

**Identifizierung und Expressionsanalyse der
SNURF-SNRPN Sense – *UBE3A* Antisense Transkriptionseinheit
in der Prader-Willi-/Angelman-Syndrom-Region auf Chromosom 15**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Maren Runte

aus Detmold

Juli 2003

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

3. Gutachter: /

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Obe

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2003

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht (in der Reihenfolge ihres Erscheinens):

Runte M, Färber C, Lich C, Zeschnigk M, Buchholz T, Smith A, Van Maldergem L, Bürger J, Muscatelli F, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B, Buiting K (2001) Comprehensive methylation analysis in typical and atypical PWS and AS patients with normal biparental chromosomes 15. *Eur J Hum Genet* 9 (7): 519-526.

Runte M, Hüttenhofer 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 (23): 2687-2700.

Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2003) *SNURF-SNRPN* and *UBE3A* transcript levels in patients with Angelman syndrome. Eingereicht bei *Human Genetics*.

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Epigenetik und genomisches Imprinting	1
1.2	Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom	7
1.2.1	Die PWS/AS-Region	8
1.2.2	Molekulargenetische Ursachen des PWS und AS	13
1.2.3	Mausmodelle für Defekte in der PWS/AS-Region	16
1.3	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Standardpuffer und –Medien	18
2.1.3	Enzyme	19
2.1.4	Vektoren	19
2.1.5	Bakterienstämme	19
2.1.6	Klone	20
2.1.7	cDNA-Bibliotheken	20
2.1.8	cDNA-Bibliothek-Filter	20
2.1.9	Northern-Blots	20
2.1.10	cDNA und RNA	21
2.1.11	Oligonukleotide	21
2.1.11.1	RT-PCR-Primer zur Charakterisierung der <i>SNURF-SNRPN</i> Exons	21
2.1.11.2	Oligonukleotide für allelspezifische Genexpressions-Analysen	23
2.1.11.3	Hybridisierungssonden	23
2.1.12	Patienten	24
2.1.12.1	Patienten mit Prader-Willi- oder Angelman-Syndrom	24
2.1.12.2	Patienten mit einem atypischen Methylierungsmuster	24
2.1.12.3	Patient mit einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom	26
2.1.13	Geräte	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Isolierung von DNA	27
2.2.1.1	Präparation von genomischer DNA aus peripherem Blut	27
2.2.1.2	Präparation von Phagen-DNA (nach Marzeluff)	28
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-, PAC- und BAC-DNA	28
2.2.2	Isolierung von RNA aus peripherem Blut	29
2.2.2.1	Präparation von RNA mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit von QIAgen	30
2.2.2.2	Präparation von RNA mit dem PAXgene RNA Blood Kit (QIAgen)	30
2.2.3	DNase-Behandlung der RNA	31
2.2.3.1	DNaseI-Behandlung mit dem RNase freien DNase Set (QIAgen)	31
2.2.3.2	DNaseI-Behandlung der RNA nach der Präparation	32

2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	32
2.2.5	Restriktionsspaltung von DNA	32
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.7	Reverse Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)	33
2.2.8	<i>Real-Time</i> quantitative RT-PCR (TaqMan®)	34
2.2.9	Allelspezifische Genexpressionsanalyse	36
2.2.10	Amplifikation von cDNA-Enden (5'- oder 3'-RACE)	37
2.2.11	Gelelektrophorese	38
2.2.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	38
2.2.12.1	Microcon-Methode	39
2.2.12.2	Millipore-Methode	39
2.2.12.3	Aufreinigung mit dem MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)	39
2.2.13	Sequenzierung von DNA	40
2.2.14	Southern-Blot Analyse	40
2.2.14.1	Southern-Blot	40
2.2.14.2	Radioaktive Markierung von DNA	40
2.2.14.3	Hybridisierung	41
2.2.14.4	Autoradiographie	41
2.2.15	Northern-Blot Analyse	42
2.2.16	Subklonierung von DNA-Fragmenten	42
2.2.16.1	Vektor-DNA	42
2.2.16.2	Insert-DNA	42
2.2.16.3	Ligation	43
2.2.16.4	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	43
2.2.17	Isolierung von Phagen aus einer Nieren-cDNA-Phagenbibliothek	44
2.2.17.1	Bestimmung des Phagentiters	44
2.2.17.2	Ausplattieren, Filterabzüge und Hybridisierung der Phagenbibliothek	44
2.2.17.3	Anfertigen einer Phagen-Stammkultur (High-Titer-Stock)	45
2.2.17.4	<i>In vivo</i> Exzisionsprotokoll mit Hilfe des ExAssist™ Helferphagen	46
3.	ERGEBNISSE	47
3.1	Methylierungsauffälligkeiten bei vier Patienten mit atypischem PWS und AS	47
3.1.1	Methylierungsanalysen in der chromosomalen Region 15q11-q13	48
3.1.2	Ausschluss struktureller Aberrationen und Deletionen in der IC-Region	51
3.1.3	Methylierungsanalyse des differentiell methylierten <i>CpG islands</i> des <i>KCNQ1</i> Antisense Transkripts in der chromosomalen Region 11p15.5	52
3.2	<i>SNURF-SNRPN</i> ist Teil einer großen und komplexen Transkriptionseinheit	53
3.2.1	Identifizierung von exprimierten Sequenzen telomerisch von <i>SNURF-SNRPN</i> Exon 20	53
3.2.2	Isolierung von cDNA-Klonen	58
3.2.3	Alle neu identifizierten Exons sind Bestandteile einer großen Transkriptionseinheit	61
3.2.4	Exons mit alternativen Spleißakzeptor- und donorstellen	64
3.2.5	Die <i>SNURF-SNRPN</i> Transkriptionseinheit ist das Wirtsgen für kleine nukleoläre RNA Gene	65
3.2.6	Alternative 3'-Enden der Transkriptionseinheit	73

3.2.7	Expressionsanalysen für die <i>SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit.....	75
3.2.7.1	Northern-Blot-Analyse	75
3.2.7.2	Expression der Transkriptionseinheit in multiplen Geweben.....	75
3.2.7.3	Allelspezifische Expressionsanalyse	76
3.2.8	Sind u1A und u1B alternative Startpositionen für die <i>SNURF-SNRPN</i> Transkriptionseinheit?	77
3.2.9	Expressionsprofil der <i>SNURF-SNRPN</i> -Transkriptionseinheit.....	78
3.2.10	Das <i>SNURF-SNRPN</i> Sense/ <i>UBE3A</i> Antisense Transkript	80
3.2.10.1	Biallelische Expression von <i>UBE3A</i> in peripherem Blut	80
3.2.10.2	Expressionsanalyse von Patienten mit Angelman-Syndrom und unbekanntem molekulargenetischen Defekt	81
3.2.10.3	Quantitative und allelspezifische Expressionsanalyse von Patienten mit Angelman-Syndrom und einer <i>UBE3A</i> -Mutation.....	83
4.	DISKUSSION	87
4.1	Die Methylierungsauffälligkeiten bei Patienten mit atypischem AS und PWS können nur einzelne Loci in 15q11-q13 betreffen.....	87
4.2	Das <i>SNURF-SNRPN</i> Gen ist eine sehr komplexe Transkriptionseinheit	89
4.2.1	Die Transkriptionseinheit dient als Wirtsgen für die verschiedenen snoRNA-Gene in 15q11-q13	90
4.2.2	Die <i>SNURF-SNRPN</i> Transkriptionseinheit startet am Imprinting-Center.....	94
4.2.3	<i>SNURF-SNRPN</i> ist ein Antisense-Transkript zu <i>UBE3A</i>	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG	104
6.	LITERATUR	105

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE

A	Adenin
AS	Angelman-Syndrom
BAC	Künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA; Kopie eines RNA Moleküls
cen	Centromer
Ci	Curie
Contig	Klone mit überlappenden Inserts (<i>contiguous</i> = zusammenhängend)
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
cpm	<i>counts per minute</i> , Impulse pro Minute
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i> , Teil einer exprimierten Sequenz
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) oder: Gramm
h	Stunde
IC	Imprinting-Center
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
Insert	Passagierfragment eines rekombinanten Klons
kb	Kilobasenpaare
LTR	<i>long terminal repeat</i> , terminale Sequenzwiederholung
M	Mol/l
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)
OD	Optische Dichte
PAC	Künstliches Chromosom von Bakteriophage P1
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units, Kolonienbildende Einheiten
Primer	Startermolekül für die DNA-Synthese
PWS	Prader-Willi-Syndrom
QRT-PCR	<i>Real-time</i> quantitative RT-PCR
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> , schnelle Amplifizierung von cDNA Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
snoRNA	<i>small nucleolar</i> RNA, kleine nukleoläre RNA
SRO	<i>smallest region of deletion overlap</i> , kleinste Überlappung von Deletionen
T	Thymin
tel	Telomer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtskultur
UPD	uniparentale Disomie
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

1.1 Epigenetik und genomisches Imprinting

Die Zellen von mehrzelligen Organismen sind genetisch homogen, aber strukturell und funktionell heterogen durch differentielle Expression verschiedener Gene. Viele dieser Unterschiede in der Genexpression entstehen während der Entwicklung und werden durch die Vielzahl der Mitosen erhalten. Stabile Modifikationen, die die differentielle Expression von Genen regulieren, bezeichnet man als „epigenetisch“, da sie vererbbar und unabhängig von der DNA selbst sind. Das „genomische Imprinting“ oder übersetzt die „genomische Prägung“ ist ein epigenetischer Prozess, bei dem in der elterlichen Keimbahn bestimmte Chromosomenabschnitte spezifisch modifiziert (geprägt) werden. Dies hat zur Folge, dass in den somatischen Zellen entweder nur das väterliche (paternale) oder nur das mütterliche (maternale) Allel eines Gens aktiv ist. Infolgedessen unterscheiden sich das väterliche und das mütterliche Genom funktionell. Transplantationsexperimente von Vorkernen bei Mauseizygoten bewiesen, dass sich das paternale und das maternale Genom nicht funktionell ersetzen können. Bei einem diploiden maternalen Chromosomensatz (gynogenetisch) ist extraembryonales Gewebe (Trophoblast) nahezu nicht vorhanden (Surani *et al.*, 1984). Das Trophoblastengewebe wird dagegen bei einem diploiden paternalen Chromosomensatz (androgenetisch) sehr stark ausgebildet, aber der Embryo ist retardiert und stirbt einige Tage nach der Implantation (Barton *et al.*, 1984). Analog werden beim Menschen embryonale Tumore mit einem zweifachen maternalen Chromosomensatz beschrieben, die aus Abkömmlingen der embryonalen Keimblätter bestehen und bei denen das Plazentagewebe fehlt (Teratom), sowie Degenerationen der Plazenta mit einem zweifachen paternalen Chromosomensatz, die einen vergrößerten Trophoblasten bilden, während der Embryoblast verkümmert (Blasenmole) (Hall, 1990).

Das Phänomen des Imprintings wurde bisher ausschließlich bei Säugetieren beobachtet. Schätzungen zufolge sind etwa 100 bis 200 menschliche Gene elternspezifisch geprägt. Bislang konnten etwa 50 Gene beim Menschen sowie bei der Maus identifiziert werden (<http://www.otago.ac.nz/IGC>; <http://www.geneimprint.com/databases/>; <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/imprin-viewdatagenes.html>). Diese Gene scheinen nicht willkürlich im Genom verteilt zu sein, sondern in bestimmten chromosomalen Regionen gehäuft aufzutreten (Reik und Maher, 1997). Dies deutet darauf hin, dass die primäre Kontrolle der Prägung nicht auf der Ebene von einzelnen Genen,

sondern von Chromosomendomänen stattfindet. Für die geprägte Region auf dem proximalen langen Arm des Chromosoms 15 konnte solch ein Element, das so genannte Imprinting-Center (IC), identifiziert werden, das für die Regulierung der elternspezifischen Expression notwendig ist (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996).

Chromosomen, die elternspezifisch exprimierte Gene tragen, fallen durch den phänotypischen Effekt der uniparentalen Disomie (UPD) auf. Eine UPD liegt vor, wenn zwei homologe Chromosomen denselben elterlichen Ursprung haben. Erstmals wurden phänotypische Unterschiede im Zusammenhang mit einer UPD bei der Maus beschrieben (Cattanach und Kirk, 1985). So sind Mausembryonen mit einer maternalen UPD des Chromosoms 11 kleiner und solche mit einer paternalen UPD 11 größer als ihre Geschwister. Auch beim Menschen weisen phänotypische Auffälligkeiten in Zusammenhang mit einer UPD auf chromosomale Regionen hin, die dem Imprinting unterliegen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Erkrankungen mit Hinweis auf elternspezifische Vererbung.

Erkrankung	UPD	Region	Gen	Expression	Referenz
Transienter Neonataler Diabetes Mellitus	upd(6)pat	6q22-q23	<i>ZAC1</i> (nicht gesichert)	pat	Temple <i>et al.</i> , 1996; Arima <i>et al.</i> , 2001
Silver-Russel-Syndrom	upd(7)mat	7q11-q13	nicht bekannt		Kotzot <i>et al.</i> , 1995
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	upd(11)pat	11p15.5	<i>IGF2, KCNQ1OT1, H19, CDKN1C</i>	pat, pat mat, mat	Henry <i>et al.</i> , 1991; Slatter <i>et al.</i> , 1994; Weksberg <i>et al.</i> , 2003
Hypotonie, motorische Entwicklungsverzögerung, milde faziale Dysmorphie, niedriges Geburtsgewicht, Kleinwuchs, vorzeitige Pubertät	upd(14)mat	14	<i>DLK1</i> (nicht gesichert)	pat	Antonarakis <i>et al.</i> , 1993; Moon <i>et al.</i> , 2002
Schwere mentale Retardierung, Muskel- und Skelettauffälligkeiten	upd(14)pat	14	nicht bekannt		Cotter <i>et al.</i> , 1997 ; Kurosowa <i>et al.</i> , 2002
Prader-Willi-Syndrom	upd(15)mat	15q11-q13	nicht bekannt		Nicholls <i>et al.</i> , 1989
Angelman-Syndrom	upd(15)pat	15q11-q13	<i>UBE3A</i>	mat	Malcolm <i>et al.</i> , 1991; Kishino <i>et al.</i> , 1997; Matsuura <i>et al.</i> , 1997

Als eine mögliche Ursache für eine UPD wurde ursprünglich eine Gametenkomplementation diskutiert (Engel, 1980). Dieser Mechanismus setzt eine Fehlverteilung des entsprechenden Chromosoms bei beiden Elternteilen voraus, denn es

würden sich eine für ein Chromosom nullisome Keimzelle und eine für das Chromosom disome Keimzelle komplementieren und in einer Zygote mit einem Chromosomenpaar uniparentaler Herkunft resultieren. Dies ist allerdings nur schwer nachzuweisen (Robinson, 2000). Gesicherte Hinweise gibt es dagegen auf die Entstehung einer UPD als Folge einer Chromosomen-Fehlverteilung (*non-disjunction*) während der Keimzellbildung. In Abb. 1.1 ist eine Fehlverteilung in der mütterlichen Meiose dargestellt.

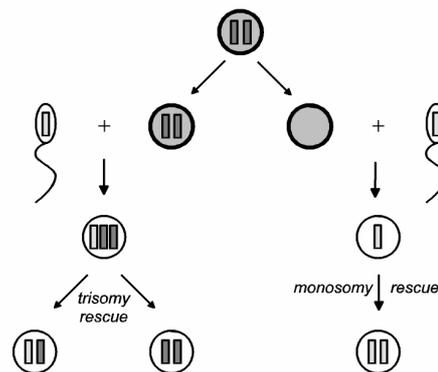


Abb. 1.1: Entstehung einer uniparentalen Disomie durch postzygotische Korrektur (*trisomy* bzw. *monosomy rescue*) einer Chromosomenfehlverteilung in der weiblichen Meiose. Es wird nur ein Chromosomenpaar dargestellt. Weibliche Keimzellen sind als graue Kreise dargestellt und männliche als Oval. Zygoten sind als weiße Kreise repräsentiert. Die mütterliche Prägung ist dunkelgrau dargestellt und die väterliche hellgrau.

Diese Fehlverteilung kann entweder während der Meiose I oder während der Meiose II auftreten. Bei der Befruchtung einer Keimzelle, die aufgrund einer Fehlverteilung in der Meiose disom ist, entsteht eine trisome Zygote. Es kann nun ein „Reparaturvorgang“ eintreten, der dazu führt, dass ein überzähliges Chromosom verloren geht (*trisomy rescue*). Geht ein Chromosom verloren, das aus der disomen Keimzelle stammt, so resultiert ein normaler Karyotyp. Geht dagegen das Chromosom verloren, das aus der normalen, monosomen Keimzelle stammt, so resultiert eine UPD (Engel, 1993). Ist die Fehlverteilung der Chromosomen in der Meiose I erfolgt, so liegen zwei heterozygote uniparentale Chromosomen vor (Heterodisomie). Ist die Fehlverteilung allerdings in der Meiose II erfolgt, in der die Chromatiden getrennt werden, resultieren zwei identische Chromosomen eines Elternteils (Isodisomie). Eine Isodisomie kann ebenfalls bei Befruchtung einer nullisomen Keimzelle mit einer normalen monosomen Keimzelle entstehen. In der Zygote kann eine Duplikation des Chromosoms zur postzygotischen Aufhebung der entstandenen Monosomie führen (*monosomy rescue*). Bei Rekombinationen vor der Fehlverteilung wechseln sich Bereiche von Hetero- und Isodisomie ab.

Der Prozess des Imprintings ist ein zyklischer Vorgang, der im Wesentlichen aus drei Schritten besteht (Barlow, 1995). Das genomische Imprinting, das die Unterscheidung der elterlichen Chromosomen (maternalen und paternalen Epigenotyp) ermöglicht, findet bereits während der Keimzellentwicklung statt. In den primordialen Keimzellen wird die Prägung aufgehoben, die von der vorhergehenden Generation geerbt wurde, und entsprechend des Geschlechts der Keimbahn neu etabliert (Imprint-Umschaltung). Dabei erhalten die Chromosomen der Spermien eine paternale Prägung und die der Oocyte eine maternale Prägung. Der zweite Schritt findet nach der Befruchtung statt. Postzygotisch wird das jeweils maternale bzw. paternale Prägungsmuster aufrechterhalten und an die Tochterzellen weitergegeben (Imprint-Replizierung). Die Imprint-Erkennung im Embryo und im adulten Organismus führt zu einer elternspezifischen Genexpression.

Die elterlichen Kopien unterscheiden sich aber nicht nur hinsichtlich ihres Expressionsmuster, sondern auch im Hinblick auf den Zeitpunkt der Replikation innerhalb des Zellzyklus (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994). In der Regel replizieren die paternalen Chromosomen früher als die maternalen. Da die asynchrone Replikationszeit auf die geprägte Region beschränkt ist, scheint sie durch *in cis*-wirkende Elemente reguliert zu sein (Greally *et al.*, 1998). Auch ist sie unabhängig von der Genexpression, so dass Gene, die gemeinsam auf einer elterlichen Kopie liegen, gleichzeitig repliziert werden, auch wenn sie von unterschiedlichen Allelen exprimiert werden (Kitsberg *et al.*, 1993). Somit müssen andere Faktoren bei der Regulierung der differentiellen Expression von Genen eine Rolle spielen. Dieses asynchrone Replikationsmuster wird in den Gameten etabliert und während der gesamten Entwicklung aufrechterhalten (Simon *et al.*, 1999).

Im Jahre 1975 wurde erstmals spekuliert, dass DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bei der Erhaltung bestimmter Expressionsmuster spielen könnte (Riggs, 1975; Holliday und Pugh; 1975). Bei der Methylierung handelt es sich um eine reversible epigenetische Modifikation, bei der an das 5'-Kohlenstoffatom eines Cytosinrestes eine Methylgruppe angehängt wird, so dass ein 5-Methylcytosin entsteht. Bei den Vertebraten sind die somatischen Genome global methyliert, mit Ausnahme von CpG reichen Regionen (*CpG-islands*) im 5'-Bereich von Haushaltsgenen und einigen gewebespezifischen Genen. *CpG-islands* sind Regionen, die mindestens 200 bp umfassen und einen GC-Gehalt von mehr als 50% haben. Der Quotient der tatsächlichen CpGs in Beziehung zu den erwarteten CpGs liegt über 0.6 (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). In der Regel sind die Promotoren von Genen, die in einem *CpG-island* liegen, in allen Stadien der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus unmethyliert (Bird *et al.*, 1986). Eine Ausnahme bilden dabei

die *CpG-islands* von Genen auf dem inaktiven X-Chromosom in weiblichen Individuen. Hier spielt Methylierung sowohl bei der Etablierung als auch bei der Erhaltung der Inaktivierung eine Rolle (Avner und Heard, 2001). Auch die meisten Gene, die dem Imprinting unterliegen, sind mit einer differentiell methylierten Region im 5'-Bereich assoziiert (Tycko *et al.*, 1997), die zur Unterscheidung der elterlichen Kopien beiträgt und bei der Regulation der Transkription geprägter Gene eine Rolle spielt (Razin und Cedar, 1994). In der Regel ist der Promotorbereich aktiver Genkopien unmethyliert, während er bei inaktiven Kopien methyliert vorliegt (Tate und Bird, 1993; Kass *et al.*, 1997). Allerdings können auch aktive Genkopien methyliert sein (Stöger *et al.*, 1993).

In den somatischen Zellen von Säugetieren wird das genomische Methylierungsmuster vermutlich durch die Aktivität der Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1 erhalten (Bestor, 2000). Zumindest in der Maus kommt es in zwei Entwicklungsperioden zu einer Reprogrammierung der Methylierungsmuster, allerdings scheinen diese Prozesse bei Säugetieren konserviert zu sein (Dean *et al.*, 2001). In den primordialen Keimzellen erfolgt zunächst eine Demethylierung von geprägten Genen und Einzelkopie-Genen, auf die eine *de novo* Methylierung in den weiblichen und männlichen Keimzellen folgt (Surani, 1998). Eine weitere Reprogrammierung erfolgt in den Embryos vor der Implantation, allerdings sind bei diesem Prozess die geprägten Gene ausgeschlossen. (Reik und Walter, 2001). Wenige Stunden nach der Fertilisation kommt es beim paternalen Genom zu einer aktiven Demethylierung, während das maternale Genom erst nach den ersten Zellteilungen passiv demethyliert wird (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Li, 2002). Genomweite *de novo* Methylierung erfolgt im Zeitraum der Implantation. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b (Okano *et al.*, 1999). Die Methyltransferase Dnmt3L hat selbst keine katalysierende Aktivität, ist aber essentiell für die Etablierung von Methylierungsmustern in der weiblichen Keimbahn (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002).

Neben der DNA-Methylierung spielen auch andere Faktoren wie die Histonproteine, die die Chromatinstruktur beeinflussen, eine Rolle bei der Erhaltung der Prägungsmuster. So konnte die Acetylierung bestimmter Lysine der Histone mit der Regulierung von Transkription in Zusammenhang gebracht werden. Änderungen im Acetylierungsstatus können sehr lokal auf ein oder zwei Promotor-nahe Nucleosomen begrenzt sein oder mehrere Chromatindomänen betreffen (Chen *et al.*, 1999; Schübeler *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte für geprägte Regionen gezeigt werden, dass DNA-Methylierung mit einer Hypoacetylierung von Histonen assoziiert ist (Jeppesen und Turner, 1993;

Fulmer-Smentek und Francke, 2001; Gregory *et al.*, 2001). Die Wichtigkeit der Histon-Deacetylasen (HDAC) konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, bei dem der Verlust von HDAC1 in embryonaler Letalität resultierte (Lagger *et al.*, 2002). Allerdings sind acetylierte Histone im Gegensatz zu Histonen, die eine Methylgruppe tragen, sehr labil, was ein Grund dafür ist, warum Histon-Methylierung als primärer Imprint für die Etablierung elternspezifischer Expression diskutiert wird. Für *Neurospora crassa* und *Arabidopsis thaliana* konnte nachgewiesen werden, dass die Methylierung von Histon H3 am Lysin 9 (Lys-9) für DNA-Methylierung durch spezifische Methyltransferasen notwendig ist (Tamaru und Selker, 2001; Jackson *et al.*, 2002). Das könnte auch bei Säugetieren der Fall sein. Für den *SNURF-SNRPN*-Promotor des maternalen Allels in der chromosomalen Region 15q11-q13 konnte bereits eine präferentielle Methylierung von Lys-9 von H3 gezeigt werden (Xin *et al.*, 2001), die von der Histon-Methyltransferase G9a abhängig ist (Xin *et al.*, 2003), und auch das inaktive X-Chromosom ist mit einer Lys9-Methylierung von H3 assoziiert (Heard *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die multiplen Histon-Modifikationen koordiniert verlaufen und von bestimmten Proteinen interpretiert werden (*'histone code'* Hypothese) (Strahl und Allis, 2000).

Die DNA-Methylierung, die scheinbar unter Einfluss von Histon-Modifikationen etabliert wird, kann die Expression von Genen auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Zum einen kann die Bindung von Proteinen verhindert werden, die *in trans* die Transkription von Genen beeinflussen. Dazu gehört zum Beispiel der Transkriptionsfaktor CTCF (*CCCTC-binding factor*) dessen Bindung die Wechselwirkung zwischen einem Transkriptionsverstärker (*Enhancer*) und dem Promotor eines Gens beeinflussen kann (Bell *et al.*, 1999; Ohlsson *et al.*, 2001). So wird z. B. die differentielle Expression der Gene *IGF2* und *H19* in der geprägten Region auf Chromosom 11 durch die gemeinsame Nutzung zweier *Enhancer*-Elemente 3' von *H19* reguliert, die vom Methylierungsstatus einer differentiell methylierten Region 5' von *H19* abhängt (Hark *et al.*, 2000). Methylierung verhindert die Bindung des Proteins CTCF, der *IGF2*-Promotor kann mit den *Enhancer*-Elementen in Wechselwirkung treten und *IGF2* wird exprimiert. Ist die Region nicht methyliert, kann CTCF binden und nur *H19* wird exprimiert. Eine Beteiligung von CTCF wird auch bei der X-Inaktivierung beschrieben (Chao *et al.*, 2002). Hier bindet das Protein an ein Element, das die X-Inaktivierung reguliert (*X-inactivation center*; *Xic*). Bei der Bindung von CTCF spielt sowohl CpG-Methylierung als auch nicht-CpG-Methylierung (Methylierung aller C-Nukleotide) eine Rolle (Chao *et al.*, 2002). Andere Proteine dagegen binden hauptsächlich an methylierte DNA und spielen eine Rolle bei der

Repression von Transkription. Die Charakterisierung des Proteins *MeCP2* (*Methyl-CpG-binding protein 2*) (Lewis *et al.*, 1992) und weiteren Angehörigen dieser Proteinfamilie (MBD1-MBD4; *methyl-CpG binding domain proteins*) (Hendrich und Bird, 1998) vermittelten Aufschluss über diesen Mechanismus. So interagiert MeCP2 mit einem Co-Repressor Komplex, der unter anderem auch HDACs enthält. Die daraus resultierende Histon-Modifizierung führt zum Verlust der Transkription (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998).

1.2 Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS), auch Prader-Labhard-Willi-Syndrom genannt, wurde im Jahre 1956 erstmals durch die drei Schweizer Pädiater und Endokrinologen A. Prader, A. Labhard und H. Willi beschrieben (Prader *et al.*, 1956) und tritt mit einer Häufigkeit von 1/15.000 bis 1/20.000 auf. Bei den betroffenen Kindern fallen direkt nach der Geburt eine ausgeprägte Muskelhypotonie, dadurch bedingte Fütterungsprobleme und Genitalhypoplasie auf. Das Wachstum ist verzögert und die Kinder zeigen eine moderate mentale Retardierung. Sie sind kleinwüchsig und haben auffallend kleine Hände und Füße. Ihre Gesichtszüge sind charakteristisch mit mandelförmigen Augen, einem dreieckigen Mund und einer schmalen Stirn (Abb. 1.2). PWS-Patienten entwickeln im Alter von ca. 2 Jahren ein übermäßiges Essverhalten, das in einer Adipositas resultiert. Im Erwachsenenalter treten besonders psychische Probleme durch vermindertes Selbstwertgefühl in den Vordergrund. Bei 5-10% der Patienten tritt ein Typ-II-Diabetes auf. Aufgrund der Symptomatik wird eine Störung des Hypothalamus vermutet, der ein Teil des Zwischenhirns ist und wichtige Regulationsvorgänge wie unter anderem Wärmeregulation, Wach- und Schlafrhythmus, Blutdruck- und Atmungsregulation, Nahrungsaufnahme (Hunger- und Sättigungsgefühl), Fettstoffwechsel und Sexualfunktion koordiniert. Lee *et al.* (1987) konnten zeigen, dass die nächtliche Ausschüttung von Wachstumshormonen bei vielen Patienten mit einem PWS vermindert ist. Behandlungen mit Wachstumshormonen führten nicht nur zu einer Steigerung der Wachstumsrate, sondern auch zu einer Umwandlung von Körperfett zu Muskelmasse aufgrund der anabolen Wirkung des Medikaments (Angulo *et al.*, 1992; Kamel *et al.*, 1995; Eiholzer *et al.*, 2000; Tauber *et al.*, 2000).

Der englische Pädiater Harry Angelman hat 1965 erstmals die klinischen Symptome des Angelman-Syndroms (AS) beschrieben, das mit einer Inzidenz von 1/10.000 bis 1/30.000

auftritt. Aufgrund des freundlichen Wesens der Patienten und häufiger unmotivierter Lachanfalle wurde es auch „*happy puppet syndrome*“ genannt. Die Patienten haben eine deutlich verzögerte motorische Entwicklung und bewegen sich ataktisch. Die Patienten entwickeln in der Regel keine oder nur minimale Sprache. Häufig sind Krampfanfälle und ein pathologisches Elektroenzephalogramm (EEG). Weiterhin sind kraniofaziale Auffälligkeiten wie Mikrozephalie und Prognathie für die Erkrankung charakteristisch (Abb. 1.2). Trotz der Entwicklung diagnostischer Kriterien, die bei der Diagnosestellung hilfreich sind (Williams *et al.*, 1995), ist die klinische Diagnose gerade in den ersten Lebensjahren schwierig. Deshalb wird das AS häufig unterdiagnostiziert. Eine mögliche Differentialdiagnose zu AS ist zum Beispiel das Rett-Syndrom (Williams *et al.*, 2001).

