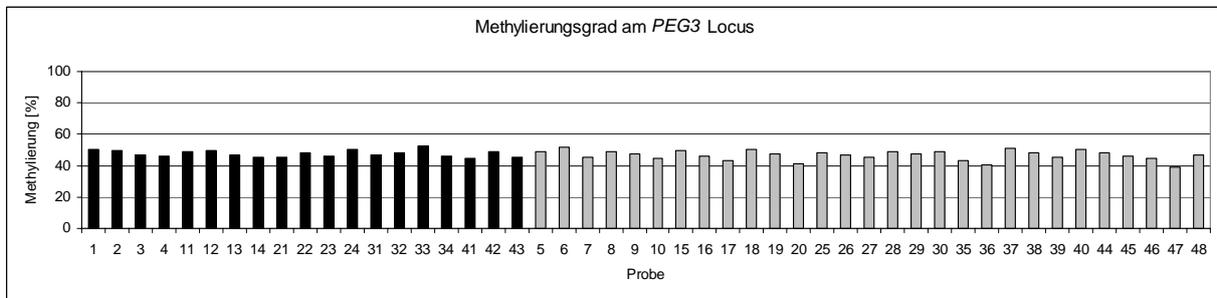
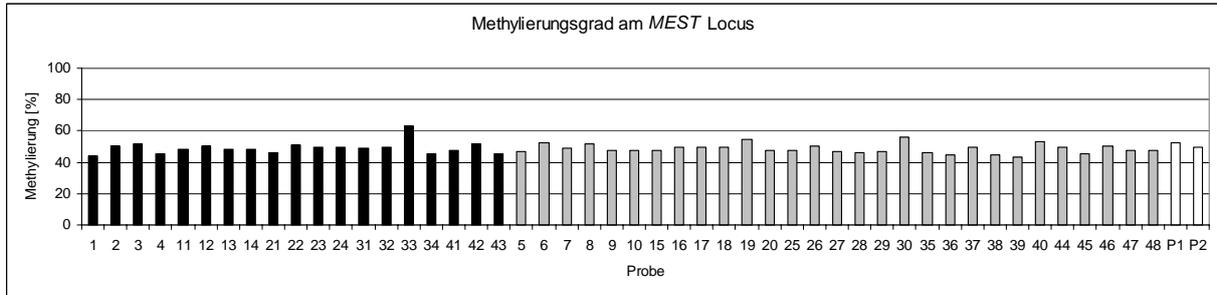
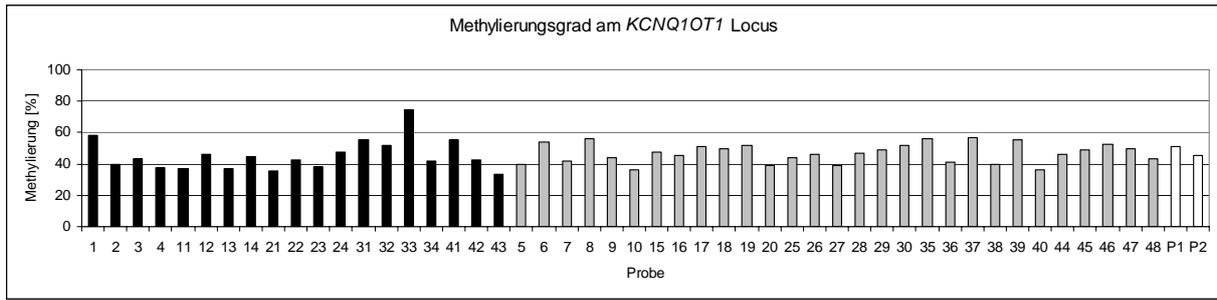
Mit Hilfe der Sequence-based Quantitative Methylation Analysis (SeQMA) wurde der Methylierungsgrad von sechs differentiell methylierten Regionen (DMRs), die mit geprägten Genen assoziiert sind, in 19 Kindern untersucht, die nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) mit einem zu geringen Gewicht geboren wurden (Tabelle

2.1.10.3.1.1). Diese Kinder wurden aus der Deutschen ICSI Follow-up Studie von Prof. Ludwig aus Hamburg rekrutiert. Als Kontrollgruppe dienten 29 gleichaltrige Kinder, die auf natürlichem Wege gezeugt wurden und ein normales Geburtsgewicht hatten. Für die Methylierungsanalysen wurde DNA aus Mundschleimhaut verwendet. Die untersuchten Regionen enthielten vier CpGs (*KCNQ1OT1*), sechs CpGs (*PEG3*), acht CpGs (*IGF2/H19*, *PLAGL1* and *MEG3*), and zehn CpGs (*MEST*). Ein Wert außerhalb von 40-60% Methylierung wurde als auffällige Methylierung gewertet. Ein weiteres Kriterium war, dass ein solcher auffälliger Wert bei der Kontrollgruppe nicht zu beobachten war. Nur ein ICSI-Kind (#33) wies eine abnormale Methylierung an zwei Loci auf (Hypermethylierung an *KCNQ1OT1* und *MEST*; Abb. 3.3.1.1). Bei einigen ICSI-Kindern konnte eine leichte Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* Locus gezeigt werden, allerdings war dies auch in der Kontrollgruppe zu beobachten. Zwei der Kinder aus der Kontrollgruppe wiesen eine leichte Hypermethylierung am *MEG3* Locus auf, dies war bei den ICSI-Kindern aber nicht zu finden.

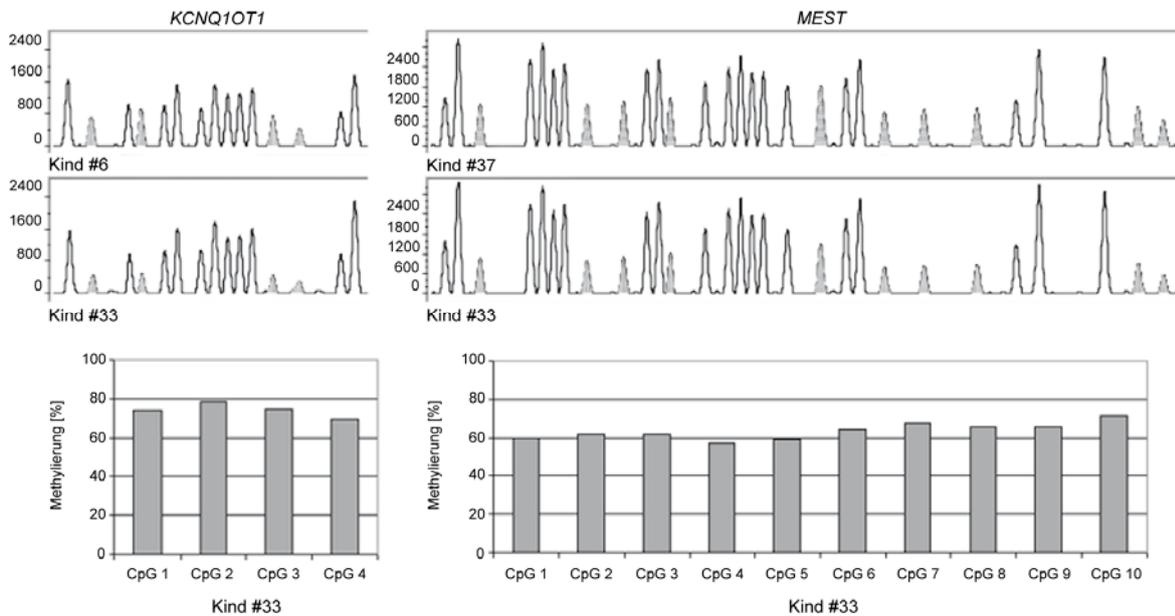
Das ICSI-Kind #33 zeigte 74% Methylierung an *KCNQ1OT1* und 63% Methylierung an *MEST* (Abb. 3.3.1.1). Alle untersuchten CpGs zeigten den gleichen Grad an Methylierung (Abb. 3.3.1.2). Die Ergebnisse wurden durch eine unabhängige zweite SeQMA und einer alternativen, unabhängigen Methode, der so genannten COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis; Abb. 3.3.1.3), bestätigt. Die Eltern des ICSI-Kindes #33 wurden ebenfalls mittels SeQMA untersucht. Bei ihnen fand sich kein Hinweis auf eine abnormale Methylierung (P1 und P2 in Abb. 3.3.1.1).

Um ein falsches PCR-Ergebnis aufgrund eines SNPs an der Primerbindestelle auszuschließen, wurden die mit der SeQMA untersuchten Regionen für *KCNQ1OT1* und *MEST* sequenziert. Ein SNP (C/T; rs11023840) im Reverse-Primer für den *KCNQ1OT1* Locus war bekannt, daher wurde von vornherein ein Wobble (C/T) in den Primer eingebaut. Dies bedeutet, dass es sowohl Reverse-Primer mit einem Cytosin an der Position des SNPs als auch Reverse-Primer mit einem Thymin an der Position des SNPs gab. So wurde gewährleistet, dass auch beide Allele amplifiziert wurden. Die Tatsache, dass das ICSI-Kind #33 und seine Mutter heterozygot für diesen SNP sind (Abb. 3.3.1.4), aber nur das Kind eine auffällige Methylierung an diesem Locus aufweist, lässt ein falsches PCR-Ergebnis ausschließen. Es wurden keine weiteren Varianten für diesen Locus oder den *MEST* Locus gefunden (Abb. 3.3.1.4).

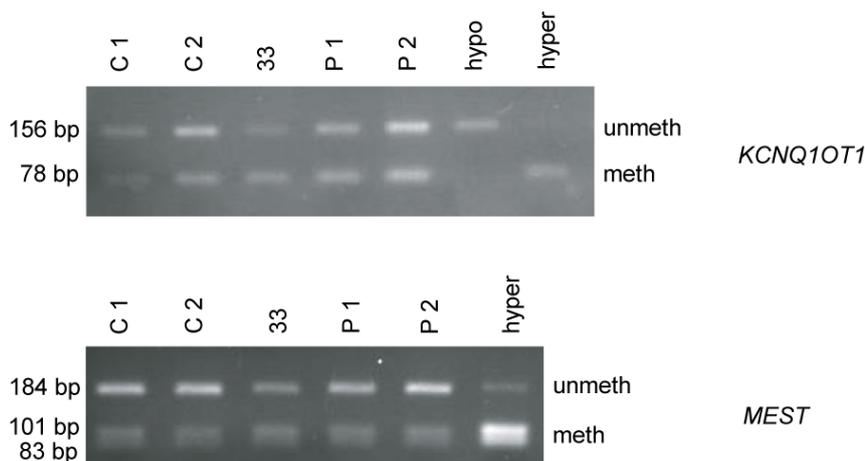
Das ICSI-Kind #33 wurde nach der 39. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht von 2440 g und einer Länge von 49 cm geboren. Nach der Geburt entwickelte sich das Kind normal und zeigte ein Catch-Up Wachstum. Es hat keine phänotypischen Auffälligkeiten.



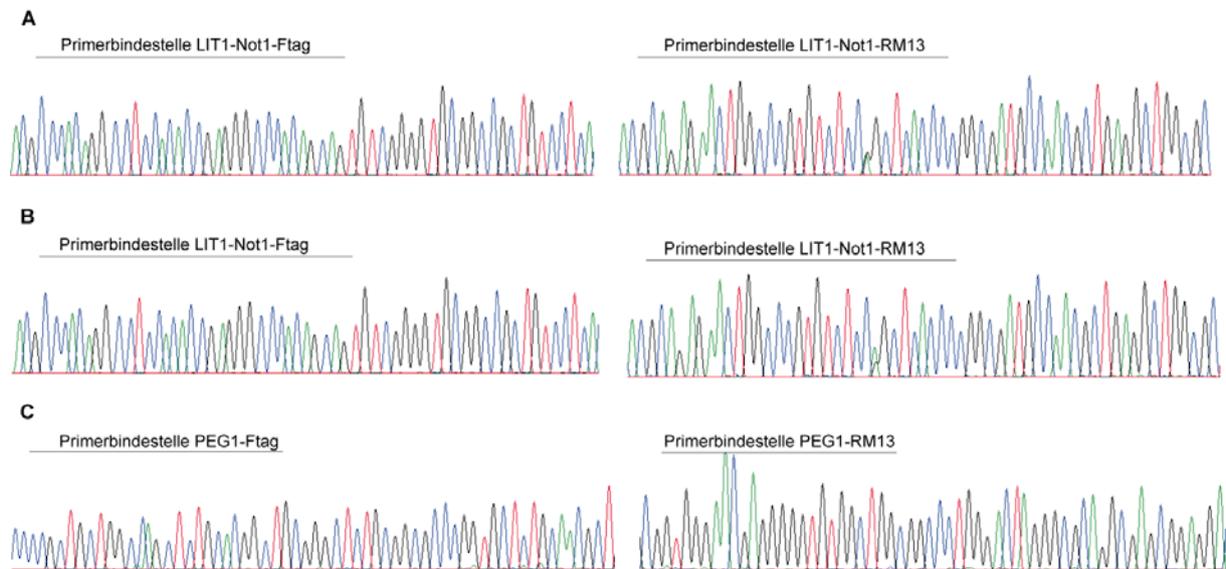
**Abb. 3.3.1.1:** Methylierungsanalyse mittels SeQMA. Die Säulendiagramme zeigen den Grad der Methylierung an den sechs Loci bei den ICSI Kindern (schwarz), den Kontrollkindern (grau) und den Eltern des ICSI Kindes #33 (P1 und P2, weiß, nur *KCNQ1OT1* und *MEST*) an. Das Kind #33 weist eine Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* Locus und eine leichte Hypermethylierung am *MEST* Locus auf. Die Eltern zeigen an diesen beiden Loci ein unauffälliges Methylierungsmuster. Da zu wenig Material von Probe #11 vorhanden war, konnte die SeQMA für diese Probe am *IGF2/H19* Locus nicht durchgeführt werden.



**Abb. 3.3.1.2:** Einzelanalyse der CG-Dinukleotide. Die Sequenzierungsreaktionen wurden einer Fragementlängenanalyse unterzogen und mittels GeneScan analysiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt den T-Kanal für *KCNQ1OT1* (links) und *MEST* (rechts). Thyminreste an den CG-Dinukleotiden, die aus der Bisulfatkonversion hervorgehen, sind grau unterlegt. Im unteren Teil der Abbildung wird die Methylierung der einzelnen CpGs (CG-Dinukleotide) angezeigt. Verglichen mit den Kontrollkindern zeigt das Kind #33 hypermethylierte CG-Dinukleotide am *KCNQ1OT1* Locus und leicht hypermethylierte CG-Dinukleotide am *MEST* Locus.



**Abb. 3.3.1.3:** Methylierungsanalyse mittels COBRA. *Bst*UI schneidet nur die Bisulfat PCR-Produkte, wenn die original DNA methyliert war. Bei Kind #33 ist die relative Intensität der unmethylierten *KCNQ1OT1* und *MEST* Bande - verglichen mit den Kontrollen (C1 und C2) und den Eltern (P1 und P2) - geringer. Hypo, stark hypomethylierte DNA Probe; Hyper, stark hypermethylierte DNA Probe. Für *MEST* war keine hypomethylierte DNA Probe verfügbar.



**Abb. 3.3.1.4:** Sequenzanalyse der *KCNQ1OT1* und *MEST* Primerbindestellen. (A) Sequenzanalyse der *KCNQ1OT1* Primerbindestellen in ICSI-Kind #33. Das Kind ist heterozygot für einen bekannten SNP in der Primerbindestelle des Primers LIT1-Not1-RM13. (B) Sequenzanalyse der *KCNQ1OT1* Primerbindestellen in der Mutter des ICSI-Kindes #33. Die Mutter ist ebenfalls heterozygot für den bekannten SNP in der Primerbindestelle des Primers LIT1-Not1-RM13. (C) Sequenzanalyse der *MEST* Primerbindestellen in ICSI-Kind #33. Für diese Primerbindestelle wurden keine SNPs detektiert. Es wurden keine weiteren Varianten gefunden.

### 3.3.2 Suche nach Mutationen im *CTCF* Gen bei subfertilen Männern

Da epigenetische Veränderungen auch eine bedeutende Ursache statt eine Folge von ART sein könnten, wurde ebenfalls untersucht, ob Mutationen in einem Gen, das für ein Schlüsselprotein epigenetischer Prozesse kodiert, häufiger in subfertilen Männern zu finden sind. Eine Gruppe von subfertilen Männern wurde zuvor im Institut für Humangenetik in Münster auf Methylierungsauffälligkeiten am *IGF2/H19* und *MEST* Locus untersucht. Aus dieser Gruppe wurden zehn Patienten mit der stärksten Hypomethylierung am *IGF2/H19* und zehn Patienten mit der stärksten Hypermethylierung am *MEST* Locus für die Untersuchung des *CTCF* Locus ausgewählt (Tabelle 3.3.2.1). Die Hypomethylierung an *IGF2/H19* kann durch Fehler der DNA Methyltransferasen hervorgehen, für die Hypermethylierung des *MEST* Locus können diese jedoch weniger verantwortlich sein. Daher ist es wahrscheinlicher, dass hier ein allgemeiner Signalweg betroffen ist. Da *CTCF* ein epigenetischer Reprogrammierungsfaktor in der männlichen Keimbahn ist (Loukinov *et al.*, 2002), wurde dieses Gen einer Mutationsanalyse unterzogen. Diese erfolgte an peripherem Blut der oben genannten Patienten. Bei der Sequenzanalyse wurden bekannte SNPs bei den subfertilen Männern detektiert (Tabelle 3.3.2.1). Außer den bekannten SNPs wurde ein bisher unbekannter nicht-synonymer Basenaustausch in Exon 1 bei dem Patienten 17432 (g.924G>C;pGlu11Gln) entdeckt. Da dieser Basenaustausch aber nicht in einer funktionellen

Domäne des Proteins liegt, handelt es sich vermutlich um eine neue, seltene, neutrale Variante (Tabelle 3.3.2.1).

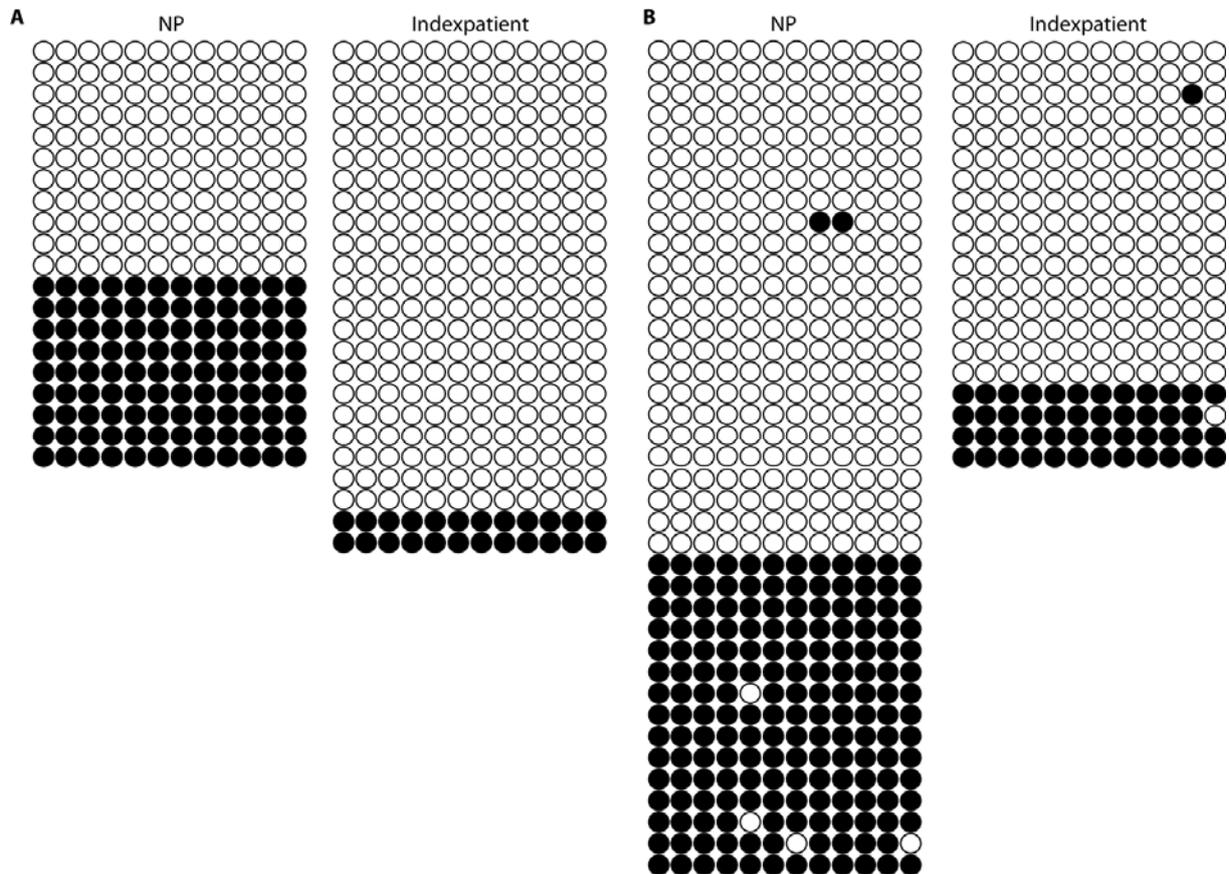
Tabelle 3.3.2.1 Methylierungsstatus am H19 und MEST Locus der subfertilen Patienten und die gefundenen Sequenzvarianten im *CTCF*L Gen.