Prader-Willi-Syndrom



Angelman-Syndrom



Abb. 1.2: Patientin mit einem Prader-Willi-Syndrom (links) und Patient mit einem Angelman-Syndrom (rechts).

1.2.1 Die PWS/AS-Region

Eine Zuordnung des PWS zum proximalen langen Arm des Chromosoms 15 wurde 1981 zum ersten Mal von David Ledbetter *et al.* beschrieben. Durch cytogenetische Untersuchungen konnte bei einigen Patienten eine *de novo* Deletion auf dem langen Arm (15q11-q13) identifiziert werden (Ledbetter *et al.*, 1981; Ledbetter *et al.*, 1982). Nur wenige Jahre später wurden *de novo* Deletionen der gleichen Region auf Chromosom 15

homologe Mausgen *Ndn* wird spezifisch in postmitotischen Neuronen vor allem im Hypothalamus und anderen Hirnregionen exprimiert (Uetsuki *et al.*, 1996; Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000) und das Protein NECDIN führt dort zu einem Arrest des Zellwachstums (Hayashi *et al.*, 1995). Boccaccio *et al.* (1999) und Lee *et al.* (2000a) identifizierten unabhängig voneinander das intronlose Gen *MAGEL2* (*melanoma antigen gene expression like 2*), das 41 kb proximal von *NDN* lokalisiert ist und nahezu ausschließlich im Gehirn exprimiert wird. Sowohl *NDN* als auch *MAGEL2* gehören zu der Gruppe der MAGE Proteine, von denen bislang 55 Gene identifiziert wurden (Chomez *et al.*, 2001). Die Autoren postulierten, dass der Verlust der *MAGEL2*-Expression zu Fehlbildungen des Gehirns und zu Dysmorphien bei PWS-Patienten führen könnte.

Das *SNURF-SNRPN*-Gen wurde 1992 von Özcelik *et al.* in die chromosomale Region 15q11-q13 kartiert. Die Expression des Gens resultiert in einem bicistronischen Transkript, das für zwei unabhängige Proteine kodiert (Gray *et al.*, 1999a). Das Protein SmN ist das Genprodukt der Exons 4-10 (*SNRPN*) und Teil des Spleißosomen-Komplexes und ist dort assoziiert mit kurzen RNA-Abschnitten und daran gebundenen Proteinen, den „*small nuclear ribonucleoprotein particles*“. Es spielt eine Rolle beim Spleißen von mRNA im Gehirn, wo es das konstitutiv exprimierte SmB'/B-Protein ersetzt, das durch zwei alternativ gespleißte Isoformen repräsentiert wird (Gray *et al.*, 1999b). Die Exons 1-3 von *SNURF-SNRPN* enthalten die Sequenzinformation für SNURF (*SNRPN upstream reading frame*), ein aus 71 Aminosäuren bestehendes Protein, das RNA binden kann und im Nucleus lokalisiert ist (Gray *et al.*, 1999a). Die Funktion ist noch weitgehend unklar. Es konnten in den letzten Jahren Transkripte identifiziert werden, die alternative Exons proximal von *SNURF-SNRPN* enthalten und auf Exon 2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt werden (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Für diese alternativen Transkripte konnten zwei unterschiedliche Startpositionen nachgewiesen werden, u1A und u1B. Interessanterweise überspannen diese Transkripte das IC, aber eine Funktion ist bisher noch unbekannt. Weiterhin konnten alternative, nicht-kodierende 3'-Exons (*SNURF-SNRPN* Exons 10a-20) identifiziert werden (Buiting *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2001).

Die Region distal von *SNURF-SNRPN* beinhaltet verschiedene Gene für kleine nukleoläre RNAs (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs) (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a). Dabei wurden Einzelkopie-Gene (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A* und *HBII-438B*) identifiziert und solche, die als Multigen-Cluster repräsentiert sind (*HBII-85* und *HBII-52*). Das *HBII-85*-Cluster besteht aus 27 Genkopien und das *HBII-52*-Cluster weiter distal aus 47 Kopien. Bei snoRNAs handelt es sich um kleine, metabolisch stabile RNAs, die

aufgrund ihrer Sequenzmotive in zwei Gruppen unterteilt werden können. Dies sind zum einen die C/D-Box snoRNAs und zum anderen die H/ACA-Box snoRNAs, wobei es sich bei denen in der PWS/AS-Region um C/D-Box snoRNAs handelt, die die charakteristischen Sequenzmotive (C-, C'-, D'- und D-Boxen) und spezifische Struktur motive (*short inverted repeats* am 5'- und 3'- Ende) aufweisen. Eine Ausnahme ist das snoRNA-Gen *HBII-437*, das eine degenerierte D-Box enthält. *HBII-438A* und *HBII-438B* sind identisch und vermutlich durch Duplikation entstanden. In der Regel spielen snoRNAs eine Rolle bei der posttranskriptionalen Modifizierung von Nukleotiden ribosomaler RNA (rRNA), die im Rahmen der Biogenese eukaryotischer Ribosomen im Nucleolus als subnukleärer Einheit stattfindet. Aber auch eine Beteiligung bei der Modifikation von so genannten „*spliceosomal small nuclear*“ RNAs (snRNAs) konnte gezeigt werden. Durch Formation spezifischer Basenpaarungen, die das zu modifizierende rRNA-Nukleotid spannen, vermitteln C/D-Box snoRNAs eine 2'-O-Ribose-Methylierung und H/ACA snoRNAs eine Pseudouridylierung (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996; Bachellerie und Cavaillé, 1997; Ganot *et al.*, 1997; Smith und Steitz, 1998). Trotz hoher Konservierung ist die Funktion dieser Modifizierungen bisher weitgehend unbekannt. Im Allgemeinen liegen die snoRNA-Gene in den Introns von ubiquitär exprimierten Haushaltsgenen (Smith und Steitz, 1998; Pelczar und Filipowicz, 1998) und werden bei der Prozessierung der Prä-mRNA freigesetzt (Fragapane *et al.*, 1993; Tycowski *et al.*, 1993; Maxwell und Fournier, 1995; Cavaillé und Bachellerie, 1996). Interessanterweise werden die snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert. Mit Ausnahme vom *HBII-52* Gencluster, das gehirnspezifisch exprimiert wird, kann die RNA der anderen snoRNA-Gene hauptsächlich im Gehirn, aber auch in anderen Geweben nachgewiesen werden. Da keine Komplementarität dieser snoRNAs zu rRNA besteht, wird bei ihnen eine andere Funktion vermutet.

Zwischen dem *HBII-85*-Cluster und dem *HBII-52*-Cluster liegen die drei Exons des Gens *IPW* (*Imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region*), das als unabhängiges Gen beschrieben wird (Wevrick *et al.*, 1994). Eine Expression von *IPW* konnte in verschiedenen fetalen und adulten Geweben nachgewiesen werden, während das homologe Mausgen *Ipw* hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird (Wevrick und Francke, 1997). Distal von der kritischen Genregion für das PWS wurde das Gen für die E6-AP Ubiquitin Protein Ligase 3A (*UBE3A*) identifiziert (Sutcliffe *et al.*, 1997). Der alleinige Verlust der maternalen Kopie des *UBE3A*-Gens reicht aus, um zu AS zu führen (1.2.2). Das Genprodukt ist ein Enzym, welches Proteine mit Ubiquitin markiert und somit der

Degradierung durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zuführt (Scheffner *et al.*, 1995). Im Unterschied zu den paternal exprimierten Genen in der Region 15q11-q13, die in den meisten oder allen Geweben allelspezifisch exprimiert werden, ist die ausschließliche Expression vom maternalen Allel sowohl beim Menschen als auch bei der Maus anscheinend auf bestimmte Gehirnbereiche beschränkt (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997; Albrecht *et al.*, 1997). In Fibroblasten und Lymphoblasten soll das *UBE3A*-Gen biallellisch exprimiert werden (Sutcliffe *et al.*, 1997). Allerdings gibt es durch RNA-FISH-Analysen Hinweise auf eine präferentiell maternale Expression von *UBE3A* in Fibroblasten, Lymphoblasten und neuronalen Vorläuferzellen (Herzing *et al.*, 2002). Es wurde sowohl beim Menschen als auch in der Maus ein nicht-gespleißtes, paternal exprimiertes *antisense*-Transkript des *UBE3A*-Gens identifiziert (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2001).

Zwei unabhängige Arbeiten beschrieben ein weiteres Gen 200 kb distal von *UBE3A*, das im Gehirn ebenfalls ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert wird, das *ATP10C*-Gen (Meguro *et al.*, 2001a; Herzing *et al.*, 2001). Es kodiert für ein putatives Protein homolog zu der murinen Aminophospholipid-transportierenden ATPase *Atp10c*.

Mit Ausnahme der snoRNA-Gene weisen die paternal exprimierten Gene in der PWS/AS-Region eine differentiell methylierte Region in ihrem 5'-Bereich auf (Abb. 1.4). Für die maternal exprimierten Gene *UBE3A* und *ATP10C* dagegen wurde bisher keine differentielle Methylierung beschrieben.

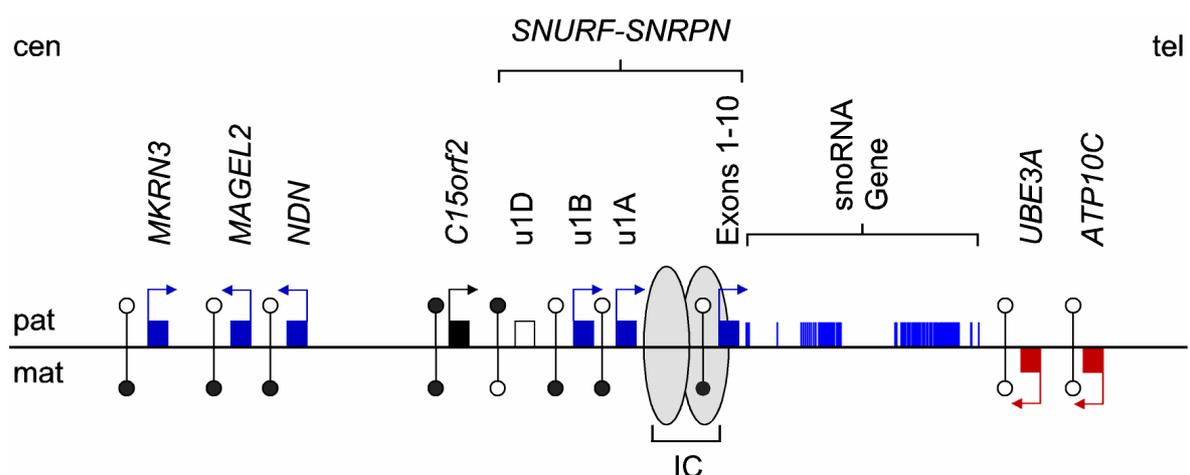


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der differentiellen Methylierung der Gene in der Region 15q11-q13. Die blauen Boxen repräsentieren paternal exprimierte Gene und die roten Boxen maternale Expression. In schwarz ist das biallellisch exprimierte Gen *C15orf2* dargestellt. Die snoRNA-Genkopien sind durch blaue Striche gezeigt. Die Pfeile an den Boxen weisen auf die Transkriptionsrichtung und die Kreise vor den Boxen repräsentieren Methylierung (schwarz) und keine Methylierung (weiß) hin. Das Imprinting-Center (IC) wird durch zwei graue Ovale dargestellt

Die typischen 4-5 Mb umfassenden Deletionen, die zu einem AS oder PWS führen können (1.2.2), schließen auch Gene mit ein, die nicht dem Imprinting unterliegen. Im centromerischen Bereich liegt *CI5orf2* (Abb. 1.3; Abb. 1.4), das intronlos ist und ausschließlich in Testis exprimiert wird (Färber *et al.*, 2000). Im distalen Bereich liegen die GABA-Rezeptor-Gene *GABRB3*, *GABRA5* und *GABRG3*, deren Verlust mit einer Modifizierung des AS-Phänotyps diskutiert wird (DeLorey *et al.*, 1998). Das P-Gen (*pink-eyed dilution*-Gen) ist mit Oculocutanem Albinismus Typ 2 (OCA2) assoziiert, einer autosomal rezessiven Erkrankung, die die häufigste Form von Albinismus ist. Der Verlust einer Genkopie führt bei Patienten mit AS und PWS und einer Deletion von 15q11-q13 zu einer Hypopigmentierung (Spritz *et al.*, 1997).

1.2.2 Molekulargenetische Ursachen des PWS und AS

De novo Deletionen der gesamten Region 15q11-q13 sind mit ca. 70% die häufigste Ursache für das PWS (paternal) bzw. AS (maternal) (Butler *et al.*, 1990; Knoll *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1999). Die Deletionsbruchpunkte liegen proximal gehäuft in zwei Regionen (*breakpoint cluster regions*, BP) um den Marker *DI5S18* (BP1 und BP2) und distal zwischen dem P-Gen und dem Marker *DI5S24* (BP3) (Christian *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1999) (Abb. 1.3). Die Instabilität dieser Regionen wird vermutlich durch duplizierte Gensequenzen (Duplikons) hervorgerufen, die in den Regionen der Chromosomenbrüche identifiziert werden konnten (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998a; Ji *et al.*, 1999; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999). Diese Duplikationen können zu ungleichen inter- und intra-molekularen Rekombinationen während der Meiose führen, die in den typischen Deletionen resultieren. Diese und weitere distale (BP4 und BP5) Bruchpunktregionen sind ebenfalls involviert in invertierte Duplikationen (Webb *et al.*, 1995), Triplikationen (Schinzel *et al.*, 1994; Cassidy *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1998; Ungaro *et al.*, 2001) und interstitielle Duplikationen, die wiederum mit einem autistischen Phänotyp assoziiert sind (Bundey *et al.*, 1994; Browne *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1997).

Bei zwei Patienten mit einem PWS, die keine Deletion der Region 15q11-q13 aufwiesen, konnten Nicholls *et al.* (1989) durch DNA-Polymorphismen das Vorhandensein von zwei maternalen Chromosomen 15, also eine maternale UPD, nachweisen. Bei beiden Patienten wurden zwei verschiedene homologe Chromosomen 15 von der Mutter ererbt (Heterodisomie). Analog dazu wurden bei einigen AS-Patienten uniparentale Disomien des Chromosoms 15 identifiziert, die immer paternalen Ursprungs waren (Malcom *et al.*,

1991). Eine maternale UPD findet man bei ca. 29% der PWS-Patienten (Mascari *et al.*, 1992) und eine paternale UPD bei ca. 1% der AS-Patienten (Knoll *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren wurde eine kleine Gruppe von Patienten identifiziert (1% bei PWS und 2-4% bei AS), die einen Imprinting-Defekt haben. Diese Patienten haben anscheinend biparentale Chromosomen 15, zeigen aber für die gesamte geprägte Region eine uniparentale Methylierung und Genexpression (Glenn *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1994; Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995, Saitoh *et al.*, 1996, Bürger *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; 1996; Buiting *et al.*, 1998b; Runte *et al.*, 2001b). Bei den Patienten mit PWS trägt das väterliche Chromosom eine maternale Prägung, während bei Patienten mit AS das mütterliche Chromosom eine paternale Prägung aufweist. In 10 bis 15% dieser Patienten beruht diese falsche Prägung auf einer Mikrodeletion des IC (Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996; Schuffenhauer *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 2000). Das IC reguliert *in cis* die Methylierung und Genexpression der gesamten geprägten Region 15q11-q13. Das IC überlappt mit dem Exon 1 des *SNURF-SNRPN* Gens und hat eine zweigeteilte Struktur (Buiting *et al.*, 1995). Familiäre IC Deletionen bei AS sind immer von der Mutter und dem mütterlichen Großvater ererbt, während sie bei PWS immer von dem Vater und der väterlichen Großmutter ererbt sind. IC Deletionen bei Patienten mit AS betreffen den mehr centromerischen Bereich des IC und haben ihren kleinsten überlappenden Deletionsbereich (AS *smallest region of deletion overlap*, AS-SRO) mit 880 bp 35 kb stromaufwärts des *SNURF-SNRPN* Gens (Abb. 1.5). Der AS-SRO enthält ein Element, das notwendig ist, um in der weiblichen Keimbahn den maternalen Imprint zu etablieren. Bei PWS Patienten betreffen die IC Deletionen eher den telomerischen Bereich des IC. Der kleinste überlappende Deletionsbereich (PWS-SRO) spannt Exon 1 von *SNURF-SNRPN* und hat eine Größe von 4.3 kb (Abb. 1.5). Der PWS-SRO ist notwendig für die postzygotische Erhaltung des paternalen Imprints (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001).

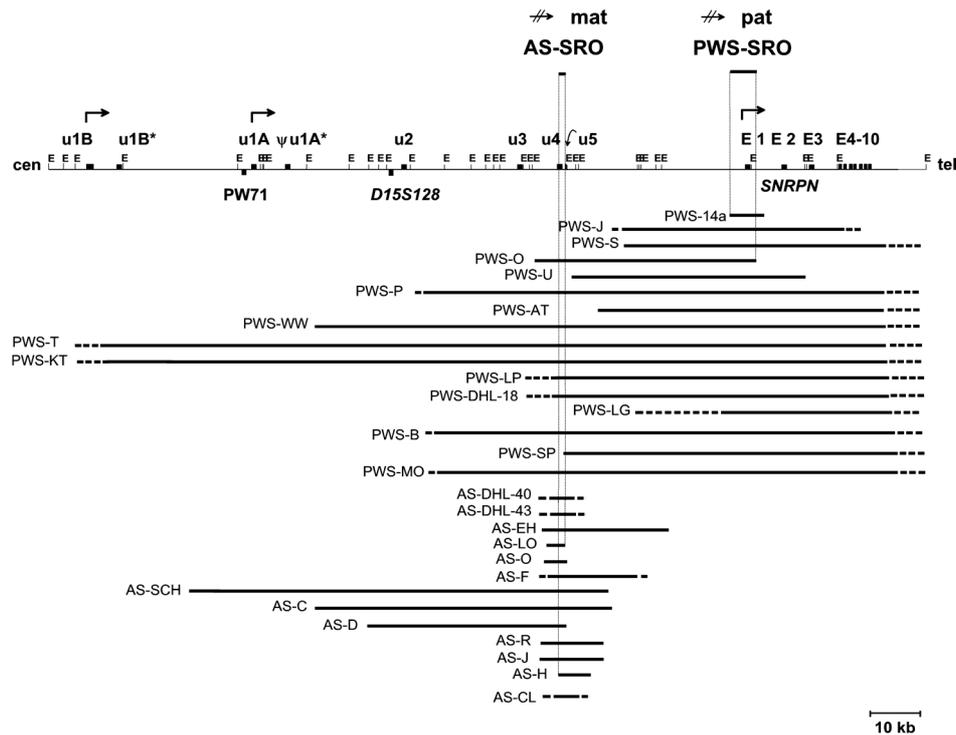


Abb. 1.5: Das Imprinting-Center wird definiert durch Mikrodeletionen von AS-Patienten (AS-X) und PWS-Patienten (PWS-X) mit einem Imprinting-Defekt. Die Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Deletionen haben je einen kleinsten überlappenden Deletionsbereich (AS-SRO bzw. PWS-SRO) (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996; Buiting *et al.*, 1999a; Färber *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b). Der AS-SRO ist 880 bp groß und beinhaltet das Exon u5. Der PWS-SRO ist 4.3 kb groß und beinhaltet das Exon 1 des *SNURF-SNRPN*-Gens.

In etwa 85 bis 90% aller Patienten mit PWS oder AS und einem Imprinting-Defekt findet man keine Punktmutationen oder kleine Deletionen in den kritischen Bereichen des IC, dem PWS-SRO bzw. dem AS-SRO, was darauf hinweist, dass der Imprinting-Defekt bei diesen Patienten auf einer Epimutation beruht. In etwa 30% aller Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt ohne IC Deletion wird ein Methylierungs mosaik identifiziert, d.h. die Anwesenheit einer schwachen methylierten maternalen Bande im Exon 1-Bereich des *SNURF-SNRPN* Gens (Buiting *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass diese Patienten ein Mosaik für normale Zellen und solche mit einem Imprinting-Defekt sind. Das lässt vermuten, dass AS Epimutationen häufig postzygot entstehen und so zum Mosaik führen. Im Gegensatz zu den AS Patienten, wo das Chromosom 15 mit dem Imprinting-Defekt sowohl von der mütterlichen Großmutter als auch vom mütterlichen Großvater stammen kann, ist das falsch geprägte Chromosom 15 bei PWS ausschließlich von der väterlichen Großmutter ererbt (Buiting *et al.*, 2003). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die epigenetische Prägung von chromosomalen Bereichen von einer Generation zur nächsten nicht komplett aufgehoben wird (*epigenetic inheritance*).

Annähernd 25% der AS-Patienten haben weder eine *de novo*-Deletion in 15q11-q13 noch eine UPD oder einen Imprinting-Defekt und in etwa 10-15% dieser Patienten wird eine Mutation im *UBE3A*-Gen nachgewiesen (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1999). Liegt die Mutation auf dem mütterlichen Chromosom, wird in den Zellen, die *UBE3A* monoallelisch exprimieren, kein funktionsfähiges Enzym gebildet und es resultiert ein AS. In einigen Patienten allerdings, die einen AS-Phänotyp zeigen, ist die Ätiologie der Erkrankung unklar, da keiner der bisher bekannten Defekte (große Deletion, UPD, Imprinting-Defekt, *UBE3A*-Mutation) identifiziert werden konnte. Beim PWS gibt es keine Patientengruppe mit einem Einzelgendefekt, was darauf hinweist, dass das PWS durch den Verlust oder die Inaktivierung mehrerer paternal exprimierter Gene entsteht (*contiguous gene syndrome*) (Nicholls *et al.*, 1998).

1.2.3 Mausmodelle für Defekte in der PWS/AS-Region

Auf Chromosom 7 der Maus befindet sich eine zu der humanen Region 15q11-q13 orthologe, ebenfalls geprägte Region mit einer konservierten syntänen Anordnung der homologen Gene (Chaillet *et al.*, 1991). Mäuse mit einer paternalen Deletion von *Snurf-Snrpn* Exon 2 (Tsai *et al.*, 1999a) und auch Mäuse mit homo- oder heterozygoter Nullmutation des offenen Leserahmens von SmN (Yang *et al.*, 1998) zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Verschiedene Maus-Modelle für das *Necdin*-Gen wurden generiert. Während ein Mausstamm mit paternalem Verlust des *Ndn*-Gens keine Auffälligkeiten zeigte (Tsai *et al.*, 1999b), führte eine ähnliche Deletion in anderen Mausstämmen zu postnataler Letalität durch respiratorische Defekte mit variabler Penetranz (Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000). Ein Maus *Knock-out* für das *MKRN3*-Homolog *Zfp127* zeigte keinen auffälligen Phänotyp und wurde als lebensfähig, fertil und nicht fettleibig beschrieben (Jong *et al.*, 1999b). Im Gegensatz dazu resultieren sowohl eine maternale Duplikation der orthologen Mausregion auf Chromosom 7 (Cattanach *et al.*, 1992) als auch eine paternale Deletion der PWS/AS-Region durch eine transgene Insertion (Gabriel *et al.*, 1999) in einem PWS-ähnlichen Phänotyp. Yang *et al.* (1998) konnten erstmalig zeigen, dass eine regionale Kontrolle durch ein IC auch in der Maus vorhanden ist, denn eine heterozygote *Knock-Out* Maus für Exons 1-6 des *Snurf-Snrpn*-Gens sowie für den distalen Teil des putativen Maus-IC resultiert im Expressionsverlust von *Zfp127*, *Ndn* und *Ipw* und führt zu PWS-Symptomen. Eine Deletion der gesamten Region von *Snurf-Snrpn* bis *Ube3a* auf dem paternalen Chromosom führt zu Mäusen mit Wachstumsverminderung, Hypotonie und neonataler Letalität (Tsai *et al.*, 1999a), während eine Deletion von *Ipw* bis *Ube3a* zu

keinem auffälligen Phänotyp führt (Nicholls *et al.*, 1999). Ein *Ube3a*-Nullallel auf dem maternalen Chromosom resultiert in fertilen Tieren, die eine milde Verhaltensauffälligkeit wie z.B. Defizit in Motorik und Koordination, Lernschwierigkeiten und Krampfanfälle zeigen, was einem AS-Phänotyp entspricht (Jiang *et al.*, 1998). Auch eine partielle paternale UPD des Mauschromosom 7 induziert einen AS-ähnlichen Phänotyp (Cattanach *et al.*, 1997). Maternale Deletionen des Gens *Atp10c* führen bei Mäusen zu einem erhöhten Körperfett (Dhar *et al.*, 2000).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die elternspezifische Methylierung ermöglicht in Regionen, die dem genomischen Imprinting unterliegen, die Unterscheidung der beiden parentalen Kopien. Noch immer ist der Mechanismus unklar, der zur Etablierung des Methylierungsprints in der Region 15q11-q13 führt. Allerdings ist klar, dass das IC eine wesentliche Rolle dabei spielt. Es konnte in Promotionsarbeit von Claudia Färber gezeigt werden, dass bei AS- und PWS-Patienten mit einem Imprinting-Defekt eine aberrante uniparentale Methylierung der biparentalen Kopien für alle untersuchten Loci in der geprägten Region vorliegt. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten Patienten mit einem atypischen PWS bzw. AS Phänotyp, die in der Routinediagnostik durch eine abweichende Methylierung an nur einem von zwei untersuchten Loci aufgefallen waren, hinsichtlich ihres Methylierungsstatus an verschiedenen Loci in 15q11-q13 untersucht werden, um weiteren Aufschluss über eine Regulierung des Methylierungsprints durch das *in cis*-wirkende IC zu erhalten.

Der distale Teil des IC (PWS-SRO) schließt das Exon 1 des *SNURF-SNRPN*-Gens mit ein. Vorangegangene Arbeiten wiesen darauf hin, dass es sich hier um einen sehr komplexen Locus handelt, für den alternative Transkripte identifiziert wurden, die entweder zusätzliche 5'- oder 3'-Exons enthalten. Zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit war nicht klar, ob es weitere distale Exons gibt. Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Des Weiteren konnten in die Region distal dieses Gens verschiedene snoRNA-Gene kartiert werden, die in der Regel aus Introns gespleißt und somit aktiviert werden. Bekannte genomische BAC- und PAC-Sequenzen aus dieser Region sollten auf die Anwesenheit exprimierter Sequenzen untersucht werden, um ein oder mehrere potentielle Wirtsgene für diese snoRNA-Gene zu identifizieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen. Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Standardpuffer und Medien

Standardlösungen

Denhardts:	0.02% Ficoll, 0.02% Polyvinylpyrrolidon, 0.02% BSA
10x Ladepuffer:	0.25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA
SM:	50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂
SSC:	150 mM NaCl, 15 mM Na ₃ -Citrat
SSPE:	180 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA pH 7.4
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
TE:	10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA

Standardmedien:

LB-Medium:	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Platten:	LB-Medium, 1.2% Bacto-Agar (Difco), 100 µg/ml Ampicillin, 16 µg/ml X-Gal
LM-Medium:	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl
NZY-Medium:	0.5% NaCl, 0.2% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5% Hefeextrakt, 1% NZ-Amin (ICN), pH 7.5 (mit NaOH)
NZY-Platten:	NZY-Medium, 1.5% Bacto-Agar (Difco)

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, GibcoBRL und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Weitere Enzyme

Alkalische Phosphatase	(Boehringer Mannheim)
<i>AmpliTaq</i> [®] -Polymerase	(Perkin Elmer, Heidelberg)
Desoxyribonuklease I (DNase I)	(Boehringer Mannheim)
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	(Boehringer Mannheim)
Proteinase K	(Boehringer Mannheim)
MuLV Reverse Transkriptase	(Perkin Elmer)
Ribonuklease A	(Boehringer Mannheim)
Ribonuklease T ₁	(Boehringer Mannheim)
RNase-Inhibitor	(Perkin Elmer)
T ₄ -DNA-Ligase	(Boehringer Mannheim, Promega Mannheim)
Terminale Transferase	(Boehringer Mannheim, GibcoBRL)

2.1.4 Vektoren

pBluescript	(Stratagene)
PGEM [®] -T Easy	(Promega)
PT7T3	(Pharmacia)

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α :	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi-1, λ^-, recA, gyrA96, relA1</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ['] :	<i>$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac [F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$</i>
<i>E. coli</i> XL0LR:	<i>$\Delta(mrcA)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r)] Su^-$</i> (nonsuppressing), λ^r (Lambda resistant)

2.1.6 Klone

Die cDNA-Klone wurden über das *RessourcenZentrum/Primär Datenbank* (RZPD), Berlin, bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete EST-Klone. Die Abkürzung n.a. steht für „nicht angegeben“.

GenBank <i>Accession</i> -Nummer	EST-Name	Vektor	Sequenz [bp]	Klonierungsstelle
AI968076	wu12g11.x1	pT7T3D-Pac	461	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
AW962047	EST374120	n.a.	653	n.a.
AI990296	ws39a03.x1	pT7T3D-Pac	483	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
AI638004	tt30h10.x1	pT7T3D-Pac	459	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
AW237252	xm68h10.x1	pT7T3D-Pac	413	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
BE313142	601153708F1	pOTB7	683	<i>XhoI</i> / <i>EcoRI</i>
AV723198	AV723198	pBluescript sk(-)	673	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
H93815	yv06h09.r1	pT7T3D	294	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
N88423	K3365F	Lambda ZAP Express	394	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
T34179	EST63776	n.a.	288	n.a.
R11106	yf39e05.r1	pT7T3D	315	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
AV727404	AV727404	pBluescript sk(-)	449	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
AI672541	wb32d12.x1	pT7T3D-Pac	446	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
R19540	yg26f01.r1	Lafmid BA	269	<i>NotI</i> / <i>HindIII</i>
N52596	yz23d02.s1	pT7T3D	253	<i>NotI</i> / <i>EcoRI</i>
W90381	zh75e05.s1	pT7T3D	307	<i>PacI</i> / <i>EcoRI</i>
W90408	zh75e05.r1	pT7T3D	452	<i>PacI</i> / <i>EcoRI</i>
AA678360	zi25g05.s1	pT7T3D	419	<i>PacI</i> / <i>EcoRI</i>
T95551	ye44a10.r1	pT7T3D	280	<i>PacI</i> / <i>EcoRI</i>
T95552	ye44a10.s1	pT7T3D	328	<i>PacI</i> / <i>EcoRI</i>

2.1.7 cDNA-Bibliotheken

Die verwendete cDNA-Bibliothek aus humaner Niere (Oligo(dT) *primed*) wurde uns von Lutz Schomberg vom Max-Planck-Institut für Medizinische Endokrinologie in Hannover zur Verfügung gestellt. Sie ist für Inserts zwischen 3 und 12 kb gröbenselektioniert, die in den Vektor λ ZAP Express kloniert sind. Der Wirtstamm (*Escherichia coli*) ist XL1 Blue MRF'.