Pat ID	17432	18856	18376	18427	18490	18626	18448	18873	16451	18361	17934	18473	18118	18206	18765	17886	16394	18570	18466	17356	
<i>H19</i>																					
Methylierung [%]	1,59	7,71	11,59	35,29	51,76	56,65	62,33	64,41	67,06	74,88	99,50	90,60	98,90	86,50	80,60	95,20	99,30	80,10	79,60	93,50	
<i>MEST</i>																					
Methylierung [%]	19,10	5,00	k.A.	12,80	k.A.	62,00	24,60	1,90	34,10	42,60	62,00	86,50	83,80	69,70	54,70	63,90	68,90	75,10	57,70	59,40	
rs6128056	C/C																				
rs11383018	C/C																				
rs2149285	T/T																				
rs8122634	A/A																				
rs41310004	T/T																				
rs11699556	A/A																				
rs62204256	G/G	G/G	A/G	G/G	A/A	G/G	A/G	G/G	G/G	A/G	A/G	G/G	G/G	A/G	G/G	A/G	A/G	G/G	A/A	A/A	
rs6070120	C/C																				
rs7352116	T/T																				
rs28532211	G/G																				
rs28472888	G/G																				
rs6070122	C/C																				
rs61754539	A/A																				
rs61746345	C/C																				
rs61754540	C/C																				
rs6092491	G/G																				
rs41305825	A/A																				
rs6025601	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T	T/T	C/T	T/T	T/T	C/T	T/T	C/C	T/T	C/C	C/T	T/T	T/T	C/T	
rs11476915	G/G																				
rs6025606	A/G	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	G/G	G/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/G	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/G	
rs11907063	C/C																				
rs61754541	G/G																				
rs6070128	G/C	C/C	G/C	G/C	G/G	G/C	C/C	C/C	G/G	G/C	C/G	C/G	C/G	G/G	C/G	G/G	C/C	C/G	G/G	G/G	
unbekannte Sequenzvariante	G/C	G/G																			

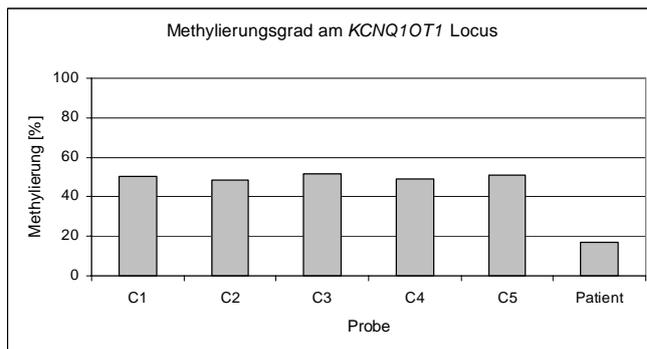
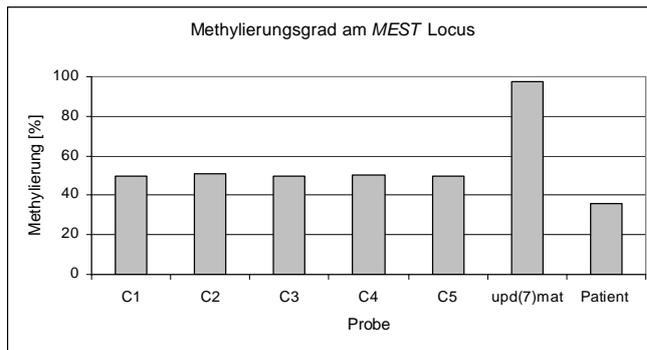
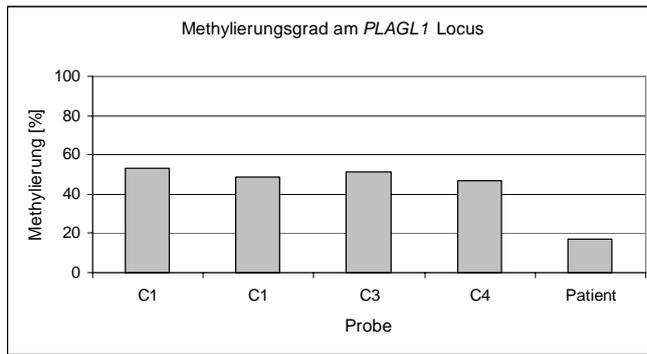
k.A.: keine Angabe.

### 3.4 Abklärung einer familiären generalisierten Imprintingstörung

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden molekulargenetische Untersuchungen bei einem Patienten mit Verdacht auf Silver-Russell-Syndrom durchgeführt. Material des Patienten wurde vom Institut für Humangenetik in Kiel geschickt. Der Patient wies klinische Merkmale wie faziale Dysmorphien, intrauterine Wachstumsverzögerung und einen unproportionierten Kleinwuchs auf. Erste Methylierungsanalysen der chromosomalen Region 11p15 mittels methylierungsspezifischer MLPA (MS-MLPA; wurde von Frau Sabine Kaya durchgeführt) zeigten, dass der Patient ein Methylierungsmuster aufwies, das kompatibel mit einem Silver-Russell-, aber auch kompatibel mit einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist. Der Patient zeigte eine Hypomethylierung am ICR1 (*KCNQ1OT1*; BWS) und eine Hypomethylierung am ICR2 (*IGF2/H19*; SRS). Dies gab den ersten Hinweis darauf, dass bei diesem Patienten vielleicht eine generalisierte Methylierungs- bzw. Imprintingstörung vorliegt. Daher wurde zunächst der Methylierungssatus von *SNRPN* und *NDN* mittels MS-MLPA untersucht (durchgeführt von Frau Christina Lich). Auch hier zeigte der Patient eine Hypomethylierung. Um die Frage zu klären, ob die Störung in einem somatischen Mosaik vorliegt oder die Methylierungsveränderungen nur an einzelnen CG-Dinukleotiden vorliegen, habe ich eine Bisulfit-Klonierung für den *SNRPN* und *KCNQ1OT1* Locus durchgeführt (Abb. 3.4.1). Auf diese Weise wurden für beide Loci Klone von unmethylierten und methylierten Sequenzen erhalten, jedoch keine Mischklone mit methylierten und unmethylierten CG-Dinukleotiden. Dies deutet darauf hin, dass bei dem Patienten die Imprintingstörung im somatischen Mosaik vorliegt. Danach wurden die Loci *PLAGL1*, *MEST* und erneut *KCNQ1OT* mittels SeQMA analysiert (Abb. 3.4.2). Auch an diesen Loci wies der Patient eine Hypomethylierung auf. Dies bestätigte den Verdacht, dass bei dem Patienten ein generalisierter Imprintingdefekt vorliegt. Daher wurde die Methylierung an acht weiteren geprägten Loci mittels MS-PCR untersucht (Tabelle 3.4.1).



**Abb. 3.4.1:** Methylierungsanalyse der Loci *KCNQ1OT1* und *SNRPN* mittels Klonierung von Bisulfit-PCR-Produkten. (A) Für den *KCNQ1OT1* Locus wurden für die Kontrolle (NP, Blut) sowohl Klone von unmethylierten Sequenzen als auch Klone von methylierten Sequenzen erhalten (9 unmeth/11 meth). Für den Indexpatienten (Blut) wurden 22 Klone von unmethylierten Sequenzen und zwei Klone von methylierten Sequenzen erhalten. (B) Für den *SNRPN* Locus wurden für die Kontrolle (NP, Blut) Klone von 24 unmethylierten und 15 methylierten Sequenzen erhalten. Der Indexpatient (Blut) wies 16 Klone von unmethylierten Sequenzen und 4 Klone von methylierten Sequenzen auf. Schwarzer Kreis, methyliert; weißer Kreis unmethyliert.



**Abb. 3.4.2:** Methylierungsanalyse mittels SeQMA. Im Vergleich zu den Kontrollen (Normalpersonen C1-C4 bzw. C5) zeigt der Patient an allen untersuchten Loci (*PLAGL1*, *MEST* und *KCNQ1OT1*) eine Hypomethylierung. Für den *MEST* Locus wurde eine weitere Kontrolle eingesetzt: upd(7)mat. Dieser Patient hat eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 7 und zeigt demnach eine Hypermethylierung am *MEST* Locus.

Tabelle 3.4.1 Ergebnisse der Methylierungsanalyse mittels MS-PCR, SeQMA und MLPA.

Locus	Meth. Allel	Chrom. Region	Phänotyp bei Hypom.	Methode	Indexpatient			Fet 1 Muskel	Fet 2 CVS	Mutter Blut	Vater Blut
					Blut	LCL	Fibrobl.				
SNRPN	maternal	15q12	AS	MLPA	20-25%	15%	10-20%	30%	normal	normal	normal
NDN	maternal	15q12	AS	MLPA	20%	15%	20%	unmeth	normal	normal	normal
KCNQ1OT1	maternal	11p15	BWS	MLPA/SeQMA*	10-15%	10-15%	hypo	15-20%	hypo	normal	normal
PLAGL1	maternal	6q24	TNDM	MS-PCR/SeQMA*	unmeth	unmeth	hypo	n.d.	normal/hypo	normal	normal
MEST	maternal	7q32		MS-PCR/SeQMA*	hypo	hypo	hypo	hypo	normal/hypo	normal	normal
PEG3	maternal	19q13		MS-PCR*	hypo	hypo	unmeth	n.d.	hypo	normal	normal
ARHI	maternal	1p31.3		MS-PCR*	unmeth	unmeth	unmeth	unmeth	hypo	normal	normal
GNAS	maternal	20q13.2	PHPIB	MS-PCR*	hypo	hypo	hypo	hypo	n.e.	normal	normal
NESPAS	maternal	20q13.2	PHPIB	MS-PCR*	n.d.	unmeth	hypo	n.d.	hypo	normal	normal
RB1	maternal	13q14.2		MS-PCR*	n.d.	hypo	n.d.	n.d.	n.e.	normal	normal
GRB10	paternal	7p12	SRS	MS-PCR*	unmeth	unmeth	unmeth	n.d.	normal	normal	normal
NESP	paternal	20q13.2	PHPIB	MS-PCR*	n.d.	hyper	hyper	hyper	hyper	normal	normal
H19	paternal	11p15	SRS	MLPA	10%	10-15%	hypo	20-25%	normal	normal	normal
GTL2	paternal	14q32	upd(14)mat Syndrom	MS-PCR	hypo	hypo	hypo	n.d.	n.d.	normal	normal
IG-DMR DLK1/GTL2	paternal	14q32	upd(14)mat Syndrom	MS-PCR*/ SeQMA*	hypo	hypo	hypo	hypo	normal	normal	normal

Für die Methylierungsanalysen wurde noch DNA aus folgenden Geweben eingesetzt: Blut von den Eltern, Muskelgewebe des ersten Feten (Fetozid; Fet 1), CVS-Material des zweiten Feten (Abort; Fet 2). AS, Angelman Syndrom; BWS, Beckwith-Wiedemann Syndrom, TNDM, Transienter neonataler Diabetes mellitus; PHPIB, Pseudohypoparathyroidismus Typ IB; SRS, Silver-Russell Syndrom; n.d., nicht durchgeführt; n.e., Imprint ist nicht etabliert; \*Methoden, die von mir durchgeführt wurden.

Die Analysen wurden an verschiedenen Geweben des Indexpatienten durchgeführt (DNA aus Blut, LCL, Fibroblasten, Mundschleimhaut). In allen Geweben des Patienten konnte eine Hypomethylierung festgestellt werden, allerdings war der Grad der Methylierung in den verschiedenen Geweben und auch an den verschiedenen Loci unterschiedlich. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Imprintingstörung im somatischen Mosaik vorliegt. Für die Analysen stand auch Material von den Eltern (DNA aus Blut) des Indexpatienten und fetales Material aus zwei weiteren Schwangerschaften, die mit einem Fetozyd (Muskelgewebe) und einem Abort (CVS Material) endeten, zur Verfügung. Die erste Schwangerschaft endete mit einem Fetozyd, da im Ultraschall massive Auffälligkeiten wie z.B. ein enger Thorax gefunden wurden. Dies ließ darauf schließen, dass eine normale Atmung nicht gewährleistet war. Bei der anderen Schwangerschaft, die mit einem Abort endete, wurden während der Pränataldiagnostik Methylierungsauffälligkeiten gefunden. Während die Eltern an den untersuchten Loci ein normales Methylierungsmuster zeigten, konnte in dem untersuchten Gewebe der beiden Feten ebenfalls eine Hypomethylierung für viele der Loci detektiert werden (Tabelle 3.4.1). Auch hier war der Grad der Methylierung an den verschiedenen Loci unterschiedlich. Demnach liegt die Imprintingstörung auch bei den zwei Feten im somatischen Mosaik vor.

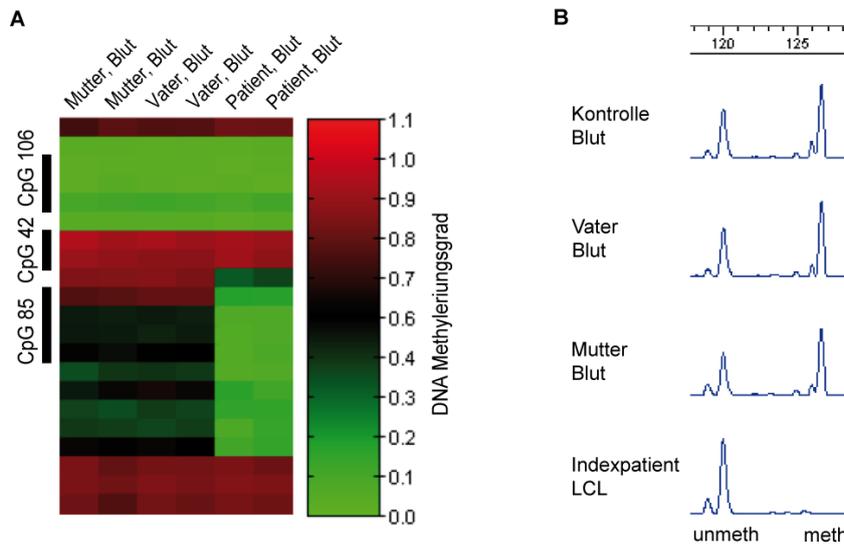
Nur an dem *NESP* Locus wurde für den Indexpatienten und die beiden Feten eine Hypermethylierung detektiert.

### **3.5 Methylierungs- und Expressionsanalysen am *RBI* Locus**

Es wurde eine genomweite Methylierungsanalyse per Array-Analyse (Infinium® HumanMethylation27 BeadChip, Illumina) für den oben beschriebenen Patienten veranlasst, die im Institut für Humangenetik in Kiel durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnten zum einen die Ergebnisse der vorangegangenen Methylierungsanalysen verifiziert werden und zum anderen konnten weitere hypomethylierte Loci identifiziert werden. Da der Patient eine generalisierte Imprintingstörung hat, könnten diese Loci neue elternspezifisch-geprägte Gene darstellen.

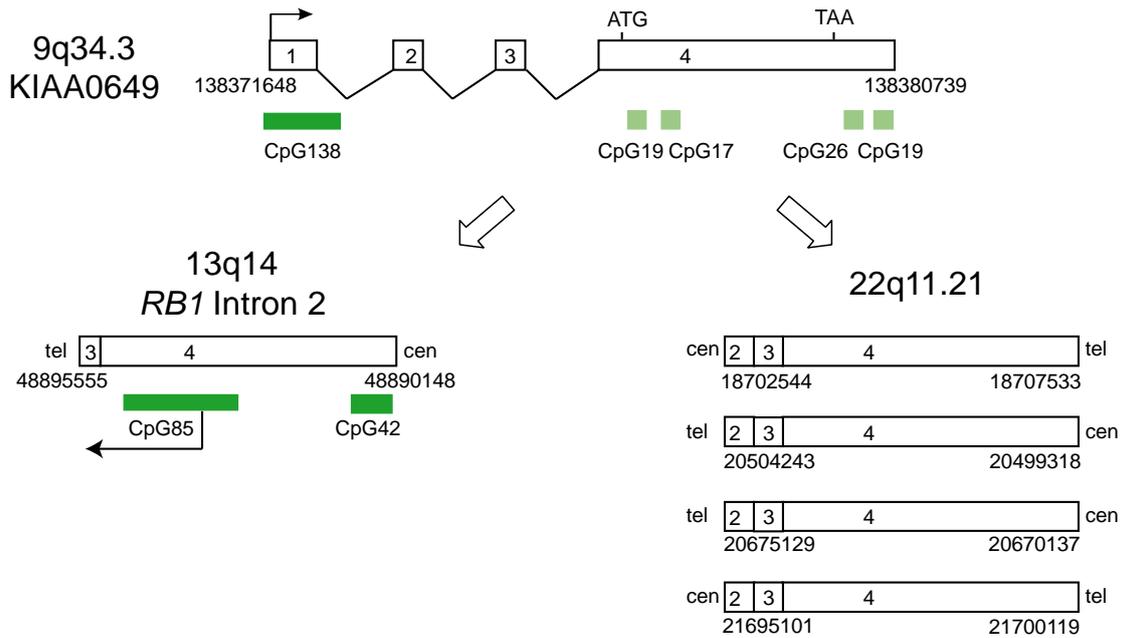
Einer dieser Loci ist das *RBI* Gen. Auf dem Array fiel auf, dass es CG-Dinukleotide in der *RBI* Region gibt, die bei dem Indexpatienten hypomethyliert erscheinen und bei den Eltern und Kontrollen eine Methylierung von ca. 50% zeigen (Abb. 3.5.1 A). Diese CG-Dinukleotide repräsentieren ein CpG Island im Intron 2 des *RBI* Gens (CpG 85, UCSC Browser, chr13:48,892,636-48,893,857, hg 19). Das Ergebnis der Array-Analyse für *RBI* für

den Indexpatienten konnte mittels MS-PCR verifiziert werden (Abb. 3.5.1 B). Der Patient weist nur das unmethylierte Allel für *RBI* auf.



**Abb. 3.5.1:** (A) Die Heatmap der Methylierungsanalyse per Array zeigt deutlich, dass einige CG-Dinukleotide am *RBI* Locus bei dem Indexpatienten hypomethyliert erscheinen und bei seinen Eltern eine Methylierung von ca. 50% zeigen. Diese CG-Dinukleotide repräsentieren ein CpG island im Intron 2 des *RBI* Gens (CpG 85). Die CG-Dinukleotide im CpG 42 sind sowohl beim Patienten als auch bei seinen Eltern voll methyliert und das CpG island in der Promotorregion des *RBI* Gens (CpG 106) ist bei allen unmethyliert. TargetID der CG-Dinukleotide, die das CpG 85 repräsentieren: cg19427472, cg13431205, cg03085377, cg18481241; CpG 42: cg19447496, cg19296958; CpG 106: cg24937706, cg10552385, cg17055959. (B) Methylierungsanalyse des *RBI* Locus mittels MS-PCR. Der Indexpatient weist, im Gegensatz zu seinen Eltern und der Kontrolle, nur ein unmethyliertes Allel auf.

Eine detaillierte Datenbanksuche (UCSC; hg19) mit Abgleich der Sequenz für CpG 85 zeigte, dass das CpG 85 Teil einer 4,5 kb großen Region ist, die eine hohe Sequenzidentität (87%) zu Exon 4 und 18 bp von Exon 3 des *KIAA0649* Gens (NM\_014811) hat. Das *KIAA0649* Gen besteht aus 4 Exons und kodiert für ein 1209 Aminosäuren Protein mit unbekannter Funktion (Yang *et al.*, 2005). Weiterhin wurden mittels Datenbankanalysen vier weitere intronlose Kopien dieses Gens auf dem Chromosom 22 (22q11.21) identifiziert (Abb. 3.5.2). Die Sequenzidentität zu Exon 2 bis Exon 4 des *KIAA0649* Gens beträgt jeweils 89%. Der offene Leserahmen, der sich in Exon 4 des *KIAA0649* Gens befindet, ist in allen Kopien verloren gegangen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Intergration von zwei prozessierten Pseudogenen durch unabhängige Retrotransposition stattgefunden hat. Die eine erfolgte auf Chromosom 13, die andere auf Chromosom 22. Die weiteren Kopien auf Chromosom 22 sind vermutlich die Folge von Genduplikationen. Die vier kleinen (<300 bp) CpG islands in Exon 4 des *KIAA0649* Gens sind in allen vier Kopien auf Chromosom 22 verloren gegangen bzw. sie sind durch Verlust einzelner CG-Dinukleotide kleiner geworden und werden somit nicht mehr als CpG island bezeichnet. Auf Chromosom 13 dagegen sind zwei große CpG islands vorhanden (CpG 85 und CpG 42; Abb. 3.5.2).