2.1.8 cDNA-Bibliothek-Filter

Die verwendeten Filter (cDNA-Bibliothek fetales Gehirn; No. 564) wurden vom *RessourcenZentrum/Primär Datenbank* (RZPD), Berlin, bezogen.

2.1.9 Northern-Blots

Human bzw. Human fetal Multiple Tissue Northern Blot I und II (Clontech)

2.1.10 cDNA und RNA

Human Fetal Brain Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)

Human Fetal Brain total RNA (Clontech)

2.1.11 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide oder Primer, die nicht bereits im Institut etabliert waren, wurden mit dem Programm Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) ausgesucht.

2.1.11.1 RT-PCR-Primer zur Charakterisierung der *SNURF-SNRPN* Exons

Es wurden mit den in Tabelle 2.2 genannten Oligonukleotiden verschiedene PRCs und RT-PCRs zur Identifizierung von Exons der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit durchgeführt.

Tabelle 2.2: Sequenzspezifische Oligonukleotide

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' Orientierung)
NG83	GCCCTGCAGAGTCCTGTAGT
NG84	CACCTGCCAGCACACAGT
NG95	GAGGTGGTACCAGTTTAAGAAGTGA
NG96	AGAATCCAGGACTCCGTGTG
AI990296a	TGTTGTGGCCATGGAAGTAA
AI990296b	GCTGGTTCCCACAATGAACT
IPWI	AATTTGGGCATGGTGACTGT
IPWII	TTTACCGTGTGGCAAATGAA
cPCR25F	GTGGCTCTCCATGCCTACCTGTGGT
cPCR25R	CAAGGCTCAGTGGAAGAGACCAGTGTT
cPCR24F	GTGATGGCCACAAAGAGGTGGATTTG
cPCR25R	CAAGGCTCAGTGGAAGAGACCAGTGTT
PE6F	GCCTTGAGCAGCATAGGTGA
PE8R	CAGGGCAACAAAAGCTCTCT
PE37F	GGTGAGTGGTCATCAGTCAGGT
PE38R	CATCCAGTGGGACCCAGATAGG
cPCR19F	GACCCCAGAGGAAGACGTGCATT
cPCR19R.2	AAGGGCTGGGCACCTGACTGATG
PE4F	ATGGAAGACCCCTGTCATTG
PE4R	TCACCTTTGCCAGTCAATCC
cPCR20F	GGAAGAATTGCGTTAGGCCCTTTG
cPCR20R	AGGAAGAGCCTGAGCTTCACCAC
cPCR21F	GTGGTGAAGCTCAGGCTCTTCCT
cPCR21R	CTTCCAGGTCTCCAGCCCAAATAAC
cPCR6F	CCTGAGTTGGGTCGATGATGAGA
cPCR6R	CTCACCACAGCTCAGGGCAGGAG

Tab. 2.2 (Fortsetzung): Sequenzspezifische Oligonukleotide

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' Orientierung)
cPCR11F	AAAATGTCCCTCAGCCAGGT
cPCR11R	CTATACCGGTCAATGCCAAGTG
cPCR7F	CCAGTGTCTGTCAGCCAGTTTCC
cPCR7R	CCCAACAGAAGTCTCACCATCTAGG
Ex103F	CTGGTGC ACTGAAGCTCAGGCCTT
Ex106R	CTCAGTGCAAGAGACCAGGGAACCA
MRts2-9F	TATGGAAGAAAAGCACTCTTTGG
MRts2-9R	CAAAGTCTCCCCTTCGTGTT
MRts5-6F	GGCACTGAAAATGTGGCATCCAGTC
MRts5-6R	GGTGTGTCAGCTGTGCTGGTGTCAA
MRts2-6F	CACTCTTTGGCCTGTTGTGA
MRts2-6R	GTGTCAGCTGTGCTGGTGTGTC
MRts8-9F	AAGGCCTGGAATCTGATCCT
MRts8-9R	CCTAGATTTTAAATAGACAATCCAAAG
MRts10-11F	AGAAAAGGCGCAATGAAAGA
MRts10-11R	TTGGCAAGGAGAGCTTGTCT
MRRT6F	TGCTGGGTGTTTTGGTAAGTT
MRRT6R	TCAGCACAAAATCTTCCTACCA
MRRT7F	AGCTGGGTTAGATGGAAGCA
MRRT7R	ACCCTTGCCTAAAGGCATCA
MRRT8F	TATATTTGTGGGCGGGGAAC
MRRT8R	GAAACAAGTCTTCGCTAGAACCA
MRRT9F	TGCTTTGGGTCATCTATGGTC
MRRT9R	GCTTTTTGCAGCATTATGTGG
MRRT10F	TGAATGAGATTGCCAGCTTT
MRRT10R	GAGTACAGCATATGCGCAAGA
Ex23F	AACATCCTGGAGTTGGTGTG
Ex26R	GTTTCTCAGAAGCATCGACCAT
Intr34F	GCATGGAAGGAAGGACTGTG
Intr34R	CCAAGGATCGCACAAGAAGA
Intr39F	TACATTCCTTGGAAGCTGAACA
Intr39R	CATATGGAAGTCATCATCGATCC
Ex74F	CCTTGGTGGGCCGTGAACTGAAT
Ex78R	ATACCAGGATGACAGGAAGGACCTG
Ex84F	GAGCTGAAGCTCAGGCCCTTCCTG
Ex88R	GCTAAGCACCTGGCTGAGGGACATT
Ex97F	ACCAGATGGTGAGCCCAGAGGAAGA
Ex102R	TGGGAAACTGGCTGACAGACACTGG
Ex103F	CTGGTGC ACTGAAGCTCAGGCCTTT
Ex106R	CTCAGTGCAAGAGACCAGGGAACCA
NE14	CCTCTACAGATTTTTGCTGCCCTTT
NE15	GCTGAGGGAACGAAGAACTTCAATG
NE12	TCTTCCCTCTGGAGCTGTTTGAGGA
NE13	TGAAAGCACTGCAACAGGTCATTAC
NE16	GGCTATTTGAGGAATGCGGCCTTTT
Ex63F	CTGAAGCTCAGGCCATTCT
Ex65R	GTCTTCCTCCAGGCTCACTG
MRts10-11F	AGAAAAGGCGCAATGAAAGA
Ex148R	GGAGAAGGGCCATAGACTCC

2.1.11.2 Oligonukleotide für allelspezifische Genexpressions-Analysen

Die in Tabelle 2.3 genannten Primer wurden für allelspezifische Genexpressions-Analysen genutzt. MutEx10R und MutEx12R tragen an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff.

Tabelle 2.3: Primer für allelspezifische Genexpressions-Analysen.

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3'-Orientierung)
MutEx10dF	TTTCATTTACATACAAAAAGTCAA
MutEx10rF	CGCATGTACAGTGAACGAAGA
MutEx10R	FAM-CCTCCCTCATCAACTCCTTG
MutEx12dF	TGGTGGCCTCAATTTACCAT
MutEx12rF	AACTTTTCGTGACTTGGGAGA
MutEx12R	FAM-TTCCTGTTTTTCATTTGTAATTGG
MutEx15dF	TGAATGCCAAACTGAAACCA
MutEx15rF	AACTACAGAATATGACGGTGGCTA
MutEx15R	TCTGTGTCTGGGCCATTTT

2.1.11.3 Hybridisierungssonden

Die in Tabelle 2.4 genannten Primer und die Sequenz der durch sie amplifizierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe des Blast-Programms von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nach nahezu homologen Bereichen in anderen chromosomalen Regionen analysiert, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden.

Tabelle 2.4: Spezifische Oligonukleotide für Hybridisierungssonden

Name des Primers	Sequenz des Primers (5'-3'-Orientierung)
Snpwsct2aF	TTTGACCTAATCTCCCACTG
Snpwsct2aR	CTAGGCCCTTGGTCCAAAT
Snpwsct5aF	CAGTATTTCAAATGTGACTTGTAGGA
Snpwsct5aR	AAATCTCACCTCTTTTTCACTCA
Snpwsct9aF	AGTCCTGAATCCAGAACATGA
Snpwsct9aR	CAAATAATGTGAAGTTTTCCCTGTA
Snpwsct12aF	TGAATAGCCAGTGTTTTTGAGTT
Snpwsct12aR	TACACCTACCTGCGCTCAAC
NB-MR1F	GGAGGGTGGTCACATGTTCT
NB-MR1R	GAGACCAGGGTGTGAGGAAG

2.1.12 Patienten

2.1.12.1 Patienten mit Prader-Willi- oder Angelman-Syndrom

Die Diagnosen der einzelnen Patienten wurden von verschiedenen erfahrenen klinischen Genetikern gestellt und molekular-genetisch bestätigt. Blut von Mitgliedern einer großen Familie (PWS-AT) (Buiting *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001) wurde uns von Dr. Peter M. Kroisel des Instituts für Humangenetik der Universität Graz zugeschickt. Zwei Mitglieder dieser Familie haben ein PWS aufgrund einer Deletion des IC (PWS-1 und PWS-2; siehe Individuen IV.1 und IV.7 in dem Stammbaum gezeigt in El-Maarri *et al.* (2001)). Die Bruchpunkte dieser Deletion konnten genau lokalisiert werden (persönliche Mitteilung von Dr. Karin Buiting). Blut der Väter dieser Patienten (F1 und F2; Individuen III.2 und III.15 in El-Maarri *et al.*, 2001), die asymptotische Träger dieser Deletion sind, wurde uns ebenfalls zur Verfügung gestellt. Die Patienten AS-ID2 und AS-ID71 zeigen AS aufgrund eines Imprinting-Defekts. Weiterhin wurde DNA und RNA von vier Patienten mit einer Mutation im *UBE3A*-Gen verwendet (Tabelle 2.5). Die Patienten wurden entweder in unserem Institut in Essen von Frau Prof. Dr. Gillessen-Kaesbach betreut oder das Material wurde uns von Dr. Raymonda Varon-Mateeva (Berlin), Dr. Joseph Wagstaff (Charlottesville, USA) bzw. Dr. Verona Monika Cohen (München) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.5: Patienten mit AS und einer Mutation im *UBE3A*-Gen. Die Positionen beziehen sich auf die Genbank *Accession*-Nummer X98032.

Patient	Mutation	<i>UBE3A</i> Exon
AS-U1	1559delTC	10
AS-U2	1985delCAGA	12
AS-U3a	G2304A	15
AS-U3b	G2304A	15

2.1.12.2 Patienten mit einem atypischen Methylierungsmuster

Die Patienten wurden von verschiedenen klinischen Genetikern gesehen. Aufgrund einiger charakteristischer Merkmale für ein PWS bzw. für ein AS wurde ihre aus Blut gewonnene DNA einer molekular-genetischen Untersuchung zugeführt. Bei allen Patienten konnten eine große Deletion, eine UPD sowie ein Imprinting-Defekt ausgeschlossen werden. Der Methylierungstest (Zeschnigk *et al.*, 1997; Runte *et al.*, 2001b) zeigte bei allen Patienten

ein normales Muster am Locus *SNURF-SNRPN*, aber ein auffälliges Muster am Locus *D15S63/PW71*. Das klinische Bild der Patienten wird im Folgenden dargestellt:

Patientin LE

Die Patientin wurde als erstes Kind nicht verwandter Eltern geboren. Das Geburtsgewicht betrug 2510 g (-2.8 SD) bei einer Größe von 47 cm (-3.2 SD). Der Kopfumfang betrug 31.5 cm (-2.6 SD). Nach der Geburt nahm das Neugeborene selbstständig keine Nahrung auf. Eine muskuläre Hypotonie lag nicht vor. Die weitere Entwicklung war verzögert. Sie begann mit 2 Jahren zu laufen und mit 4 Jahren zu sprechen. Seit dem 2. Lebensjahr ist sie adipös und ihr fehlt ein Sättigungsgefühl. Im Alter von 5 Jahren und 10 Monaten wurde sie am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen vorgestellt und es folgte eine molekular-genetische Untersuchung bei Verdacht auf ein PWS. Das Längenmaß entsprach zu diesem Zeitpunkt 108.4 cm (3.-10. Perzentile). Es bestand eine ausgeprägte Adipositas mit einem Gewicht von 24.5 kg (>97. Perzentile). Der Kopfumfang lag mit 50.5 cm auf der 25. Perzentile. Sie war mental schwer retardiert. Es zeigte sich keine Gesichtsdysmorphie. Bis auf eine Klinodaktylie des Digitus V wies sie keine weitere klinische Auffälligkeit auf. Zusammenfassend sprechen die Symptome für ein atypisches PWS.

Patient FB

Der Patient wurde als viertes Kind gesunder, nicht verwandter Eltern geboren. Die Geschwister sind gesund und unauffällig. Das Geburtsgewicht lag bei 4300 g (+1.7 SD) und die Größe betrug 55 cm (+0.6 SD). Während der Schwangerschaft beobachtete die Mutter reduzierte Bewegungen des Kindes. Postnatal gab es keine Schwierigkeiten beim Füttern des Jungen und eine muskuläre Hypotonie wurde nicht festgestellt. Es traten Schlafprobleme in den ersten zwei Lebensjahren auf. Er begann mit 19 Monaten zu laufen und mit ungefähr 3 Jahren und 6 Monaten zu sprechen. Der mental retardierte Junge wurde mit 8 Jahren und 9 Monaten am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen untersucht. Seine Größe betrug zu diesem Zeitpunkt 149 cm (>97. Perzentile) und er war stark adipös mit einem Gewicht von 56 kg (>97. Perzentile). Sein Knochenalter lag bereits bei 12 Jahren, er zeigte außerdem Anzeichen einer verfrühten Pubertät. Dysmorphien waren nicht vorhanden. Er fiel durch erhöhte Aggressivität auf.

Patient MK

Der Patient wurde nach unauffälliger Schwangerschaft geboren. Die Eltern sind gesund. Die Geburt erfolgte durch einen Kaiserschnitt und der Säugling erschien schwach und kraftlos. In den ersten 6 Monaten gab es Fütterungsprobleme. Bereits mit 8 Tagen wurde er von einem Kinderarzt gesehen und an das Institut für Pathologie und Genetik in Loverval/Belgien verwiesen. Er war entwicklungsverzögert und begann erst 3 Wochen vor seinem zweiten Geburtstag zu laufen. Er konnte nicht sprechen und hatte eine linksseitige Schielstellung. Ein Hoden war nicht deszendiert. Der Junge hatte einen hohen Gaumen, blaue Augen, braune Haare und war nicht hypopigmentiert. Beide kleinen Finger zeigten eine Klinodaktylie. Mit neun Jahren hatte er Schlafprobleme, es gab aber keinen Hinweis auf eine Epilepsie. Sein Gang war ataktisch. Des Weiteren hatte er einen großen Mund und ein großes Kinn. Er war ein fröhliches Kind, das viel und inadäquat lachte. Er konnte sich verständlich machen, indem er einfache Zeichen und ca. 15 Wörter benutzte. Sein Gewicht betrug 35 kg (90. Perzentile), seine Größe 130.4 cm (25.-50. Perzentile) und sein Kopfumfang 55.5 cm (nahezu 98. Perzentile). Bei der letzten Untersuchung mit zwölf Jahren zeigte er eine normale Pubertät und immer noch keine Anzeichen für eine Epilepsie. Sein Kopfumfang und Gewicht lagen immer noch über der 90. Perzentile. Bis auf den sehr großen Kopfumfang zeigt der Patient typische Symptome für ein AS.

Patientin MC

Die Patientin wurde 1950 geboren. Die Eltern sind nicht mit einander verwandt. Die Mutter war bei der Geburt, die normal verlief, 28 Jahre alt. Allerdings hatte sie vorher bereits zwei Fehlgeburten. Als die Patientin 6 Monate alt war, kam es zu Krampfanfällen. Die Entwicklung und die Sprache waren verzögert. Sie begann mit zwei Jahren zu laufen und war schwer mental retardiert. Sie zeigte Anzeichen einer primären Thrombozythämie und Polyglobulie. Bei der klinischen Untersuchung mit 41 Jahren war sie 153 cm groß (-2 SD) und der Kopfumfang lag bei 54 cm. Sie hat immer noch Krampfanfälle, die nur sehr schwer mit antiepileptischen Medikamenten zu kontrollieren sind.

2.1.12.3 Patient mit einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom

Im Rahmen der Charakterisierung der unter 2.1.12.2 vorgestellten Patienten wurde eine Methylierungsauffälligkeit auf Chromosom 11 ausgeschlossen. DNA von einem Patienten mit einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom diente bei dieser Untersuchung als Kontrolle zur richtigen Interpretation der Methylierungsergebnisse und wurde uns von Dr. Eamonn Maher (Birmingham) zur Verfügung gestellt.

2.1.13 Geräte

PCR-Gerät:

GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)

GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems)

Automatische Elektrophoresegeräte für die Sequenzierung und Mikrosatellitenanalyse:

ABIprism[®] 310 und 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Echtzeit quantitative PCR (*Real-time* quantitative PCR, Taqman[®]):

ABIprism[®] 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

ABIprism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1 Präparation von genomischer DNA aus peripherem Blut

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut wurde das Nucleon Kit BACC-2 der Firma Amersham Lifescience verwendet. Es wurden 2-5 ml EDTA-Blut, das entweder frisch abgenommen oder bereits bei -20°C lagerte, mit 30 ml Reagenz A für 4 min bei RT gemischt. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (4 min 3500 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml des Reagenz B gelöst und nach Zugabe von 500 μl Natrium-Perchlorat wurde die Lösung für 20 min bei 65°C im Schüttelbad gemischt. Anschließend wurden 2 ml kaltes Chloroform mit Isoamylalkohol (96%, 4%) zugegeben, der Ansatz für 10 min bei RT gemischt und für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Von der Nucleon Silica-Suspension wurden 300 μl zugegeben und der Ansatz für 3 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Phase über der Silica-Suspensionsschicht enthielt die DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (3 min bei 3500 rpm) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen gefüllt und zur Fällung der DNA mit 4 ml 100% Ethanol versetzt. Die DNA wurde mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette aus dem Ansatz gefischt, in 70% Ethanol gewaschen, 15 min an der Luft getrocknet und in 300 μl TE gelöst.

2.2.1.2 Präparation von Phagen-DNA (nach Marzeluff)

Der Wirtstamm wurde in 5 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0.2% Maltose angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 300 µl dieser Kultur wurden in 30 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0.2% Maltose pipettiert und 4 h bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Die phagensensitiven Bakterien wurden 15 min bei 850 g und 4°C pelletiert und in 12 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. 350 µl der Zellen wurden mit 350 µl Ca²⁺/Mg²⁺-Lösung (jeweils 10 mM CaCl₂ und MgCl₂) gemischt und die Phagenmenge zugegeben (10⁶-10⁸ pfu). Nach Inkubation von 15 min bei 37°C wurde das Bakterien/Phagengemisch in 350 ml LM-Medium, 10 mM MgSO₄, 0.2% Maltose überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 0.7 ml Chloroform hinzugegeben und die Kultur für 10 min bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (15 min bei 9950 g und 4°C). Der Überstand wurde mit 21 g NaCl und 24.5 g PEG (MW 8000) gemischt, der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 17700 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 ml Φ80-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) gelöst und mit demselben Volumen Chloroform extrahiert. Die bakterielle DNA und RNA wurden durch Zugabe von 2 µg/ml DNase1, 2 mg/ml RNaseA und 40 U/ml RNaseT₁ und Inkubation über Nacht bei 37°C abgebaut. Um die Phagenköpfe zu zerstören, wurde 1.4 ml SDS-Mix (2.5% SDS, 250 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 8.0) zugegeben und 10 min bei 65°C inkubiert. Die Lösung wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, einmal mit Phenol-Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Phagen-DNA wurde durch Zugabe von 310 µl 5 M NaCl und 15.5 ml Ethanol gefällt. Schließlich wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, pelletiert, getrocknet und in 100 µl RNase-Lösung (50 µg/ml RNaseA, 80 Units/ml RNaseT₁) aufgenommen und 1 h bei 37°C gelöst.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-, PAC- und BAC-DNA

Die Vermehrung der Bakterien erfolgte in dem jeweiligen Flüssigmedium (Plasmide: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin; PACs: LB-Medium mit 40 µg/ml Kanamycin; BACs: 30 µg/ml Chloramphenicol) über Nacht im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific G26) bei 37°C und 275 rpm inkubiert. Die Präparation erfolgte bis auf wenige Modifikationen nach dem Protokoll der Firma QIAGEN, das auf der Alkali-Lyse-Methode von Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Zusammensetzung der Puffer 1-3 ist in den Präparationsprotokollen für die analytische Präparation und die Präparation im großen Maßstab identisch.

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 5 ml geeignetem Medium inkubiert. 1.5 ml der ÜNK wurden 5 min bei 15000 g zentrifugiert und das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl des Puffers 3 (3 M KOAc pH 5.5) zugegeben und 15 min bei 11500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 500 µl Ethanol hinzu gegeben und die DNA wurde durch Zentrifugation (25 min bei Raumtemperatur und 11500 g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-Lösung (50 µg/ml RNaseA, 20 Units RNase T₁ in H₂O) gelöst und 1 h bei 37°C inkubiert.

Um im großen Maßstab Plasmid- bzw. PAC-DNA zu gewinnen, wurden 150 ml Medium mit 0.5 ml einer ÜNK angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 9950 g und 4°C) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer 2 zugegeben und der Ansatz 3 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 10 ml gekühltem Puffer 3 versetzt und 20 min auf Eis gestellt. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation (20 min bei 4°C und 13800 g) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert (15 min bei 4°C und 13800 g) und auf eine Qiagen 500 Ionenaustauschsäule gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100) äquilibriert worden ist. Die an das Säulenmaterial gebundene DNA wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol) gewaschen und anschließend mit 15 ml QF-Puffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% Ethanol) eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 ml Isopropanol und Zentrifugation (20 min bei 14000 g und RT). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl RNase-Lösung aufgenommen. Abschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C.

2.2.2 Isolierung von RNA aus peripherem Blut

Zur Isolierung von RNA aus peripherem Blut wurden zwei verschiedene Präparationsprotokolle verwendet. Wurde das Blut im Essener Institut abgenommen, wurde die unter 2.2.2.1 beschriebene Methode verwendet. In bereits abgenommenem Blut ist die RNA nur begrenzt stabil und wird sehr schnell durch RNasen abgebaut. Der Vorteil der unter 2.2.2.2 beschriebenen Methode ist, dass das Blut direkt bei der Abnahme in Vacutainer aufgenommen wird, die einen RNA-stabilisierenden Puffer enthalten. Zur Inaktivierung von RNasen wurde für alle selbst angesetzten Lösungen Diethylpyrocarbonat

(DEPC) behandeltes bidestilliertes Wasser benutzt. DEPC wurde in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zugesetzt und das Wasser 12 h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.1 Präparation von RNA mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit von QIAGEN

Nach der Blutabnahme in EDTA-Röhrchen wurde umgehend mit der Präparation begonnen. Es besteht die Gefahr, dass die RNA abgebaut wird bzw. dass die unter Stress stehenden Blutzellen die Expression einiger Gene induzieren oder abschalten. Von dem Blut wurden 1.5 ml mit 7.5 ml EL-Puffer vermischt und es folgte eine Inkubation von 10-15 min auf Eis zur Lyse der Erythrozyten. Um eine effizientere Lyse der Zellen zu erzielen, sollte die Suspension während der Inkubation zweimal kurz auf dem Vortexer geschüttelt werden. Die Leukozyten wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 400 g und 4°C pelletiert und der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 3 ml EL-Puffer resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Nun wurden 600 µl RLT-Puffer zu den Leukozyten gegeben und das Pellet gelöst. Das Lysat wurde auf eine „QIAshredder“ Säule überführt und für 2 min bei maximaler Umdrehung in einer Mikrozentrifuge zur Homogenisierung zentrifugiert. Das Filtrat wurde in ein 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und 600 µl 70% Ethanol zur Präzipitation hinzugefügt. Die gesamte Probe wurde in ein „QIAamp“ Zentrifugensäulchen überführt, das sich in einem 2ml umfassenden Gefäß befindet, und für 15 sec mit 8000 g zentrifugiert. Die RNA wurde in diesem Schritt an die Silikagel-Membran der Säule gebunden. Zum Waschen der RNA wurden 700 µl Waschpuffer RW1 auf die Säule pipettiert, der gesamte Ansatz für 15 sec 8000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl ethanolhaltigem Puffer RPE. Dazu wurde beim ersten Schritt mit 8000 g für 15 sec und beim zweiten Schritt für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um jegliche Ethanolreste zu entfernen, wurde für 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freiem Wasser durch Zentrifugation von 1 min bei 8000 g in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Eine zweite Elution mit 30 µl Wasser erfolgte ebenso in ein zweites, neues Reaktionsgefäß. Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2 Präparation von RNA mit dem PAXgene RNA Blood Kit (QIAGEN)

Es wurde bei der Abnahme 2.5 ml Blut durch ein Vakuum in einen mit Lysepuffer gefüllten Vacutainer („PAXgene blood RNA Tube“) gezogen. Hier erfolgte nach kurzem Schütteln direkt eine Lyse der Zellen und Stabilisierung der RNA, so dass der Vacutainer gelagert bzw. verschickt werden konnte. Vor der Präparation der RNA musste die

Blutprobe für ein Minimum von 2 h in dem PAXgene-Blutröhrchen bei RT inkubiert werden, um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten. Nun wurde der Vacutainer für 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Leukozytenpellet mit 5 ml RNase-freiem Wasser resuspendiert. Erneut wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 360 µl Puffer BR1 gelöst und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 55°C in einem Schüttelinkubator bei maximaler Schüttelfrequenz, nachdem 300 µl Puffer BR2 und 40 µl Proteinase K zu der Probe hinzugefügt worden sind. Die Proteinreste wurden 3 min bei maximaler Umdrehung in einer Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand mit der RNA vorsichtig in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 350 µl absolutem Ethanol präzipitiert und an ein PAXgene-Säulchen gebunden, das sich in einem Auffanggefäß befindet. Dazu wurde die Probe mit dem Präzipitat auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das aufgefangene Filtrat konnte verworfen werden. Zum Waschen der gebundenen RNA wurden 700 µl Puffer BR3 auf die Säule pipettiert und wiederum für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl ethanolhaltigem Puffer BR4. Dazu wurde beim ersten Schritt mit 8000 g für 1 min und beim zweiten Schritt für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Entfernen möglicherweise verbliebener Ethanolreste folgte eine Zentrifugation bei maximaler Umdrehung für 1 min. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freies Wasser durch Zentrifugation von 1 min bei 8000 g in ein 1.5 ml umfassendes Reaktionsgefäß eluiert. Eine zweite Elution der RNA erfolgte mit 30 µl Wasser und einer Zentrifugation in ein zweites, neues Reaktionsgefäß. Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

2.2.3 DNase-Behandlung der RNA

Um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Diese wurde entweder während (2.2.3.1) oder nach (2.2.3.2) der RNA-Präparation vollzogen.

2.2.3.1 DNaseI-Behandlung mit dem RNase freien DNase Set (QIAGEN)

Diese Behandlung war bei beiden der oben beschriebenen Präparationsmethoden möglich. Statt der 700 µl (wie in 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.2 beschrieben) wurden nur 350 µl des ersten Waschpuffers (RW1 bzw. BR3) auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu 10 µl aliquotierter und tiefgefrorener DNaseI (3 U/µl) wurden 70 µl

Reaktionspuffer gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde direkt auf die Membran pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Wiederum wurde mit 350 μ l Puffer RW1 bzw. BR3 gewaschen. Anschließend wurde die Präparation wie bereits beschrieben fortgeführt.

2.2.3.2 DNaseI-Behandlung der RNA nach der Präparation

Falls nach der Präparation noch genomische DNA im Ansatz vorhanden war, wurde diese DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden in einem Ansatz ca. 5 μ g RNA, 5 mM MgCL₂, 0.1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL, 3 Units DNase I und 1 Unit RNase Inhibitor gemischt und 4 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Denaturierung bei 95°C für 5 min und die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Für die Bestimmung der Konzentration wurde die DNA bzw. die RNA in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm in dem Spektralphotometer Ultrospec III von Pharmacia gemessen. Die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 33 μ g/ml einzelsträngiger DNA und 40 μ g/ml RNA. Die OD₂₆₀-Werte wurden also mit dem Faktor 50 (DNA) bzw. 40 (RNA) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ etwa 1.8. Reine RNA besitzt einen Quotienten zwischen 1.8 und 2.1.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots neben 12 μ l λ HindIII-Größenstandard auf einem Agarosegel und anschließendem Vergleich der Intensitäten der Banden abgeschätzt. Dabei entsprach das 23 kb große Fragment des λ HindIII-Größenstandards einer DNA-Menge von 150 ng.

2.2.5 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden je nach Komplexität der zu spaltenden DNA verschiedene Mengen eingesetzt. Für die Restriktionsspaltung von hochmolekularer DNA (genomischer DNA, BAC-, PAC- und Phagen-DNA) waren 2 μ g notwendig und für die Spaltung von Plasmid-DNA ca. 0.8 μ g. Die DNA wurde mit 10 bis 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym und dem erforderlichen 1x Restriktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l gemischt. Durch Zugabe von 0.1 μ g/ μ l BSA wurden die Restriktionsenzyme stabilisiert. Die Restriktion genomischer DNA benötigte mindestens 6 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, während eine vollständige Spaltung von BAC-, PAC- und Plasmid-

DNA nach 1 bis 2 h erreicht war. Beim Schneiden der DNA durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme musste jeweils die optimale Salzkonzentration im Puffer berücksichtigt werden. Zunächst wurde mit dem Enzym geschnitten, das eine niedrigere Salzkonzentration benötigte, anschließend wurde die höhere Salzkonzentration in einem Reaktionsvolumen von 40 µl eingestellt und das zweite Enzym zugegeben.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki *et al.*, 1985) wird für die Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Fragmenten eingesetzt. Ausgehend von einer geringen Menge an DNA können hohe Konzentrationen der Ziel-DNA produziert werden. Die Reaktionen wurden mit der thermostabilen *AmpliTaq*[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer) in 200 µl Reaktionsgefäßen oder 96-Lochplatten („*Optical Plates*“, Applied Biosystems) durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Komplexität wurden von genomischer DNA ca. 100 ng und von Phagen- und Plasmid-DNA je 1 pg in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt. Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 2.5 Units *AmpliTaq*[®] Polymerase, je 4 pmol 5'- und 3'- Primer, je 0.2 mM der dNTPs und 1x Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine). Die Reaktionszeiten waren wie folgt: Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 95°C folgten 35 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec *Annealing* und 30 sec Elongation bei 72°C und anschließend eine verlängerte Synthesepériode von 7 min bei 72°C, um das Problem der Template-unabhängigen Addition von Nukleotiden zu umgehen (Clark, 1988; Smith *et al.*, 1995). Die *Annealing*-Temperatur richtete sich nach der Zusammensetzung der in einer PCR-Reaktion kombinierten Primer.