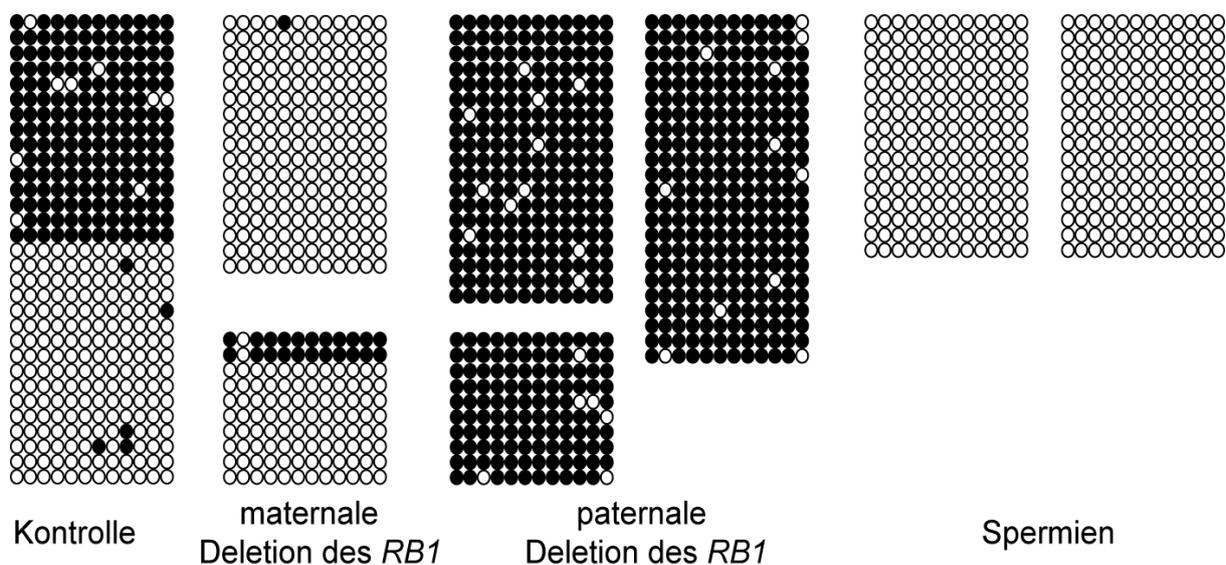


**Abb. 3.5.2:** Struktur von *KIAA0649* und der fünf prozessierten Pseudogene (Positionsangaben laut hg19, UCSC). Die Kopie des Pseudogens auf Chromosom 13 beinhaltet 18 bp des Exons 3 und das Exon 4 und weist eine Sequenzidentität von 87% zu der cDNA Sequenz des *KIAA0649*. Zwei der vier CpG islands (hellgrün; <300 bp) in Exon 4 des *KIAA0649* Gens (CpG 19 und CpG 17) finden sich im CpG 85 auf Chromosom 13 wieder. Die zwei anderen CpG islands (CpG 26 und CpG 19) finden sich im CpG 42 wieder. Alle vier Kopien des Pseudogens auf Chromosom 22 beinhalten Exon 2, 3 und 4 des *KIAA0649* Gens und haben eine Sequenzidentität von 89% mit der cDNA Sequenz. Die CpG islands in Exon 4 von *KIAA0649* sind in den Kopien auf Chromosom 22 nicht vorhanden. Hellgrün, CpG island <300 bp; dunkelgrün, CpG island >300 bp.

Um das Ergebnis der Methylierungsanalyse per Array-Analyse zu verifizieren und definitiv zu klären, ob das CpG 85 elternspezifisch methyliert ist, wurde die Methylierung an 12 CG-Dinukleotiden mittels Bisulfit-Klonierung und Sequenzierung untersucht. Da keine spezifischen Primer für das CpG 85 generiert werden konnten, gab es auch Klone der Chromosom 9 und Chromosom 22 Regionen. Auch wenn die Duplikate auf Chromosom 9 und Chromosom 22 eine hohe Sequenzidentität aufweisen, gibt es dennoch einige wenige Sequenzunterschiede, die für die Unterscheidung bzw. Zuordnung der Klone zu CpG 85 genutzt werden konnten. Zunächst wurde der Methylierungsstatus im Blut einer Normalperson, die als Kontrolle diente, untersucht. Insgesamt wurden hier 31 Klone analysiert. Von diesen Klone wurden 15 Klone von nahezu vollständig methylierten Sequenzen und 16 Klone von unmethylierten Sequenzen erhalten (Abb. 3.5.3). Dieses Ergebnis gab einen ersten Hinweis darauf, dass es vermutlich ein methyliertes und ein unmethyliertes Allel gibt. Um herauszufinden, ob dies der Fall ist und um zu bestimmen welches Allel maternaler und welches Allel paternaler Herkunft ist, wurde auch Blut DNA von Patienten mit Retinoblastom und einer Deletion des maternalen oder paternalen *RB1* Allels untersucht (Abb. 3.5.3). Die Klone, die von den Patienten mit einer maternalen

Deletion des *RB1* Gens erhalten wurden, waren fast alle ausschließlich von unmethylierten Sequenzen. Wohingegen die Klone der Patienten mit einer paternalen Deletion des *RB1* Gens alle von vollständig methylierten Sequenzen erhalten wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass das CpG 85 elternspezifisch methyliert ist. Das maternale Allel ist methyliert und das paternale Allel unmethyliert. Weiter wurde die Methylierung in Spermien untersucht – hier wurden nur Klone von unmethylierten Sequenzen erhalten (Abb. 3.5.3).

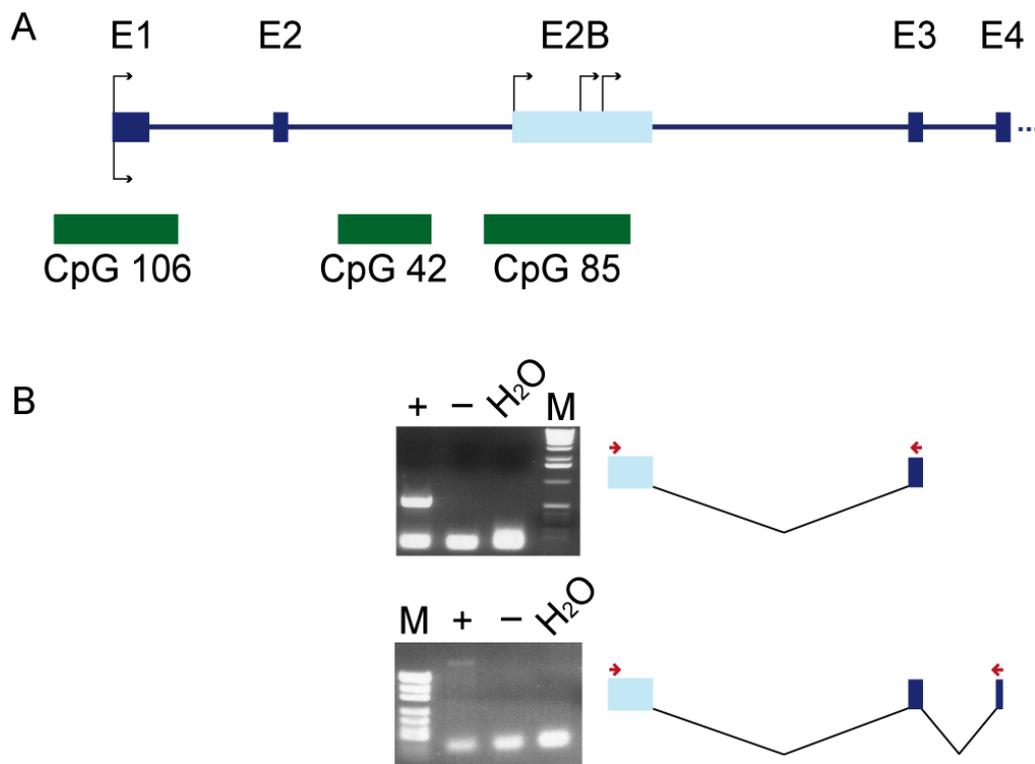
Die Klone, die für Chromosom 9 und 22 erhalten worden waren, stammen alle von methylierten Sequenzen.



**Abb. 3.5.3:** Methylierungsanalyse des CpG 85 mittels Bisulfit-Klonierung und MS-PCR. Methylierungsanalyse des CpG 85 mittels Bisulfit-Klonierung. Es wurden 12 CG-Dinukleotide im CpG 85 untersucht. Die Klone einer Kontrollprobe (Normalperson, Blut DNA) wurden von methylierten oder unmethylierten Sequenzen erhalten. Fast alle Klone der zwei Patienten mit Retinoblastom und einer maternalen Deletion des *RB1* Gens stammen von unmethylierten Sequenzen. Die erhaltenen Klone der drei Patienten mit Retinoblastom und einer paternalen Deletion des *RB1* Gens stammen von methylierten Sequenzen. Für die zwei Spermien wurden nur Klone von unmethylierten Sequenzen erhalten. Jeder Block repräsentiert ein Individuum. Schwarzer Kreis, methyliert; weißer Kreis unmethyliert.

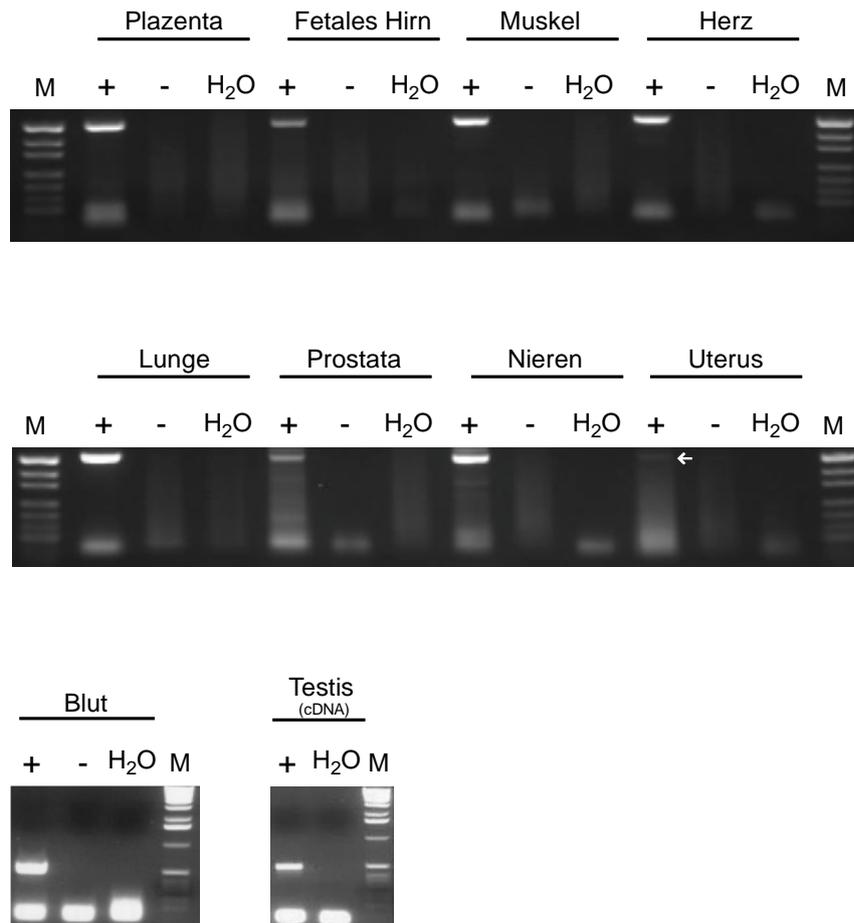
Der nächste Schritt bestand darin zu klären, ob das CpG 85 als Promotor für ein unbekanntes Antisense- oder alternatives Sense-Transkript dient. Dazu wurde versucht einen gespleißten Antisense EST Klon stromaufwärts von *RB1* mit einem antisense EST Klon, der mit dem CpG 85 überlappt, zu verbinden. Da diese Versuche und auch die 5'- und 3'-RACE keine positiven Ergebnisse erbrachten, wurde eine Exon-connection RT-PCR zwischen dem CpG 85 und Exon 3 des *RB1* Gens durchgeführt. Das erhaltene Produkt beinhaltete 360 bp des CpG 85 und das Exon 3 mit Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen (Abb. 3.5.4). Dadurch gibt es auch ein neues Intron (Intron zwischen dem neuem Exon 2B und Exon 3), das 22683 bp groß ist. Dieses Ergebnis wurde verifiziert, indem eine Exon-connection RT-PCR

zwischen dem CpG 85 und Exon 4 des *RBI* Gens durchgeführt wurde. Das erhaltene Produkt beinhaltete 360 bp des CpG 85, Exon 3 und einen Teil des Exon 4 und hatte ebenfalls Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen (Abb. 3.5.4). Dies zeigt, dass das CpG 85 ein neues Startexon (Exon 2B) für ein alternatives *RBI* Transkript beinhaltet. Um den genauen Transkriptionsstartpunkt zu ermitteln, wurde eine 5'RACE durchgeführt. Auf diese Weise konnten 3 putative Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden (Abb. 3.5.4). Je nachdem welcher Startpunkt genutzt wird hat das neue Exon 2B eine Größe von 478, 632 oder 1160 bp.



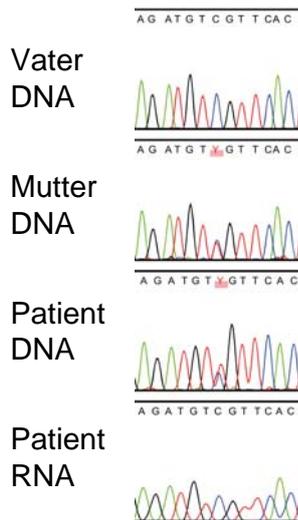
**Abb. 3.5.4:** Identifizierung eines neuen geprägten Locus. (A) Schematische Darstellung der 5'-Region des *RBI* Locus (nicht maßstabsgetreu) und die Lokalisation der CpG islands (grüne Kästchen). Die regulären Exons sind blau dargestellt, während das neue Exon 2B hellblau dargestellt ist. Die schwarzen Pfeile stellen die Transkriptionsstartpunkte dar. (B) Exon-connection RT-PCR. M, Größenstandard; +, mit RT; -, ohne RT; H<sub>2</sub>O, ohne RNA; rote Pfeile, Lokalisation der Primer für die Exon-connection RT-PCR.

Als Nächstes wurde ein Expressionsprofil für das alternative *RBI* Transkript (2B-Transkript) erstellt (Abb. 3.5.5). Dazu wurden eine RT-PCR an RNA aus verschiedenen Geweben und eine Sequenzierung der RT-PCR-Produkte durchgeführt. Eine Expression für das alternative *RBI* Transkript konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden.



**Abb. 3.5.5:** Expressionsprofil für das alternative *RBI* Transkript. M, Größenstandard; +, mit RT; -, ohne RT; H<sub>2</sub>O, ohne RNA.

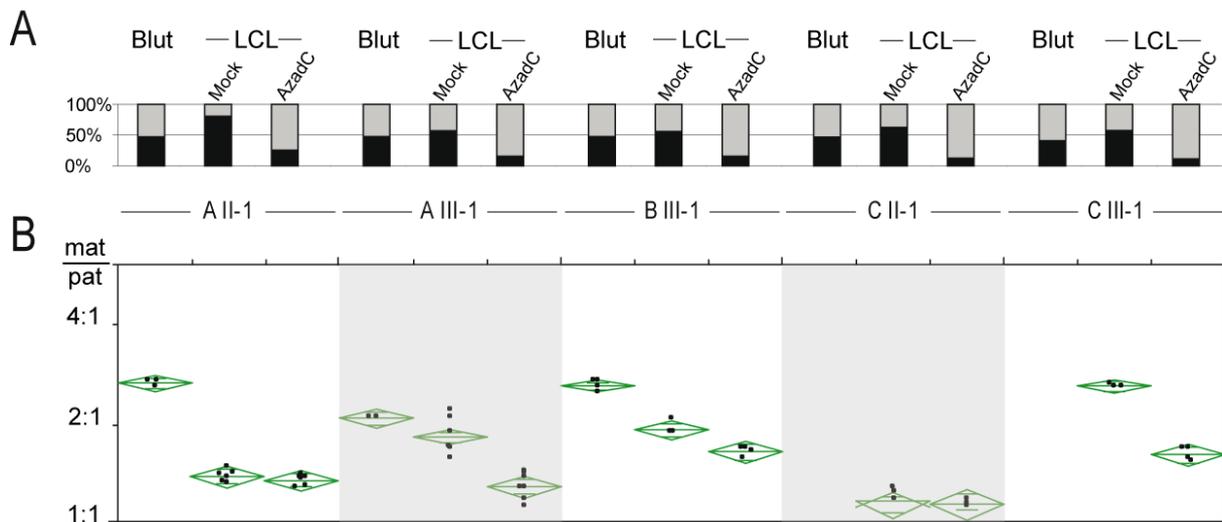
Um zu klären, ob die elternspezifische Methylierung des CpG 85 auch mit einer elternspezifischen Expression einhergeht, wurde eine allelspezifische Expressionsanalyse durchgeführt. Da das *RBI* Gen jedoch hoch konserviert ist und es daher keine exprimierten SNPs gibt, wurde eine seltene exprimierte Variante genutzt, die während des Mutationsscreens bei einem Patienten mit Retinoblastom entdeckt wurden. Für die oben genannte Analyse wurde DNA und RNA aus Blut eines Patienten, der heterozygot für eine seltene Variante in Exon 3 ist, genutzt. Sequenzanalysen des RT-PCR Produkts, das spezifisch für das 2B-Transkript ist, zeigen nur das C Allel, welches paternalen Ursprungs ist. Demnach wird das alternative *RBI* Transkript paternal exprimiert (Abb. 3.5.6).



**Abb. 3.5.6:** Allelspezifische Expressionsanalyse des alternativen *RBI* Transkripts bei einem Patienten für eine maternal vererbte seltene Variante (heterozygot) in Exon 3. Die Sequenzanalyse des RT-PCR Produkts zeigt nur das paternal vererbte C Allel (RT-PCR-Primer in Exon 2B und Exon 3 des *RBI* Gens).

Die paternale Expression des alternativen *RBI* Transkripts wirft die Frage auf, ob dies einen Effekt auf die relative Menge an totaler paternaler und maternaler *RBI* Transkripte hat. Mittels Primerextensionsanalyse an DNA und RNA von 14 Individuen, die heterozygot für eine exprimierte seltene Variante im *RBI* Gen sind, konnte Tea Berulava im Institut für Humangenetik in Essen zeigen, dass an diesem Locus eine allelische Expressionsimbalance herrscht. Das Transkriptverhältnis ist in allen untersuchten Individuen zugunsten des maternalen Transkripts verschoben ( $2.7 \pm 16 \%$ , ratio  $\pm$  SD).

Um zu klären was bei einer Demethylierung des CpG 85 geschieht, wurden lymphoblastoide Zellen (LCL) mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (AzadC) behandelt, das die DNA Methyltransferase DNMT1 inhibiert. Die darauf folgende Methylierungsanalyse mittels MS-PCR zeigte, dass alle AzadC-behandelten LCLs eine partielle Demethylierung des CpG 85 zeigen, während die Mock-behandelten LCLs eine Methylierung  $>50\%$  an CpG 85 aufweisen (Abb. 3.5.7 A). Die Methylierungsanalyse des CpG 106 an der Promotorregion des *RBI* Gens mittels Bisulfit-Sequenzierung (direkte Sequenzierung der PCR-Produkte – für die PCR wurde Bisulfit-behandelte DNA eingesetzt) zeigte, dass dieses CpG island unmethyliert blieb. Die partielle Demethylierung an CpG 85 geht einher mit einem geringer verschobenen Transkriptverhältnis des regulären *RBI* Transkripts (Abb. 3.5.7 B; dieser Versuch wurde von Tea Berulava durchgeführt).



**Abb. 3.5.7:** Behandlung lymphoblastoiden Zellen (LCLs) mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (AzadC). (A) Methylierungsanalyse des CpG 85 mittels MS-PCR. Der Methylierungsstatus des CpG 85 in Blut, Mock-behandelten und AzadC-behandelten LCLs ist dargestellt. Die Prozentwerte der methylierten und unmethylierten MS-PCR Produkte sind in schwarzen und grauen Säulen dargestellt. (B) Quantifizierung der allelischen Imbalance am *RBI* Locus (persönliche Mitteilung Tea Berulava). Die Ratio der allelischen Expressionsimbalance wurde mittels Primerextensionsanalyse (SNaPshot) ermittelt. In den Individuen C II-1 und C III-1 konnte die allelische Imbalance im Blut nicht ermittelt werden, da keine RNA aus Blut zur Verfügung stand. Die Individuen der Familie A sind heterozygot für eine seltene Variante in Exon 3. Das Individuum der Familie B und die Individuen der Familie C sind heterozygot für eine seltene Variante in Exon 9.

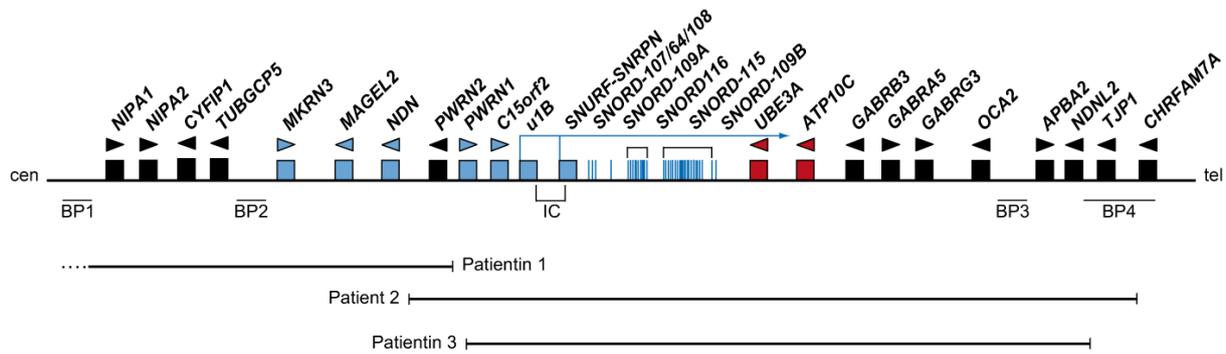
Die Analyse der LCLs von Familie A zeigte, dass die Expression des 2B-Transkripts monoallelisch in den Mock-behandelten Zellen ist. In den AzadC-behandelten Zellen jedoch wird das alternative Transkript aufgrund der Demethylierung des CpG 85 biallellisch exprimiert (persönliche Mitteilung Tea Berulava). Dies konnte für A II-1 in zwei Experimenten gezeigt werden. Für A III-1 konnte nur eine geringe biallellische Expression detektiert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das alternative *RBI* Transkript nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die paternale Deletion der Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* führt nicht zum Prader-Willi Syndrom (PWS)

Alle Patienten mit einem typischen PWS haben eine *de novo* Deletion des Bereichs 15q11q13 auf dem paternalen Chromosom, eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 15 oder einen Imprintingdefekt. Atypische Deletionen bei Patienten mit PWS sind eher selten. In dieser Arbeit werden zwei Patienten mit PWS und einer atypischen Deletion, die *C15orf2*, *SNURF-SNRPN* und die snoRNA Gene, aber nicht die Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* beinhaltet, beschrieben. Beide Patienten zeigen alle phänotypischen Merkmale eines PWS (Tabelle 3.1.1). Da das Imprinting Center (IC) bei beiden Patienten von der Deletion betroffen ist (Abb. 4.1.1), ist zu erwarten, dass die IC-Deletion zu einer abnormalen Methylierung und zum Verlust der Genexpression der nicht-deletierten paternal exprimierten Gene führt. Für Patientin 3 wurde eine Hypermethylierung am *NDN* Locus detektiert, wohingegen Patient 2 ein normales Methylierungsmuster an diesem Locus aufwies. Eine Expressionsanalyse an RNA aus Blut des Patienten 2 zeigte, dass *NDN* exprimiert wird (die RT-PCR wurde von Corinna Zogel durchgeführt). Wieso dieser Patient trotz IC-Deletion ein normales Methylierungsmuster zeigt, ist nicht klar. Eine mögliche Erklärung wäre ein Positionseffekt des Deletionsbruchpunktes. Bei Patient 2 liegt der Bruchpunkt sehr nahe am Promotor des *NDN* Gens (22-77 kb), wohingegen bei Patientin 3 der Bruchpunkt ungefähr 800 kb vom *NDN* Locus entfernt ist. In der Literatur wird ebenfalls ein Patient beschrieben, der eine IC-Deletion hat, aber ein normales Methylierungsmuster für *NDN* zeigt (Calounova *et al.*, 2008). Bei diesem Patienten, der ebenfalls eine atypische Deletion der 15q11q13 Region hat, liegt der centromerische Bruchpunkt im *C15orf2* Gen.

Im Gegensatz zu Patient 2 und Patientin 3 beinhaltet die Deletion auf Chromosom 15 bei Patientin 1 nur die Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN*. Diese Patientin zeigt keine klinischen Merkmale eines PWS außer der Adipositas, der mentalen Retardierung und der hohen Schmerzgrenze (Tabelle 3.1.1).



**Abb. 4.1.1:** Schematischer Überblick der chromosomalen Region 15q11q13. Paternal exprimierte Gene sind blau und snoRNA Gene als Striche dargestellt. Maternal exprimierte Gene sind rot dargestellt; biallellisch exprimierte Gene sind schwarz dargestellt. Die Transkriptionsrichtung wird durch Pfeile oberhalb der Gene angezeigt. BP, Bruchpunkt; IC, Imprinting Center; cen, Centromer; tel, Telomer. Nicht maßstabsgetreu. Die Deletionsbereiche und die Lokalisation der Deletionsbruchpunkte für die Patienten 1-3 sind unter der Karte angegeben (schwarze Balken).

Es ist möglich, dass die beobachteten klinischen Merkmale bei Patientin 1, die nicht im Zusammenhang mit PWS stehen, durch eine Haploinsuffizienz der pseudoautosomalen Region 2 in Xq28 verursacht werden. Dies kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden, da bis dato ein Phänotyp, der mit der Deletion dieser Region assoziiert ist, nicht beschrieben worden ist. Es ist auch nicht ganz auszuschließen, ob sich die X-Inaktivierung des der(X) Chromosoms nicht doch in den autosomalen Teil ausbreitet und eine Inaktivierung der Gene auf 15q bewirkt - auch wenn kein Hinweis darauf gefunden wurde. Außerdem kann auch eine Inaktivierung im Mosaik in anderen Geweben nicht ausgeschlossen werden (hier wurde nur DNA aus peripherem Blut untersucht). Anhand dieser Ergebnisse kann die Schlussfolgerung gemacht werden, dass der Verlust der Expression der paternal exprimierten Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* nicht auszureichen scheint, um ein typisches PWS hervorzurufen.

Bei sechs Patienten mit typischen Merkmalen eines PWS und einer balancierten Translokation, die den *SNURF-SNRPN* Locus betrifft, könnten die snoRNA Gene, die im *SNURF-SNRPN* Locus liegen, für einige phänotypischen Merkmale verantwortlich sein (Sun *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999; Wirth *et al.*, 2001; Schule *et al.*, 2005). Bei allen sechs Patienten liegt das Gencluster *SNORD116* und das Gencluster *SNORD115* distal zu den Translokationsbruchpunkten und in drei untersuchten Patienten konnte gezeigt werden, dass diese Gencluster nicht exprimiert werden (Wirth *et al.*, 2001; Schule *et al.*, 2005). Daher könnte es sein, dass diese snoRNA Gene für den PWS Phänotyp verantwortlich sind. In zwei nicht-verwandten Familien wurde eine kleine Deletion, die das *UBE3A* Gen und das snoRNA Cluster *SNORD115* beinhaltet, detektiert. Die maternale Transmission dieser Deletion ruft das Angelman Syndrom (AS) hervor. Die phänotypisch unauffälligen Mütter dieser Patienten mit AS tragen die Deletion des

Genclusters auf dem paternalen Chromosom 15. D.h., dass diese Mütter defizient für das paternal exprimierte snoRNA Gencluster *SNORD115* sind, aber keine Merkmale eines PWS vorweisen. Demnach führt eine paternale Transmission zu keinem Phänotyp (Hamabe *et al.*, 1991; Burger *et al.*, 2002; Runte *et al.*, 2005). Dies schließt eine wichtige Rolle des snoRNA Clusters *SNORD115* für PWS aus. Dennoch sollte hier die Arbeit von Kishore und Stamm (Kishore und Stamm, 2006) erwähnt werden, in der beschrieben wird, dass *SNORD115* das alternative Spleißen der mRNA des Serotoninrezeptors 5-HT<sub>2C</sub>R reguliert, indem es an eine komplementäre Region in Exon Vb bindet. Kishore und Stamm konnten zeigen, dass Patienten mit PWS, die *SNORD115* nicht exprimieren, andere mRNA Isoformen des Serotoninrezeptors aufweisen als gesunde Individuen.

Kürzlich beschrieb Sahoo *et al.* (2008) einen Patienten mit einigen PWS Merkmalen, wie neonatale Hypotonie, Fütterungsprobleme, Adipositas und Hypogonadismus. Dieser Patient wies auch atypische Merkmale wie zu hohes Geburtsgewicht, Makrosomie und Makrocephalie auf. Der Patient war nicht mental retardiert und hatte keine fazialen Auffälligkeiten. Bei diesem Patienten sind die paternalen Kopien der Gene *SNORD109A*, des gesamten Genclusters *SNORD116* und die Hälfte des Genclusters *SNORD115* deletiert (Abb. 4.1.1). Es gibt zwei Mausmodelle mit einer Deletion des snoRNA Clusters *Snord116*. Diese Mäuse haben keine Makrosomie, sondern sind klein (Skryabin *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008). Ein weiterer Patient mit einer Deletion, die außer dem Gencluster *SNORD115* und *SNORD109B* alle snoRNA Gene und Exon 2-10 des *SNURF-SNRPN* Gens beinhaltet, weist ein typisches PWS auf (de Smith *et al.*, 2009). Er hat folgende klinische Merkmale: Hypotonie, Hyperphagie, Adipositas, Hypogonadismus, Entwicklungsverzögerung, Verhaltensauffälligkeiten, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße und Lernschwierigkeiten. Für diesen Patienten wurde unter anderem gezeigt, dass die Gene *MAGEL2* und *NDN* exprimiert werden.

Vergleicht man beide Deletionen so erhält man einen Überlappungsbereich, der das snoRNA Gen *SNORD109A* und das Gencluster *SNORD116* beinhaltet. Daher kann man darauf schließen, dass das Gencluster *SNORD116* bei PWS eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Da aber der Patient der Publikation von de Smith *et al.* (2009) ein typisches PWS aufweist, ist nicht auszuschließen, dass die snoRNA Gene *SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*, *SNORD109A* und *SNORD116* für die volle Ausprägung eines PWS verantwortlich sind (Abb. 4.1.1).

Die Beobachtungen, die bei Mausmodellen für PWS gemacht wurden, sind schlecht mit den Beobachtungen bei Patienten mit PWS zu vergleichen. Mäuse, die für *Magel2* defizient sind

behalten den circadianen Rhythmus bei, aber zeigen eine reduzierte Aktivität (Kozlov *et al.*, 2007). Sie weisen eine neonatale Wachstumsretardierung, eine starke Gewichtszunahme zwischen der fünften und zwölften Woche nach der Geburt und eine Adipositas auf (Bischof *et al.*, 2007). Für *Ndn* gibt es verschiedene Mausmodelle. Je nach genetischem Hintergrund der Mäuse, die für die Modelle verwendet wurden, wurden unterschiedliche Phänotypen beobachtet. Tsai *et al.* (1999) konnten bei *Ndn* defizienten Mäusen keine Auffälligkeiten finden. Während Gérard *et al.* (1999) eine postnatale Letalität beobachtet hat, die möglicherweise auf respiratorische Probleme zurückzuführen ist. Weiter wurde beobachtet, dass sich *Ndn* defiziente Mäuse auffällig häufig kratzen und eine verbesserte räumliche Merkfähigkeit haben (Muscatelli *et al.*, 2000).

MAGEL2 und NDN gehören zu der Gruppe der MAGE (melanoma-associated antigen) Protein Familie. *MAGEL2* ist ein intronloses Gen und wird im Gehirn und in verschiedenen fetalen Geweben exprimiert (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). *NDN* ist ebenfalls ein intronloses Gen wird aber in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert. In Gehirn und Plazenta ist die Expression besonders hoch (MacDonald und Wevrick, 1997).

Obwohl Mäuse, die für *Magel2* und *Ndn* defizient sind, einige PWS typische Merkmale aufweisen, zeigt Patientin 1, dass eine paternale Defizienz dieser Gene nicht ausreicht, um PWS hervorzurufen. Sicherlich kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass sie für die Adipositas, die mentale Retardierung und die hohe Schmerzgrenze bei Patientin 1 verantwortlich ist. Die Deletionen, die im Rahmen dieser Arbeit beschrieben werden, legen eine Region fest, die kritisch für PWS zu sein scheint. Diese kritische PWS Region umfasst die Gene: *C15orf2*, *SNURF-SNRPN* und die snoRNA Gene. Da das *C15orf2* Gen in der Maus nicht konserviert ist (Färber *et al.*, 2000), gibt es hierfür kein Mausmodell. Patienten mit einer Translokation, bei der der *SNURF-SNRPN* Locus betroffen ist, weisen viele PWS Merkmale auf (Sun *et al.*, 1996; Kuslich *et al.*, 1999). Natürlich könnten diese Merkmale aber auch aufgrund des Verlustes der Expression der snoRNA Gene, die im *SNURF-SNRPN* Locus liegen, hervorgerufen worden sein.

Trotz anderer Behauptungen (Sahoo *et al.*, 2008) kann aufgrund der bestehenden Daten die Annahme gemacht werden, dass PWS nicht durch einen Einzelgendefekt hervorgerufen wird, sondern durch den Verlust der Genexpression in der PWS kritischen Region, die das *C15orf2* Gen, das *SNURF-SNRPN* Gen und die snoRNA Gene beinhaltet. Außerdem kann die Annahme gemacht werden, dass *MKRN3*, *MAGEL2* und/oder *NDN* nur eine untergeordnete Rolle beim PWS zu haben scheinen. Für das genaue Verständnis der Bedeutung der Gene in

15q11q13 für PWS wären weitere Untersuchungen bei Patienten mit unterschiedlichen atypischen Deletionen der 15q11q13 Region hilfreich.

#### 4.2 Das upd(14)mat Syndrom

Durch uniparentale Disomien, die mit einem Phänotyp assoziiert sind, können Gene identifiziert werden, die dem Imprinting unterliegen. Die uniparentale Disomie führt in diesem Fall zu einem Ungleichgewicht der Expression elterlich geprägter Gene. Die maternale uniparentale Disomie 14 [upd(14)mat] ist mit einem charakteristischen Phänotyp assoziiert, der eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Hypotonie, Fütterungsprobleme, kleine Hände und Füße, Adipositas und eine frühzeitige Pubertät einschließt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben Patienten mit einem upd(14)mat Phänotyp untersucht. Bei zwei dieser Patienten (Patientin 3 und Patient 4), mit unbestätigtem Verdacht auf PWS, sollte geklärt werden, ob sie ein auffälliges Methylierungsmuster für die IG-DMR und *MEG3* DMR haben. Da die Merkmale einer upd(14)mat mit denen des Prader-Willi Syndroms überlappen, kann es vorkommen, dass bei einem Patient mit einer upd(14)mat die klinische Verdachtsdiagnose PWS gestellt wird (Mitter *et al.*, 2006). Bei den restlichen fünf Patienten war eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 14 ausgeschlossen worden. Alle diese Patienten wurden mittels Methylierungsanalyse an der IG-DMR und *MEG3* DMR untersucht und zeigten eine Hypomethylierung an beiden DMRs. Da aber auch eine Deletion des paternalen Allels der geprägten Domäne zu einem aberranten Methylierungsmuster führen kann, wurde bei allen Patienten eine Gendosisanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Patientin 3 eine Deletion der fast gesamten geprägten *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne auf dem väterlichen Chromosom aufweist. Nicht deletiert sind einige der miRNA Gene und das Gen *DIO3*. Da die Deletion auf dem väterlichen Chromosom vorliegt, fehlt der Patientin eine aktive Kopie der paternal exprimierten Gene *DLK1* und *RTL1*. Dies bedeutet, dass bei dieser Patientin ein Expressionsverlust dieser Gene vorliegt. Daher sind beide Gene gute Kandidatengene, die für den upd(14)mat Phänotyp verantwortlich sein könnten. *Dlk1* wird in verschiedenen fetalen Geweben und der Plazenta exprimiert (Laborda *et al.*, 1993; Floridon *et al.*, 2000). Es spielt eine Rolle bei der Kontrolle des Embryonalwachstums (Schmidt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2002) und ist außerdem an verschiedenen Differenzierungsprozessen beteiligt wie z.B. der Hämatopoese und Fettbildung (Garces *et al.*, 1999; Kaneta *et al.*, 2000; Raghunandan *et al.*, 2008). Ein *Dlk1*

Knockout-Mausmodell machte deutlich, dass *Dlk1* für eine normale Entwicklung wichtig ist und für die beobachtete Adipositas in diesen Mäusen verantwortlich ist. Es ist demnach möglich, dass *Dlk1* für die meisten Merkmale, die bei einer upd(12)mat bei Mäusen und bei einer upd(14)mat beim Menschen beobachtet werden, verantwortlich ist. Der Phänotyp bei der Maus ist allerdings viel schwerer als der beim Menschen (Moon *et al.*, 2002). Für *Rtl1* konnte gezeigt werden, dass es für die Aufrechterhaltung der fetalen Kapillaren verantwortlich ist (Sekita *et al.*, 2008). *Rtl1* spielt demnach für die Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, da es den Nährstoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Fet gewährleistet. Sowohl die Überexpression als auch die Defizienz von *Rtl1* führte bei Mäusen zu prä- und postnataler Letalität.

Sechs der sieben untersuchten Patienten (Patientin 1, Patient 2 und 4, Patientinnen 5-7) haben eine primäre Epimutation am *DLK1/MEG3* Locus wie der von Temple *et al.* (2007) beschriebene Patient. Eine Patientin (Patientin 3) zeigt eine paternale Deletion der fast kompletten *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne. Es gibt bislang nur drei beschriebene Fälle mit einem upd(14)mat Phänotyp und einer paternalen Deletion in der *DLK1-MEG3-DIO3* Domäne (Kagami *et al.*, 2008) und drei beschriebene Fälle mit einer primären Epimutation am *DLK1/MEG3* Locus (Temple *et al.*, 2007; Hosoki *et al.*, 2008; Zechner *et al.*, 2009).

Imprintingdefekte werden auch bei anderen Erkrankungen wie dem Prader-Willi Syndrom, Angelman Syndrom, Beckwith-Wiedemann Syndrom, Silver-Russell Syndrom und dem Transienten neonatalen Diabetes mellitus beobachtet. Die Frequenz von Epimutationen ist bei Patienten mit Beckwith-Wiedemann Syndrom, Silver-Russell Syndrom und Transientem Neonatalen Diabetes Mellitus höher als bei Patienten mit Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom. Hier findet man nur in 1-4% der Fälle einen Imprintingdefekt. Der Grund für die niedrige Frequenz von Epimutationen bei Patienten mit PWS und AS ist wahrscheinlich, dass die 15q11q13 Region 250-450 kb große „low copy number repeats“ beinhaltet, die für eine nicht-homologe Rekombination verantwortlich sind. Solche großen Repeats sind für die 14q32 nicht bekannt. Allerdings gibt es zwei Patienten mit einer paternalen Deletion mit identischen Bruchpunkten in expandierten TGG Repeats von 500 bp, die das Imprintingcluster in 14q32 flankieren (persönliche Mitteilung Dr. Karin Buiting).

Die vorhandenen Daten zeigen deutlich, dass das Prader-Willi Syndrom und das upd(14)mat Syndrom sich sehr ähnlich sind. Es gibt viele Überlappungen bei den klinischen Merkmalen und beide Erkrankungen haben dieselben Klassen an Defekten (uniparentale Disomie, Imprintingdefekt und Deletion).

Eine Nachuntersuchung (Methylierungs- und Deletionsanalyse) der bislang gefundenen Patienten mit Verdacht auf upd(14)mat, aber biparentaler Herkunft des Chromosom 14 könnte helfen, weitere Patienten mit einem Imprintingdefekt oder einer Deletion zu identifizieren. Dies würde dazu beitragen, mehr über die relative Häufigkeit der drei genetischen Subtypen (maternale UPD, Imprintingdefekt, Deletion), die zum upd(14)mat Phänotyp führen, herauszufinden. Außerdem sollte bei Patienten mit nicht bestätigter Verdachtsdiagnose PWS und phänotypischen Merkmalen, die auch mit einer upd(14)mat assoziiert sind, geklärt werden, ob nicht das upd(14)mat Syndrom vorliegt.

### **4.3 Imprinting und assistierte Reproduktion (ART)**

Es wurde beobachtet, dass durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugte Kinder, verglichen mit natürlich gezeugten Kindern, ein höheres Risiko für ein geringes Geburtsgewicht (Schieve *et al.*, 2002; Helmerhorst *et al.*, 2004) und angeborene Fehlbildungen haben (Rimm *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005). Die biologische Ursache für diese Beobachtungen konnte bislang nicht geklärt werden. Es ist möglich, dass sie auf Fertilitätsprobleme der Eltern oder aber auf die angewandte Technik (Superovulation, Kulturbedingungen) zurückzuführen sind.