2.2.7 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[®] RNA PCR Kit“ der Firma Perkin Elmer 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 MgCl₂, 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 wurde im PCR-System GeneAmp

9700 oder GeneAmp 2700 (Perkin Elmer) in vier Schritten durchgeführt: 10 min 21°C, 15 min 42°C, 5 min 99°C und 5 min 5°C.

PCR

Mit der cDNA wurde eine PCR durchgeführt, bei der spezifische Primer eingesetzt wurden. In der Regel wurden in neuen Reaktionsgefäßen parallel 40 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 aus folgenden Komponenten: 2 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl 10x PCR Puffer, 0,5 µl (5 U/µl) AmpliTaq-Polymerase, je 10 pmol 5'- und 3'-Primer und Wasser. Von dem RT-Ansatz wurden je 10 µl zu den vorbereiteten PCR Ansätzen pipettiert. Die Reaktionszeiten für die Amplifikationen wurden bereits in 2.2.6 beschrieben. 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 Reverser Transkriptase und ohne RNA angesetzt. Die PCR-Primer für β -Aktin liegen in Exon 4 bzw. Exon 5 und amplifizieren ein 493 bp umfassendes RT-PCR-Produkt (Buiting *et al.*, 2001). Die *Annealing*-Temperatur liegt bei 56°C.

Primersequenzen:

β -AktinF: 5'-TTGCTATCCAGGCTGTGCTA-3'
 β -AktinR: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

2.2.8 Real-Time quantitative RT-PCR (TaqMan[®])

Die *Real-Time* quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung von DNA und RNA PCR-Produkten durch die Detektion eines Fluoreszenzsignals, dessen Zunahme sich proportional zu der Mengenzunahme eines PCR-Produktes verhält (Heid *et al.*, 1996, Gibson *et al.*, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit dem so genannten TaqMan[®]-System gearbeitet, um die Expression von Genen zu analysieren. Hierbei wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer-Express“ (Applied Biosystems) spezifische Primer komplementär zu dem mRNA-Bereich des zu quantifizierenden Gens gelegt. Gleichzeitig bestimmte das Programm eine TaqMan[®]-Sonde, deren *Annealing*-Temperatur um 10°C höher war als die der PCR-Primer. Um die Detektion von DNA als Kontaminante der RNA auszuschließen, wurde der zu amplifizierende cDNA-Bereich so gewählt, dass die Sonde einen Exon-Exon-Übergang spannte. Die Sonde wurde am

5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom versehen. Im freien Zustand der Sonde wurde die Fluoreszenzaktivität durch einen Quencher am 3'-Ende der Sonde unterdrückt (Livak *et al.*, 1995). Die PCR wurde im ABI Prism 7700 Sequence Detection System oder ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Taq Polymerase verlängerte die Primer am 3'OH Ende und degradierte dabei durch ihre intrinsische 5'-3' Nuclease Aktivität die TaqMan Sonde. Dadurch wurden das Reporter-Fluorochrom und der Quencher räumlich voneinander getrennt, was zur Erzeugung eines Fluoreszenz-Signals führte (Holland *et al.*, 1991). Dieses wurde gemessen und direkt im angeschlossenen Computer verarbeitet. Als Ergebnis erhielt man einen Wert (Schwellenzyklus, C_T), welcher der PCR-Zykluszahl entsprach, bei der das Fluoreszenz-Signal eine bestimmte Intensitätsschwelle, die über dem Hintergrundrauschen und in der exponentiellen Phase der Reaktion lag, überschritten hatte. Dieser Wert verhielt sich umgekehrt proportional zur Anzahl der eingesetzten Zielmoleküle: je höher die Anzahl der Zielmoleküle, desto niedriger war der C_T -Wert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich relative Quantifizierungen durchgeführt, das heißt, es wurden die Werte für zwei verschiedene Gene miteinander verglichen. Dafür musste gewährleistet sein, dass die Effizienz der PCR-Reaktionen vergleichbar war. Dazu wurde eine bekannte cDNA-Konzentration als Verdünnungsreihe der PCR hinzugefügt, wodurch eine Standardkurve erstellt werden konnte.

Versuchsdurchführung

Um die Methode zu etablieren, wurde zunächst eine reverse Transkription an einer Kontroll-RNA (fetales Gehirn, Clontech) durchgeführt. Dazu wurde das unter 2.2.8 beschriebene Protokoll benutzt, allerdings unter dem Einsatz von 300-500 ng RNA. In einer ersten Testreaktion wurde für jedes Gen die optimale Primerkonzentration ermittelt. Dazu wurden Reaktionsansätze in MicroAmp[®] *Optical 96-Well Reaction Plates* (Applied Biosystems) mit allen möglichen Kombinationen von 50 nM, 300 nM und 900 nM jedes Primers angesetzt mit folgenden, weiteren Komponenten: 1x TaqMan Universal PCR Master Mix, 250 nM TaqMan-Sonde und 50 ng cDNA fetales Gehirn. Jeder PCR-Ansatz wurde mindestens zweimal pipettiert, um eventuelle Pipettierfehler auszugleichen. Die Platten wurden mit einer Folie (*adhaesive cover*; Applied Biosystems) verschlossen. Die PCR-Bedingungen waren für jede Real-Time PCR standardisiert (2 min 50°C, 10 min 95°C, 40 Zyklen mit 15 sec 95°C und 1 min 60°C). Nach dem PCR-Lauf wurde mit Hilfe der Sequence-Detection Software (Applied Biosystems) geprüft, bei welchen Konzentrationen der C_T -Wert am niedrigsten und somit die PCR am effektivsten war. Für

alle Gene war eine 300 nM Konzentration beider Primer optimal. Für *UBE3A* war dieser Test nicht notwendig, da ein kommerziell erhältlicher *Assay* eingesetzt wurde (*Assay-On Demand* Hs00166580_m1 für *UBE3A*).

Um die komparative C_T -Methode anwenden zu können, war es erforderlich, in einer zweiten Testserie nachzuweisen, dass die Effektivität der quantitativen PCR der zu untersuchenden Transkripte gleich war. Zu diesem Zweck wurden 6 Verdünnungen der Kontroll-cDNA hergestellt (25 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 1 ng, 0.5 ng). Durch die unverdünnte cDNA sowie diese Verdünnungen wurden die Standardkurven für die einzelnen Gene auf den linearen Anstieg der Expressionsstärke mit zunehmender Konzentration der cDNA-Proben hin miteinander verglichen. Bei Reaktionen im ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) wurden bei jeder QRT-PCR parallel Standard-Verdünnungsreihen jedes einzelnen Transkripts durchgeführt, da die Software dadurch die Ausgangskonzentrationen jeder cDNA berechnen konnte.

Sequenzen der für die quantitative PCR verwendeten Oligonukleotide:

SNURF-SNRPN 57-58:

TaqIPWF: CAGGAAAGATCAAAACGATGCA
 TaqIPWR: TCCAAAGGAGGCAGTTGGAT
 TaqIPW: ^{FAM}TGCAAGTGTGATTGGTCCAGATAGCTGC^{DQ}

SNURF-SNRPN 142-143 (*Assay* 1):

TaqUBE3AasF: CACAGCTGACACACCCAGATATC
 TaqUBE3AasR: CCCTGAAGTTTCCTTGAAGTTGTT
 TMUBE3Aas : ^{FAM}CAACCAGGATTTAAGGATGCCACTCTGGTTAAA^{TAMRA}

SNURF-SNRPN 142-143 (*Assay* 2)

UBE3AastaqF: TCTGTTTGGTCTCCTGTGAACTTTC
 UBE3AastaqR: CTTTCCCTGAAGTTTCCTTGAAG
 UBE3Aastaq: ^{FAM}TAAGGATGCCACTCTGGTTAAAAGCTGAAACA^{DQ}

2.2.9 Allelspezifische Genexpressionsanalyse

Für die allelspezifische Genexpressionsanalyse wurde eine RT-Reaktion an ca. 300 ng RNA eines Patienten und anschließend eine PCR mit cDNA-spezifischen Primern durchgeführt. An ca. 100 ng DNA des Patienten erfolgte ebenfalls eine PCR-Analyse mit DNA-spezifischen Primern. Die Produktgrößen für die RT-PCR und die PCR sind in Tabelle 2.6 angegeben. Der 3'-Primer konnte für beide Reaktionen benutzt werden und hatte an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAMTM) gebunden. Der Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen waren wie unter 2.2.6

beschrieben. Die spezifische *Annealing*-Temperatur der benutzten Primerpaare lag bei 58°C. Die PCR-Produkte wurden mit dem ABIprism® 3100 Genetic Analyzer und der *GeneScan*™ Analyse Software sowie dem Programm *Genotyper* (Applied Biosystems) analysiert.

Tabelle 2.6: Produktgrößen der PCR und RT-PCR-Experimente für *UBE3A* Exons 10, 12 und 15.

Exon	Produktgröße PCR [bp]	Produktgröße RT-PCR [bp]
10	215	209
12	197	195
15	183	189

2.2.10 Amplifikation von cDNA-Enden (5'- oder 3'-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 (Frohmann *et al.*, 1988; Ohara *et al.*, 1989; Loh *et al.*, 1989). Zunächst wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und an die Enden jeweils eine Adaptersequenz angehängt. Dadurch können die Enden der mRNA in einer PCR mit einem spezifischen Primer für den Adapter (AP-Primer) und einem genspezifischen Primer amplifiziert werden. Für die RACE wurde ein RACE-System der Firma Clontech verwendet. Dieses enthielt humane cDNA (Marathon-Ready™ cDNA), die an RNA aus fetalem Gehirn hergestellt wurde und die für die Reaktion notwendigen Komponenten (Advantage cDNA PCR Kit). Nach dem Protokoll des Herstellers setzte sich ein Reaktionsansatz von 50 µl wie folgt zusammen: 5 µl der Marathon-Ready™ cDNA (0.1 ng/µl), 1 µl des Adapter-Primers AP (10 µM), 1 µl des genspezifischen Primers (10 µM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Advantage cDNA Polymerase Mix (50x; enthält *KlenTaq*), 5 µl 10x cDNA PCR-Puffer und 36 µl Wasser. Es wurden folgende genspezifischen Primer verwendet:

RACE1F: 5'-TTGACACCAGCACAGCTGACACACC-3'
 RACE2F: 5'-AAGGCCTGGAATCTGATCCTCCAC-3'
 NE13: 5'-TGAAAGCACTGCAACAGGTCATTCAC-3'
 NE15: 5'-GCTGAGGGAACGAAGAACAACACTTCAATG-3'

Nach einer initialen Denaturierung (30 sec 95 C) folgten 5 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 95°C und 4 min *Annealing* und Synthese bei 72 C; 5 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 95°C und 4 min *Annealing* und Synthese bei 70°C und 25 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 95C und 4 min *Annealing* und Synthese bei 68°C. Als Kontrolle wurde eine Reaktion in Abwesenheit des AP-Primers durchgeführt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob der AP-Primer unspezifisch an die cDNA bindet. Des Weiteren wurde als Kontrolle eine Reaktion mit einem spezifischen Primer (5'-G3PDH bzw. 3'-G3PDH) für das Gen Glucose-3-Phosphat-Dehydrogenase (*G3PDH*) durchgeführt, welches ubiquitär exprimiert wird. Diese Primer waren dem RACE-Kit beigelegt.

2.2.11 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Effizienz und zur Produktmengenabschätzung sowie für die Southern-Blot-Analyse wurden 1 – 2.5% ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelkammern unterschiedlicher Größe gegossen. Nach dem Auskühlen wurden von 50 µl umfassenden PCR-Ansätzen jeweils 15 µl aufgetragen. Dazu wurden die Proben mit Ladepuffer gemischt (Endkonzentration 1x) und bei ca. 3 V/cm Elektrodenabstand in 1x TAE-Puffer mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Phagen-DNA wurde vor dem Auftragen 10 min bei 65 C inkubiert, um Konkatemere zu zerstören. Als Größenstandards dienten die 1 kb-Leiter (Invitrogen), *Msp1*-gespaltene pUC19-DNA (MBI Fermentas) und *HindIII*-geschnittene Lambda-Phagen-DNA (Boehringer). Die Gele wurden auf einem Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) begutachtet und mit einem digitalen Fotodokumentationssystem (Herolab) fotografiert. Die Fotos wurden auf Thermopapier ausgedruckt.

2.2.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die aus einer Restriktionsspaltung oder einer PCR resultieren, müssen für eine weitere Verwendung von unspezifischen DNA-Fragmenten, freien Nukleotiden, Proteinen, Primern und sonstigen Verunreinigungen befreit werden. Erst nach der Aufreinigung können sie für die Erstellung einer Sonde, für eine Southern-Blot-Analyse, Sequenzierung oder Subklonierung genutzt werden. Dazu wurden sie einer der im Folgenden beschriebenen Methoden zugeführt.

2.2.12.1 Microcon-Methode

Zur Aufreinigung der gesamten DNA-Fragmente in einem Ansatz wurde das Volumen der PCR-Reaktion mit Wasser auf 500 µl erhöht und in einen Filtereinsatz eines „Microcon-100 Mikrokonzentrators“ (Amicon) pipettiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 500 g wurde das Eluat verworfen, das Salze, Primer und Nukleotide enthält. Es wurden erneut 500 µl Wasser auf die Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert. Nun wurde der Filtereinsatz umgedreht, in ein neues Gefäß überführt und 2 min bei 500 g zentrifugiert. Danach liegen die DNA-Fragmente in einem Volumen von ca. 10 µl vor.

2.2.12.2 Millipore-Methode

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden diese zunächst mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Filtergefäß „Ultrafree-MC 0,45 µm“ der Firma Millipore überführt. Der Agaroseblock wurde mindestens 1 h bei -80°C inkubiert, dann 20 min bei 37°C aufgetaut und 20 min bei 5600 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µl Wasser wurde erneut 20 min bei 5600 g zentrifugiert, wobei die Agarose im Filter verblieb. Die DNA-Fragmente gelangten ins Filtrat und konnten für weitere Verwendungen eingesetzt werden.

2.2.12.3 Aufreinigung mit dem MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Das zu aufreinigende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Lösen der Agarose wurde 1 Volumen Puffer QG hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von 10 min bei 50°C, wobei das Lösen durch mehrmaliges Schütteln auf einem Vortexer erleichtert wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol präzipitiert und der gesamte Ansatz auf die Säule eines „MinElute“-Gefäßes pipettiert. Zum Binden der DNA an die Säule wurde für 1 min bei 10000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nun wurden 500 µl Puffer QG auf die Säule gegeben und wiederum zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 750 µl ethanolhaltigem Puffer PE mit anschließender Zentrifugation für 1 min. Zum Entfernen möglicherweise verbliebener Ethanolreste wurde die Zentrifugation wiederholt. Für die Elution wurde das „MinElute“-Gefäß in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 11 µl Wasser mittig auf die Säule pipettiert. Nach Inkubation von 1min und abschließender Zentrifugation lag die aufgereinigte DNA in einem Volumen von ca. 10 µl vor.

2.2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde mit den automatischen Sequenziergeräten ABI PRISM[®] 310 und 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Terminatoren im Prism[™] Bigdye[™] TerminatorCycle Sequencing ReadyReactionKit von Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die lineare Reaktion wurde bei PCR-Produkten mit einem spezifischen Primer durchgeführt und bei klonierten Fragmenten wurden die vektorspezifischen Primer T3, T7, sp6 und M13 bei einer *Annealing*-Temperatur von 45°C verwendet. Die Reaktion erfolgte im GeneAmp[®] PCR System 9700 oder 2700. Nach der Sequenzierreaktion wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol gefällt und gewaschen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „DNAS[™]“ (Lasergene) oder mit „Sequencher“ der Firma Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA. Die Suche nach Sequenzhomologien erfolgte in der DNA-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.14 Southern-Blot Analyse

2.2.14.1 Southern-Blot

Um DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde das Gel zur Denaturierung der DNA 30 min in Denaturierungslösung (0.25 M NaOH, 0.6 M NaCl) geschwenkt. Die einzelsträngige DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall) übertragen. Dazu wurde das Gel auf zwei Lagen 10x SSC-getränktem Filterpapiers (3MM, Whatman) gelegt, deren überhängende Enden in ein Pufferreservoir von 500 ml 10x SSC eintauchten. Auf das Gel wurde eine in 2x SSC getränkte Nylonmembran gelegt und darauf zwei in 2x SSC getränkte Filterpapiere sowie ein Stapel saugfähiges Zellstoffpapier. Die Konstruktion wurde mit einem Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC geschwenkt, getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung von 5 min bei 302 nm oder in einem UV-Crosslinker (Hoefer) auf der Membran fixiert.

2.2.14.2 Radioaktive Markierung von DNA

Die DNA, die als Sonde für eine radioaktive Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde mit der *random-oligo-priming*-Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) markiert. Bei dieser Methode werden Hexanukleotide mit allen möglichen Nukleotidabfolgen (*random oligos*) als Primer für die Klenow-Polymerase eingesetzt.

Letztere synthetisiert an der einzelsträngigen DNA-Sonde den komplementären Strang und baut dabei radioaktive Nukleotide ein. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l mit H₂O verdünnt und 15 ng der Sonde wurden mit 5 μ l OLB (*oligo labelling buffer*) vermischt, 5 min gekocht, auf Eis gestellt und 1 Unit Klenow-Polymerase sowie 25 μ Ci [α^{32} P]dCTP [10 μ Ci/ μ l] zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT inkubiert. Um die nicht eingebauten Nukleotide von der Sonde zu trennen, wurde der Ansatz mit 25 μ l 10 mM EDTA vermischt, auf Mikrofilter mit einer Porengröße von 0.5 μ m pipettiert und 30 min gegen H₂O dialysiert. Anschließend wurde die Sonde abgenommen, der Filter mit 50 μ l 10 mM EDTA gewaschen und der radioaktive Einbau durch Messung eines 5 μ l-Aliquots im Szintillationszähler (nach Cerenkov) gemessen.

OLB: 50 μ l Lösung A + 125 μ l Lösung B + 75 μ l Lösung C
Lösung A: 0.5 ml 1.25 M Tris-HCl pH 8.0, 0.125 M MgCl₂ + 9 μ l β -Mercaptoethanol
+ je 2.5 μ l 0.1 M dATP, dGTP, dCTP
Lösung B: 0.2 M HEPES pH 6.6
Lösung C: 50 OD pd(N)₆ (Pharmacia) + 550 μ l TE

2.2.14.3 Hybridisierung

Der Southern-Blot (2.2.8.1) wurde in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 4 ml Hybridisierungslösung (4x SSPE, 6% PEG M_r 15000-20000 SIGMA P2263, 2x Denhardts-Lösung, 0.5% SDS, 100 μ g/ml denaturierte Lachssperma-DNA) für 2 h bei 65°C im Rotationsofen (Bachofer) inkubiert. Danach wurden von der hitzedenaturierten Sonde 1.0 x 10⁶ bis 1.5 x 10⁶ cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben und der Southern-Blot über Nacht im Rotationsofen bei 65 C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde der Southern-Blot dreimal bei RT mit 2x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Die Stringenz der anschließenden Waschschrte richtete sich nach dem Hybridisierungsverhalten der radioaktiven Sonde (ca. 10 min bei 65 C mit 2x SSC bzw. 0.1% SDS bis 0.1x SSC bzw. 0.1% SDS). Zur Wiederverwendung eines hybridisierten Southern-Blots wurde die radioaktiv markierte Sonde durch Inkubation für 30 min in kochender 0.1% SDS-Lösung abgewaschen, der Blot getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und bei 4 C gelagert.

2.2.14.4 Autoradiographie

Nach einer Hybridisierung wurden die gewaschenen Southern-Blots kurz getrocknet, auf eine Plastikunterlage gelegt, in Frischhaltefolie gepackt und in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie (Dupont Cronex lightning plus) gelegt. Die verwendeten Röntgenfilme (Fuji Xray RX) wurden vorgeblitzt und auf die Southern-Blots gelegt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke für 1 bis 14 Tage bei -80°C.

2.2.15 Northern-Blot Analyse

Die Hybridisierung der Northern-Blots erfolgte mit 1.5×10^6 bis 3×10^6 cpm der hitzedenaturierten Sonde und einer Hybridisierungslösung aus 5x SSPE, 10x Denhardts-Lösung, 2% SDS, 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA und 50% deionisiertem Formamid. Die Northern-Blots wurden zunächst bei RT gewaschen und danach, wie die Southern-Blots, je nach der verwendeten Sonde 30-45 min bei 50°C im Schüttelwasserbad gewaschen (2x SSC, 0.1% SDS). Die Expositionszeit betrug 1 h.

2.2.16 Subklonierung von DNA-Fragmenten

2.2.16.1 Vektor-DNA

Bei der Subklonierung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsspaltung gewonnen wurden, dienten die Plasmide pT7/T3 (Pharmacia) oder pBluescript (pKS⁺, Stratagene) als Vektoren. Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde ein Vektor generiert, der an seinen 3'-Enden ein überhängendes ddT enthält (ddT-Vektor). Die *Taq*-Polymerase hängt bei der PCR-Reaktion unspezifisch einzelne dATPs an das 3'-Ende von Produkten an. Diese können daher in den ddT-Vektor kloniert werden. In einer Methode von Holton und Graham (1991) wurden zur Herstellung des Vektors 6 µg pBluescript mit *EcoRV* geschnitten, das Enzym hitzeinaktiviert, die DNA gefällt und mit 100 Units Terminaler Transferase in 40 µl 25 mM Tris-HCl pH 6.6, 200 mM KCacodylat, 250 µg/ml BSA, 1.5 mM CoCl₂, 10 µM ddTTP 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionslösungen stammten aus dem „Terminale Transferase Kit“ (Boehringer). Anschließend wurde der Vektor aufgereinigt. Im Laufe dieser Arbeit wurde das selbstständige Synthetisieren des Vektors für Klonierungen von PCR-Fragmenten eingestellt und Subklonierungen folgend mit dem pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) und dem dazugehörigen Puffer nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.16.2 Insert-DNA

Die DNA-Fragmente, die für die Subklonierung eingesetzt wurden, wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe der Microcon-Methode (2.2.12.1) oder aus dem Agarose-Gel mit Hilfe der Millipore-Methode (2.2.12.2) bzw. des MinElute-Kits (2.2.12.3) aufgereinigt.

2.2.16.3 Ligation

Bei einer Klonierung von PCR-Produkten wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA für die Ligation benötigt. Die Ligation mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurde mit 5 Units T₄-DNA-Ligase (Boehringer) in 1x Ligasepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) angesetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Für das pGEM[®]-T Easy Vektor System wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Die Konzentration der PCR-Produkte wurde durch Auftragen auf ein Agarose-Gel abgeschätzt. Die Ligation wurde mit 3 Units T₄-DNA-Ligase (Promega) in 1x Ligasepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 10% Polyethylenglycol) angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.16.4 Herstellung und Transformation 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) gewonnen. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 α wurde in 10 ml ϕ b-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Trypton, 5 g MgSO₄, pH 7.6 [mit KOH]) bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD₅₅₀ von 0.3 erreicht hatte. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml ϕ b-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen eines OD₅₅₀-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 1250g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5.8 [mit 0.2 M HAc]) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen 15 min bei 1250 g und 4°C zentrifugiert und in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6.5 [mit KOH]) gelöst. Die Bakteriensuspension wurde mit vorgekühlten Pipettenspitzen in 100 μ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für eine Transformation wurden 50 μ l der kompetenten DH5 α -Zellen mit 3-8 μ l Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 42°C) wurde der Ansatz kurz auf Eis gestellt, mit 450 μ l LB-Medium gemischt und 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden je 150 μ l und 350 μ l der Kultur auf LB-Indikatorplatten (100 μ g/ml Ampicillin, 40 μ g/ml X-Gal) verteilt, die eine Blau/Weiß-Selektion nach Sambrook *et al.* (1989) ermöglichen. Nach Inkubation der Platten über

Nacht bei 37°C waren weiße (mit Insertion von DNA in den Vektor) und blaue Kolonien (ohne Insertion von DNA in den Vektor) sichtbar. Von den weißen Kolonien wurde die DNA präpariert (2.2.1.3), mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Von den rekombinanten Klonen wurden Stammkulturen (500 µl der ÜNK mit 500 µl sterilem Glycerin) angelegt und bei -80°C gelagert.

2.2.17 Isolierung von Phagen aus einer Nieren-cDNA-Phagenbibliothek

2.2.17.1 Bestimmung des Phagentiters

Die cDNA-Bibliothek wurde in drei Portionen amplifiziert. Um eine optimale klonale Repräsentation zu erzielen, mussten die Phagentiter dieser drei Portionen bestimmt und im vergleichbaren Verhältnis vermischt werden. Zur Bestimmung des Phagentiters wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} mit SM-Puffer hergestellt. Der Wirtstamm XL1-Blue MRF⁺ wurde wie unter 2.2.1.2 beschrieben für eine Phageninfektion vorbereitet, und je 10 µl einer Verdünnung wurden mit 100 µl der phagensensitiven Zellsuspension 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml 50°C warmen Softtop (NZY-Medium, 0.7% Agarose) wurden die Gemische auf kleinen NZY-Platten verteilt und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der *plaque forming units* (pfu) wurde am nächsten Tag gezählt und der Titer (pfu/µl) bestimmt. Entsprechend dem Titer wurden die drei Portionen gemischt und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-4} wurde nochmals wie oben beschrieben der Titer bestimmt.

2.2.17.2 Ausplattieren, Filterabzüge und Hybridisierung der Phagenbibliothek

Aus der Phagenbibliothek wurden insgesamt 10^6 Phagenklone auf insgesamt vier 300 ml NZY-Platten ausplattiert. Dabei wurde pro Platte 1 ml der phagensensitiven XL1-Blue MRF⁺-Bakterienzellen mit 250.000 pfu Phagen vermischt, 15 min bei 37°C inkubiert, 40 ml 50°C warmer Softtop hinzu gegeben und das Gemisch auf der vorgewärmten Platte verteilt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten 4 h bei 4°C gekühlt, um den Agar für das Abziehen der Filter möglichst hart werden zu lassen. Auf jede der gekühlten Platten wurden 4 Nylonfilter (Biodyn A, Pall) der Größe 10.5 x 10.5 cm aufgelegt. Diese wurden an den Ecken mit einer tintegetränkten Kanüle durchstoßen, um die Position der Filter auf den Platten zu markieren. Der erste Filtersatz wurde nach 2 min abgezogen und nacheinander je 5 min auf Filterpapier (Whatman, 3MM) gelegt, das mit

Denaturierungs- (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) bzw. Neutralisierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.0) getränkt war. Es wurden drei weitere Filtersätze abgezogen, die jeweils für 3, 4 und 5 min auf die Platten gelegt wurden. Die Filter wurden mit 3x SSC gewaschen, um anhaftende Bakterien und Agarosereste zu entfernen, anschließend getrocknet und zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C gebacken.

Die Hybridisierung der Filterabzüge der Phagenbibliothek erfolgte wie in 2.2.14.3 beschrieben, allerdings enthielt die Hybridisierungslösung kein PEG und es wurde aufgrund der Größe der Filter in Haushaltsdosen aus Kunststoff hybridisiert. Vor der Prähybridisierung wurden die Filter 1 h mit 4x SSC, 0.5% SDS bei 65°C im Schüttelwasserbad gewaschen, um eventuell noch vorhandene Agarosereste abzuwaschen. Je nach Anzahl der zu hybridisierenden Filter wurden zwischen 100 und 300 ml Hybridisierungslösung und die entsprechende Menge an radioaktiv markierter Sonde verwendet. Die Autoradiogramme wurden mit den NZY-Platten verglichen und die Plaques, die ein positives Hybridisierungssignal zeigten, wurden identifiziert und mit einer Pasteurpipette ausgestochen. Das Agarosestück wurde in 1 ml SM, 10 µl Chloroform überführt und bei 4°C gelagert. Es wurden zum Vereinzeln der Plaques Verdünnungen der Phagensuspension auf 25 ml NZY-Platten ausplattiert und neue Filterabzüge (Rundfilter Biodyn A, Pall) hergestellt. Dazu wurden zwei Rundfilter für 5 bzw. 3 min auf eine Platte aufgelegt und je 5 min denaturiert, neutralisiert und mit 6x SSC gewaschen. Nach Fixierung der DNA durch UV-Bestrahlung wurde mit derselben Sonde hybridisiert. Die positiven vereinzelt Plaques wurden anschließend isoliert und in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform als Phagensuspension aufgenommen.

2.2.17.3 Anfertigen einer Phagen-Stammkultur (*High-Titer-Stock*)

Zur langfristigen Lagerung der vereinzelt Phagen wurden Stammkulturen hergestellt. Dazu wurden 150 µl der Phagensuspension mit 100 µl des Bakterienstammes XL1-Blue MRF' vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml NZY-Medium zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl Chloroform zugegeben, die Kultur 15 min geschüttelt (300 rpm) und die Bakterien 10 min bei 850 g pelletiert. Es wurde 1 ml des Überstands bei 4°C gelagert.