#### **4.3.1 Methylierungsanalysen bei ICSI-Kindern mit geringem Geburtsgewicht**

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob das niedrige Geburtsgewicht der Kinder, die durch intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) gezeugt wurden, Ursache eines Imprintingfehlers an einem der geprägten Loci ist. Dazu wurde mit Hilfe der SeQMA das Methylierungsmuster von sechs differentiell methylierten Genbereichen in 19 Kindern (aus einer prospektiven Studie (Katalinic *et al.*, 2004)) untersucht, die mit niedrigem Gewicht geboren wurden. Von diesen 19 Kindern zeigt ein Kind Methylierungsauffälligkeiten am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus. Bei keinem der Kinder gab es einen Hinweis auf das Silver-Russell Syndrom (SRS). Das SRS ist häufig mit einer Hypomethylierung am *H19/IGF2* Locus (Gicquel *et al.*, 2005) oder mit einer Hypermethylierung am *MEST* Locus assoziiert (Kagami *et al.*, 2007; Abu-Amero *et al.*, 2008). Es ist bemerkenswert, dass unter 19 ICSI-Kindern mit geringem Geburtsgewicht ein ICSI-Kind mit Methylierungsauffälligkeiten gefunden worden ist. Da aber die Daten zur Variation in normalen Kindern fehlt, kann über die Häufigkeit keine Aussage gemacht werden. Um dies machen zu können, müssten 100-200

Kontrollkinder untersucht werden. Es muss auch erwähnt werden, dass in dieser Studie nur ein Gewebe (Mundschleimhaut), das zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurde, untersucht worden ist. Es bestand leider nicht die Möglichkeit, Material zum Zeitpunkt der Geburt und Material der Plazenta zu bekommen. Imprintingdefekte treten häufig im somatischen Mosaik auf. Daher könnte es sein, dass eine Zelllinie mit einem abnormalen Methylierungsmuster einen Wachstumsnachteil gegenüber einer normalen Zelllinie hat und somit im Laufe der Entwicklung verloren geht. Die tatsächliche Frequenz von Imprintingfehlern könnte demnach höher sein als hier in dieser Studie beobachtet.

Es konnte ein Kind (Kind #33) mit einer Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* Locus und am *MEST* Locus identifiziert werden. Bei diesem Kind konnte eine Hypermethylierung von 72-74% am *KCNQ1OT1* Locus und eine Hypermethylierung von 60-63% am *MEST* Locus nachgewiesen werden. Die Eltern zeigten ein unauffälliges Methylierungsmuster an diesen Loci, was darauf deutet, dass dieses Kind eine *de novo* Hypermethylierung aufweist. Die Ergebnisse für die Methylierungsanalyse mittels SeQMA für das Kind und dessen Eltern konnten mit einer weiteren unabhängigen Methode (COBRA) verifiziert werden. Beide Methoden zeigen, dass die Hypermethylierung am *MEST* Locus grenzwertig ist. Es muss aber auch erwähnt werden, dass unter allen 48 untersuchten Kindern dieses Kind (Kind #33) den höchsten Wert an Methylierung an diesem Locus zeigt. Die inter-experimentelle Variation ist sehr gering, da zwei unabhängige Experimente dieselben Ergebnisse lieferten. Allerdings scheint es einen gewissen Grad an inter-individueller Variation bei der Methylierung zu geben. Dies macht es sehr schwierig, Imprintingdefekte im Mosaik, vor allem wenn es sich um ein niedergradiges Mosaik handelt, zu detektieren.

Eine Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus bedeutet, dass das paternale Allel, das normalerweise unmethyliert ist, methyliert vorliegt. Das *MEST* Gen ist in 7q32 lokalisiert und codiert für ein Protein, das der Familie der Hydrolasen mit alpha/beta-Hydrolasen-Faltung angehört. Dieses Gen wird in humanen fetalen Geweben paternal exprimiert. Die Promotorregion ist auf dem maternalen Chromosom methyliert und auf dem paternalen Chromosom unmethyliert (Moore *et al.*, 2003). Eine maternale uniparentale Disomie des Chromosom 7 ist mit prä- und postnateller Wachstumsretardierung assoziiert. Lefebvre *et al.* (1998) konnten zeigen, dass heterozygote Mäuse, die ein mutantes paternales Allel erben, kleiner und leichter sind, was dem Phänotyp des Silver-Russell Syndroms gleicht.

*CDKN1C* ist in 11p15 lokalisiert, codiert für einen Cyclin-anhängigen Kinase-Inhibitor p57KIP2 und wird maternal exprimiert. Die Regulation der geprägten *CDKN1C* Expression geschieht durch die maternal methylierte ICR2 in Intron 10 des *KCNQ1* Gens. Hierüber wird

auch die Expression des paternal exprimierten *KCNQ1OT1* Gens, das Antisense-Transkript zu *KCNQ1*, reguliert (Mitsuya *et al.*, 1999). Der Verlust der Expression des *CDKN1C* Gens ist mit einem Großwuchssyndrom assoziiert (Beckwith-Wiedemann Syndrom (Diaz-Meyer *et al.*, 2003)). Eine maternale Duplikation der Region 11p15 ist dagegen mit einer Wachstumsretardierung assoziiert (Fisher *et al.*, 2002; Schönherr *et al.*, 2007), wobei hier auch der *H19/IGF2* Locus eine Rolle spielen könnte. Bislang wurde über eine Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* Locus im Menschen nicht berichtet, aber sie könnte zu einer Überexpression von *CDKN1C* und somit zur fetalen Wachstumsretardierung führen. Eine Studie von Fitzpatrick *et al.* (2002) zeigte, dass eine paternal vererbte Deletion der ICR2 in einer Überexpression von *CDKN1C* resultiert. Das Hauptmerkmal dieser Knockout-Mäuse ist eine Wachstumsretardierung.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Methylierungsveränderungen in dem Kind #33, das bei der Geburt zu klein war und ein geringes Geburtsgewicht hatte, in die erwartete Richtung gehen.

Epimutationen nach ART könnten aber auch mit den Fertilitätsproblemen der Eltern (Vater oder Mutter) zusammenhängen. Eine Studie von Kobayashi *et al.* (2007) zeigte, dass Spermien von infertilen Männern ein höheres Risiko tragen, inkorrekte primäre Imprints an ihre Nachkommen zu vererben. Außerdem stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass in den Spermien die Fehler häufiger an maternal methylierten DMRs auftauchen als an paternal methylierten DMRs. Eine aberrante Methylierung an mehreren maternal methylierten Loci, wie *MEST*, *KCNQ1OT1*, *PLAGL1*, *PEG3* und *SNRPN*, in den Spermien könnte eine Folge einer fehlerhaften Imprintauslöschung sein. Die Transmission inkorrekt er Imprints könnte somit während der Behandlung der männlichen Infertilität gefördert werden (Marques *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2008). Daher ist es möglich, dass ein Spermium des Vaters, der eine Oligozoospermie hat, inkorrekte Imprints trug (Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus), welche er an sein Kind (Kind #33) weitergegeben hat.

Interessanterweise berichtete Kagami *et al.* (2007) über eine Patientin mit SRS, die eine partielle Hypermethylierung am *MEST* Locus aufwies. Diese Patientin wurde mit Hilfe der *in vitro* Fertilisation gezeugt. Außerdem waren vier der acht abnormal methylierten CG-Dinukleotide auch beim Vater methyliert. Daraus wurde gefolgert, dass das paternale *MEST* Allel, welches leicht hypermethyliert ist, weiter aufmethyliert und an die Patientin vererbt wurde.

Falls die Annahme richtig ist, dass die inkorrekten Imprints eines Spermiums an das Kind #33 weitergegeben wurden, wieso zeigt dieses Kind dann keine 100%ige Methylierung an diesen

Loci? Die partielle Hypermethylierung an den Loci *KCNQ1OT1* und *MEST* in Kind #33 weist auf ein somatisches Mosaik hin. Dies bedeutet, dass Zellen mit einer Hypermethylierung an diesen Loci und Zellen mit einem normalen Methylierungsmuster vorhanden sind. Dieses Mosaik könnte daraus resultieren, dass 1. diese Loci postzygotisch hypermethyliert wurden (möglicherweise aufgrund eines unzureichenden Schutzes der paternalen Allele gegenüber der *de novo* Methylierung) oder aber 2. die fehlerhaften Imprints postzygotisch verloren gegangen sind. Es ist schwierig, solche Vorgänge mit den Techniken der assistierten Reproduktion in Zusammenhang zu bringen.

Die gefundenen Methylierungsveränderungen, die bei infertilen Männern nachgewiesen wurden (*MEST* mit eingeschlossen), lassen die Annahme zu, dass die Methylierungsveränderungen, die in Kind #33 gefunden worden sind, mit den Fertilitätsproblemen des Vaters zusammenhängen. Das folgende Szenario wäre mit den schon veröffentlichten Daten und unseren Ergebnissen kompatibel. Das Kind #33 wurde mit einem Spermium gezeugt, das eine fehlerhafte Methylierung am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus trug. Diese fehlerhafte Methylierung könnte Folge einer fehlerhaften Auslöschung maternal methylierter Imprints während der Spermatogenese sein. Bei Patienten mit dem Prader-Willi Syndrom und sporadischem Imprintingdefekt konnte gezeigt werden, dass das Chromosom, das den Imprintingdefekt trägt immer von der Großmutter väterlicherseits stammt (Buiting *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass Fehler in der Auslöschung von Imprints tatsächlich vorkommen. Im Gegensatz zu einem richtigen maternal methylierten Imprint muss das aberrante Methylierungsmuster nicht an jedem CG-Dinukleotid in der DMR beobachtet werden. Dies könnte eine gewisse Instabilität des Imprints während der postzygoten Entwicklung bedeuten, die wiederum dazu führen könnte, dass der aberrante Imprint in einigen Zellen verloren geht. Außerdem haben normale Zellen wahrscheinlich einen gewissen Wachstumsvorteil gegenüber den Zellen mit einer Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus, was zur Folge hätte, dass der Anteil von normalen Zellen höher wäre als der Anteil an betroffenen Zellen. Dies würde auch erklären, dass das Kind #33 ein normales Wachstum nach der Geburt zeigte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass unter 19 ICSI-Kindern ein ICSI-Kind mit einer Imprintingstörung am *KCNQ1OT1* und *MEST* Locus identifiziert werden konnte. Wie relevant dieses Ergebnis ist, kann nicht gesagt werden, da hierzu mehr Kontrollkinder und auch mehr ICSI-Kinder untersucht werden müssten. Eine Hypermethylierung am *KCNQ1OT1* Locus bei einem normalen oder wachstumsretardierten Kind wurde bislang nicht publiziert. Es könnte ein seltenes stochastisches Ereignis sein oder aber mit der Infertilität des Vaters

zusammenhängen. Ein direkter Zusammenhang mit der ICSI Technik ist unwahrscheinlich. Da die Häufigkeit von Imprintingdefekten selten ist und fehlerhafte Imprints an bestimmten Loci instabil sein könnten und dadurch verloren gehen könnten, ist es notwendig, dass verschiedene Gewebe um den Zeitpunkt der Geburt (einschließlich der Plazenta) untersucht werden. Außerdem ist es notwendig, dass mehr Kinder untersucht werden. Nur so kann man einen Gesamteindruck darüber bekommen, wie sich das Mosaik verhält und Imprintingdefekte eventuell besser detektieren.

#### 4.3.2 Suche nach Mutationen im *CTCF* Gen bei subfertilen Männern

Bislang wurden beim Menschen noch keine Genmutationen gefunden, die mit fehlerhaftem Imprinting und fehlerhafter Spermatogenese assoziiert werden können. Für die Maus konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von *Dnmt3a* und *Dnmt3L* die Spermatogenese stark beeinflusst (Kaneda *et al.*, 2004; LaSalle *et al.*, 2007). Ein Fehlen dieser Enzyme könnte die aberrante Methylierung am *H19* Locus (Hypermethylierung) der untersuchten Patienten erklären, nicht aber die Hypermethylierung am *MEST* Locus. Diese Hypermethylierung könnte das Resultat einer fehlerhaften Auslöschung maternaler Imprints in der männlichen Keimbahn sein. Loukinov *et al.* (2002) haben beobachtet, dass die Auslöschung der Methylierung maternaler Imprints während der männlichen Keimzellentwicklung mit einer Hochregulierung der *CTCF*-Expression assoziiert ist. Damit könnte *CTCF* ein Schlüsselprotein der epigenetischen Reprogrammierung in der männlichen Keimbahn darstellen. Es sollte hier daher untersucht werden, ob bestimmte Mutationen im *CTCF* Gen häufiger in subfertilen Männern mit aberranten Methylierungsmustern an *H19* und/oder *MEST* zu finden sind. Die Sequenzanalyse von 20 subfertilen Männern, mit einer Hypomethylierung am *H19* Locus und einer Hypermethylierung am *MEST* Locus, ergab keine *bona fide* Mutationen. Es wurden schon bekannte SNPs gefunden, die eventuell das Risiko für Reprogrammierungsfehler erhöhen könnten. Um dies zu klären, müsste eine groß angelegte Fall-Kontroll-Studie durchgeführt werden.

Hier wurde nur das *CTCF* Gen analysiert, es gibt aber noch weitere Kandidatengene, die auf Mutationen und/oder Sequenzvarianten untersucht werden könnten. Die Expression der kurzen Isoform des *MBD2* Gens z.B. ist ebenfalls während der Spermatogenese hochreguliert. Bhattacharya *et al.* (1999) berichteten, dass *MBD2* DNA aktiv demethyliert (1999). Es könnte demnach auch ein Schlüsselprotein der epigenetischen Reprogrammierung in der männlichen Keimbahn darstellen.

#### 4.4 Abklärung einer familiären generalisierten Imprintingstörung

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patient zeigt an allen untersuchten Loci (außer am *NESP* Locus), sowohl an maternal methylierten Loci als auch an paternal methylierten Loci, eine Hypomethylierung. Nur an dem *NESP* Locus wurde eine Hypermethylierung detektiert. Der *GNAS* Locus scheint zwei unabhängige Imprintingdomänen zu besitzen (Liu *et al.*, 2005a). Der Imprint des *GNAS Exon 1A* Gens wird durch eine Imprintingkontrollregion reguliert, während der Imprint der Gene *NESP*, *NESPAS* und *GNASXL* durch eine zweite, unabhängige Imprintingkontrollregion reguliert wird. Eine Deletion der Imprintingdomäne *GNAS Exon 1A* hat keine Wirkung auf die zweite Imprintingdomäne. Liu *et al.* (2005b) beobachteten, dass eine Hypomethylierung am *NESPAS* Locus immer mit einer Hypermethylierung am *NESP* Locus verbunden ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen für den Indexpatienten und die beiden Feten (Fet 1, Fetozyd; Fet 2, Abort) dieser Familie überein.

Die Methylierungsergebnisse für die verschiedenen untersuchten Loci wurde mit Hilfe der MS-PCR, SeQMA und MS-MLPA ermittelt und durch eine genomweite Methylierungsanalyse per Array verifiziert. Anhand der Methylierungsergebnisse müsste der Patient ein somatisches Mosaik für folgende Erkrankungen sein: Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), Silver-Russell Syndrom (SRS), upd(14)mat Syndrom, Transienter neonateler Diabetes mellitus (TNDM), Pseudohypoparathyroidismus Typ IB (PHPIB) und Angelman Syndrom (AS). Interessanterweise aber weist der Patient wider Erwarten einen eher milden Phänotyp auf. Möglicherweise heben sich die Defekte bis zu einem gewissen Grad gegenseitig auf. Bislang zeigt er u.a. Merkmale, die für BWS typisch sind (z.B. eine Nabelhernie), aber auch Merkmale, die für SRS typisch sind (z.B. intrauterine Wachstumsretardierung). Regelmäßige klinische Nachuntersuchungen des Patienten, der inzwischen zwei Jahre alt ist, werden zeigen, ob und wie sich die verschiedenen Imprintingerkrankungen phänotypisch ausprägen werden (z.B. mentale Retardierung, fehlende Sprachentwicklung, vorzeitige Pubertät).

Anhand der erhobenen Daten scheinen der Patient und die beiden Feten eine generalisierte Imprintingstörung zu haben. Ein solcher Fall wurde bislang in der Literatur nicht berichtet. Kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der Patienten mit Silver-Russell Syndrom und Beckwith-Wiedemann Syndrom eine Hypomethylierung an maternal und paternal methylierten Loci aufweisen (Azzi *et al.*, 2009). Trotz der Hypomethylierung mehrerer Loci zeigen diese Patienten nur einen Phänotyp. Entweder zeigen sie die klinischen Merkmale

eines Beckwith-Wiedemann Syndroms oder die Patienten zeigen einen Phänotyp, der typisch für das Silver-Russell Syndrom ist.

Es gibt drei weitere Publikationen, in denen über Patienten berichtet wird, die für einige Loci eine Hypomethylierung aufweisen. Allerdings sind bei diesen Patienten, die entweder TNDM oder BWS haben, nur maternal methylierte Loci betroffen (Mackay *et al.*, 2006; Blik *et al.*, 2008; Boonen *et al.*, 2008). Zur Klärung der molekulargenetischen Ursache führten Blik *et al.* (2008) eine Mutationsanalyse für das *DNMT3L* Gen bei Müttern von zwei der untersuchten BWS Patienten durch. Allerdings fanden sie nur vier SNPs, die auch in der Normalpopulation gefunden wurden. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Dnmt3L* für die Etablierung der maternalen Imprints notwendig ist (Bourc'his *et al.*, 2001).

Bei dem von uns untersuchten Patienten ist der Grad der Methylierung an verschiedenen Loci im selben Gewebe unterschiedlich (Blut: *SNRPN* 20-25% Methylierung; *PLAGL1* unmethyliert), aber auch am selben Locus in verschiedenen Geweben unterschiedlich (*NDN*: Blut 20% Methylierung; *MSH* unmethyliert). Die Bisulfit-Klonierung für die Loci *KCNQ1OT1* und *SNRPN* zeigte, dass die Imprintingdefekte als somatisches Mosaik vorliegen. Für beide Loci wurden Klone von komplett methylierten oder komplett unmethylierten Sequenzen erhalten. Mischklone, die unmethylierte CG-Dinukleotide und methylierte CG-Dinukleotide aufweisen, wurden nicht erhalten. Im Gegensatz zum Patienten zeigen die beiden untersuchten Feten eine Hypomethylierung an mehreren geprägten Loci, jedoch nicht an allen. Genau wie beim Patient aber liegen die Imprintingdefekte auch hier als somatisches Mosaik vor.

Interessanterweise sind Mäuse, die für *Dnmt1o* defizient sind, auch an paternal und maternal methylierten Loci hypomethyliert (Howell *et al.*, 2001; Toppings *et al.*, 2008; Cirio *et al.*, 2008). Auch hier liegt die Hypomethylierung als somatisches Mosaik vor (Toppings *et al.*, 2008; Cirio *et al.*, 2008). *Dnmt1o* ist eine Isoform der DNA Methyltransferase *Dnmt1*, die für die Aufrechterhaltung der Methylierung zuständig ist. Diese Isoform wird in der Oocyte exprimiert und ist im Cytoplasma lokalisiert. Während der Embryonalentwicklung wird die Methylierung der geprägten Gene im 8-Zell-Stadium durch die Methyltransferase *Dnmt1o* aufrechterhalten. Zu diesem Zeitpunkt ist die Methyltransferase *Dnmt1o* im Nukleus lokalisiert (Howell *et al.*, 2001; Ratnam *et al.*, 2002). Das Fehlen von *Dnmt1o* führt dazu, dass die Imprints vom 8-Zell-Stadium zum 16-Zell-Stadium nicht aufrechterhalten werden können. Allerdings gehen nicht alle Imprints verloren – in welcher Zelle und an welchem Locus die Imprints verloren gehen ist zufällig. Dies bedeutet, dass der Verlust von *Dnmt1o* zu verschiedenen Epigenotypen führt (Cirio *et al.*, 2008). Die zufällige Segregation der

Chromosomen während der Zellteilung spielt ebenfalls eine große Rolle bei der Entstehung von epigenetischen Mosaiken in Embryos (Cicio *et al.*, 2008). Alle *Dnmt1o* defizienten Mäuse stellen ein Mosaik von Zellen mit unterschiedlichem, aber stabilem Epigenotyp dar (Cicio *et al.*, 2008). Auch bei der untersuchten Familie kann man erkennen, dass die verschiedenen untersuchten Individuen (Indexpatient, Fet 1 und Fet 2) ein Mosaik von Zellen mit unterschiedlichem Epigenotyp darstellen.

Die bei dieser Familie detektierten Methylierungsauffälligkeiten (Patient, Fet 1 und Fet 2) scheinen ein familiäres Problem darzustellen. Bei allen Nachkommen wurden aberrante Methylierungsmuster (Hypomethylierung) an maternal und paternal methylierten geprägten Loci gefunden. Die Ursache für den generalisierte Imprintingstörung ist vermutlich auf ein Problem bei der Mutter zurückzuführen. Sie könnte eine Mutation haben, die die Oocyten betrifft und eine maternale-Effekt-Mutation darstellt. In diesem Fall wären alle Oocyten der Mutter betroffen und damit auch alle ihre Nachkommen. Da alle drei Kinder der Mutter betroffen sind, würde diese Hypothese passen. Das *NLRP7* Gen codiert für ein Protein der NLRP Familie, das bei der Aktivierung von proinflammatorischen Caspasen eine Rolle spielt, und wird in verschiedene Gewebe exprimiert (Kinoshita *et al.*, 2005). Mutationen im *NLRP7* Gen führen zu Blasenmolen, Fehlgeburten, Totgeburten und zur intrauterinen Wachstumsretardierung (Murdoch *et al.*, 2006; Deveault *et al.*, 2009). Am Institut für Humangenetik in Kiel wurde eine Mutationsanalyse des *NLRP7* Gens durchgeführt. Dabei wurde bei der Mutter eine heterozygote Mutation in Exon 6 des *NLRP7* Gens gefunden, die einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin an Position 719 zur Folge hat. Deveault *et al.* (2009) haben dieselbe heterozygote Mutation bei einer Patientin identifiziert. Diese Patientin hatte drei Fehlgeburten, zwei Blasenmole und ein gesundes Kind, an welches sie die Mutation vererbt hat. Es ist aber auch möglich, dass es bei der von uns untersuchten Familie einen rezessiven Defekt in den Nachkommen gibt. Es wäre dann allerdings überraschend, dass drei von drei Nachkommen betroffen sind. Auch eine Störung am *DNMT1O* Locus bei der Mutter ist denkbar. Leider ist dies sehr schwierig zu klären, da bislang nicht genau geklärt ist, wo das oozytenspezifische Exon 1 und der entsprechende Promotor für *DNMT1O* beim Menschen lokalisiert sind und eine Untersuchung der Oocyten der Mutter nicht möglich ist.

Am Institut für Humangenetik in Kiel werden zurzeit weitere molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt, um die Ursache der generalisierten Imprintingstörung bei dieser Familie zu klären.

#### 4.5 Methylierungs- und Expressionanalysen am *RBI* Locus

Eine genomweite Methylierungsanalyse per Array-Analyse (Infinium® HumanMethylation27 BeadChip, Illumina) für den oben beschriebenen Patienten lieferte den ersten Hinweis darauf, dass das *RBI* Gen geprägt ist. Mutationen des *RBI* Gens, ein Tumorsuppressorgen, können zur Entstehung des Retinoblastoms, ein intraokularer Tumor im Kindesalter, führen. Das *RBI* Gen liegt in 13q14 und kodiert für ein Phosphoprotein (pRb), das im Nukleus lokalisiert ist. Dieses Protein kann als Transkriptions-Cofaktor wirken und kann, indem es Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutiert, die Aktivität von E2F Transkriptionsfaktoren, die eine proliferative Wirkung haben, reprimieren (Friend *et al.*, 1986). Eine Phosphorylierung von pRb durch aktivierte Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) resultiert in der Aktivierung von E2F-abhängigen Promotoren. CDK Inhibitoren, wie z.B. CDKN1C, inhibieren diesen Prozess. Außer der Regulierung des Zellzyklus spielt pRb auch eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Aufrechterhaltung von Trophoblastenstammzellen (Wenzel *et al.*, 2007). Obwohl einige wenige elternspezifische Effekte am Retinoblastom-Locus beobachtet wurden, gab es bislang keinen Hinweis auf eine differentielle Methylierung des Promotors oder eine allelspezifische Expression.

Der Patient mit der generalisierten Imprintingstörung zeigte eine Hypomethylierung für ein CpG Island (CpG 85) in Intron 2 des *RBI* Gens. Mittels Bisulfit-Klonierung konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das CpG 85 maternal methyliert und paternal unmethyliert ist. Weitere Analysen zeigten, dass das CpG 85 einen Promotor für ein alternatives Transkript repräsentiert, das paternal exprimiert wird. Demnach unterliegt dieser Locus dem Imprinting.

Die Entdeckung eines paternal exprimierten alternativen *RBI* Transkripts und die Entdeckung einer allelischen Imbalance, mit einem 3:1 (mat:pat) verschobenen Transkriptverhältnis, am *RBI* Locus (Tea Berulava führte die Experimente zur allelischen Imbalance durch) führten zu der Frage, ob und wie diese beiden Entdeckungen in Zusammenhang stehen. Dazu wurden Zellkultur-Versuche durchgeführt, bei denen das CpG 85 durch die Behandlung mit AzadC demethyliert wurde. Nach der AzadC-Behandlung wurde die Expression von *RBI* von Tea Berulava im Institut für Humangenetik in Essen untersucht. Hier zeigte sich, dass die partielle Demethylierung an CpG 85 mit einem geringer verschobenen Transkriptverhältnis des regulären *RBI* Transkripts einhergeht. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression des alternativen *RBI* Transkripts, aufgrund des unmethylierten CpG 85, zur Reduktion der Expression des regulären paternalen *RBI* Transkripts führt.

Ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung wäre die so genannte transkriptionelle Interferenz (TI; Shearwin *et al.*, 2005). Die TI ist eine Form der Genregulation, bei der zwei Promotoren um die Transkriptionsmaschinerie konkurrieren. Es ist aber auch möglich, dass an beide Promotoren Transkriptionskomplexe binden, die sich dann aber gegenseitig behindern bzw. stören. Diese Störung oder Blockierung kann aufgrund unterschiedlicher Transkriptionsgeschwindigkeiten entstehen (Shearwin *et al.*, 2005). Die Demethylierung des CpG 85 auf dem maternalen Chromosom führt zur Expression des alternativen Transkripts und dadurch auch zur Inhibierung der Expression des regulären maternalen *RBI* Transkripts – die Transkriptionsmaschinerie des 2B-Transkripts behindert die Transkriptionsmaschinerie des regulären *RBI* Transkripts. Ein geringer verschobenes Transkriptverhältnis des regulären *RBI* Transkripts wurde auch in den Mock-behandelten LCLs, die eine erhöhte Methylierung des CpG 85 aufweisen (AII-1 and CII-1), beobachtet. Hier verhält es sich anders als oben beschrieben: Da das paternale CpG 85 an Methylierung zunimmt, wird das 2B-Transkript weniger stark exprimiert und die Expression des regulären paternalen *RBI* Transkript wird nicht eingeschränkt – da das CpG 85 methyliert ist, kann die Transkriptionsmaschinerie für das 2B-Transkript nicht binden und der Transkriptionskomplex des regulären *RBI* Transkripts wird nicht gestört. In beiden Fällen erhält man ein weniger verschobenes Transkriptverhältnis. Das bedeutet, dass die Reduktion der Expression des regulären *RBI* Transkripts durch die Expression des alternativen Transkripts (TI) und damit vom Methylierungsstatus des CpG 85 abhängig ist.

Ein weiteres Erklärungsmodell für das Beobachtete wäre das so genannte „Isolator-Modell“, das auch am *IGF2/H19* Locus wirkt (Banerjee *et al.*, 2001). Die Imprintingkontrollregion 1 (ICR1) befindet sich zwischen den beiden Genen *IGF2* und *H19* auf Chromosom 11 und repräsentiert eine Bindestelle für das Isolator-Protein CTCF. Sie ist differentiell methyliert und kontrolliert den Zugang von zwei Enhancer-Elementen, die stromabwärts von *H19* liegen und von beiden Genen genutzt werden. Auf dem maternalen Chromosom 11 ist die ICR1 unmethyliert und CTCF kann binden. Dadurch können die Enhancer-Elemente nicht mehr mit dem *Igf2* Promotor wechselwirken, sondern es kommt zu einer Wechselwirkung mit dem *H19* Promotor und *H19* wird exprimiert. Da die ICR1 auf dem paternalen Chromosom methyliert ist, kann CTCF nicht binden, die Enhancer-Elemente interagieren mit dem *Igf2* Promotor und es kommt zur Expression von *Igf2* (Hark *et al.*, 2000; Ohlsson *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2004). CTCF (CCCTC-binding factor) ist ein 11-Zinkfingerprotein, das ein wichtiger Regulator der geprägten Genexpression ist. Es ist ein Chromatin Isolator, der den Zugang von entfernten Enhancern zu Promotoren reguliert. Es bindet nur an das unmethylierte Allel

(Kanduri *et al.*, 2000; Klenova *et al.*, 2002). Für den *RBI* Locus konnte aber keine CTCF Bindestelle identifiziert werden.

Datenbankanalysen zeigten, dass das CpG 85 Teil einer ~4,5 kb großen Region ist, die eine hohe Sequenzidentität (87%) zu Exon 4 und 18 bp von Exon 3 des *KIAA0649* Gens (NM\_014811) hat. Das *KIAA0649* Gen ist in 9q34 lokalisiert und besteht aus 4 Exons. Seine Funktion ist bislang nicht bekannt (Yang *et al.*, 2005). Es fand also eine Retrotransposition eines prozessierten Pseudogens auf Chromosom 13 statt. Vier weitere intronlose Kopien dieses Gens wurden auf dem Chromosom 22 (22q11.21) gefunden, die eine Sequenzidentität zu Exon 2 bis Exon 4 des *KIAA0649* Gens von jeweils 89% aufweisen. Nach der Integration des prozessierten Pseudogens auf Chromosom 22 fanden vermutlich Genduplikationen statt, die zu den vier Kopien führten. Der offene Leserahmen, der sich in Exon 4 des *KIAA0649* Gens befindet, ist in allen Kopien verloren gegangen. In Exon 4 des *KIAA0649* Gens befinden sich vier kleine CpG islands (<300 bp). Aus jeweils zwei dieser CpG islands entstanden die zwei großen CpG islands auf Chromosom 13 (CpG 85 und CpG 42). In den vier Kopien auf Chromosom 22 sind die kleinen CpG islands verloren gegangen. Es ist aber auch denkbar, dass das ancestrale Gen *KIAA0649* ein großes CpG island besaß, dieses aber, nach der Retrotransposition auf Chromosom 13, wegmutiert ist. Das CpG 85 würde demnach einen Teil dieses ancestralen CpG islands repräsentieren. Die Retrotransposition auf Chromosom 22 hätte sich dann nach dem Verlust des ancestralen CpG islands ereignet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die allelische Imbalance am *RBI* Locus mit der Integration eines prozessierten Pseudogens, das einen Promotor für ein alternatives Transkript darstellt, zusammenhängt. Diese Ergebnisse erweitern die bisherigen Beobachtungen zu epigenetisch kontrollierter transkriptioneller Interferenz durch Retrotransposons (Whitelaw *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004) - epigenetisch kontrollierte transkriptionelle Interferenz kann auch durch prozessierte Pseudogene hervorgerufen werden. Diese Ergebnisse unterstützen auch die Ansicht, dass genomisches Imprinting auf Schutzmechanismen des Wirtsgenoms aufbaut (Barlow *et al.*, 1993; Yoder *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2007; Pask *et al.*, 2009). Ein Beispiel hierfür ist das geprägte Gen *PEG10*, das eine gewisse Homologie mit dem Sushi-ichi Retrotransposon teilt (Ono *et al.*, 2001). Dieses Gen, das von einem Retrotransposon stammt, ist unter den Säugetieren hoch konserviert und wird paternal exprimiert (Ono *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2006). Knockout-Experimente in der Maus zeigten, dass *Peg10* essentiell für die Entwicklung der Plazenta ist

(Ono *et al.*, 2006). Anders als *PEG10* stammt die DNA Sequenz, die in das *RBI* Gen integriert wurde von einem endogenen Gen (*KIAA0649*). Dies scheint auch für das geprägte Gen *Zrsr1* zuzutreffen, das im Intron 1 des *Commd1* Gens liegt (Wang *et al.*, 2004). Das *Zrsr1* Gen wird nur vom paternalen Allel exprimiert und wird in Antisense Richtung zu seinem Wirtsgen *Commd1* transkribiert. Für das Wirtsgen *Commd1* wurde eine überwiegende Expression des maternalen Allels beobachtet, die auf eine TI beider Gene zurückzuführen sein könnte (Wang *et al.*, 2004). Ein weiteres solches Beispiel liefert das geprägte *Nnat* Gen (Schulz *et al.*, 2009). Dieses Gen liegt im Intron 1 des *Blcap* Gens und wird paternal exprimiert. Es wird ebenfalls in Antisense Richtung zu seinem Wirtsgen transkribiert. Das *Mcts2* Gen stellt eine Duplikation des X-chromosomalen *Mcts1* Gens dar, das durch eine Retrotransposition der mRNA in das vierte Intron des *H13* Gens gelangt ist (Wood *et al.*, 2008). Wie die Gene *Zrsr1* und *Nnat* ist es ein paternal exprimiertes, unabhängiges, aktives Gen, das für ein Protein codiert. Anders als *Zrsr1* und *Nnat* wird es in dieselbe Richtung transkribiert wie sein Wirtsgen *H13*. Eine Hypermethylierung der Promotorregion des *Mcts2* Gens führt zur Transkription der langen Isoform des *H13* Gens, während eine Hypomethylierung der Promotorregion des *Mcts2* Gens zur Transkription der kurzen Isoform des *H13* Gens führt (Wood *et al.*, 2008). Dies bedeutet, dass vom maternalen Allel (*Mcts2* methyliert) überwiegend die lange Isoform des *H13* Gens exprimiert wird, während vom paternalen Allel (*Mcts2* unmethyliert) die kurze Isoform exprimiert wird. Anders als das *Zrsr1*, das *Nnat* und das *Mcts2* Gen jedoch müssen die *KIAA0649* cDNA Fragmente schon bei ihrer Ankunft funktionslos gewesen sein, da ihnen das 5'Ende fehlt. Es codiert für kein Protein, sondern das CpG island (CpG 85) agiert jetzt als ein alternativer *RBI* Promotor. Im Gegensatz zu dem 5'trunkierten, prozessierten *KIAA0649* Pseudogen in Intron 2 des *RBI* Gens sind die Gene *Zrsr1*, *Nnat* und *Mcts2*, die in Intron 1 des *Commd1* Gens und *Blcap* Gens bzw. in Intron 4 des *H13* Gens lokalisiert sind (Wang *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2009), unabhängige, aktive Gene, die in Antisense oder Sense Orientierung zu ihren Wirtsgenen transkribiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, über den die monoallelische Expression gewährleistet wird. Imprintingfehler führen zu Entwicklungsstörungen und einer veränderten Genexpression, was zu Imprintingkrankungen führt.

Das Prader-Willi Syndrom (PWS) wird durch den Funktionsverlust paternal exprimierter Gene in der 15q11q13 Region hervorgerufen, wobei allerdings nicht klar ist, welche Rolle die einzelnen Gene bei der phänotypischen Ausprägung des PWS spielen. In dieser Arbeit konnte durch eine Genotyp/Phänotyp Analyse von zwei Patienten mit PWS mit einer atypischen Deletion in 15q11q13 und einer Patientin mit einer unbalancierten Translokation  $t(X;15)(q28;q11.2)$  gezeigt werden, dass die paternal exprimierten Gene *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* keine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung des PWS haben.

Durch eine Kombination von Methylierungs-, Segregations- und Gendosisanalysen bei sieben Patienten konnte bestätigt werden, dass Imprintingfehler und Deletionen in der *DLK1/MEG3* Region zu einem Phänotyp führen, der vergleichbar mit dem Phänotyp ist, der ursprünglich bei dem Vorliegen einer maternalen uniparentalen Disomie 14 beschrieben wurde. Demnach scheint der Funktionsverlust der paternal exprimierten Gene *DLK1* und *RTL2* für den upd(14)mat Phänotyp verantwortlich zu sein.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob Kinder, die durch ICSI gezeugt wurden und ein niedriges Geburtsgewicht hatten, abnormale Methylierungsmuster an geprägten Loci aufweisen. Dazu wurden sechs geprägten Loci bei 19 ICSI-Kindern und 29 gleichaltrigen Kontroll-Kindern (natürlich gezeugt; normales Geburtsgewicht) untersucht. Unter 19 ICSI-Kindern zeigte ein ICSI-Kind Methylierungsveränderungen am *KCNQ1OT1* und am *MEST* Locus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem mittels ausgedehnten Methylierungsanalysen bei einem Patienten eine generalisierte Imprintingstörung nachgewiesen. Er zeigte eine Hypomethylierung sowohl an maternal als auch an paternal methylierten Loci. Die aberranten Methylierungsmuster liegen als somatisches Mosaik vor. Bisher wurde kein weiterer Fall mit einer Hypomethylierung an allen bekannten geprägten Loci beschrieben. Ausgehend von einer genomweiten Methylierungsanalyse dieses Patienten konnte gezeigt werden, dass im Intron 2 des *RBI* Gens ein elternspezifisch methyliertes CpG Island lokalisiert ist, das einen alternativen *RBI* Promotor beinhaltet. Das neu identifizierte, alternative *RBI* Transkript wird ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion dieses Transkripts und dessen klinische Relevanz zu klären.

## 6. Literatur

- Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE (2008) The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 45:193-199
- 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* 65:370-386
- Antonarakis SE, Blouin JL, Maher J, Avramopoulos D, Thomas G, Talbot CC, Jr. (1993) Maternal uniparental disomy for human chromosome 14, due to loss of a chromosome 14 from somatic cells with t(13;14) trisomy 14. *Am J Hum Genet* 52:1145-1152
- 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*
- Banerjee S, Smallwood A, Lamond S, Campbell S, Nargund G (2001) Igf2/H19 imprinting control region (ICR): an insulator or a position-dependent silencer? *ScientificWorldJournal* 1:218-224
- 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* 349:84-87
- Barlow DP (1993) Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 260:309-310
- Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Doderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445:671-675
- Bastepe M, Lane AH, Juppner H (2001) Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q-- and the resulting changes in GNAS1 methylation--as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *Am J Hum Genet* 68:1283-1289
- Bastepe M, Juppner H (2005) GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res* 63:65-74
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579-583
- Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI (2000) De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* 25:74-78
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21
- Bischof JM, Stewart CL, Wevrick R (2007) Inactivation of the mouse Magel2 gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* 16:2713-2719

- Bliek J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, Mannens MM (2001) Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* 10:467-476
- Bliek J, Terhal P, van den Bogaard MJ, Maas S, Hamel B, Salieb-Beugelaar G, Simon M, Letteboer T, van der Smagt J, Kroes H, Mannens M (2006) Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet* 78:604-614
- Bliek 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* 17:611-619
- Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalande 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* 8:2497-2505
- Boonen SE, Porksen S, Mackay DJ, Oestergaard E, Olsen B, Brondum-Nielsen K, Temple IK, Hahnemann JM (2008) Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings. *Eur J Hum Genet* 16:453-461
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294:2536-2539
- Branco MR, Oda M, Reik W (2008) Safeguarding parental identity: Dnmt1 maintains imprints during epigenetic reprogramming in early embryogenesis. *Genes Dev* 22:1567-1571
- 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* 89:5457-5461
- 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* 9:395-400
- Buiting K, Gross S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B (1998) Expressed copies of the MN7 (D15F37) gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* 81:247-253
- 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* 68:1290-1294
- 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* 72:571-577
- Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, Wawrzik M, Gross S, Horsthemke B (2007) C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* 89:588-595

- Buiting K, Kanber D, Martin-Subero JI, Lieb W, Terhal P, Albrecht B, Purmann S, Gross S, Lich C, Siebert R, Horsthemke B, Gillissen-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* 29:1141-1146
- Burger J, Horn D, Tonnie H, Neitzel H, Reis A (2002) Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 111:233-237
- Calounova G, Hedvicakova P, Silhanova E, Kreckova G, Sedlacek Z (2008) Molecular and clinical characterization of two patients with Prader-Willi syndrome and atypical deletions of proximal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 146A:1955-1962
- 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* 11:1527-1538
- 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* 73:898-925
- 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* 11:850-862
- Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA (1999) Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 8:2317-2323
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* 57:40-48
- 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* 8:1025-1037
- Cirio MC, Ratnam S, Ding F, Reinhart B, Navara C, Chaillet JR (2008) Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints. *BMC Dev Biol* 8:9
- Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, Tsuchiya K, Nicholls RD, Buiting K, Horsthemke B, Cassidy SB, Schwartz S (1997) Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 61:388-394
- Constancia M, Kelsey G, Reik W (2004) Resourceful imprinting. *Nature* 432:53-57
- 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* 13:1025-1032