2.2.17.4 *In vivo* Exzisionsprotokoll mit Hilfe des ExAssist™ Helferphagen

Mit Hilfe des ExAssist™ Helferphagen (Stratagene) konnte das pBK-CMV Phagemid aus dem ZAP Express Vektor entfernt und in ein Plasmid überführt werden. Zunächst wurden Bakterienkulturen (5 ml) der Stämme XL1 Blue MRF' und XLOLR angesetzt wie in 2.2.1.2 beschrieben und die Bakterien in 2 ml 10 mM MgSO₄ langsam gelöst. Nun wurden 100 µl des Bakterienstammes XL1-Blue MRF' mit 100 µl Phagensuspension und 1 µl ExAssist™ Helferphage vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 3 ml LB-Medium hinzugefügt und das Gemisch 2.5 bis 3 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Nach dieser Zeit folgten 20 min bei 70°C und es wurde 15 min bei 10000 g zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde als filamentöser Phagenstock bei 4°C gelagert. Nun wurden 200 µl des Bakterienstammes XLOLR mit 100 bzw. 10 µl des filamentösen Phagenstocks vermischt und nach 15 min Inkubation bei 37°C auf LB-Platten ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 275 rpm geschüttelt. Die DNA wurde wie in 2.2.1.3 beschrieben präpariert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Methylierungsauffälligkeiten bei vier Patienten mit atypischem PWS und AS

Patienten mit einem Imprinting-Defekt haben zwar Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, aber bei PWS-Patienten weist das paternale Chromosom 15 eine maternale Prägung auf und bei AS-Patienten das maternale Chromosom eine paternale Prägung. Diese Patienten zeigen an einzelnen elternspezifisch methylierten Bereichen in der PWS/AS-Region ein uniparentales Methylierungsmuster, das sich über die gesamte PWS/AS-Region erstreckt (siehe Normalperson, ID/PWS, ID/AS in Abb. 3.2) (Runte *et al.*, 2001b). Dies konnte Claudia Färber in ihrer Promotionsarbeit durch eine Methylierungsanalyse für verschiedene Loci in der PWS-AS-Region (*NDN*, u1D, u1B, PW71/u1A (D15S63), *SNURF-SNPRN* Exon 1 (*CpG-island*), *SNURF-SNPRN* Intron 7 und YL48E) zeigen, die mit differentiell methylierten Schnittstellen assoziiert sind.

In der Routine-Diagnostik fielen vier Patienten auf, die ein normales Methylierungsmuster für die Exon 1-Region des *SNURF-SNRPN*-Gens (*CpG-island*) hatten, aber eine abnormale Methylierung am *D15S63*-Locus (PW71) aufwiesen. Bei zwei der Patienten (LE und FB) bestand der Verdacht auf ein PWS und bei den Patienten MK und MC war die Verdachtsdiagnose AS. Eine UPD und eine Deletion der gesamten Region konnten ausgeschlossen werden. Eine Mikrosatelliten-Analyse ergab, dass die Patienten Chromosomen 15 biparentaler Herkunft haben (nicht gezeigt). Das normale Methylierungsmuster am *SNURF-SNRPN*-Locus (*SNURF-SNRPN* CpG) aller vier Patienten wurde durch eine methylierungssensitive Southern-Blot Untersuchung identifiziert. Hierfür wurde die DNA der Patienten mit einem häufig spaltenden Restriktionsenzym (*Xba*I) und einem methylierungssensitiven Enzym (*Not*I) geschnitten. Ein methylierungssensitives Enzym spaltet die DNA nur, wenn sie nicht methyliert ist. Daher wird in der Southern-Blot-Analyse mit einer Sonde für diesen Locus (KB17; Saitoh *et al.*, 1996) das unmethylierte paternale Allel als ein kürzeres Fragment detektiert und das methylierte maternale Allel als ein längeres Fragment (siehe *SNRPN* CpG Insel in Abb. 3.1). Bei der Southern-Blot-Analyse für eine differentiell methylierte *Cfo*I-Schnittstelle am Locus *D15S63* (PW71/u1A) detektierte die Hybridisierungssonde PW71C bei den Patienten LE und FB eine schwächer methylierte (maternale) Bande und eine stark methylierte (paternale) Bande. Dieses eher AS-ähnliche Muster steht im Widerspruch zu dem Phänotyp der Patienten, die eher PWS-Symptome zeigen. Die Patienten MK und MC

mit den eher typischen Symptomen eines AS zeigten eine stark methylierte (maternale) Bande und eine schwächer methylierte (paternale) Bande, also eher das Methylierungsmuster eines PWS (Abb. 3.1).

3.1.1 Methylierungsanalysen in der chromosomalen Region 15q11-q13

Um zu überprüfen, ob die Methylierungsauffälligkeit auf die *CfoI*-Schnittstelle am Locus *DI5S63* beschränkt ist oder ob weitere Loci betroffen sind, die mit differenziell methylierten Restriktionsschnittstellen innerhalb der Region 15q11-q13 assoziiert sind, wurden verschiedene Bereiche durch methylierungssensitive Southern-Blot-Analyse analysiert. Die Restriktionsenzyme und Hybridisierungs sonden, die für die einzelnen Loci verwendet wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Auch die resultierenden allelspezifischen Fragmentgrößen sind dort angegeben.

Tabelle 3.1: Übersicht über die untersuchten Loci in der Region 15q11-q13, die mit differenziell methylierten Restriktionsschnittstellen assoziiert sind.

Locus	Hybridisierungs-sonde	Referenz	Enzym-kombination	Fragmentgrößen [kb]		
				maternal	paternal	konstant
<i>NDN</i>	PCR mit Primern von Robert D. Nicholls	Jay <i>et al.</i> , 1997; MacDonald und Wevrick, 1997	<i>HindIII</i> + <i>EagI</i>	2.7	0.9	10
ulD	D800	Färber <i>et al.</i> , 1999	<i>HindIII</i> + <i>CfoI</i>	9.0	13	
u1B	B800	Dittrich <i>et al.</i> , 1996	<i>HindIII</i> + <i>CfoI</i>	9.2	7.4	
71.19.12	71.19.12HR	Saitoh <i>et al.</i> , 1996	<i>HindIII</i> + <i>SacII</i>	12	7	
<i>PW71</i> u1A	PW7IC	Dittrich <i>et al.</i> , 1993	<i>BglII</i> + <i>CfoI</i>	8.0	6.4	
<i>PW71</i> LTR	PW7IC	Dittrich <i>et al.</i> , 1993	<i>HindIII</i> + <i>HpaII</i>	6.6	4.4 2.5	
YR9AB (RN4RR)	PCR mit Primern von Robert D Nicholls	Dittrich <i>et al.</i> , 1994; Gabriel <i>et al.</i> , 1994; Nicholls <i>et al.</i> , 1998	<i>TaqI</i> + <i>HpaII</i>	2.2	1.8	1
Y48.5	Y48.5	Buiting <i>et al.</i> , 1995	<i>SacI</i> + <i>HpaII</i>	2.9 1.0	2.9 2.5	
<i>SNURF-SNRPN</i> CpG	kb17	Saitoh <i>et al.</i> , 1996	<i>XbaI</i> + <i>NotI</i>	4.2	0.9	
<i>SNURF-SNRPN</i> Intron 7	Smnl	Buiting <i>et al.</i> , 1993	<i>BglII</i> + <i>CfoI</i>	5.8 5	5.8	7.5 (Pseudogen Chromosom 6) 4.5 (Exon 3?)
YL48E	YL48E	-	<i>HindIII</i> + <i>HpaII</i>	3.0 2.6	3.0	

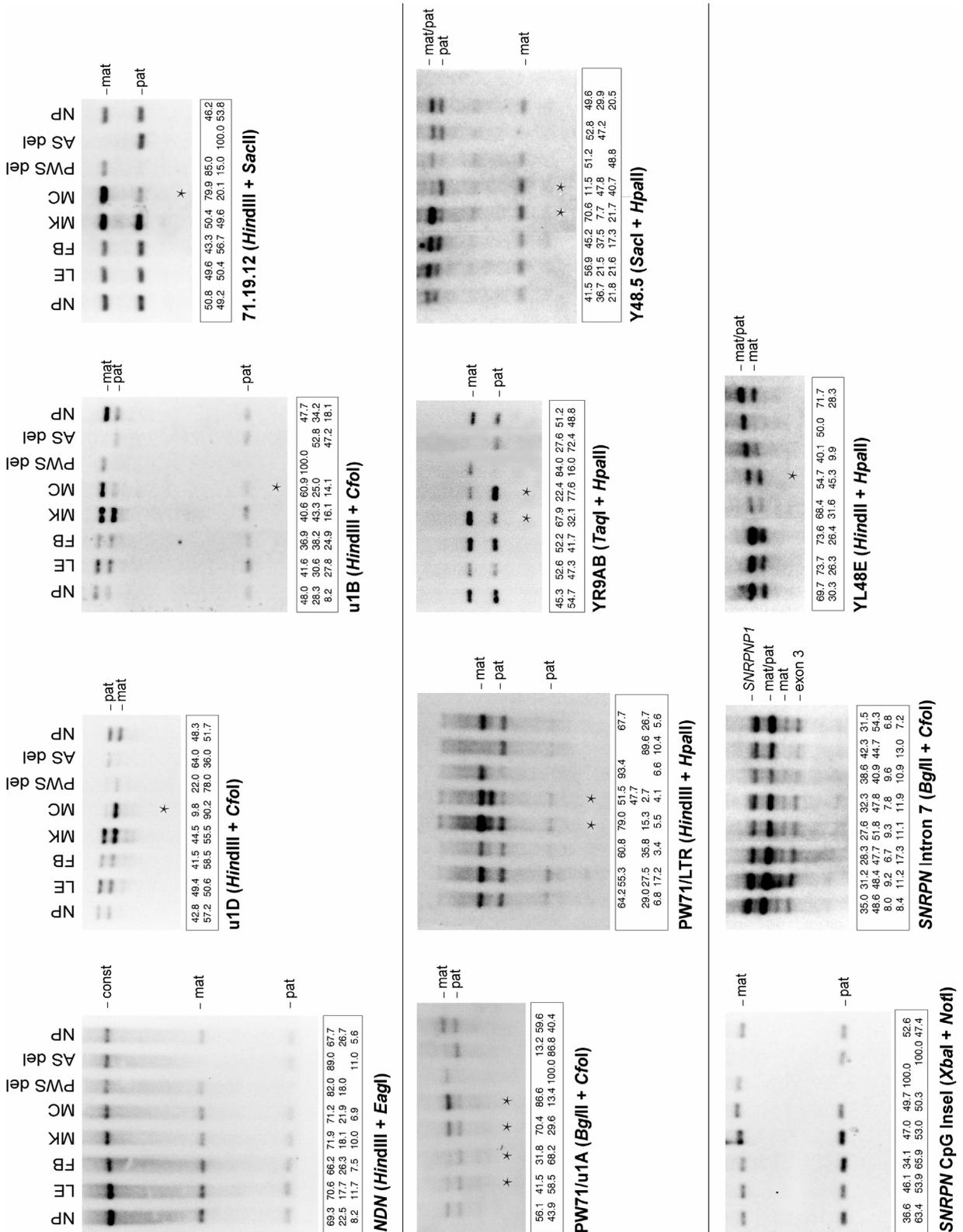


Abb. 3.1: Methylierungssensitive Southern-Blot-Analysen der Patienten LE, FB, MK und MC mit Sonden für *NDN*, *u1D*, *u1B*, *71.19.12*, *PW71* Exon *u1A*, *PW71* LTR, *YR9AB*, *Y48.5*, *SNURF-SNRPN* CpG-Insel, *SNURF-SNRPN* Intron 7 und *YL48E*. Als Kontrollen wurde DNA von Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion der Region 15q11-q13 (AS del, PWS del) sowie einer Normalperson (NP) benutzt. Mat, maternal; pat, paternal; const, konstant. Die relativen Intensitäten der Banden sind jeweils unter dem Autoradiogramm in Prozent angegeben. Sterne geben ein auffälliges Methylierungsmuster an

Die Patienten LE und FB zeigten ein normales biparentales Methylierungsmuster an jedem dieser Loci (Abb. 3.1), d. h. eine Methylierungsveränderung findet sich ausschließlich an der *CfoI*-Schnittstelle im Locus *DI5S63*. Auch eine eng benachbarte *HpaII*-Schnittstelle 1.3 kb distal der *CfoI*-Bindestelle zeigte eine Bandenverteilung, die mit der einer Normalperson vergleichbar ist. Die DNA der Eltern beider Patienten zeigte keine Auffälligkeiten für die *CfoI*-Schnittstelle.

Die Southern-Blot-Analysen für die untersuchten Loci zeigten bei Patient MK an vier Positionen veränderte Bandenintensitäten gegenüber der Kontroll-DNA (PW71/u1A, PW71/LTR, YR9AB und YL48E) (Abb. 3.1). Es war jeweils die methylierte, maternale Bande stärker, was auf eine verstärkte Methylierung des väterlichen Chromosoms an diesen Positionen hindeutet. Insgesamt umfasst die Region, in der Methylierungsabweichungen gefunden wurden, annähernd 50 kb.

Die Untersuchung der DNA von Patientin MC ergab ein auffälliges Muster an insgesamt acht Positionen, wobei die Tendenz mal in Richtung Hypomethylierung und mal in Richtung Hypermethylierung ging (Abb. 3.1). Am Locus YR9AB lag das maternale Allel hypomethyliert vor (22.4% relative Intensität der paternalen Bande gegenüber 45.3% bzw. 51.2% bei Normalpersonen). An den beiden untersuchten Restriktionsschnittstellen (*CfoI* und *HpaII*) des Locus *DI5S63* (PW71/u1A und PW71/LTR) sowie die Loci 71.19.12 und u1B wies eine Überrepräsentation der methylierten Bande auf eine Hochmethylierung des paternalen Allels hin. Am Locus u1D dagegen, wo in der Mehrzahl der Zellen das väterliche Allel methyliert ist, war dieses Allel bei Patientin MC sehr stark hypomethyliert mit einer relativen Intensität von 9.8 %. Auch eine untersuchte, differentiell methylierte *HpaII*-Schnittstelle, die durch die Hybridisierungssonde Y48.5 erkannt wird, weist bei der Patientin MC Unterschiede zur Normalperson auf. Da an diesem Locus jedoch zwei *HpaII*-Bindestellen gleichzeitig betrachtet werden, lässt sich das Bandenmuster im Southern-Blot nicht eindeutig interpretieren. Bei dem Locus YL48E liegt auch in der normalen Situation keine eindeutige Methylierung vor, da das väterliche Allel komplett und das mütterliche nur in einigen Zellen methyliert vorliegt. Dadurch war es auch hier nicht möglich, das Methylierungsmuster in der *HpaII*-Restriktion der DNA von MC eindeutig zu interpretieren. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Patienten LE, FB, MK und MC sind in Abb. 3.2 zusammenfassend dargestellt.

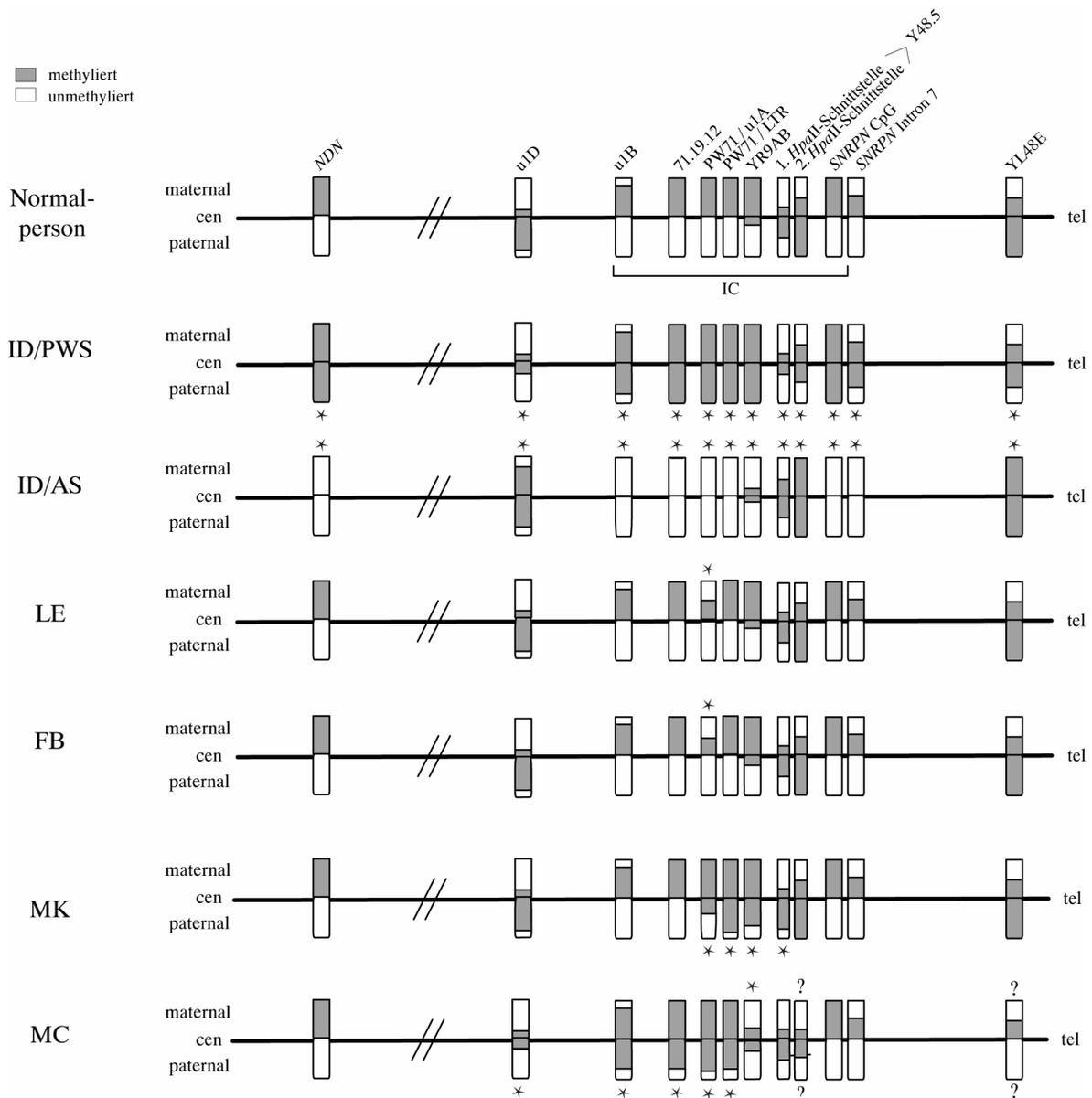


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Methylierungsstatus einer Normalperson und bei Patienten mit einem Imprinting-Defekt (ID/PWS; ID/AS) sowie den Patienten LE, FB, MK und MC. Die Balken zeigen den Methylierungsgrad in grauer Schattierung. Sterne weisen auf eine auffällige Methylierung hin. Bei der Patientin MC war die parentale Identität des aberranten Musters an den Loci Y48.5 und YL48E nicht klar, was durch Fragezeichen gekennzeichnet ist.

3.1.2 Ausschluss struktureller Aberrationen und Deletionen in der IC-Region

Das IC reguliert *in cis* die DNA-Methylierung der gesamten geprägten Region 15q11-q13. Um herauszufinden, ob bei den vier Patienten eventuell eine strukturelle Aberration oder eine kleine Deletion in der IC-Region vorliegt, die zu den partiellen Methylierungsveränderungen führt, wurde eine 35 kb umfassende Region proximal von *SNURF-SNRPN* Exon 1 durch Southern Blot-Analyse auf Veränderungen hin untersucht.

Strukturelle Aberrationen würden durch Fragmentlängenveränderungen auffallen, während Deletionen eine Reduktion in der Intensität der Hybridisierungssignale zur Folge hätten. Mit Hilfe des Programms DNASTAR *MapDraw* (Lasergene) wurde eine Restriktionskarte für die zu untersuchende Region angefertigt und in der Sequenz nach Schnittstellen verschiedener, häufig schneidender Enzyme gesucht. Es wurden fünf Restriktionsenzyme (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *XbaI* und *SacI*) ausgewählt. Für jedes dieser Restriktionsenzyme wurde ein Southern-Blot mit DNA der vier Patienten und von Normalpersonen hergestellt, der dann mit vier mittels PCR generierter Sonden hybridisiert wurde: SNPWSCT 2a (309 bp), SNPWSCT 5a (131 bp), SNPWSCT 9a (531 bp) und SNPWSCT 12a (1.2 kb). Die Sonden wurden so gewählt, dass die Fragmente, die sie detektieren, den 35 kb umfassenden Bereich möglichst komplett abdeckten. Eine strukturelle Aberration oder Deletion konnte bei allen vier Patienten ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

3.1.3 Methylierungsanalyse des differentiell methylierten CpG islands des *KCNQ1* Antisense Transkripts in der chromosomalen Region 11p15.5

Möglicherweise resultiert die aberrante Methylierung bei den vier Patienten aus einem Defekt, der nicht auf die Region 15q11-q13 beschränkt ist, sondern auch andere chromosomale Bereiche betrifft, die dem genomischen Imprinting unterliegen. Der Grund dafür könnte möglicherweise der Verlust eines *trans* aktiven Faktors sein. Ein Beispiel für eine gut charakterisierte Region, die dem Imprinting unterliegt, ist die für das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) relevante Region auf Chromosom 11p15.5. In dieser sehr komplexen Region wurden bisher 12 geprägte Gene identifiziert, die durch zwei unterschiedliche zentrale Elemente reguliert werden (Weksberg *et al.*, 2003). Der Locus *KCNQ1* ist mit einer auf dem maternalen Allel methylierten Region (*KvDMR1* oder DMR2) assoziiert, die im Intron 10 des Gens liegt. In dieser Region startet die Transkription von *KCNQ1OT1* in Antisense Orientierung zu *KCNQ1* (Smilnich *et al.*, 1999). Annähernd 50% der Patienten mit BWS haben eine Epimutation, die im Verlust des Imprintings von *KCNQ1OT1* resultiert. Durch Southern-Blot-Analyse nach Restriktion mit *EcoRI* und *NotI* konnte der Methylierungsstatus der *NotI*-Schnittstelle an DMR2 überprüft werden. Die Patienten LE, FB, MK und MC zeigten ein unauffälliges Bandenmuster und es konnte somit ein genereller Methylierungsdefekt ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

3.2 *SNURF-SNRPN* ist Teil einer großen und komplexen Transkriptionseinheit

Das *SNURF-SNRPN*-Gen ist ein bicistronisches Gen mit ursprünglich zehn Exons, für das in den letzten Jahren weitere 3'-Exons identifiziert werden konnten (Exons 10a-20) (Buiting *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2001). Das letzte Exon umfasst 15.8 kb und enthält drei potentielle Polyadenylierungsstellen. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Exon eine alternative Spleiß-Donorstelle enthält und dass es weitere 3'-Exons gibt.

In der Region distal zu *SNURF-SNRPN* konnten verschiedene Gene für kleine nukleoläre RNAs (*small nucleolar RNA*; snoRNA) identifiziert werden (Cavaillé *et al.*; 2000, Runte *et al.*, 2001a). Da snoRNA-Gene in der Regel in den Introns von Haushaltsgenen lokalisiert sind und nach Expression dieser Gene und anschließendem Spleißen der RNA freigesetzt werden, sind in der Region distal von *SNURF-SNRPN* ein oder mehrere Gene zu vermuten, in dessen oder in deren Introns diese snoRNA-Gene lokalisiert sind.

Es wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit versucht, weitere Exons in dem distalen Bereich von *SNURF-SNRPN* identifizieren. Die Identifizierung exprimierter Sequenzen in diesem Bereich kann ebenfalls Aufschluss über ein oder auch mehrere potentielle Wirtsgene für die snoRNA-Gene geben.

3.2.1 Identifizierung von exprimierten Sequenzen telomerisch von *SNURF-SNRPN* Exon 20

Es wurde zunächst eine zusammenhängende Sequenz aus Einzelsequenzen bereits bekannter genomischer Klone für den Bereich distal von *SNURF-SNRPN* erstellt (Abb. 3.3). Für den Bereich direkt distal der bekannten *SNURF-SNRPN*-Exons lag uns die Sequenz des BAC-Klons RP11-131I21 (GenBank-Accession-Nummer AC009696) vor. Die Sequenz dieses Klons wurde in 3'→5'-Orientierung in der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)-Datenbank veröffentlicht. Dies konnte durch die Lage der bekannten *SNURF-SNRPN*-Exons 1 bis 20 innerhalb dieses Klons bestimmt werden. Insgesamt umfasst der BAC-Klon 159 kb. Die Sequenz dieses Klons überlappt mit der Sequenz zweier weiterer genomischer Klone über einen Bereich von 11 kb. Hierbei handelt es sich um die zwei überlappenden Klone A17157 und P0950, die zusammen 228 kb spannen (GenBank-Accession-Nummer AF250841). Weiter distal konnten die 134 kb des PAC-Klon pDJ373b1 (GenBank-Accession-Nummer AC004600) kartiert werden, der die 16 Exons des *UBE3A*-Gens enthält. Allerdings gab es keine Überlappung zu dem Klon AF250841. Es konnte durch Datenbank-Suche in der NCBI-Datenbank Blast

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kein komplett sequenzierter PAC- oder BAC-Klon identifiziert werden, sondern nur eine aus mehreren ungeordneten Fragmenten bestehende Sequenz (PAC-Klon RP13-487P22, *Accession-Nummer* AF084009). Durch die Teilsequenzen dieses PAC-Klons konnte die 11 kb große Sequenzlücke allerdings geschlossen werden. Im Verlauf der Arbeit konnte diese Überlappung durch einen komplett sequenzierten genomischen Klon (*Accession-Nummer* AC100774) bestätigt werden.

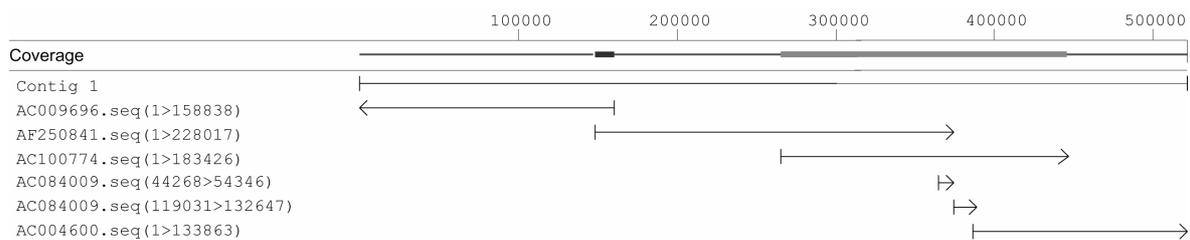


Abb. 3.3: Graphische Darstellung der genomischen Klone, die insgesamt mehr als 500 kb spannen. In Klammern sind die Sequenzen (von x bp bis y bp des Klons) angegeben, die in das Contig eingebunden wurden. Es wurden zwei Fragmente des nicht komplett sequenzierten Klon AC084009 eingebunden.

Mit Hilfe dieses Contigs konnten die bisher bekannten Gene (*SNURF-SNRPN* Exons 1-20, *IPW* und *UBE3A*) und die verschiedenen snoRNA-Gene in der Region distal von *SNURF-SNRPN* genau kartiert werden (Abb. 3.4).

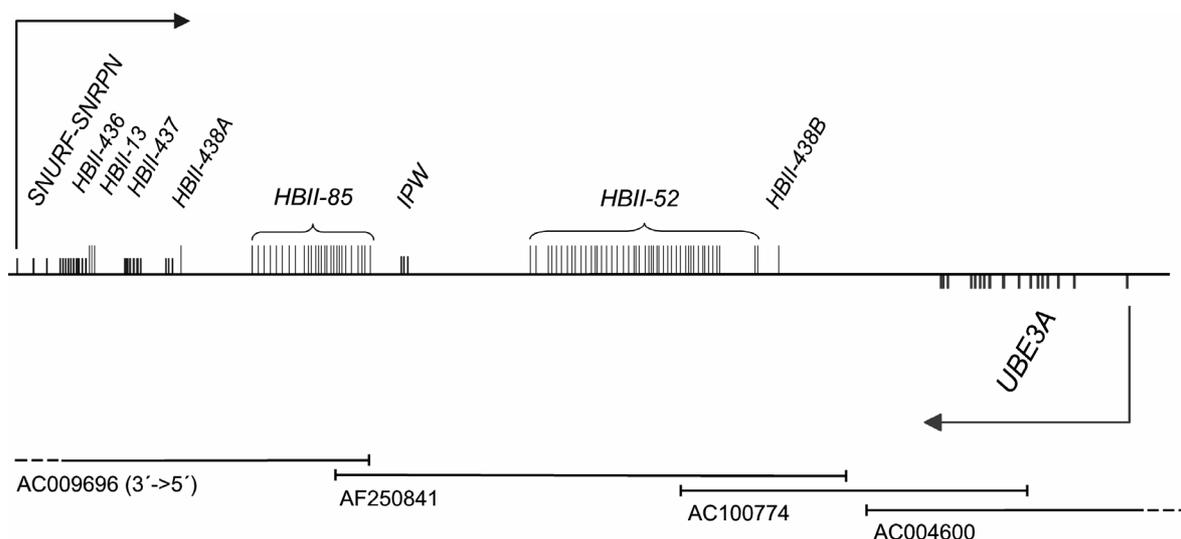


Abb. 3.4: Übersicht über die Region, die durch die überlappenden Sequenzen der genomischen Klone AC009696, AF250841, AC100774 und AC004600 abgedeckt wird (im unteren Teil der Abbildung als Striche dargestellt). *SNURF-SNRPN* Exons 1-20 sind als kurze Striche oberhalb der horizontalen Linie dargestellt und die snoRNA-Genkopien als längere Striche. Die Exons des maternal exprimierten *UBE3A*-Gens sind unterhalb der horizontalen Linie dargestellt. Die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin.

Mit dem im Internet verfügbaren Programm NIX (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/>), mit dessen Hilfe man Sequenzen hinsichtlich verschiedener genetischer und Protein-relevanter Parameter analysieren lassen kann, wurde mit der Sequenz des Contigs nach exprimierten Sequenzen (*expressed sequence tags*, ESTs) gesucht. Mit diesem Programm konnten auch konservierte Promotorsequenzen für diese Region ausgeschlossen werden. Durch die NIX-Analyse wurden EST-Klone identifiziert, die eine gespleißte Organisation aufwiesen, da sie gegenüber der genomischen Sequenz als einzelne Fragmente dargestellt wurden. Zur genaueren Übersicht wurden die in Frage kommenden EST-Klone zusammen mit der genomischen Sequenz mit Hilfe der Software SeqMan (DNASTAR, Lasergene) in einem Contig zusammengefügt. Es ließen sich zwei Bereiche ermitteln, an denen gehäuft ESTs auftraten. Eine Ansammlung von ESTs lag distal von *SNURF-SNPRN* auf dem PAC AC009696 und auf dem proximalen Bereich von AF250841 (proximales Cluster), während das zweite Cluster 147 kb weiter distal auf dem PAC-Klon AC004600 im Bereich des *UBE3A*-Gens lokalisiert war (distales Cluster).

Insgesamt wurden für das proximale Cluster 15 ESTs identifiziert (Abb. 3.5). Zur vollständigen Analyse wurden sechs der dazugehörigen cDNA-Klone (AI968076, AI990296, AI638004, AW237252, R11106, AI672541) beim Ressourcen Zentrum/Primär Datenbank (RZPD) in Berlin bestellt, die DNA präpariert, die Größe des einklonierten Fragments überprüft und dieses mit Vektor- und Sequenz-spezifischen Primern komplett sequenziert. Insgesamt konnten durch das proximale EST-Cluster 26 neue Exons identifiziert werden, die sich in verschiedenen alternativ gespleißten Varianten präsentierten (Abb. 3.5). Diese Varianten schlossen die drei Exons des Gens *IPW* ein, das bisher als eigenständig galt (Wevrick *et al.*, 1994). In diesem Bereich zeigte die Sequenzstruktur der Klone AV727404 und AI672541 eine Variante, bei der das zweite Exon nicht genutzt wird und des Weiteren gibt es mindestens drei zusätzliche 5'-Exons, was durch die cDNA-Klone AV723198, H93815, R11106, AV727404 und AI672541 gezeigt werden konnte (Abb. 3.5).

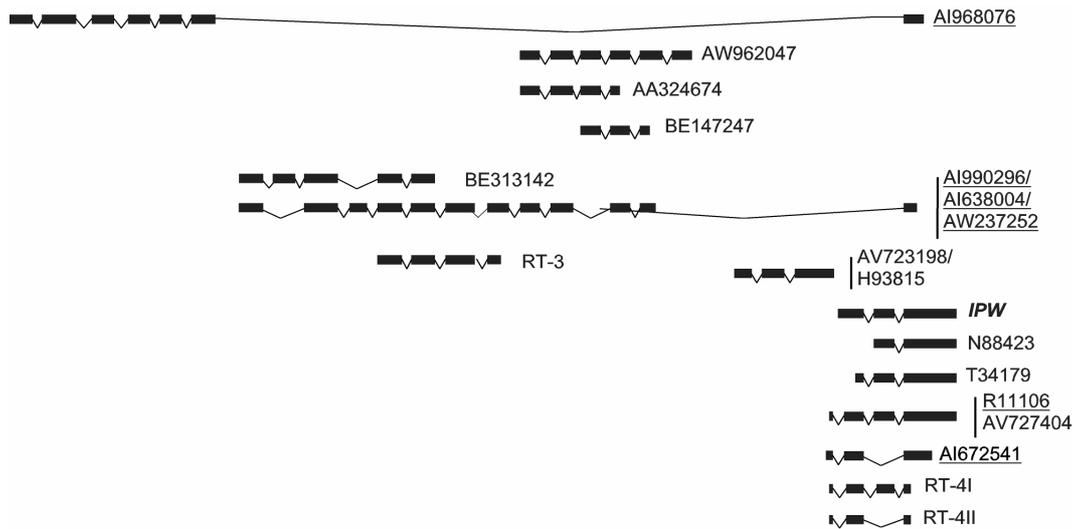


Abb. 3.5: Übersicht über die identifizierten cDNA-Klone des proximalen Clusters. Es ist die Exon-Intron-Struktur dargestellt, die sich aus dem Sequenz-Abgleich mit den genomischen Klonen AC009696 und PAC AF250841 ergibt. Die cDNA-Klone der unterstrichenen EST-Namen wurden komplett sequenziert. Weiterhin sind die RT-PCR Experimente (RT-x) angegeben, die an RNA aus fetalem Gehirn und zum Teil auch an RNA aus peripherem Blut durchgeführt wurden, um die ermittelten Exons zu verifizieren. Die Boxen repräsentieren die ermittelten Exons. Die cDNA-Klone der unterstrichenen EST-Namen wurden komplett sequenziert.

Es wurden 147 kb weiter telomer dieses EST-Clusters weitere ESTs gefunden (distales Cluster), die im Abgleich mit den genomischen Klonen A17157/P0950 (*Accession-Nummer* AF250841) und pDJ373b1 (*Accession-Nummer* AC004600) eine gepleißte Struktur zeigten. Dieses waren die sieben ESTs mit den GenBank-*Accession-Nummern* R19540, N52596, W90408, W90381, AA678360, T95551 und T95552. Die ESTs W90408 und W90381 bzw. T95551 und T95552 repräsentieren jeweils nur einen cDNA-Klon, wobei W90408 und T95551 mit dem spezifischen 5'-Primer des Vektors sequenziert wurden, während es sich bei W90381 und T95552 um die 3'-Sequenz handelt. Die Sequenzen lagen unter verschiedenen *Accession-Nummern* in der Datenbank vor. Da von keinem der Klone die Sequenz vollständig vorlag, wurden diese ebenfalls beim RZPD in Berlin bestellt, die DNA präpariert und die Sequenz der Klone mit spezifischen Primern komplettiert.

Nach Ermittlung der Exon-Intron-Übergänge konnten insgesamt 11 Exons identifiziert werden, die in drei verschiedenen Spleißvarianten genutzt wurden (Abb. 3.6). Die Inserts der cDNA-Klone W90408/W90381 und AA678360 waren identisch und führten zur Identifizierung von neun weiteren Exons. Die Sequenz der Klone wies ein Polyadenylierungssignal (Poly(A)-Signal; 5'-AATAAA-3') 13 bp vor Abbruch der Sequenz auf. Bis auf das erste Exon, das fehlte, enthielt der cDNA-Klon, der durch die ESTs T95551 und T95552 repräsentiert wurde, die gleichen Exons wie W90408/W90381

und AA678360. Allerdings endete die Sequenz 18 bp nach dem Poly(A)-Signal. Vier dieser Exons waren auch in den cDNA-Klonen R19540 und N52596 enthalten. Die Sequenzierung des Klons R19540 führte distal zu zwei weiteren Exons, während die Sequenz des Klons N52296 ein Exon übersprang (Abb. 3.6). Das letzte Exon der beiden Klone enthielt ebenfalls ein Poly(A) Signal.

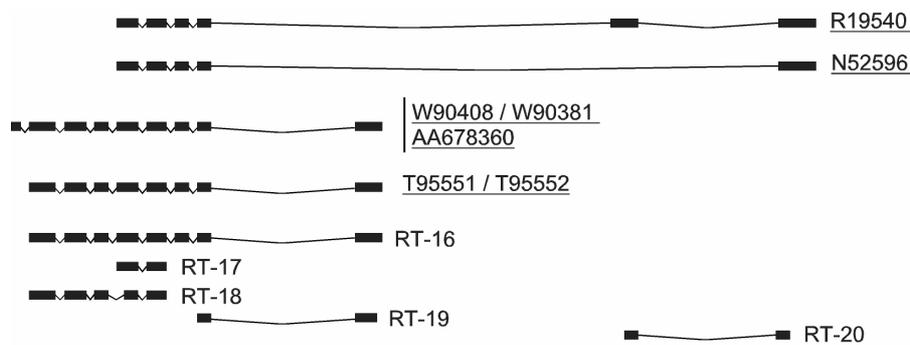


Abb. 3.6: Übersicht über die identifizierten cDNA-Klone des distalen Clusters. Es ist die Exon-Intron-Struktur dargestellt, die sich aus dem Sequenz-Abgleich mit dem genomischen Klon AC004600 ergibt. Alle cDNA-Klone wurden komplett sequenziert und sind unterstrichen dargestellt. Weiterhin sind die RT-PCR Experimente (RT-x) angegeben, die an RNA aus fetalem Gehirn und zum Teil auch an RNA aus peripherem Blut durchgeführt wurden, um die ermittelten Exons zu verifizieren. Die Boxen repräsentieren die ermittelten Exons.

Zur Verifizierung der durch die Datenbanksuche ermittelten Exons wurde an verschiedenen Positionen mit spezifischen Primern eine PCR an cDNA oder eine RT-PCR an RNA aus humanem fetalen Gehirn durchgeführt.

Zur Bestätigung der durch die cDNA-Klone des proximalen Clusters ermittelten Exons wurden zwei Primerpaare synthetisiert. Die Aufreinigung und Sequenzierung des Produkts der PCR RT-3 (Primer AI990296a und AI990296b) ergab die gleiche Sequenz wie die innerhalb der cDNA-Klone (Abb. 3.5). Die Analyse der PCR RT-4 (Primer IPWI und IPWII) auf dem Agarosegel ergab zwei Banden verschiedener Größe. Die Aufreinigungen und Sequenzierungen beider Produkte ergaben zwei alternativ gespleißte Transkriptionsvarianten (RT-4I und RT-4II), wobei die kürzere Variante ein Exon weniger aufwies (Abb. 3.5). Die überprüften Exons konnten also bestätigt werden. Allerdings lagen zwischen dem 15.8 kb umfassenden Exon 20 von *SNURF-SNRPN* und dem ersten Exon des cDNA-Klons AI968076 insgesamt 23 kb genomischer Sequenz, die durch keinen cDNA-Klon überbrückt werden konnten.

Für die Verifizierung der Exons im distalen EST-Cluster wurden fünf verschiedene RT-PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 3.6). Die durch den cDNA-Klon W90408/W90381 ermittelten Exons wurden durch eine RT-PCR (RT-16) mit Primern im zweiten und im

letzten Exon des cDNA-Klons (MRts2-9F und MRts2-9R) bestätigt. Auch mit den RT-PCR-Analysen RT-17 (Primer MRts5-6F und MRts5-6R), RT-18 (Primer MRts2-6F und MRts2-6R) und RT-19 (Primer MRts8-9F und MRts8-9R) konnten die ermittelten Exons verifiziert werden. Der distale Bereich des Clusters wurde mit Hilfe von Primern in den letzten beiden Exons (MRts10-11F und MRts10-11R) bestätigt (RT-20).

3.2.2 Isolierung von cDNA-Klonen

Zwischen den insgesamt 37 neu identifizierten Exons lagen immer noch zwei Lücken vor, für die keine verbindenden cDNA-Klone gefunden werden konnten. Zum einen waren das 23 kb zwischen *SNURF-SNP* Exon 20 und dem ersten Exon des cDNA-Klons AI968076 und zum anderen 147 kb zwischen dem letzten Exon dieses Clusters und dem Beginn des distalen Clusters mit den ESTs W90408/W90381.

Zur Identifizierung weiterer exprimierter Sequenzen wurde eine cDNA-Bibliothek aus humaner Niere genutzt, die für Inserts zwischen 3 und 12 kb selektioniert ist. Die Bibliothek wurde ausplattiert und nach dem Transfer auf Nylon-Membranen mit spezifischen Sonden für das proximale und distale Cluster hybridisiert. Als Hybridisierungssonden wurden die RT-PCR-Produkte RT-3 (Abb. 3.5) für das proximale und RT-18 (Abb. 3.6) für das distale Cluster genutzt, die nach erfolgter RT-PCR aufgereinigt und radioaktiv markiert wurden. Die cDNA-Klone, die nach Exposition auf dem Röntgenfilm ein Signal zeigten, wurden durch mehrmaliges Ausplattieren und Hybridisieren vereinzelt und letztendlich deren DNA isoliert. Das inklonierte Fragment wurde jeweils zur Größenabschätzung mit *EcoRI* und *XhoI* restringiert und anschließend mit Vektor und Sequenz-spezifischen Primern sequenziert.

Für den Bereich des proximalen Cluster konnten 16 cDNA-Klone isoliert werden (kid1-16) und für den des distalen Clusters ein cDNA-Klon (kid17). Beim Abgleich der Sequenzen von kid1 bis 16 mit den genomischen Sequenzen (AC009696 und AF250841) konnten weitere Exons zwischen *SNURF-SNRP*N und den *IPW*-Exons identifiziert werden. Die cDNA-Klone, die gleiche Spleißvarianten darstellten, werden in Abb. 3.7 exemplarisch durch einen cDNA-Klon repräsentiert. Durch den cDNA-Klon kid4 konnten zwei weitere Exons im proximalen Bereich des Clusters in Richtung Exon 20 des *SNURF-SNRP*N-Gens ermittelt werden.

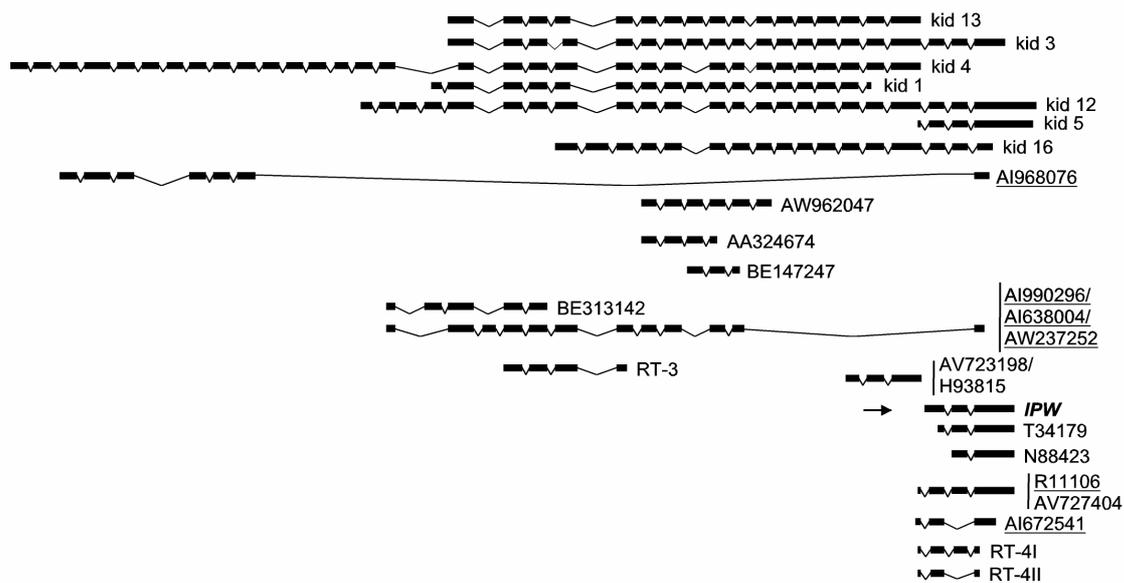


Abb. 3.7: Darstellung des proximalen Clusters mit weiteren Exons, die durch die cDNA-Klone, die aus der humanen Nieren-cDNA-Bibliothek isoliert werden konnten, identifiziert wurden. Die Boxen repräsentieren einzelne Exons. Die obersten Reihen zeigen die cDNA-Klone (kid) und die folgenden Reihen EST-Sequenzen sowie RT-PCR-Produkte. Die cDNA-Klone der unterstrichenen ESTs wurden komplett sequenziert.

Durch eine Exon-verbindende PCR sollte versucht werden, Exons zu amplifizieren, die die bereits bekannten *SNURF-SNRPN*-Exons (Exons 1-20) mit der 17 kb entfernt beginnenden Transkriptionseinheit des proximalen Clusters verbinden. Dazu wurden die Primer NG95 und NG96 generiert, deren komplementäre Sequenzen sich in *SNURF-SNRPN* Exon 18 und im ersten Exon des cDNA-Klons kid4 befinden. Es wurde eine PCR an cDNA aus fetalem Gehirngewebe durchgeführt, die bei der Firma Clontech erhältlich ist. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach der Agarosegel-Elektrophorese waren zwei Produkte von ca. 550 bp (RT-2I) und ca. 400 bp (RT-2II) zu erkennen. Es wurden beide Produkte aus dem Gel aufgereinigt und sequenziert. Beide Produkte enthielten Exon 18 und 19 von *SNURF-SNRPN* (Abb. 3.8). In Exon 20, das bisher 15.8 kb umfasste, wird eine alternative Spleiß-Donorstelle genutzt und führt zu einem verkürzten Exon 20 (Exon 20a) von 172 bp. In dem kleineren der beiden Produkte wird dieses Exon direkt an das erste Exon von kid 4 gespleißt, während in dem größeren der Produkte ein alternatives Exon folgt. Dieses Exon liegt 15 kb distal der 15.8 kb, die *SNURF-SNRPN* Exon 20 alternativ umfassen kann. Eine RT-PCR mit den Primern NG83 und NG84 bestätigte dieses alternative Exon (RT-1). Diese Daten zeigen, dass die neu ermittelten Exons des proximalen Clusters weitere 3'-Exons des *SNURF-SNRPN*-Gens sind.

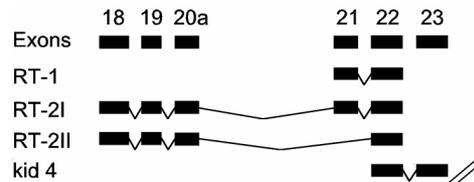


Abb. 3.8: Darstellung der RT-PCRs RT-1, RT-2I und RT-2II, die zur Verbindung des *SNURF-SNRPN* Exons 20 und des proximalen Cluster durch kid4 führen.

Der cDNA-Klon kid17, der für das distale Cluster isoliert wurde, umfasste 6.1 kb. Aufgrund hoher Sequenzwiederholungen innerhalb des cDNA-Klons konnten durch Sequenz-spezifische Sequenzierprimer nicht immer eindeutige Sequenzen erhalten werden und es wurden verschiedene Strategien gewählt, um die Sequenz des gesamten Klons zu erhalten. So wurden die Primer in verschiedenen Variationen genutzt, um eine PCR an dem Klon durchzuführen und diese zu sequenzieren. Weiterhin wurde ein Teil der Sequenz von der Firma Genotype GmbH (Hirschhorn) ermittelt, die eine Sequenzierung von sehr großen Fragmenten anbietet. Letztlich konnte die Sequenz des Klons kid17 vervollständigt werden. Durch Abgleich der Sequenz mit den genomischen Klonen ließ sich eine Exon-Intron-Struktur erstellen. Durch den Phagenklon kid17 konnten insgesamt 40 Exons identifiziert werden, von denen bereits acht wenigstens zum Teil durch die cDNA-Klone bekannt waren (Abb. 3.9). Das letzte Exon von kid 17, das 1955 bp umfasste, konnte 35 kb distal des letzten Exons von W90408/W90381, AA678360 und T95551/T95552 kartiert werden und weist 21 bp vor dem Ende der Sequenz ein Poly(A)-Signal auf. Die Entfernung zu dem vorletzten Exon von R19540 beträgt 16 kb. Der cDNA-Klon kid17 spannt insgesamt 158 kb in genomischer DNA.

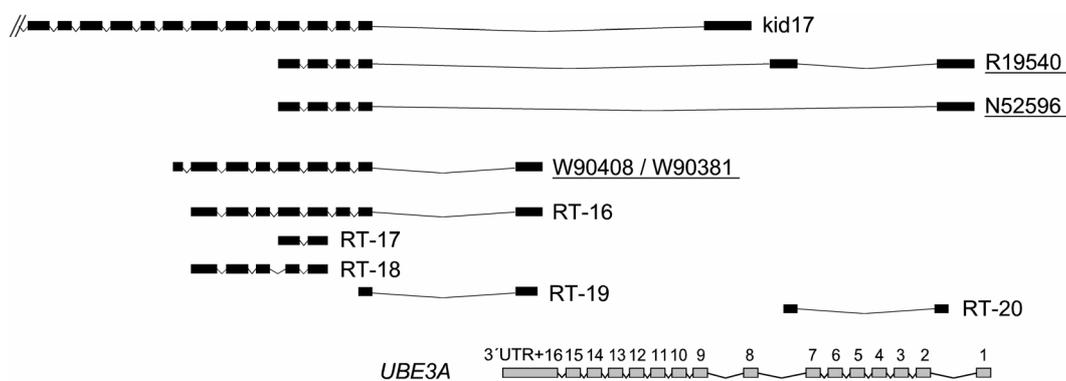


Abb. 3.9: Darstellung des distalen Clusters, das durch die ermittelten Exons des cDNA-Klon kid17, der aus der humanen Nieren-cDNA-Bank isoliert wurde, in Richtung Centromer erweitert werden konnte. Die Boxen repräsentieren einzelne Exons. Die oberste Reihe zeigt die distalsten Exons vom cDNA-Klon (kid17) und die folgenden Reihen die EST-Sequenzen sowie die RT-PCR-Produkte. Die cDNA-Klone der unterstrichenen ESTs wurden komplett sequenziert. In grau sind die Exons des *UBE3A*-Gens dargestellt.

In der Sequenz des PAC-Klons pDJ373b1 (*Accession*-Nummer AC004600) ist 315 kb distal vom Exon 20a des *SNURF-SNRPN*-Gens das *UBE3A*-Gen enthalten. Die Transkriptionsrichtung dieses Gens ist vom Telomer in Richtung Centromer. Um die Position der ermittelten Exons in Bezug auf dieses Gen zu kartieren, wurden die 16 Exons von *UBE3A* in das bereits bestehende SeqMan-Contig eingefügt (Abb. 3.9).

Das letzte Exon der Klone R19540 und N52596 liegt im Intron 1 von *UBE3A* 19 kb distal von *UBE3A* Exon 1 und 3 kb proximal von *UBE3A* Exon 2. Das vorletzte Exon des Klons R19540 befindet sich im Intron 7 von *UBE3A*. Insgesamt 27 kb proximal von diesem Exon liegt das 2 kb umfassende, letzte Exon vom Klon kid17, das 12 bp mit dem Exon 8 des *UBE3A*-Gens überlappt. Ein weiterer überlappender Bereich befindet sich in dem untranslatierten Bereich (3'-UTR) des *UBE3A*-Gens.

Das distale Cluster wurde durch den cDNA-Klon kid17 um 47 kb in Richtung des Centromers erweitert und zwischen dem proximalen Cluster und dem ersten Exon von kid17 liegen nunmehr 100 kb genomischer Sequenz. Mit einer zweiten Hybridisierungssonde (NB-MR1) wurde nun versucht, weitere Klone aus der Region proximal von kid17 aus der Phagenbibliothek zu isolieren. Es wurde aber nach der Hybridisierung ausschließlich das Signal von dem Klon kid17 erhalten und keine weiteren cDNA-Klone, die die bestehende Lücke schließen könnten.

Die RT-PCR-Analysen haben gezeigt, dass die Expression der Exons im Gehirn sehr gut ist. Aus diesem Grund habe ich cDNA-Bibliothek-Filter aus humanem Gehirn (Clontech) mit der Sonde RT-18 hybridisiert, um weitere cDNA-Klone aus der Region zu erhalten. Der Röntgenfilm zeigte allerdings nach ausreichender Exposition ausschließlich unspezifische Signale. Es musste ein anderer Weg gefunden werden, um zu prüfen, ob es eine Verbindung zwischen dem proximalen und dem distalen Cluster gibt.

3.2.3 Alle neu identifizierten Exons sind Bestandteile einer großen Transkriptionseinheit

Bei der Sequenzierung des Klons kid 17 kam es zu unspezifischen Primerbindungen aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten der ermittelten Exons. Es fiel auf, dass es zwei Gruppen von Exons mit großer Homologie gibt, deren Größe bei ungefähr 130 bp und bei ca. 40 bp lagen. Ein Ansatz zur Identifizierung neuer Exons war nun die Suche nach putativen Exons im Bereich zwischen dem proximalen und dem distalen Cluster. Dies erfolgte mit dem im Internet verfügbaren Programm *Blast 2 Sequences* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) von NCBI.

In die potentiellen Exons wurden insgesamt 90 verschiedene Primer gelegt, die in verschiedensten Kombinationen für eine PCR an cDNA oder eine RT-PCR an RNA aus fetalem Gehirn genutzt wurden. Meist resultierten multiple Banden. Konnte man einzelne distinkte Banden erkennen, wurden diese ausgeschnitten und reamplifiziert, um die Menge an PCR-Produkt für die Sequenzierung anzureichern. Teilweise wurde auch der gesamte PCR-Ansatz aufgereinigt und die Produkte im Gemisch subkloniert. Es konnten nur in vier verschiedenen PCR-Reaktionen spezifische Produkte für die Region erhalten werden: RT7 (Primer PE6 und PE8), RT-7A (Primer PE37 und PE38), RT-12 (Primer cPCR6F und cPCR6R) und RT-14 (Primer cPCR7F und cPCR7R). Allerdings hat der Primer cPCR6R aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwar in der Region, aber nicht in der vorgesehenen Sequenz gebunden. Insgesamt konnten durch die vier PCR-Ansätze 21 neue Exons identifiziert werden, wobei das dritte Exon von RT-14 mit dem ersten des cDNA-Klons kid17 über einen Bereich von 81 bp überlappte, so dass ein 1761 bp umfassendes Exon resultierte (Abb. 3.10).

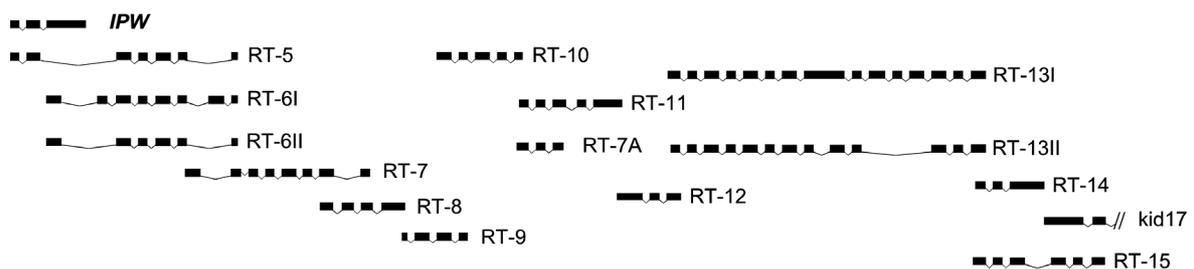


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Verbindung des proximalen Clusters (ursprüngliche *IPW*-Exons) mit dem distalen Cluster (*kid17*) durch die RT-PCR-Experimente (RT-x). Die Boxen repräsentieren die Exons.

Eine weitere Strategie, exprimierte Sequenzen zu finden, war die Suche nach konservierten Spleißstellen. Die Spleißakzeptorstelle im 5'-Bereich des Exons umfaßt ein Polypyrimidin-Element und grenzt in der Regel mit den Basen „AG“ an das Exon. Beim Vergleich der Akzeptorstellen der bisher ermittelten Exons fiel auf, dass die meisten im distalen aber auch einige im proximalen Cluster auf „CAG“ enden. Daher wurde mit dieser Basenabfolge in der Region zwischen dem proximalen und dem Beginn der distalen Transkriptionseinheit gesucht. Spleißdonorstellen grenzen distal mit den Basen „GT“ an das vorhergehende Exon. Im proximalen Cluster schlossen sich bei den meisten der Spleißdonorstellen die Basen „AA“ an, während im distalen Cluster die Basen „GA“ häufig auftraten. Mit diesen jeweils vier Basen umfassenden Sequenzmotiven wurde ebenfalls in der Sequenz von PAC AF250831 zwischen dem proximalen und dem distalen

Cluster nach putativen Spleißstellen gesucht. Für Exons, die diese Spleißstellen nutzen könnten, wurden fünf spezifische Primerpaare generiert, mit denen eine PCR an cDNA aus fetalem Gehirn durchgeführt wurde. Die PCR mit dem Primerpaar PE4F und PE4R (RT-9) ergab Produkte. Der PCR-Ansatz wurde aufgereinigt und subkloniert. Einer der resultierenden Plasmid-Klone ergab vier neue Exons proximal von RT-7A (Abb. 3.10).

Da die noch vorhandenen Lücken nicht mehr so groß waren, wurde nun direkt mittels Exon-verbinder PCR versucht, sie zu schließen. Durch die drei Primerpaare cPCR19F/R.2 (RT-8), cPCR20F/R (RT-10) und cPCR21F/R (RT-11) konnte gezeigt werden, dass die Exons zwischen RT-7 und RT-12 durch eine Transkriptionseinheit miteinander verbunden sind. Allerdings hat auch hier ein Primer (cPCR19R.2) aufgrund der hohen Sequenzhomologie nicht in der vorgesehenen Sequenz gebunden. Die Exons von RT-12 und RT-14 konnten durch eine PCR mit den Primern cPCR11F und cPCR11R verbunden werden. Nach Subklonierung der multiplen Produkte dieser PCR und abschließender Sequenzierung wurden fünfzehn weitere Exons identifiziert, die in zwei alternativen Spleißvarianten genutzt werden (RT-13I und RT-13II). Durch eine verbindende PCR mit den Primern Ex103F und Ex106R konnte eine alternative Variante für das 1761 bp umfassende erste Exon von *kid17* identifiziert werden (RT-15). Das distale Cluster konnte also bis zu den Exons von RT-7 erweitert werden (Abb. 3.10).

Zwischen dem proximalen Cluster und RT-7 liegen noch 55 kb in genomischer Sequenz. Für eine Exon-verbinder PCR wurden mehrere Primer in die drei Exons des ursprünglichen *IPW*-Gens und mehrere Primer in die Exons von RT-7 gelegt. Es wurden mit den Primern cPCR25F (*IPW* Exon 1) und cPCR25R (RT-7 Exon 2) und mit den Primern cPCR24F (*IPW* Exon 3) und cPCR25R (RT-7 Exon 2) multiple Produkte erhalten. Es handelte sich bei einigen der Banden um spezifische Produkte für diesen Bereich, die eine Verbindung zum proximalen Cluster mit verschieden genutzten Exons herstellten (RT-5 bzw. RT-6I und RT-6II) (Abb. 3.10).

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit umfasste das *SNURF-SNRPN*-Gen 20 Exons. Durch die verschiedenen Ansätze wie die Datenbanksuche nach ESTs, das Durchmusterung einer Phagenbank aus cDNA humaner Niere und die verbindenden PCR-Reaktionen an RNA und cDNA aus fetalem Gehirn konnte gezeigt werden, dass das Gen weitaus komplexer ist und aus viel mehr Exons besteht, als ursprünglich angenommen. Insgesamt konnten 128 weitere Exons identifiziert werden, die in multiplen Spleißvarianten genutzt werden. Es ist für die Gesamtheit der neu ermittelten Exons kein offener Leserahmen vorhanden.