- Coveler KJ, Yang SP, Sutton R, Milstein JM, Wu YQ, Bois KD, Beischel LS, Johnson JP, Shaffer LG (2002) A case of segmental paternal isodisomy of chromosome 14. *Hum Genet* 110:251-256
- Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71:162-164
- 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* 18:3257-3265
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP (2003) Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72:156-160
- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64:849-859
- 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* 18:888-897
- Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K, Maher ER, Cooper W, Reik W, Junien C, Graham G, Algar E, Der Kaloustian VM, Higgins MJ (2003) Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 40:797-801
- Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Kramer N, Janssen B, Zschocke J (2007) Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes* 21:208-215
- Ding F, Prints Y, Dhar MS, Johnson DK, Garnacho-Montero C, Nicholls RD, Francke U (2005) Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mamm Genome* 16:424-431
- Ding F, Li HH, Zhang S, Solomon NM, Camper SA, Cohen P, Francke U (2008) SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* 3:e1709
- Eggermann T, Wollmann HA, Kuner R, Eggermann K, Enders H, Kaiser P, Ranke MB (1997) Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet* 100:415-419
- Eggermann T, Schonherr N, Meyer E, Obermann C, Mavany M, Eggermann K, Ranke MB, Wollmann HA (2006) Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. *J Med Genet* 43:615-616
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* 27:341-344
- Engel E (1980) A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6:137-143

- 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* 65:174-183
- Fisher AM, Thomas NS, Cockwell A, Stecko O, Kerr B, Temple IK, Clayton P (2002) Duplications of chromosome 11p15 of maternal origin result in a phenotype that includes growth retardation. *Hum Genet* 111:290-296
- Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ (2002) Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet* 32:426-431
- Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B (2000) Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* 66:49-59
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646
- Gallagher RC, Pils B, Albalwi M, Francke U (2002) Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 71:669-678
- Garces C, Ruiz-Hidalgo MJ, Bonvini E, Goldstein J, Laborda J (1999) Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk. *Differentiation* 64:103-114
- Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* 23:199-202
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y (2003) In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 72:1338-1341
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y (2005) Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 37:1003-1007
- Hall JG (1990) Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 46:857-873
- Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA (2004) Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 75:526-528
- Hamabe J, Kuroki Y, Imaizumi K, Sugimoto T, Fukushima Y, Yamaguchi A, Izumikawa Y, Niikawa N (1991) DNA deletion and its parental origin in Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* 41:64-68
- Hannula K, Kere J, Pirinen S, Holmberg C, Lipsanen-Nyman M (2001) Do patients with maternal uniparental disomy for chromosome 7 have a distinct mild Silver-Russell phenotype? *J Med Genet* 38:273-278
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ (2005) Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod* 20:328-338

- 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* 405:486-489
- Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ (2004) Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *Bmj* 328:261
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H (2008) Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 22:1607-1616
- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F (1993) Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91:398-402
- Horsthemke B (2006) Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:45-59
- Horsthemke B, Buiting K (2006) Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 113:292-299
- 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* 16:1019-1023
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104:829-838
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080
- 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* 8:533-542
- Jin SG, Guo C, Pfeifer GP (2008) GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet* 4:e1000013
- Kagami M, Nishimura G, Okuyama T, Hayashidani M, Takeuchi T, Tanaka S, Ishino F, Kurosawa K, Ogata T (2005) Segmental and full paternal isodisomy for chromosome 14 in three patients: narrowing the critical region and implication for the clinical features. *Am J Med Genet A* 138A:127-132
- Kagami M, Nagai T, Fukami M, Yamazawa K, Ogata T (2007) Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 24:131-136
- 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* 40:237-242
- Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K (2009) A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:582-590

- 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* 10:853-856
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429:900-903
- Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG, Takahama Y (2000) A role for pre-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164:256-264
- Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452:112-115
- Katalinic A, Rosch C, Ludwig M (2004) Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril* 81:1604-1616
- Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H (2007) Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16:2272-2280
- Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R (2001) Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* 7:419-427
- Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Suda T (2005) PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion. *J Biol Chem* 280:21720-21725
- Kishore S, Stamm S (2006) The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 311:230-232
- Kiss T (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109:145-148
- Klenova EM, Morse HC, 3rd, Ohlsson R, Lobanenkov VV (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 12:399-414
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Glatt K, Graham JM, Jr., Kaplan L, Lalande M (1990) Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 47:149-154
- Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 16:2542-2551
- Kotzot D, Utermann G (2005) Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A* 136:287-305
- Kotzot D (2008) Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31:100-105
- Kozlov SV, Bogenpohl JW, Howell MP, Wevrick R, Panda S, Hogenesch JB, Muglia LJ, Van Gelder RN, Herzog ED, Stewart CL (2007) The imprinted gene Magel2 regulates normal circadian output. *Nat Genet* 39:1266-1272

- Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H (2008) Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol* 313:335-346
- Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA (1999) Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene. *Am J Hum Genet* 64:70-76
- Kuwano A, Mutirangura A, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Saitoh S, Niikawa N, Ledbetter SA, Greenberg F, Chinault AC, et al. (1992) Molecular dissection of the Prader-Willi/Angelman syndrome region (15q11-13) by YAC cloning and FISH analysis. *Hum Mol Genet* 1:417-425
- La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, Bourc'his D, Bestor TH, Trasler JM (2007) Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev Biol* 7:104
- Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V (1993) dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem* 268:3817-3820
- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R (2000) Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* 9:1813-1819
- Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, Surani MA (1998) Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet* 20:163-169
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3:662-673
- 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* 35:97-102
- Liu J, Chen M, Deng C, Bourc'his D, Nealon JG, Erlichman B, Bestor TH, Weinstein LS (2005a) Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5513-5518
- Liu J, Nealon JG, Weinstein LS (2005b) Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type IB. *Hum Mol Genet* 14:95-102
- Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, 3rd, Lobanenko VV (2002) BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6806-6811
- Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL (2005) Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 15:875-884
- MacDonald HR, Wevrick R (1997) The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* 6:1873-1878

- Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J, Goodship J, Hahnemann JM, Kant SG, Njolstad PR, Robin NH, Robinson DO, Siebert R, Shield JP, White HE, Temple IK (2006) A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 120:262-269
- Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 40:62-64
- Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A (2004) Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363:1700-1702
- Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, Sousa M (2008) Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 14:67-74
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403:501-502
- McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179-183
- Metivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452:45-50
- Miozzo M, Simoni G (2002) The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate* 81:217-228
- 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* 8:1209-1217
- Mitter D, Buiting K, von Eggeling F, Kuechler A, Liehr T, Mau-Holzmann UA, Prott EC, Wiczorek 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* 140:2039-2049
- Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS (2002) Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 22:5585-5592
- Moore MW, Dietz LG, Tirtorahardjo B, Cotter PD (2003) A multiplex methylation PCR assay for identification of uniparental disomy of chromosome 7. *Hum Mutat* 21:645-648
- Moore T, Haig D (1991) Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7:45-49
- 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* 38:300-302
- Muscатели F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H (2000) Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* 9:3101-3110

- Mutirangura A, Jayakumar A, Sutcliffe JS, Nakao M, McKinney MJ, Buiting K, Horsthemke B, Beaudet AL, Chinault AC, Ledbetter DH (1993) A complete YAC contig of the Prader-Willi/Angelman chromosome region (15q11-q13) and refined localization of the SNRPN gene. *Genomics* 18:546-552
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 9:64-71
- Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S (2005) A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65:6071-6079
- Nazlican H, Zeschning M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillesen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* 13:2547-2555
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 14:194-200
- Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC (2008) Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 3:181-187
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenko V (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 17:520-527
- Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2001) A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics* 73:232-237
- Ono R, Shiura H, Aburatani H, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2003) Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal chromosome 6. *Genome Res* 13:1696-1705
- Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Ogonuki N, Miki H, Kohda T, Ogura A, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2006) Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* 38:101-106
- Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K (2003) Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 72:218-219
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10:475-478
- Pask AJ, Papenfuss AT, Ager EI, McColl KA, Speed TP, Renfree MB (2009) Analysis of the platypus genome suggests a transposon origin for mammalian imprinting. *Genome Biol* 10:R1
- Paulsen M, Takada S, Youngson NA, Benchaib M, Charlier C, Segers K, Georges M, Ferguson-Smith AC (2001) Comparative sequence analysis of the imprinted Dlk1-Gtl2 locus in three mammalian species reveals highly conserved genomic elements and refines comparison with the Igf2-H19 region. *Genome Res* 11:2085-2094

- 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* 50:690-699
- Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R (2002) The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *Embo J* 21:5807-5814
- Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, Ettinger R, Rudikoff E, Riggins P, Farnsworth R, Tesfaye A, Laborda J, Bauer SR (2008) Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev* 17:495-507
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM (2002) Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245:304-314
- Reik W, Brown KW, Schneid H, Le Bouc Y, Bickmore W, Maher ER (1995) Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum Mol Genet* 4:2379-2385
- Reik W, Maher ER (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 13:330-334
- Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2:21-32
- Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP (2004) A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet* 21:437-443
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597-610
- Robinson WP (2000) Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* 22:452-459
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001) 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* 10:2687-2700
- Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K (2005) Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 116:228-230
- 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* 40:719-721
- Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22:26-35
- Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS (2002) Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 346:731-737
- Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ, Tilghman SM (2000) The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev* 14:1997-2002
- Schönherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann HA, Eggermann T (2007) The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 44:59-63

- Schule B, Albalwi M, Northrop E, Francis DI, Rowell M, Slater HR, Gardner RJ, Francke U (2005) Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC Med Genet* 6:18
- Schulz R, McCole RB, Woodfine K, Wood AJ, Chahal M, Monk D, Moore GE, Oakey RJ (2009) Transcript- and tissue-specific imprinting of a tumour suppressor gene. *Hum Mol Genet* 18:118-127
- Schulze A, Hansen C, Skakkebaek NE, Brondum-Nielsen K, Ledbeter DH, Tommerup N (1996) Exclusion of SNRPN as a major determinant of Prader-Willi syndrome by a translocation breakpoint. *Nat Genet* 12:452-454
- 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* 14:1741-1748
- Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2008) Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 40:243-248
- Shearwin KE, Callen BP, Egan JB (2005) Transcriptional interference--a crash course. *Trends Genet* 21:339-345
- Shemer R, Hershko AY, Perk J, Mostoslavsky R, Tsuberi B, Cedar H, Buiting K, Razin A (2000) The imprinting box of the Prader-Willi/Angelman syndrome domain. *Nat Genet* 26:440-443
- Skryabin BV, Gubar LV, Seeger B, Pfeiffer J, Handel S, Robeck T, Karpova E, Rozhdestvensky TS, Brosius J (2007) Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation. *PLoS Genet* 3:e235
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45
- Sun Y, Nicholls RD, Butler MG, Saitoh S, Hainline BE, Palmer CG (1996) Breakage in the SNRPN locus in a balanced 46,XY,t(15;19) Prader-Willi syndrome patient. *Hum Mol Genet* 5:517-524
- Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550
- Sutcliffe AG, Ludwig M (2007) Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 370:351-359
- Suzuki S, Ono R, Narita T, Pask AJ, Shaw G, Wang C, Kohda T, Alsop AE, Marshall Graves JA, Kohara Y, Ishino F, Renfree MB, Kaneko-Ishino T (2007) Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting. *PLoS Genet* 3:e55
- 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* 24:4791-4800
- Takada S, Tevendale M, Baker J, Georgiades P, Campbell E, Freeman T, Johnson MH, Paulsen M, Ferguson-Smith AC (2000) Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr Biol* 10:1135-1138
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3740-3745

- Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P (1991) Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 28:511-514
- 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* 44:637-640
- Toppings M, Castro C, Mills PH, Reinhart B, Schatten G, Ahrens ET, Chaillet JR, Trasler JM (2008) Profound phenotypic variation among mice deficient in the maintenance of genomic imprints. *Hum Reprod* 23:807-818
- Tsai CE, Lin SP, Ito M, Takagi N, Takada S, Ferguson-Smith AC (2002) Genomic imprinting contributes to thyroid hormone metabolism in the mouse embryo. *Curr Biol* 12:1221-1226
- Tsai TF, Armstrong D, Beaudet AL (1999) Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* 22:15-16
- Valleley EM, Cordery SF, Bonthron DT (2007) Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet* 16:972-981
- Wang Y, Joh K, Masuko S, Yatsuki H, Soejima H, Nabetani A, Beechey CV, Okinami S, Mukai T (2004) The mouse Murr1 gene is imprinted in the adult brain, presumably due to transcriptional interference by the antisense-oriented U2af1-rs1 gene. *Mol Cell Biol* 24:270-279
- Wawrzik M, Spiess AN, Herrmann R, Buiting K, Horsthemke B (2009) Expression of SNURF-SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *Eur J Hum Genet*
- Wenzel PL, Wu L, de Bruin A, Chong JL, Chen WY, Dureska G, Sites E, Pan T, Sharma A, Huang K, Ridgway R, Mosaliganti K, Sharp R, Machiraju R, Saltz J, Yamamoto H, Cross JC, Robinson ML, Leone G (2007) Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population. *Genes Dev* 21:85-97
- Whitelaw E, Martin DI (2001) Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 27:361-365
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, et al. (1995) Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* 56:237-238
- 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* 10:201-210
- Wood AJ, Schulz R, Woodfine K, Koltowska K, Beechey CV, Peters J, Bourc'his D, Oakey RJ (2008) Regulation of alternative polyadenylation by genomic imprinting. *Genes Dev* 22:1141-1146
- 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* 10:1711-1718

- Yang L, Zhao J, Lu W, Li Y, Du X, Ning T, Lu G, Ke Y (2005) KIAA0649, a 1A6/DRIM-interacting protein with the oncogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 334:884-890
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13:335-340
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153-154
- Zechner U, Kohlschmidt N, Rittner G, Damatova N, Beyer V, Haaf T, Bartsch O (2009) Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype. *Clin Genet* 75:251-258
- Zeschnick 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* 16:328-334
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2343-2360



**Locus: MEST (AC144863)**

17941 ccctgcgcgcg gctgtgggct gcggggtgcg cccccgctgc tggccagctc tgcacggctg  
 18001 cgggctctgc ggcgcccggg gctctgcaac gctgcggcgg gcggcatggg ataacgcggc  
 18061 catgggtgcg cgagatcgcc tccgcagggtg agtgtgcggg gggaacgagg ggggtgtggc  
 18121 ggcggccctg ggactagggc gcaggcgagc ggaggactgt gtgcccgtgt ccgagctggg  
 18181 gctgcctctg ggcgaaaact ctaccgacag gcggcacgca ttccgcgccc gctctgcta  
 18241 cttgaggagg ggggtgtcact cctgcccgca atggaatggt cagaacgcgg gacctccttg

1 CCCTGCGCGGGCTGTGGGCTGCGGGCTGCGCCCCGCTGCTGGCCAGCTCTGCACGGCTG  
 :::|++++|:|||||:|++|:|++:::++:|:||||:|:|:|++|:|  
 1 TTTTGC CGGGTTGTGGGTTGCGGGTTGCGTTTT**TCGTTGTTGGTTAGTTTTGTACGGTTG** + tag  
 61 CGGGCTCTGCGGCGCCCGGTGCTCTGCAACGCTGCGGCGGGCGGCATGGGATAACGCGGC  
 ++|:|:|++|++:++|:|:|:|++:|++|++|++|:|||||++++|:  
 61 CGGGTTTTGCGGCGTTCGGTGTTTTTGTAACGTTGCGGCGGGCGGTATGGGATAACGCGGT  
 121 CATGGTGC CGCAGATCGCCTCCGAGGTGAGTGTGCGGTGGGAACGAGGGGGTGTGGCT  
 :|:|:|++:++|:|++:|:++:|:|:|:|++|:|++|:|:|:|:|:|:  
 121 TATGGTGC GTCGAGATCGTTTTTCGTAGGTGAGTGTGCG**GTGGGAACGAGGGGGTGTGGTT** + tag  
 181 GCGGCCCTGGGACTAGGGCGCAGGCGAGCGGAGGACTGTGTGCCCGTGTCCGAGCTGGG  
 |++|:~:|:|:|:|++:|++|++|:|:|:|:~:~:~|:~:~|:~:~|:  
 181 **GGCGTTTTGGGATTAGGGCGTAGGCGAGCGGAGGATTGTGTGTTTCGTGTTTCGAGTTGGG**

**Primer MEST 5'-3'**

PEG1-Ftag CTTGCTTCCTGGCACGAG-TYGTTGTTGGTTAGTTTTGTAYGGTT

PEG1-RM13 CAGGAAACAGCTATGACCCAACCACACCCCCTCRTTCCCAC

**Sonstiges**

Annealing Temperatur 58°C

Keine SNPs

Sequenzierung mit Ftag 56°C

Produktgröße 184 bp

Der Forward-Primer wurde übernommen aus Sato *et al.* (Sato *et al.*, 2007) und mit einem "tag" am 5'-Ende versehen.









**Locus: NDN (ensembl)**

ATCTGATTTGGTAGGGAGTCGATCATTTTTTTATTGGAATTTCTCAGGATTTCCAACCTCAGACATCCACTTTACAGTTTACACA  
TTTTCTTGGACAAGCCCGACTGTTCCTCTCACTGGTTCGCATAAAGCTCATGTTTACAAAGCCGCCAGACCTTTCTCTGGGA  
CTCTCATATTTAACTTAATTCTGGATATAACCAGGTAAGCGTTTCCCAAGAACTTGACCCCAACATCCAAAAACTTAAGGT  
ATCTTTCCCTTAAACTGGCCCTTCTCCAGTACGCATCCATCTCACTTCTCTCCTGCCCTAGATCTTCTCAGCCCAAACAGGA  
AACCCCGGGATCGCTCTCCAGCAGGTGAAGCCTCGCCATGGACCCTCCCGTCCGGGGCCCGCGCTGCCCGCCCGCCCCA  
GCCGTGGCCAAGGCCGCGGTCCGCGAGGCGCAGTGCCTCGTCCCGCCGCCCGCCCTGCCCGTGCCTGCGGAAGGCGCC  
GCGCGCAGCAACGCGCACTTCTCTCCAGGAATCCGCGGAGGGAGCGCAGGCTCGAAGAGCTCCTGGACGCAGAGGCCCTGCC  
CTTGGCAGACGGCGCAGACATGTCAGAACAAGTAAGGATCTGAGCGACCCTAACTTTGCAGCCGAGGCCCCCAACTCCGAGG  
TGCACAGCAGCCCTGGGGTTTCGGAGGGGGTTCCCTCCGTCGCGACCTTGGCAGAGCCGAGAGCCCTCCTTAGGCCCGACG  
GCCGTCCCGCAGGCCGCGCCCTCCCGAGGCCCGAACGACGAGGGCGACCCGAAGGCCCTGCAGCAGGCTGCGGAGGAGGG  
CCGCGCCACCAGGCCCGAGCGCGGCCAGCCGGGCCCGGCACCGCCAGCCCGCGCAGCTGGTGCAGAAGGCGCACGAGC  
TCATGTGGTACGTGCTGGTCAAGGACCAGAAGAAGATGATCATCTGGTTTCCAGACATGGTGAAGATGTCATCGGCAGCTAC  
AAGAAGTGGTGCAGGAGCATCTCCGCGCACACAGCCTCATCCTCGCCCGGGTGTTCGGGCTGCACCTGAGGCTAACCAGCCT  
GCACACCATGGAGTTTGGCGTGGTCAAAGCGCTGGAGCCCGAGGAGCTGGACAGGGTGGCGCTGAGCAACCGCATGCCATGA  
CAGGCTCCTGCTCATGATCTGAGCCTCATCTACGTGAAGGGCCGCGGCCAGAGAGAGCGCCGCTTGAACGTGCTGCGC  
ATCCTGGGGCTGCGGCCCTGGAAGAAGCACTCCACCTTCGGGGACGTTCGGAAGCTCATCACTGAGGAGTTTCGTCCAAATGAA  
TTACCTGAAGTACCAGCGCTCCCATACGTGGAGCCGCCGAATACGAGTTCTTTTGGGGCTCCCGGCCAGCCGCGAAATCA  
CCAAGATGCAAATCATGGAGTTCTTGGCCAGGGTCTTTAAGAAAGAAGCCAGGCCCTGGCCCTCCCGATACAGAGAAGCTCTG  
GAGGAGGCCAGAGCTTGCGGGAGGCTAATCCCACTGCCACTACCTTCGCAGCAGTGTCTTGAGGACTAGCAAGTCTGGA  
GGCAGATGAATGGTTTCTGACCTCACCAGGGCTGTGGAAGGGTGGGGTGGGTCAATTATAGTATTCAGGATTTACAGTGCAG  
TATTCACGTGTAACTTTAAAGTTTTTCACTACAGTGCCTTTTATACCTTTAATGCAATGTTGTATTCAATTTGGGTACTATTGTGT  
AGTATTTAGGATGTATGCATGTTTGTATATGTAAGCTTGGTGGTGCCTTTTCGCTTTTGTGCTACCTTTCTGGATTTTGT  
ACCGAGATGTGCTAACTGATGAAATACATTGAGAAAGTTTCCATCTTATTCTTTTATATGGGACTGATGATGTGTGTGGG  
GTAGACTGCTCCTGCAGAGTTTGGAAAGATCACCAGCAAAGCCGGCCTAACCAAGAAAAGTCAAGGCCCTTCATGACCTTGC  
TGGGCACAGAAAACACCTCGTGGAGTACACTAATTTGAACTGGACTGGTCTCAGTGTGAGCACTTGGCACACTTTACTAAAC  
ACATATACAACCCACCGTGAGTCAACTTTAAAGTAAACATTAAGATTCTTGTGATACAATCATTTTTGGAAAAGTGTACTT  
TATCATTT