3.2.4 Exons mit alternativen Spleißakzeptor- und donorstellen

An einigen Positionen fiel auf, dass zusätzlich zu den gespleißten Exons kolineare Expression in genomischer DNA vorhanden war. So zum Beispiel bei *SNURF-SNRPN* Exon 20. Es gab Hinweise auf ein mindestens 15.8 kb großes Exon, aber durch cDNA-Klone und RT-PCR-Analysen konnte eine kolineare Expression über ca. 30 kb nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Dr. Karin Buiting). Alternativ gibt es eine Variante, die eine interne Spleißdonorstelle nutzt und den kolinearen Bereich spannt. Eine ähnliche Situation liegt in dem Bereich der ehemaligen *IPW*-Exons vor. In dem dritten Exon führt ebenfalls eine interne Spleißdonorstelle zu Transkriptionsvarianten (RT-6I und RT-6II), die insgesamt einen Bereich von 50 kb spannen. Um zu prüfen, ob in dem Bereich eine alternative, kolineare Expression von genomischer DNA stattfindet wie es auch in Exon 20 der Fall ist, wurden an fünf verschiedenen Positionen innerhalb diesen Bereichs RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Primerpaare (MRRT10F/R, MRRT6F/R, MRRT7F/R, MRRT8F/R, MRRT9F/R) wurden so gewählt, dass eine gute Abdeckung des gesamten Bereichs gewährleistet war (Abb. 3.11 A).

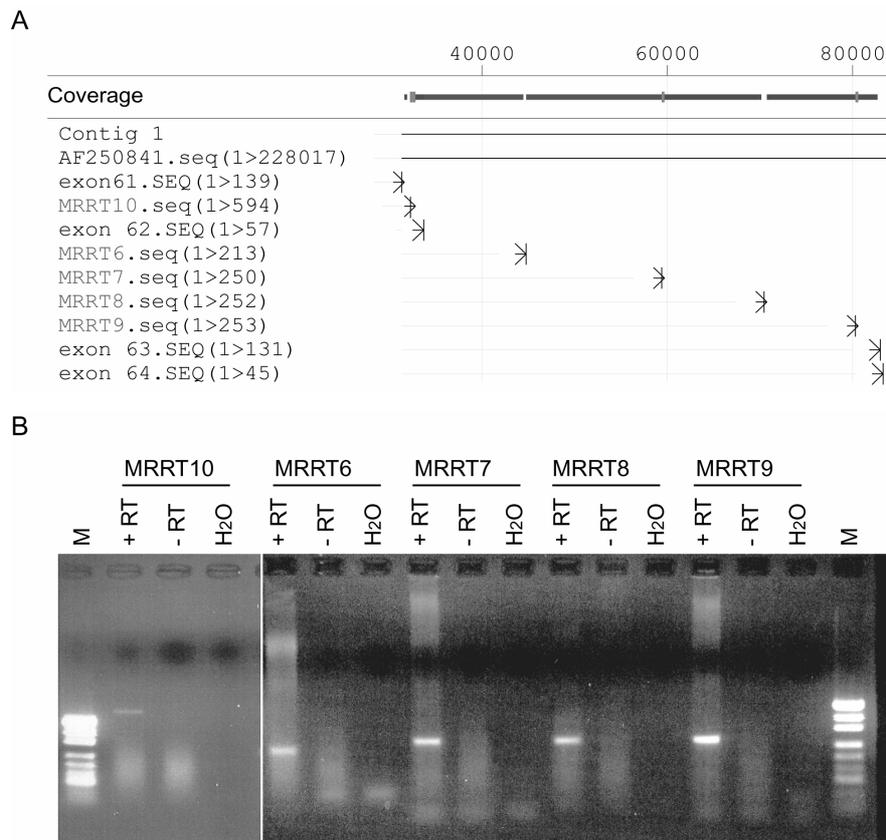


Abb. 3.11: **A.** Schematische Darstellung der Lage der RT-PCR-Produkte MRRT10 (594 bp), MRRT 6 (213 bp), MRRT7 (250 bp), MRRT8 (252 bp) und MRRT9 (253 bp). (in Klammern sind jeweils die Produktgrößen angegeben) in Bezug auf die *SNURF-SNRPN* Exons 61 bis 63. **B.** RT-PCR-Analyse an RNA aus fetalem Gehirn. Als Größenstandard diente der pUC-Marker.

Die RNA aus fetalem Gehirn wurde für die RT-PCR-Experimente mit DNase behandelt, um eine DNA-Kontamination der RNA auszuschließen. Die Produktgrößen (Abb. 3.11 B) stimmten mit denen überein, die man in genomischer DNA erwartet hätte. Innerhalb dieser Region liegt auch das 2.4 kb umfassende cDNA-Fragment PAR-1. Somit wird in diesem Bereich alternativ zu den gespleißten Varianten kolinear zu genomischer DNA exprimiert. An anderen Positionen der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit findet man ähnliche Expression (Abb. 3.12): an Exon 12 (Buiting *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2001), Exon 16 (Wirth *et al.*, 2001) und Exon 145 (Rougeulle *et al.*, 1998). Durch das ungespleißte Fragment von Exon 145 werden die Exons 11 bis 16 des *UBE3A*-Gens in *antisense* Richtung überspannt.

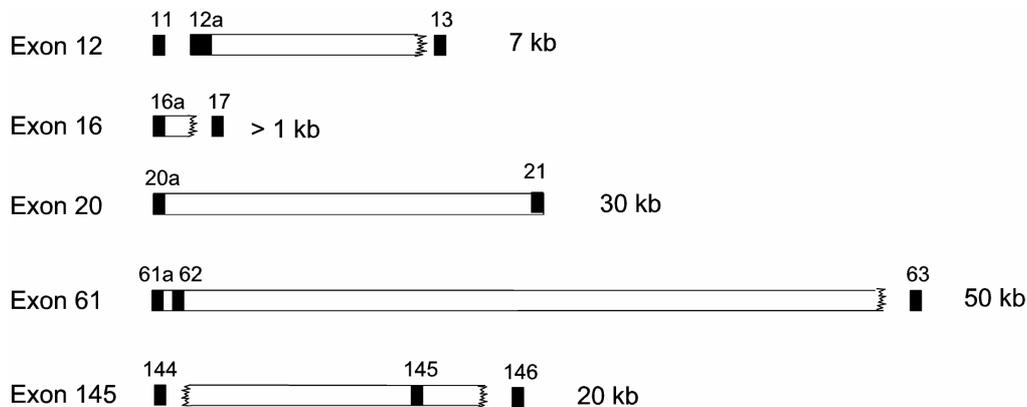


Abb. 3.12: Schematische Übersicht der *SNURF-SNRPN* Exons 12, 16, 20, 61 und 145, die alternative Spleißstellen enthalten. Ungespleißte RNA ist als weiße Box dargestellt. Schwarze Boxen repräsentieren die *SNURF-SNRPN* Exons, die alternative Spleißstellen innerhalb der colinear exprimierten Region nutzen.

3.2.5 Die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit ist das Wirtsgen für kleine nukleoläre RNA Gene

In der Region, den die *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit spannt, sind die verschiedenen kleinen nukleolären (*small nucleolar*, sno) RNA-Gene lokalisiert, die entweder einzeln oder als Multigen-Cluster vorliegen. In der Regel liegen snoRNA-Gene in Introns von Haushaltsgenen und werden durch den Spleißprozess freigesetzt. Es musste nun geprüft werden, ob die snoRNA-Gene in den Introns der Transkriptionseinheit lokalisiert sind und *SNURF-SNRPN* entsprechend das Wirtsgen für diese snoRNAs ist.

Die meisten Gene bzw. Genkopien sind in einem Intron der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit lokalisiert (Abb. 3.13).

A

AC009696 (3' - 5' Orientierung)

AF250841

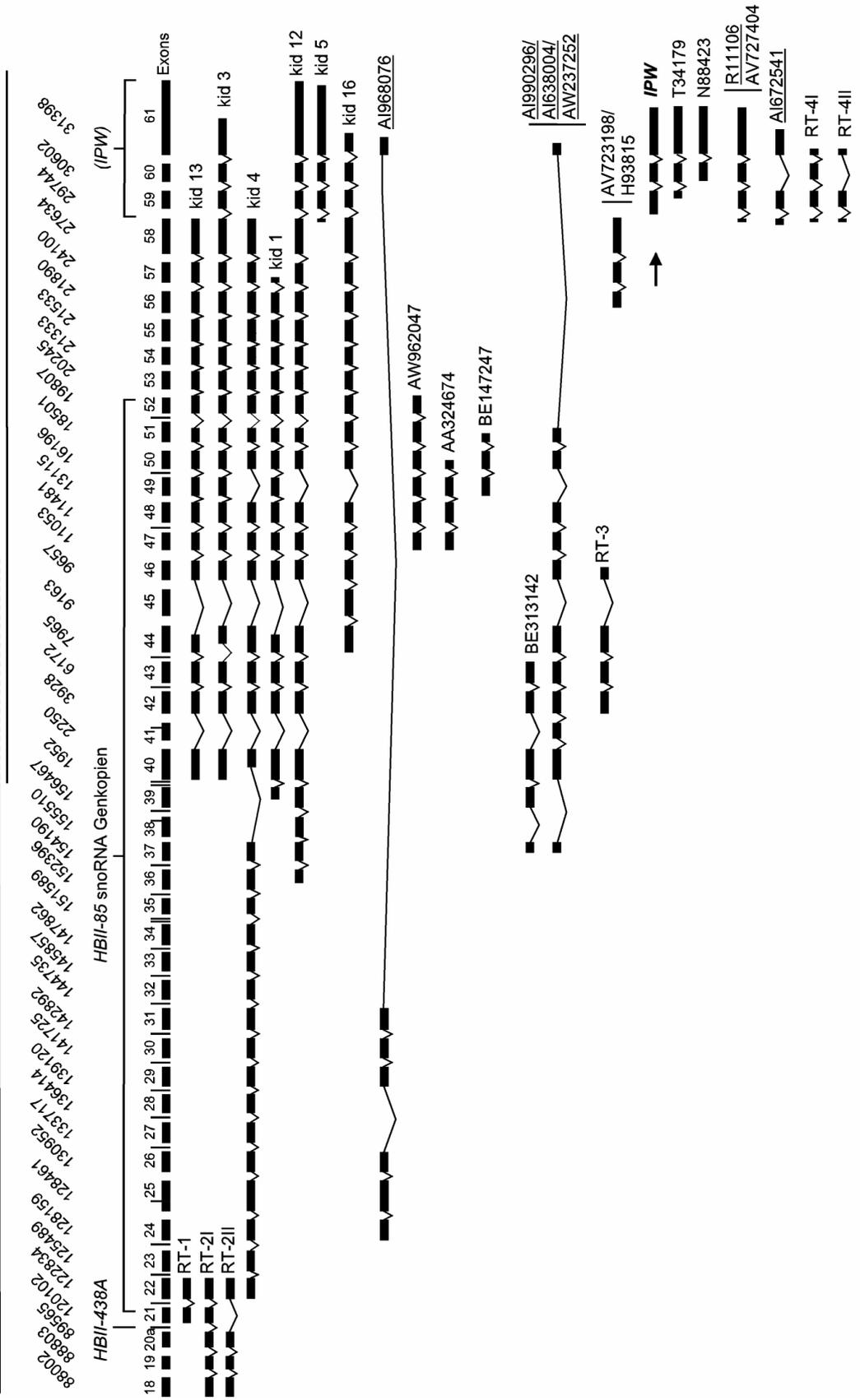


Abb. 3.13: Legende siehe Seite 68

Abb. 3.13: (siehe vorherige Seiten) Schematische Übersicht über die Regionen **A.** *SNURF-SNRPN* Exons 18 - 61), **B.** *SNURF-SNRPN* Exons 59 – 107 und **C.** *SNURF-SNRPN* Exons 102 – 148. Die *SNURF-SNRPN*-Exons sind in schwarz und die *UBE3A*-Exons in hellgrauer Farbe dargestellt. Die snoRNA-Genkopien *HBII-438A*, *HBII-85*, *HBII-52* und *HBII-438B* sind als vertikale Linien in der oberen Exon-Intron-Organisation dargestellt. In den Reihen darunter sind jeweils die cDNA-Klone aus der humane cDNA-Bibliothek (humane Niere; kid), die EST-Klone und die RT-PCR-Produkte dargestellt. Die Nukleotid-Positionen beziehen sich auf die erste Base des jeweiligen Exons und ergeben sich aus den genomischen Klonen AC009696, AF250841 und AC004600.

Allerdings lagen insgesamt vier Genkopien innerhalb eines Exons (*HBII-85* Genkopie 5 in Exon 25, *HBII-52* Kopie 7 in Exon 76 and *HBII-52* Kopie 13 in Exon 86), die auch in keiner alternativen Spleißvariante im Intron lagen, wie es bei der in Exon 41 der Fall ist. Die *HBII-85* Genkopie 17 in Exon 38 lag in der Variante des cDNA-Klons BE313142 in einem Intron, allerdings zusammen mit der *HBII-85* Kopie 18. Es befanden sich auch an drei weiteren Positionen je zwei snoRNA-Genkopien in einem Intron (*HBII-85* Genkopien 13 und 14 in Intron 34, *HBII-85* Kopien 19 und 20 in Intron 39 und *HBII-52* Kopien 21 und 22 in Intron 99).

Für die Suche nach weiteren Spleißvarianten, die die snoRNA-Kopien freigeben würden, wurden spezifische PCR-Primer in die Exons in der Umgebung gelegt (Ex23F/Ex26R, Ex74F/Ex78R, Ex84F/Ex88R bzw. Intr34F/Intr34R, Intr39F/Intr39R, Ex97F/Ex102R). Es wurde eine PCR an cDNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Da aufgrund der Sequenzhomologie der Exons bei den meisten Reaktionen keinen einzelnen Produkte amplifiziert werden konnten, da die Primer auch in anderen Bereichen eine Bindestelle fanden, wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und subkloniert. Einige Plasmide ermöglichten die Identifizierung neuer Spleißvarianten (Abb. 3.14).

An nur einer Position (Exon 25) verbleibt *HBII-85* Genkopie 5 trotz des neu ermittelten Exons 25.1 in der exonischen Sequenz. Für die *HBII-85* Genkopien 17 und 18 in Intron 37 und für die Kopien 19 und 20 in Intron 39 konnte keine alternative Spleißvariante identifiziert werden, die die Gene in zwei verschiedene Introns verlagern würde. Man kann jedoch annehmen, dass es Transkriptionsvarianten gibt, die zur Freisetzung dieser snoRNA-Gene führen, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden konnten.

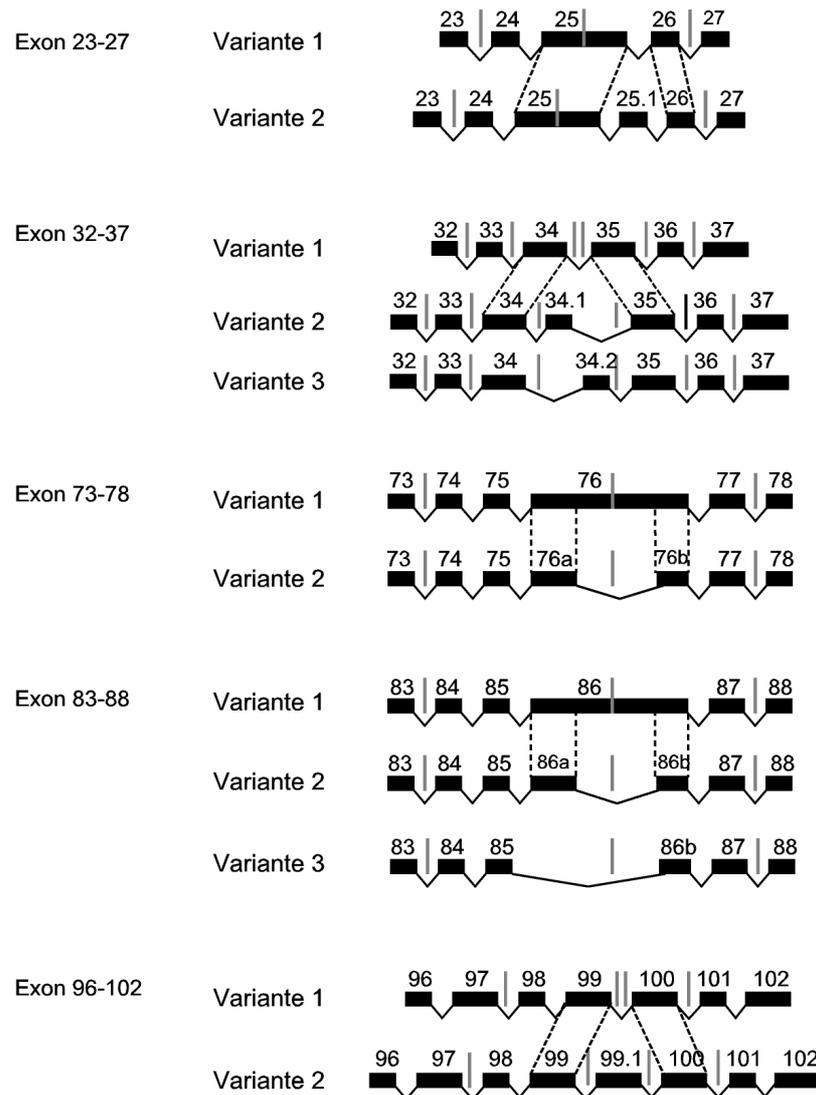


Abb. 3.14: Übersicht über nachträglich identifizierte Spleißvarianten, durch die snoRNA-Gene vereinzelt in ein Intron verlagert werden, die entweder noch in einem Exon lagen (Exon 73-76, Exon 83-88) oder mit einer weiteren Gen-Kopie in einem Intron (Exon 32-37, Exon 96-102) auftraten.

Zusammenfassend sind in Tabelle 3.2 alle identifizierten Exons der *SNURF-SNRPN* Sense - *UBE3A* Antisense Transkriptionseinheit unter Angabe ihrer Größe und der Sequenz für die 15 bp 5' und 3' der Exons, sowie die Größen der Introns und die Sequenzen der Spleißstellen.

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Exon-Intron-Sequenzübergänge der *SNURF-SNRPN*-Exons sowie Größen der Exons und Introns.

Nummer des Exons	Größe [bp]	Intronsequenz	Exonsequenz	Intronsequenz	Introngröße [bp]
Exon 20a	172	...tgactctctcag	GTCAAATCCAGAGA.....CTGCTTTTCGCAA	gtaatt...	303
Exon 21	135	...ttccccggagaag	TTGTCATGGGAGGCC.....GGATGGCTTAGGACG	gtaagc...	2597
Exon 22	140	...ttacacttctcag	AGGCAGTTGCTGTGG.....AGGTGGCTCAGGACG	gtaagc...	2515
Exon 23	140	...ttacacttctcag	GGGCAGTTATCATGG.....GGATGGCTCAGGATG	gtaagc...	2530
Exon 24	140	...ttatacttctcag	GGGCAGTTGCCGTGG.....GGATTGCTCAGGATG	gtaagc...	162
Exon 25	262	...ctatcttccccag	GGTGCCGAAGGTCTT.....AGGCAGTTGCTGTGG	gtaaat...	1587
Exon 25a	108	...ggttttccgccag	GTGCACCTCACCTAA.....GGTGGTGGCTGTTAG	gtaaga...	543
Exon 26	139	...ttacacttctcag	GGACAGTTGCCGTGG.....GGGTGGCCAGGACG	gtaagc...	2626
Exon 27	141	...ttacacttttcag	GGGCAGTTGCCCTTGA.....GGATGGCTCAGGACA	gtaagc...	2556
Exon 28	120	...cacttctcagcag	CAGTTGTCATGAGAG.....GTGCACCCAATGCTG	gtgagt...	2586
Exon 29	140	...ttacacttctaag	GGGCAGTTGCCGTGG.....GGATGGCTCAGGACG	gtaagc...	2465
Exon 30	139	...ttacacttctcag	GGGCAGTTGCCATGG.....GGGTGGCTCAGGACG	gtaagc...	1028
Exon 31	159	...tgtctttctgaag	CACACTCATTCTCTC.....GGATTTCTCTGAAT	gtaagt...	1683
Exon 32	132	...ctgcacttcttag	GTGGCGTTGGTATGG.....GGATACCTCAGGATG	gtaagt...	990
Exon 33	134	...ctgtacctcccag	GTGGCGTTGGCATGG.....GGATCCGTCGTGAAT	gtaagc...	1871
Exon 34	134	...ctgcacttcccag	GTGGCATGGGCATGC.....GGATCCCTTCATACG	gtatgt...	830
Exon 34.1	254	...tgtccaaaatcag	GTAAAGCCAGAGTTG.....GGATCTCTCTGAAT	gtaagc...	1011
Exon 34.2	134	...ctgcacttccag	GTAGTGTGGTGTAA.....GGATCCCTCTGGAT	gtaagt...	1365
Exon 35	117	...ctgtacttctcag	GTGGTGTGGGCATGG.....CTTCTCAGGTGCTG	gtaagt...	690
Exon 36	132	...ctgcacttcccag	GTGGTGTGGCATGA.....GTATCCCTCTGAAT	gtaagt...	1662
Exon 37	133	...ctgaactttccag	GTGGCGTGGGCATAG.....GGATTCCTTAGGATG	gtaagt...	1187
Exon38	107	...tcctcctctgcag	GGACAAACACTGTGC.....CCTCGTCGAACTGAG	gtccag...	850
Exon 39	133	...ctgcacttcacag	GTGGTGTGGCATGA.....GAAACCCTCTGAAT	gtaagt...	2014
Exon 40	253	...tgtttatgaacag	GTGAGGCCAGAGACA.....GGATCCCTCTGAAT	gtaagt...	45
Exon 41	99	...tcctcatttgcag	GGGCAAGGACTGGAT.....CCTCGTCGAACTGAG	gtccag...	1579
Exon 42	149	...ctgcacttcccag	GTGTTGTGGCCATGA.....TGGTGGATCCACAG	gttgggt...	2114
Exon 43	141	...ctctaattcttag	GTGGTCTGGCATGGA.....GGATCCCTCAGGATG	gtaaat...	1652
Exon 44	202	...tattttcctgtag	CTTTTCAAGGTTTTT.....CTTCTTTGTGTGCAG	gtattt...	1490
Exon 44a	102	...tattttcctgtag	CTTTTCAAGGTTTTT.....TCCAGAGAGGCGGAG	gtaaac...	1590
Exon 44b	110	...ttgtgttttccag	AGAGGCGGAGGTAAA.....CTTCTTTGTGTGCAG	gtattt...	1490
Exon 45	203	...tattttcctgtag	CTTTTCAAGGTTTTT.....CTTCTTTGTGTGCAG	gtattt...	290
Exon 46	119	...tctatttttgtag	TTCAATTGTGGAACCA.....CAAATGTGATATTG	gtaagc...	1277
Exon 47	112	...ctgtactctgtag	ATTGGGTGAGATAGA.....CAATACACTCTAAG	gtaaca...	316
Exon 48	134	...tctcttctacag	GACAGCATAGACCAA.....GGAACTCTAATATTG	gtaagc...	1500
Exon 49	112	...ctacactttgtag	ATTGGGTGAGATACA.....CAACACTCCTGAG	gtagta...	2969
Exon 50	112	...atgtactttgtag	ATTGGTTTTACAGA.....CAATACTCTCCTGAG	gtaaca...	2193
Exon 51°	131	...cctattttcaaag	GTTAATGTGGACCAA.....GGAATTCAAATATTG	gtaagc...	1175
Exon 51b	59	...cctattttcaaag	GTTAATGTGGACCAA.....CCTTCTACTTGAGGT	gtgaca...	1247
Exon 52	117	...ctgtgccttgcag	AACGGAAGTGATTTT.....GGACGCACTCCAAAG	gtaaca...	321
Exon 53	129	...actgttttcaacag	ATCGGCATGAACCAA.....AGGAATTCTCCCATG	gtaagc...	959
Exon 54	106	...aattgatgtctag	GTGGACTTACGGTT.....ACACCTTGTCACTGA	gtatgt...	94
Exon 55	206	...ctgtggtttgcag	GTTCATGTGATACT.....ATGAAACAGCTGAG	gtaaca...	151
Exon 56	161	...tgttcttttccag	AATTTTTGTGCTTTC.....CAGCAGTACCACCTG	gtgagc...	2049

Tabelle 3.2 (Fortsetzung): Zusammenstellung der Exon-Intron-Sequenzübergänge der *SNURF-SNRPN*-Exons sowie Größen der Exons und Introns.

Nummer des Exons	Größe [bp]	Intronsequenz	Exonsequenz	Intronsequenz	Introngröße [bp]
Exon 57	130	...ttccccctttatag	ATTGGAAGTGATATT.....ACGATGCACTGCAAG	gttaac...	3404
Exon 58	356	...tctcgttcctcag	TGTGATTGGTCCAGA.....TACCCTCAGGACCT	gtaagt...	1754
Exon 59	106	...attgacttgtcag	GAAGCAAAAGAATGA.....TGGACACCCTGCGAG	gtatgt...	752
Exon 60	115	...ttttaaacctcag	AAGATGACTTCCTGG.....GACCACCCACTAAAG	gtaaga...	682
Exon 61a	139	...tgtgtccttgcag	GTGATGGCCACAAAG.....TGCCTCCTGCAGATA	agaaat...	2274
Exon 62	57	...tattggtttacag	TTTATCTTCTGCTGG.....TCTTATTCCCAATAG	gtaagt...	49039
Exon 63	131	...cctgttccccccag	ATGGTGACCACAGAG.....CTGCACTGAGTTGTG	gtgagc...	381
Exon 64	45	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCC.....CATGACCGGCATAG	gtgagt...	1355
Exon 65	131	...cttgtccccccag	ACAGTGAGCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	371
Exon 66a	150	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCGCC.....CCTGAATCCCCTG	gtgagg...	658
Exon 66b	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCGCC.....CCTTGAGCAGCATAG	gtgagc...	763
Exon 67	146	...cctgtctctccag	ATGGTGACCCTGAAG.....CCCCAATAATTCAAC	gtaggt...	909
Exon 68	58	...atggcttcagcag	GTCCCTCCGTTTGGG.....TCCACTGAGCCTTG	gtgagc...	368
Exon 69	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCACCA.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	1873
Exon 70	43	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCCCC.....GATTGACGAGCATAG	gtgagt...	1350
Exon 71	132	...cctgtccccccag	ATGGTGACTGTGGAA.....CTGCCCTAAGCTGTG	gtgagc...	382
Exon 72	44	...ctgtgtctttcag	CGAGCTCTTCTGCC.....CCTTAAGTGGGATAG	gtaagt...	1201
Exon 73	132	...cccaccctccag	ATGGTGACCCAGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	1369
Exon 74	86	...atgtgacttgcag	GTCTGCAGCGGCATC.....TGCCAGTATATCTG	gtatga...	123
Exon 75	87	...cctgtccttccag	GGTTCGGTGGCTGAG.....ATGGATCCATGGAGG	gtgagc...	91
Exon 76	558	...cctgtttccccag	ATGTTGAGCCAGAG.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	1186
Exon 76a	132	...cctgtttccccag	ATGTTGAGCCAGAG.....CTGCATTGAGCTGTG	gtgagc...	383
Exon 76b	43	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCACAT.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	1186
Exon 77	135	...cctgtcctttcag	GGTTCAGTGGCGGAG.....TGCCAGCATGGAAGG	gtgagg...	1367
Exon 78	132	...cccgctccctccag	ATGGTGAGCACAGAG.....CTGCACTGAGGTGTG	gtgagt...	385
Exon 79	48	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCCCC.....GACTGGCAAAGGTGA	gtggat...	1341
Exon 80	131	...cctgtccccccag	ATGGTGTCTGTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	382
Exon 81	44	...ctgtgtctttcag	TGACCTCTTTTGCC.....CATTGACCAGCATAG	gtgagt...	1317
Exon 82	132	...tcctgtccccccag	ATAGTGAGACTGGAA.....CTGCACGGAGCTGCG	gtgagc...	386
Exon 83	44	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTACCC.....CCTTGAGCGGCATAG	gtgagt...	1455
Exon 84	111	...cccacccttccag	ATGGTGACCCAGAG.....CTGCACTGAGCTGCG	gtgagc...	366
Exon 85	46	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCACCC.....CATGACCAGCATAG	gtgagt...	1370
Exon 86	559	...cctgtttccccag	GTATTGAGCCTGGAG.....CATTGACTAGCATCG	gtgagt...	1554
Exon 86a	277	...cctgtttccccag	GTATTGAGCCTGGAG.....TGAGGCCAGTCTAG	gtgaga...	237
Exon 86b	45	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCCCAC.....CATTGACTAGCATCG	gtgagt...	1554
Exon 87	44	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCC.....CAGTGACCAGCATAG	gtgagt...	2091
Exon 88	132	...cccaccctccag	ATGTGACCCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	395
Exon 89	45	...ttctgtctttcag	TGAGCTCTTCCAGCC.....CACTGATGCGCATAG	gtgagt...	1308
Exon 90	133	...cctgtccccccag	ATGGTGAGCCTGGAG.....CTACACTGAGCTGAG	gtgagc...	386
Exon 91	46	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCAACCC.....CATTACCAGCATAG	gtgagt...	1312
Exon 92	131	...cctgttccccctag	ACTGTGAAATGGGAG.....CCTGCACTGAGCTTG	gtgagc...	385
Exon 93	44	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTTTGCC.....CATTGATCGGCATAG	gtgagt...	1344

Tabelle 3.2 (Fortsetzung): Zusammenstellung der Exon-Intron-Sequenzübergänge der *SNURF-SNRPN*-Exons sowie Größen der Exons und Introns.