541 GAGCGCAGGCTCGAAGAGCTCCTGGACGCAGAGGCCCTGCCCTTGGCAGACGGCGCAGAC  
| | | + + : | | : | + + | | | | : | : | | | + + : | | | | : : | | | : | : | | + + | + + : | | :  
541 GAGCGTAGGTTTGAAGAGTTTT**TGGACGTAGAGGTTTTGTTTTG**TTAGACGGCGTAGAT + tag

601 ATGTCAGAACAAGTAAGGATCTGAGCGACCCTAACTTTGCAGCCGAGGCCCCCAACTCC  
| | | : | | | : | | | | | | | | : | | | + + : : | | : | | | : | : + + | | : : : : | | : +  
601 ATGTTAGAATAAAGTAAGGATTTGAGCGATTTTAAATTTTGTAGTCGAGGTTTTTAATTTT

661 GAGGTGCACAGCAGCCCTGGGGTTTCGGAGGGGGTTCTCCGTCCGCGACCCCTGGCAGAG  
+ | | | | : | : | : | : : | | | | | + + | | | | | | : | : + + : + + + + : : : | | | | | |  
661 **GAGGTGATAGTAGTTTTGGGGTTT**TCGGAGGGGGTTTTTTCGTTCCGCGATTTTGGTAGAG + tag

**Primer NDN 5'-3'**

NDN-MLPA-Ftag CTTGCTTCCTGGCACGAGTGGAYGTAGAGGTTTTGTTTTTG

NDN-MLPA-RM13 CAGGAAACAGCTATGACAAACCCCAAACTACTATACACCTC

**Sonstiges**

Annealing Temperatur 57°C

Keine SNPs in den Primern

Sequenzierung mit M13r 50°C

Produktgröße 159 bp



**PCR-Ansatz und –Programm für die SeQMA**

## Ansatz:

1,00 µl	BisDNA	
4,50 µl	dNTPs	1,25mM
2,50 µl	Puffer	10x (ohne MgCl <sub>2</sub> )
3,00 µl	MgCl <sub>2</sub>	25 mM
1,00 µl	Primer fw	20 pmol/µl
1,00 µl	Primer rev	20 pmol/µl
0,25 µl	AmpliTaq Gold	5 U/µl
<u>11,75 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
25,00 µl		

## PCR-Programm:

10'	95°C	
20"	95°C	
20"	X°C	35 Zyklen
30"	72°C	
7'	72°C	
∞	4°C	

### 7.3 Oligonukleotide für die Suche nach Sequenzvarianten im *CTCF* Gen bei subfertilen Männern

Primer	Sequence (5'-3')	Tm PCR	Seq-Primer / Temp.
CTCF-Ex1-F	actgccaccctccactctc	68°C	rev / 60°C
CTCF-Ex1-R	cagaacagcccatgctcttg		
CTCF-Ex2-F1	ctcataccaccccctctcc	62°C	fw / 60°C
CTCF-Ex2-R1	AGCACCACTCCACTTCTTC		
CTCF-Ex2-F2	AAGACCATCGGAGCCCTAGT	62°C	fw / 60°C
CTCF-Ex2-R2	ttgcataaaagccgacttga		
CTCF-Ex3-F	gcttcatccaggcaaaagtc	51°C	fw / 51°C
CTCF-Ex3-R	accatcacctgcccataag		
CTCF-Ex4-F	ttgaaaggacgatgtgctga	56°C	fw / 56°C
CTCF-Ex4-R	tggaaattcaagaaaagaagaca		
CTCF-Ex5-F	gaattccttggatgtttctgg	56°C	fw / 56°C
CTCF-Ex5-R	aaaagcctgtttgtaacagattc		
CTCF-Ex6-F	aatttaaatctctttacaatgctga	56°C	fw / 56°C
CTCF-Ex6-R	aacctgtaggtatcaggccttc		
CTCF-Ex7-F	ggtgagaaggggtgataa	56°C	rev / 56°C
CTCF-Ex7-R	ataggaccacgtccaaaga		
CTCF-Ex8-F	gaaaccccggttagaggag	56°C	fw / 56°C
CTCF-Ex8-R	cagccctccattctccata		
CTCF-Ex9-F	ttggggagggaataaaagg	56°C	fw / 56°C
CTCF-Ex9-R	gatcttccatgggggattt		
CTCF-Ex10-F	attgcctcgaagaactca	66°C	fw / 60°C
CTCF-Ex10-R	caaatagggctctggacac		
CTCF-Ex11-F1	tgcacagttataaattccaatcc	51°C	fw / 51°C
CTCF-Ex11-R1	ACCTGCAATGTTTCTTTGAAAT		
CTCF-Ex11-F2	TTCATGACAATGGATGACACAA	62°C	rev / 60°C
CTCF-Ex11-R2	TCATTTCTACTCAGTTTTCTTTTT		
CTCF-Ex11-F3	ACAAAATTTAAAGCTACCATAATGC	62°C	fw / 60°C
CTCF-Ex11-R3	TACAGGGGTGGAGACAGGTT		
CTCF-Ex11-F4	TTCTATCTGGATACAGAGGCAGATT	62°C	rev / 60°C
CTCF-Ex11-R4	acggtccaatttctccaca		

Primer, die im Exon liegen sind in Groß- und Primer, die im Intron liegen in Kleinbuchstaben aufgeführt.

**PCR-Ansatz und -Programm für die Suche nach Sequenzvarianten im CTCFL Gen**

## Ansatz:

4,00 µl	genomische DNA	(25 ng/µl)
3,00 µl	dNTPs	1,25mM
2,50 µl	Puffer	10x (ohne MgCl <sub>2</sub> )
3,00 µl	MgCl <sub>2</sub>	25 mM
0,50 µl	Primer fw	20 pmol/µl
0,50 µl	Primer rev	20 pmol/µl
0,20 µl	AmpliTaq Gold	5 U/µl
<u>11,00 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
25,00 µl		

## PCR-Programm:

10'	95°C	
20"	95°C	
20"	X°C	35 Zyklen
30"	72°C	
7'	72°C	
∞	4°C	

## 7.4 Oligonukleotide für die MS-PCR

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	5'-Modifikation	Annealing Temperatur
<i>MEG3</i>	IG-DMR-MF	GGTTTGTAAATTGTTAGCGATTTGTTAATTGC	---	58°C
	IG-DMR-MR	AAAACCGAAAAACCTAAAAAACG	5'FAM	
	IG-DMR-UF	ATTGTTAGTGATTTGTTAATTGTGA	---	
	IG-DMR-UR	AAAAAACCAAAAAACCTAAAAAACAA	5'FAM	
<i>GNAS</i>	GNAS-ME	GAAATCCCCGCTCTTCCGCGACGCGAACG	---	60°C
	GNAS-UNME	CTTCACAAACTTCTCAAATCCCCACTCTTCCACA	---	
	GNAS-FAM	GGGTTATTATGTTGAAGATGGTTATGAAG	5'FAM	
<i>NESP</i>	NESP-ME	GAGCGTGCGTATTTGTTTCGCGCGCG	---	60°C
	NESP-UNME	GTGTGTGTTGGAGTTGATTTTTTTTTGGTGGTGG	---	
	NESP-FAM	CATACAACCTAACCACCCRACCAACTAC	5'FAM	
<i>NESPAS</i>	NESPAS-ME	GTTTCGAGAGTAGTCGCGGTCGTCGCG	---	60°C
	NESPAS-UNME	GTGTGGTTGTTGTGTGTATTATGATGAAGGG	---	
	NESPAS-FAM	CTTCTCCRCCAAAAATACCTTCTTAACC	5'FAM	
<i>ARHI</i>	ARHI-ME	CGCGGTTTTATATTTTCGATTTGCGTATAGGAGCG	---	60°C
	ARHI-UNME	TGATTTGTGTATAGGAGTGGGGTGTGGGGGTG	---	
	ARHI-FAM-wobble	CTTCTAAACTAACCCTCRATTATTATAAATACC	5'FAM	
<i>GRB10</i>	GRB10-1-ME	CGGTAGGCGGGTAGGGGGTCGCGC	---	60°C
	GRB10-1-UNME	GTGAGTTTGTGGTAGGTGGGTAGGGGGTTGTGTG	---	
	GRB10-1-FAM	CCYCCCYCTCTCAAATACTCAAATAAACTCC	5'FAM	
<i>PEG3</i>	PEG3-2-ME	CGGGTACGTCGGCGTCGCGAGGTCG	---	60°C
	PEG3-2-UNME	GAGGGTAGTTGGGTATGTTGGTGTGTG	---	
	PEG3-2-FAM	CCAACAAAATCRACACCAATACTATCCC	5'FAM	
<i>RB1</i>	RB1-MF	GGTTTCGTTTTTTATGGTTCGGGTACGGTTTACG	---	58°C
	RB1-MR	AAAACGTA AAAACGACGACCATAACC	5'FAM	
	RB1-UF	GGTTTTGTTTTTTATGGTTGGGTATGGTTTATG	---	
	RB1-UR	CATAAAAACAACAACCATAACC	5'FAM	
<i>PLAGL1</i>	UPD6-MMR	TTCGGGGAAGCGTTTCGCGCGTTAAGGTT	---	60°C
	UPD6-PUR	GGTTATGATGGTGATTTGGGGAAGTGTTTTG	---	
	UPD6-F	CACRACATCTACCATTATCATTCAACC	5'FAM	
<i>MEST</i>	UPD7-MMF	TGGTTGTGGGTTTTGTGGTGTGGT	---	63°C
	UPD7-PUF	GGTTGTAGTTGTTCCGCGCGG	---	
	UPD7-R	TCCCACCRCACACTCACCT	---	
<i>MEG3</i>	UPD14MF	GTTAGTAATCGGGTTGTGCGGC	---	58°C
	UPD14MR	AATCATAACTCCGAACACCCGCG	---	
	UPD14UF	GAGGATRGTTAGTTATTGGGGT	---	
	UPD14UR	CCACCATAACCAACACCTATAATCACA	---	
<i>SNRPN</i>	MAT	TATTGCGGTAAATAAGTACGTTTTCGCGGGTC	---	58°C
	PAT	GTGAGTTTGGTGTAGAGTGGAGTGGTTGTTG	---	
	3'-Primer	CTCCAAAACAAAAACTTTAAAACCCAAATTCC	---	

Die Oligonukleotidsequenzen für die Loci *GRB10*, *PEG3*, *ARHI*, *GNAS*, *NESPAS* und *NESP* wurden von D. Mackay zur Verfügung gestellt.

Für die verschiedenen MS-PCRs wurden auch verschiedene Polymerasen verwendet: Die AmpliTaq Gold Polymerase wurde für die MS-PCR für *MEG3* IG-DMR, *ARHI*, *RBI* und *SNRPN* eingesetzt. Die AmpliTaq Gold Polymerase benötigt einer initialen Aktivierung bei 95°C für 10 min.

Für den Rest der aufgeführten Loci wurde das HotStarTaq Master Mix Kit von Qiagen verwendet. Das HotStarTaq Master Mix Kit benötigt einer initialen Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min.

### 7.5 Oligonukleotide für die RT-PCR (Expressionsanalyse)

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>SNURF-SNRPN</i>	RN134	GCTCAGTGAGGCAGTCCTTC	62°C
	RN175	AGAGTGGAGCGGCCCGCCGG	
<i>NDN</i>	RN700	AGCCCCAAAAGAACTCGTATT	56°C
	RN709	CAGAAGGCGCACGAGCTC	
<i>RBI</i>	CpG85-fw	CTGCCCTTGTTCTCCTGCT	58°C
	RB1-Exon3-rev	CTGATTCTATGTTTTTCTGTAGCTC	
<i>β-Aktin</i>	β-AktinF	TTGCTATCCAGGCTGTGCTA	56°C
	β-AktinR	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

### Oligonukleotide für die Exon connection PCR (nach der RT)

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>RBI</i>	CpG85-fw	CTGCCCTTGTTCTCCTGCT	58°C
	RB1-Exon3-rev	CTGATTCTATGTTTTTCTGTAGCTC	
	RB1-Exon4-rev	TCCAATTTGCTGAAGAGTGC	

### PCR-Ansatz und -Bedingungen für die RT-PCR bzw. Exon connection PCR

Ansatz für *RB1*:

10,00 µl	RT-Ansatz	(100-150 ng RNA)
8,00 µl	dNTPs	1,25mM
5,00 µl	Puffer	10x
1,00 µl	Primer fw	20 pmol/µl
1,00 µl	Primer rev	20 pmol/µl
1,00 µl	Advantage cDNA Polymerase Mix	50x
<u>24,00 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
50,00 µl		

PCR-Programm für *RB1*:

"CpG85-fw / RB1-Exon3-rev"			"CpG85-fw / RB1-Exon4-rev"		
95°C	1'		95°C	1'	
95°C	20"	5 Zyklen	95°C	20"	35 Zyklen
62°C	2' 30"		64°C	3'	
95°C	20"	5 Zyklen	68°C	3'	
60°C	2' 30"				
95°C	20"	30 Zyklen	4°C	4ever	
58°C	2' 30"				
95°C	20"	5 Zyklen			
56°C	2' 30"				
68°C	2'				
4°C	4ever				

Für *SNURF-SNRPN*, *NDN* und *β-Aktin* wurde die AmpliTaq Gold verwendet:

Ansatz

10,00 µl	RT-Ansatz	(100-150 ng RNA)
2,00 µl	MgCl <sub>2</sub>	25 mM
5,00 µl	Puffer	10x
1,00 µl	Primer fw	20 pmol/µl
1,00 µl	Primer rev	20 pmol/µl
0,50 µl	AmpliTaq Gold	5 U/µl
<u>30,50 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
50,00 µl		

PCR-Programm:

10'	95°C	
20"	95°C	
20"	X°C	35 Zyklen
30"	72°C	
7'	72°C	
∞	4°C	

### 7.6 Oligonukleotide für die 5'RACE

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>RBI</i>	5'RACE-CpG85-2as	CCCATAAAGAGTTCGCCTTTC	58°C
	5'RACE-CpG85-3as	CCCAGAAGCCTCAAGTCCAG	58°C

#### Ansatz:

##### RACE Kit „Schritt C“

10,00 µl	dA-tailed cDNA	
1,00 µl	Oligo dT-anchor primer	vial 8
1,00 µl	5RACE-CpG85-2as	12,5 µM
8,00 µl	dNTPs	1,25 mM
0,75 µl	High Fidelity Taq	5 U/µl
5,00 µl	Puffer	10x
<u>24,25 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
50,00 µl		

##### RACE Kit „Schritt D“

1,00 µl	PCR-Produkt aus „C“	
1,00 µl	Oligo dT-anchor primer	vial 8
1,00 µl	5RACE-CpG85-2as	12,5 µl
8,00 µl	dNTPs	1,25 mM
0,75 µl	High Fidelity Taq	5 U/µl
5,00 µl	Puffer	10x
<u>33,25 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
50,00 µl		

#### Programm:

94°C	2'	
94°C	15"	
58°C	30"	15x
72°C	40"	
94°C	15"	
58°C	30"	20x
72°C	40" +20"	
72°C	7'	

### 7.7 Oligonukleotide für die Sequenzierungsanalysen (genomische DNA)

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>KCNQ10T1</i>	LitnDNA5fw	GAGACCTTGCCCCGGGTTTC	61°C
	LitnDNA4rev	ACTGGCTGGGTGTGAGGT	
<i>MEST</i>	PEG1-fw	CCGGAGTGGCTGTAGCTG	61°C
	PEG1-rev	CGCCTGTCCGGTAGAGTTTTC	
<i>MEG3</i>	MEG3-IG-SNP-F	TACGGTCCTCAGGCAACTTC	61°C
	MEG3-IG-SNP-R	CCCACCTTCTGTCTCCACCAT	

#### PCR-Ansatz und -Programm für die Sequenzierungsanalysen von *KCNQ10T1* und *MEST*

Ansatz:

4,00 µl	genomische DNA	(25 ng/µl)
0,50 µl	Primer fw	20 pmol/µl
0,50 µl	Primer rev	20 pmol/µl
12,50 µl	GoTaq Green Master Mix	2x
<u>7,50 µl</u>	Merck-H <sub>2</sub> O	
25,00 µl		

PCR-Programm:

2'	95°C	
30"	95°C	
30"	X°C	35 Zyklen
1'	72°C	
5'	72°C	
∞	4°C	

PCR-Ansatz und -Programm für *MEG3* siehe 7.3

#### Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung (Bisulfit-behandelte DNA)

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>RBI</i>	Bis-CpG106-RB1-Ftag	CTTGCTTCCTGGCAGAG-TTAGGTTTTTTAGTTTAATTTTTTATGAT	60°C
	Bis-CpG106-RB1-RM13	CAGGAAACAGCTATGAC-AACTATAAAAAA ACRCCRAAAAAAAC	

PCR-Ansatz und -Programm siehe 7.2

### 7.8 Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Klonierung eingesetzt wurden

Locus	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing Temperatur
<i>KCNQ1OT1</i>	LIT1-Not1-Ftag	CTTGCTTCCTGGCACGAG-TTTATAGGTTTTTATATYGAGGGTTTATAGTAG	57°C
	LIT1-Not1-RM13	CAGGAAACAGCTATGAC-AAATAAACYRAAAACACRAACCAATTCTCTAC	
<i>SNRPN</i>	BisSNRPNfw	tgtaaacgacggccagtGGAGGGAGTTGGGATTTTTGTATTG	56°C
	BisSNRPNrev	caggaaacagctatgaccCCCCAACTATCTCTTAAAAAAAACCAC	
<i>RBI</i>	RB1-Ftag	CTTGCTTCCTGGCACGAG-TATATTTGGATGGTTTTTTTTAGTGT	56°C
	RB1-RM13	CAGGAAACAGCTATGAC-AAACCTCAAATCCAAAATCAC	

#### PCR-Ansatz und Programm für alle drei Loci siehe 7.2

Für die Allelspezifische Genexpressionsanalyse wurden die Primer „CpG85-fw“ und „RB1-Exon3-rev“ verwendet (s. Tabelle unter 7.5).

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte jeweils mit dem entsprechenden Forward- bzw. Reverse-Primer. Ausnahmen sind die Sequenzierung der Klone, die mit den Primern T7 bzw. SP6 erfolgte, und die Sequenzierung der PCR-Produkte für die SeQMA – hier wurde der Ftag- bzw. der RM13-Primer verwendet (s. Tabelle unter 7.1 und 7.2).

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir auf unterschiedliche Weise bei meiner Doktorarbeit geholfen haben. Ich danke insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm dafür, dass er mir die Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen ermöglicht hat.

Frau Dr. Karin Buiting für ihre große Hilfsbereitschaft, für die vielen Ratschläge und Antworten auf meine Fragen und die wissenschaftlichen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Des Weiteren danke ich ihr für ihre unendliche Geduld und für die freundschaftliche und großartige Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Lohmann für seine geduldigen Erklärungen, Ratschläge, Hilfsbereitschaft und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Meinen Kolleginnen Stephanie Groß, Christina Lich, Sabine Kaya, Saskia Seland, Stephanie Gkalypoudis und Melanie Heitmann für ihre jederzeit gewährte Unterstützung, technische Hilfe im Laboralltag und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Stefan Böhringer für seine Hilfe bei mathematischen Fragen und Herrn Dr. Michael Zeschknig für seine Ratschläge bei technischen Problemen.

Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke und Herrn Nicholas Wagner für ihre Hilfe bei jeder Art von Computer-Problemen.

Den Cytos (besonders Frau Regina Kubica und Frau Elke Jürgens) für ihre Geduld und die gute Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. Dagmar Wiczorek, Frau Dr. Beate Albrecht und Frau Dr. Alma Kuchler für die Beantwortung klinischer Fragen.

Allen hier nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine schöne Arbeitsatmosphäre, für die gute Zusammenarbeit und für das Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre immerwährende Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Personen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Lebenslauf

Name **Deniz Kanber**

Geburtsdatum 09.05.1981

Geburtsort Neuss

Staatsangehörigkeit deutsch

Promotion seit Mai 2006  
**Promotion im Fach Biologie** im Institut für Humangenetik,  
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Studium Oktober 2000 – August 2005  
**Studium der Biologie** an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
*Abschluss: Diplom*

Schulausbildung 1991 – 2000  
**Georg-Büchner-Gymnasium, Kaarst**  
*Abschluss: Abitur*

1987 - 1991  
**Grundschule, Kaarst**

Sprachen Deutsch Muttersprache  
Türkisch Muttersprache  
Englisch Fließend in Wort und Schrift  
Latein Latinum  
Spanisch Basiswissen

Auslandsaufenthalt August 2005 – November 2005  
Sprachreise nach Australien (Perth)

Kaarst, Oktober 2009

(Deniz Kanber)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Genomisches Imprinting und Imprintingkrankungen beim Menschen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Deniz Kanber befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

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

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin  
(Deniz Kanber)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche 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 abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin  
(Deniz Kanber)