Nummer des Exons	Größe [bp]	Intronsequenz	Exonsequenz	Intronsequenz	Introngröße [bp]
Exon 94	131	...cctgtacccccag	ATGGCAGCGCTGGAG.....CTGCACTGAGCTTG	gtgagc...	381
Exon 95	749	...ttgattctttcag	TGAGCTCTTCTGCTC.....CTGCACTGAGCTTG	gtgagt...	383
Exon 95a	45	...ttgattctttcag	TGAGCTCTTCTGCTC.....CATTGACCAGCATAG	gtaagt...	573
Exon 96b	131	...cctgtccccccag	ATGGTGCCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTTG	gtgagt...	383
Exon 96	45	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCC.....TCTTGATGGGCATAG	gtgagt...	1344
Exon 97	158	...ccccgcattgcag	GGTGAGGCCCTGTT.....GTCTCCTGCACTGAG	gtgtgg...	384
Exon 98	45	...ctgtctctttcag	TGAGCTCTTCCGCC.....CATTGACCAGCATAG	gtgagt...	1266
Exon 99	132	...cctcctgtcctag	ATGGTGAGCTCGGAG.....CTGCCCTGAGCTGTG	gtgagc...	1703
Exon 99.1	129	...cctgtccccccag	ATGGTGAGCCTGGAG.....TCCTTCATGGAGCTG	gtgagc...	1745
Exon 100	132	...cctgtccatccag	ATGGTGAGCCTGAAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	385
Exon 101	46	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCA.....CATTGACCAACATAG	gtgagt...	1289
Exon 102	132	...cctgtccccccag	ATGGTGAGCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagt...	382
Exon 103	45	...ttgtgtctttcag	TGAGTGCTTCTGCCC.....CATTGACCAGCATAG	gtgagt...	3194
Exon 104a	130	...tctgtccctcctag	TGGTGAGCCTGGAGG.....CTGCACTGTGCTGTG	gtgagc...	1097
Exon 105	125	...cctgttccccctag	ATGGTGAGACTTCTG.....ACTGAGCTGTGATGA	gtacat...	363
Exon 106	45	...ctttgtctttcag	TGAGCTCTTCCACT.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	3186
Exon 107	132	...cctgtccctacag	ATGGTGACCCTGAAG.....TTGCACTGAGCTCTG	gtgagc...	768
Exon 108	132	...cctgtgccccccag	ATGGTGAGACTTGAG.....CTGAACAGAGCTGTG	gtgagc...	384
Exon 109	44	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCA.....CATTGACCAACATAG	gtgagt...	1396
Exon 110	132	...cctgtacccccag	ATGGTGAGCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagt...	382
Exon 111	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCC.....AATTGATGGGTATAG	gtgagt...	1344
Exon 112	132	...cctgtctccccag	ATGGTGACCCCGGAG.....CTGCACTGAGCTCTG	gtgagt...	1730
Exon 113	132	...cctgtccctccag	ATGGTAAGCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGGG	gtaagc...	382
Exon 114	41	...ttgtgcctttcag	ATTTTCCACCTAGGA.....CATTGACTGACATAG	gtgagt...	1335
Exon 115	112	...tctgttccctccag	ATGGTGAGACTTCTG.....CTGGACTGAGCTGTG	gtgagc...	384
Exon 116	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCA.....CATTGACCAACATAG	gtgagt...	989
Exon 117	132	...cctgtacccccag	GTGGTGAGCCTGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	379
Exon 118	45	...ctgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCGCC.....CCTTAAGCGGCATAG	gtgagt...	1302
Exon 119	146	...cctgtccctccag	ATGGTGAGCCTGGAG.....GATGACCATATCCAG	gtcctg...	371
Exon 120	43	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCAAAC.....CATTGACCAGCAGAG	gtgagt...	1789
Exon 121	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTGCCACCC.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	3196
Exon 122	132	...cctgtccctgcag	ATGCTGACCCTGGAG.....CAGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	386
Exon 123	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTTTTCCACCC.....CATTGACCAGCATAG	gtgagt...	1346
Exon 124	132	...cctgtgccccccag	ATGATGAGACTGGAG.....CTGCACTAAGCTGTG	gtgagc...	381
Exon 125	45	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTTCCACCC.....CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	1310
Exon 126	131	...acctctctcccag	ATGGTGAGACGGGAG.....CTGCACTAGCTGTG	gtgagc...	382
Exon 127	45	...ccatgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCC.....CCTTACACGACATAG	gtgagt...	150
Exon 128	137	...aatctgatcctag	GAGCACGCATTTCTT.....CCAGGCCACATGAG	gtgggc...	866
Exon 129	72	...cttgtctttcag	GGTTTGGTGCCGGG.....CATGGATTCCATCAC	gtgggt...	79
Exon 130	133	...cctgtcaccaccag	ATGGTGAGCCTTGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	384
Exon 131	45	...ttgtgtctttcag	TGAACCTTTCTCC...CATTGACTGGCATAG	gtgagt...	1306
Exon 132	132	...acctctctcccag	ATGGTGAGACCGGAG.....CTGCACTGAGCTGTG	gtgagc...	384
Exon 133	45	...ccatgtctttcag	TGAGCTCTTCTGCCC.....CCTTAAGCGGCATAG	gtgagt...	150

Tabelle 3.2 (Fortsetzung): Zusammenstellung der Exon-Intron-Sequenzübergänge der *SNURF-SNRPN*-Exons sowie Größen der Exons und Introns

Nummer des Exons	Größe [bp]	Intronsequenz	Exonsequenz	Intronsequenz	Introngröße [bp]
Exon 134	137	...aatctgacccttag	GAGCATGCATTTTCGT.....CCAGGCCACATGAG	gtgggc...	2677
Exon 135	131	...cctgtcccttcag	ATGGTGAGTCTGGAG.....CTCCTGCACTGAGCT	gtggtg...	364
Exon 136	44	...ttgtgtctttcag	TGAGCTCTCCACCC.....CATTGACTGGCAG	gtgagt...	1005
Exon 137	109	...cctgtcccaccag	GTGGTGAGCCCGGAG.....CTGCGGACCCTCGCT	gtgagt...	14095
Exon 138	184	...atctgtcccttag	ATGATGATATGGAAG.....AAATCTTCTGATTTG	gtgaga...	297
Exon 139	133	...ttgtgtatttcag	TAAGACATGCTGCCA.....GTTTTACACCTTCAG	gtaatc...	1284
Exon 140	125	...cctatgcctgtag	ATAAAGACTGCTGAG.....AAGGATGCTATTCTG	gtaagg...	1151
Exon 141	129	...ttgtcttttacag	AAAAGACTGTGGAGG.....AGGAAACCATCTCTG	gtaagc...	1684
Exon 142	117	...ctcctccccttag	ATAAGGATGACTGAG.....AAGGATGCCACTCTG	gtaggt...	5831
Exon 143	43	...tattttgctgcag	GTAAAAAGCTGAAAC.....CTTCAGGGAAAAGAG	gtgagc...	1437
Exon 144	38	...tttctgagatag	AAGGCCTGGAATCTG.....CTTCAGAGAACAGGG	gtgagt...	59164
Exon 145	189	...cattcatttcag	GTCAGCTTACTGTAT.....AAAACCTATCTTAA	gtgcac...	35312
Exon 146	1955	...actctgttgccag	GTGGAATGCAGTGG.....TACCTTTAAAATCAA	ttctag...	16136
Exon 147	196	...tactgtccccag	AGAAAAAGTACATG.....AGACGGCAACCTGAG	gtaagg...	26997
Exon 148	675	...atTTTTTCATCAG	GTGGTGGAGTCTATG.....ACATTTCCATACAAA	caaaag...	
Consensus		Py(10)cag		gtaagt	

3.2.6 Alternative 3'-Enden der Transkriptionseinheit

Die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit überlappt im distalen Bereich mit dem *UBE3A*-Gen in Antisense Orientierung. Potentielle 3'-Enden der Transkriptionseinheit ergeben sich aus den Poly(A)-Signalen (5'-AATAAA-3') und den Poly(A)-Anhängen der cDNA-Klone W90408/W90381, AA678360 bzw. T95551/T95552 (Exon 145), kid 17 (Exon 146) und schließlich R19540 und N52296 (Exon 148) (Abb. 3.15). Das am distalsten gelegene Exon liegt im Intron 1 von *UBE3A*.

Exon 145	
Genomische Sequenz W90408/W90381, AA678360 T95551/T95552	AATAAAAACCTCTATCTTAAGTGCACCTTTCACATGCTTTTTGTTTATAATAAACAA AATAAAAACCTCTATCTTAAAAAAAAA AATAAAAACCTCTATCTTAAGTGCAAAAAAAAAA
Exon 146	
Genomische Sequenz kid 17	AATAAAAACATCTTACCTTTAAAATCAATTCTAGCGCCTTTCCTTGTTCATTTTTAT AATAAAAACATCTTACCTTTAAAATCAAAAAAAAAA
Exon 148	
Genomische Sequenz R19540, N52296	AATAAAGACATTTCCATACAAACAAAAGCTGAAAGATTTTGTAGCCAGTAGACCT AATAAAGACATTTCCATACAAACAAA

Abb. 3.15: Sequenzen der 3'-Enden der cDNA-Klone W90408/W90381, AA678360 bzw. T95551/T95552, kid 17 und R19540 und N52296 im Vergleich mit der genomischen PAC-Sequenz.

Um zu prüfen, ob es weitere Spleißvarianten gibt, die das *UBE3A*-Gen komplett überspannen, wurde eine 3'-RACE mit spezifischen Primern für Exon 142 (RACE1F) und 144 (RACE2F) an cDNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Da multiple Produkte aus den PCR-Reaktionen resultierten, wurden beide Ansätze aufgereinigt, im Gemisch subkloniert und sequenziert. Neben bekannten 3'-Enden (Klon 39 und Klon 44 von RACE2) wurden auch alternative Varianten identifiziert (Abb. 3.16).

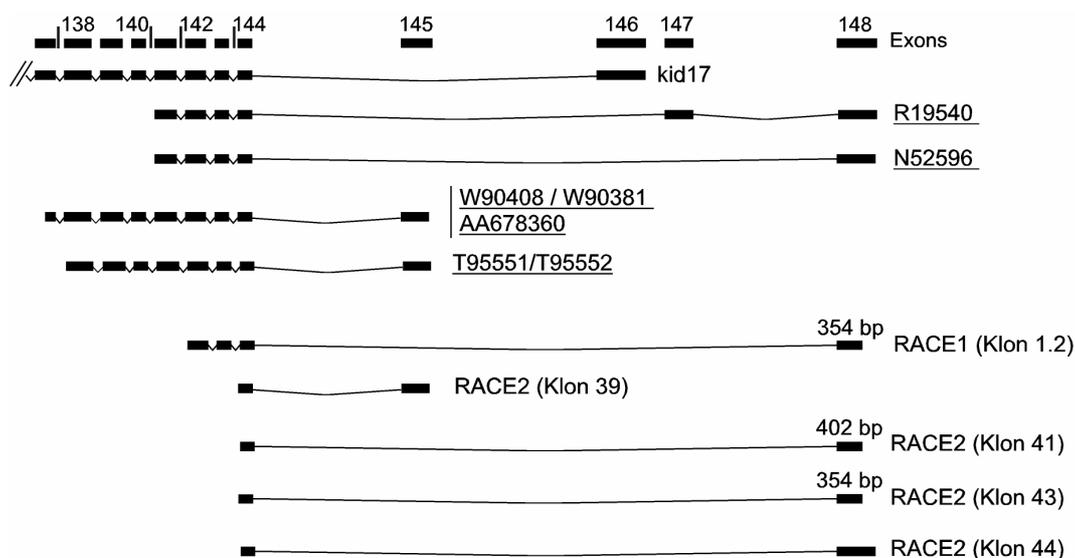


Abb. 3.16: Graphische Darstellung der durch die 3'-RACE 1 und 3'-RACE 2 identifizierten Exons

Die Sequenzen der Klone 1.2 (RACE1) und 43 (RACE2) zeigten eine 354 bp umfassende Variante des Exons 148. Ein Poly(A)-Signal ist 21 bp weiter proximal vorhanden (Abb. 3.18). Klon 41 der 3'-RACE 2 führte zu einer weiteren alternativen Variante des Exons 148, das hier 402 bp umfasst und 20 bp nach einem Poly(A)-Signal endet. Somit konnte die Transkriptionseinheit in Richtung Telomer nicht verlängert werden.

Exon 148	
Genomische Sequenz	AATAAA TAGTTGCTGATATTTAAGGCACTAAGTTTGGGGCAATGTATTACACAGC
Klon 1.2, Klon 43	AATAAA TAGTTGCTGATATTTAAGTCA AAAAAA
Exon 148	
Genomische Sequenz	AATAAA TAACTGGAACAGCATAGTAAATTCTAGTTAAAAATACTAACTACTAAG
Klon 41	AATAAA TAACTGGAN CAGCAAAAAA

Abb. 3.17: Sequenzen der 3'-Enden der Klone 1.2, 43 und 41 der 3'-RACE im Vergleich mit der genomischen PAC-Sequenz.

3.2.7 Expressionsanalysen für die *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit

3.2.7.1 Northern-Blot-Analyse

Zur Analyse der gewebespezifischen Expression der Transkriptionseinheit wurden Northern-Blots der Firma Clontech, die RNA aus multiplen fetalen und adulten Geweben enthalten, mit zwei verschiedenen Hybridisierungssonden hybridisiert. Dazu wurden die RT-PCR-Produkte RT-3 (Exons 42, 43, 44 und 46; 501bp) und RT-18 (Exons 138 bis 142; 608 bp) aufgereinigt, radioaktiv markiert und auf die Blots hybridisiert. Mit beiden Proben konnte kein distinktes Signal erhalten werden, sondern hauptsächlich ein Schmier in der Spur mit Gehirn-RNA (nicht gezeigt).

3.2.7.2 Expression der Transkriptionseinheit in multiplen Geweben

In Tabelle 3.3 sind die Herkunftsgewebe der cDNA-Klone angegeben, die durch die Datenbanksuche ermittelt wurden. Sie geben einen Hinweis auf die verschiedenen Gewebe, in denen die Transkriptionseinheit exprimiert wird. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 17 Klone aus der cDNA-Bibliothek aus adulter Niere isoliert (kid1 bis kid17). Die Transkriptionseinheit wird also in multiplen Geweben exprimiert, aber die Klone geben keinen Hinweis auf die Stärke der Expression.

Tabelle 3.3: Übersicht über die verschiedenen Gewebe der cDNA-Bibliotheken, aus denen die für die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit ermittelten cDNA-Klone isoliert wurden.

Genbank <i>Accession</i> -Nummer	Gewebe der cDNA-Bibliothek
AI968076	Keimzelltumoren
AW962047	nicht angegeben
AI990296	Keimzelltumoren
AI638004	Keimzelltumoren
AW237252	Keimzelltumoren
BE313142	Neuroblastom
AV723198	Hypothalamus
H93815	Leber und Milz
N88423	Humanes fötales Gehirn
T34179	Weißer Blutkörperchen
R11106	Leber und Milz
AV727404	Hypothalamus
AI672541	Keimzelltumoren
R19540	Gesamtes Gehirn
N52596	Läsionen (Multiple Sklerose)
W90381	Leber und Milz
W90408	Leber und Milz
AA678360	Leber und Milz
T95551	Leber und Milz
T95552	Leber und Milz

3.2.7.3 Allelspezifische Expressionsanalyse

Für die ersten 20 Exons von *SNURF-SNRPN* konnte eine monoallelische Expression vom paternalen Chromosom gezeigt werden (Wirth *et al.*, 2001). Um den Imprinting-Status der neu identifizierten Transkripte zu ermitteln, wurden die RT-PCR-Primer für RT-3 (AI990296a und AI990296b; Exons 42, 43, 44, 46; 501 bp) und für RT-17 (MRts5-6F und MRts5-6R; Exons 142 und 143; 120 bp) genutzt. Es wurde RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien eines Patienten mit AS und einer maternalen Deletion der Region 15q11-q13 sowie eines Patienten mit PWS und einer paternalen Deletion dieser Region verwendet. Beide Primerpaare konnten ein Produkt in dem Patienten mit AS und einer großen Deletion amplifizieren, während kein PCR-Produkt in der RNA des PWS-Patienten amplifiziert werden konnte (Abb. 3.18). Da der PWS-Patient aufgrund der Deletion für den untersuchten Bereich kein paternales Allel besitzt, wohl aber der AS-Patient, dem das maternale Allel fehlt, ist die Expression paternal.

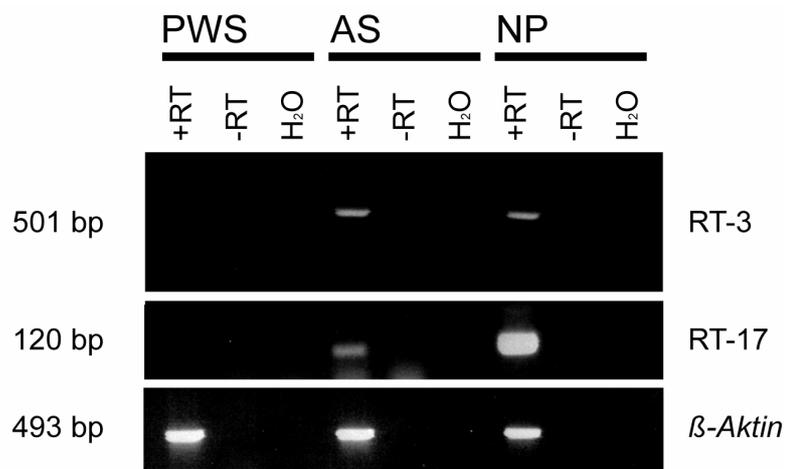


Abb. 3.18: RT-PCR-Analyse an RNA eines PWS- bzw. AS-Patienten mit einer Deletion der Region 15q11-q13 (AS; PWS) und einer Normalperson (NP) zur Untersuchung des Imprinting-Status des *SNURF-SNRPN*-Transkripts. Es wurden spezifische Primer für RT-3 (Produktgröße: 501 bp) und RT-17 (Produktgröße: 120 bp Produkt). Die Integrität der RNA wurde durch Amplifikation eines 493 bp umfassenden Produkts vom β -Aktin-Gen überprüft. +RT, RT-PCR mit Reverse Transkriptase, -RT, RT-PCR ohne Reverse Transkriptase; H₂O, Leerkontrolle ohne RNA

3.2.8 Sind u1A und u1B alternative Startpositionen für die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit?

Der Transkriptionsstartpunkt des *SNURF-SNRPN*-Gens überlappt mit dem IC. Mindestens zwei alternative 5'-Startexons (u1A und u1B) führen zu IC/*SNRPN*-Transkripten, die die IC-Region überspannen und weitere alternative 5'-Exons enthalten (u2 bis u5; Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Diese Transkripte werden auf *SNURF-SNRPN* Exon 2 gespleißt. Um herauszufinden, ob es Transkripte gibt, die sowohl diese 5'- als auch die 3'-Exons enthalten, wurden RT-PCR-Analysen an RNA aus fetalem Gehirn mit spezifischen 5'-Primern für u1A (NE12), u1B (NE16) und u4 (NE14) und 3'-Primern für Exon 15 (NE13; NE15) durchgeführt. Für jede RT-PCR erhielt ich multiple unspezifische Produkte. Bei einer 5'-RACE-Reaktion mit den Primern NE13 und NE15 erhielt ich Produkte, die *SNURF-SNRPN* Exons 13 bis 15 repräsentierten, aber keine neue Variante mit einer Verbindung zu den 5'-Exons.

Es wurde nun der Effekt einer paternalen IC-Deletion auf die Transkription der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit untersucht. Dazu wurden zwei verwandte PWS-Patienten (PWS-1 und PWS-2) mit einer solchen Deletion ausgesucht, bei denen die Deletionsbruchpunkte charakterisiert waren (Buiting *et al.*, 2000; El-Maari *et al.*, 2001; persönliche Mitteilung von Dr. Karin Buiting). Der proximale Bruchpunkt befindet sich ca. 28 kb proximal von *SNURF-SNRPN* Exon 1 und der distale Bruchpunkt liegt zwischen Exon 20 und 21 der Transkriptionseinheit. Es wurde RNA der zwei Patienten und deren Vätern (F1 und F2) sowie drei Normalpersonen (NP1, NP2 und NP3) mit dem PAXgene RNA Blood Kit (siehe 2.2.2.2) präpariert. Die Expression der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit wurde durch quantitative *Real-time* RT-PCR (QRT-PCR) mit Primern und Sonde für *SNURF-SNRPN* Exon 57-58 bestimmt. Gleichzeitig wurde die Expression des *UBE3A*-Gens mit einem kommerziell erhältlichen Assay (*Assay-On-Demand* für Genexpression, Applied Biosystems) bestimmt. Anschließend wurde eine quantitative RT-PCR (QRT-PCR, *Real-time*-PCR) auf einem ABIprism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Standardkurve wurde genutzt, um die Ausgangskonzentration der RNA (c_0) zu bestimmen. Mit diesen Werten wurde die relative Expressionsstärke von *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* ermittelt, indem der Quotient von c_0 von *SNURF-SNRPN* RNA und c_0 von *UBE3A* berechnet wurde. Bei beiden Patienten konnte kein Fluoreszenz-Signal für das *SNURF-SNRPN*-Gen detektiert werden, so dass der Quotient entsprechend null ist (Abb. 3.19). Die Väter F1 und F2 sind asymptotische Deletionsträger. Sie haben die Deletion auf ihrem inaktiven maternalen

Chromosom. Die Werte 0.48 (F1) und 0.49 (F2) für das relative Verhältnis lagen innerhalb des Wertebereichs, den die Normalpersonen bilden (0.38, 0.57 und 0.62; Mittelwert 0.52) (Abb. 3.19).

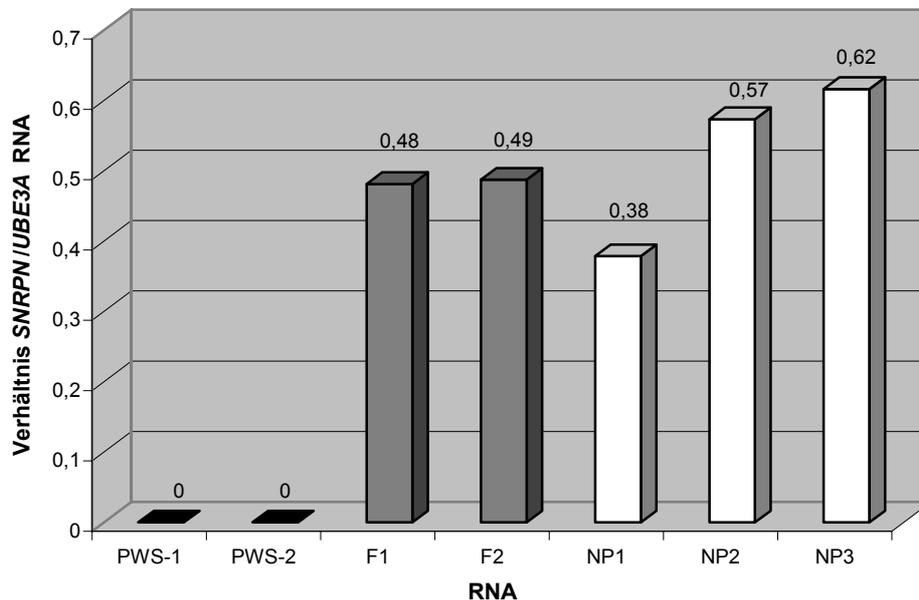


Abb. 3.19: Diagramm der relativen Expression von *SNURF-SNRPN* Exon 57-58 und *UBE3A* bei den Patienten mit PWS und einer IC-Deletion (PWS-1 und PWS-2), deren Vätern (F1 und F2) und drei Normalpersonen (NP1-NP3).

3.2.9 Expressionsprofil der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit

Für die snoRNA-Gene, die in den Introns der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit liegen, wurde die Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Mit Ausnahme der 47 Kopien von *HBII-52*, die gehirnspezifisch exprimiert werden, werden die snoRNA-Gene stark im Gehirn, aber weniger stark auch in anderen Geweben wie zum Beispiel Muskel, Lunge und Niere exprimiert (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a). In der Annahme, dass die Expression des Wirtsgens *SNURF-SNRPN* die der snoRNAs widerspiegeln müsste, wurden RT-PCR Experimente an verschiedenen Positionen der Transkriptionseinheit durchgeführt. Dabei wurden Blut-RNA einer Normalperson und RNA aus fetalem Hirn als Ausgangsmaterial benutzt. Es wurden folgende Primer verwendet: Exon 1-2: RN134 und RN175 (Sun *et al.* 1996); Exon 57-58: TaqIPWF und TaqIPWR (QRT-PCR-Primer); Exon 63-65: Ex63-65F und Ex63-65R; Exon 142-143: TaqUBE3AasF und TaqUBE3AasR (QRT-PCR-Primer); Exon 147-148: MRts10-11F und Ex148R. Die RT-PCR-Analysen sind in Abb. 3.20 zusammengestellt.

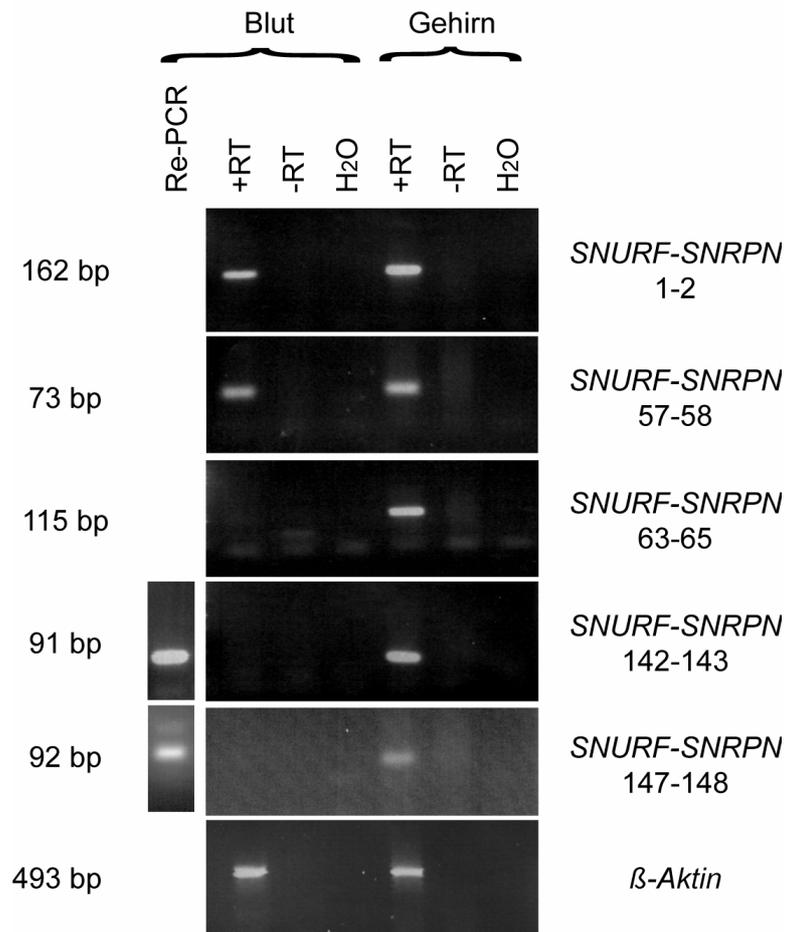


Abb. 3.20: RT-PCR-Analysen an verschiedenen Positionen des *SNURF-SNRPN* Transkripts. Die Reaktionen wurden an RNA aus peripherem Blut einer Normalperson und RNA aus fetalem Gehirn durchgeführt. Die Reamplifizierung für *SNURF-SNRPN* Exons 142-143 und 147-148 ist links gezeigt (Re-PCR). Die Integrität der RNA wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern für den β -Aktin-Locus überprüft.

Es konnten für *SNURF-SNRPN* Exons 1 bis 2 und auch für Exons 57 bis 58 Produkte an RNA aus Blut sowie aus Gehirn erhalten werden. Für Exons 142 bis 143 und Exons 147 bis 148 konnte erst nach Reamplifizierung mit den gleichen spezifischen Primern Expression in Blut nachgewiesen werden, so dass in dieser Region Expression in Blut zwar vorhanden ist, aber im Vergleich zur Expression im Gehirn sehr schwach. Auch durch Reamplifizierung konnte für die *SNURF-SNRPN* Exons 63 bis 65 direkt proximal des *HBII-52* Cluster keine Expression in Blut nachgewiesen werden. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt.

3.2.10 Das *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense Transkript

Der distale Bereich der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit spannt in die Region des *UBE3A*-Gens und wird von Centromer nach Telomer abgelesen, während *UBE3A* in Richtung des Centromers exprimiert wird. Das *UBE3A*-Gen spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des AS. Im Folgenden wurden Expressionsanalysen von der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit und *UBE3A* durchgeführt.

3.2.10.1 Biallelische Expression von *UBE3A* in peripherem Blut

UBE3A wird in verschiedenen Gehirnregionen nur vom maternalen Chromosom exprimiert, während die Expression in anderen Geweben biallelisch beschrieben wurde (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu *et al.*, 1997). Allerdings wiesen Untersuchungen mittels RNA Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von Herzing *et al.* (2002) auf eine präferentielle Expression vom maternalen Allel im Blut hin (Herzing *et al.*, 2002). Um die Expression in Blut zu quantifizieren, wurde RNA von zwei Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion genutzt. Mittels der unter 3.2.8 beschriebenen QRT-PCR wurde die RNA der beiden Patienten analysiert und der Quotient der Ausgangskonzentration von *SNURF-SNRPN* zu *UBE3A* RNA berechnet (Abb. 3.21).

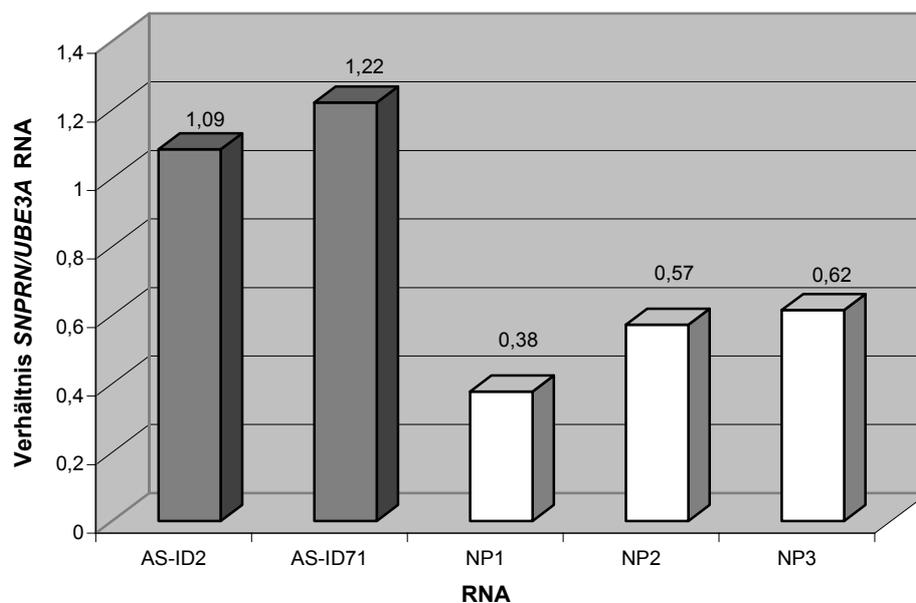


Abb. 3.21: Darstellung der Ergebnisse der QRT-PCR der Patienten AS-ID2 und AS-ID71 sowie der Normalpersonen NP1 bis NP3. Gezeigt wird der Quotient aus *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* Transkript.

Im Vergleich zur Kontrollperson haben diese Patienten ein maternales Chromosom, das sich wie ein paternales verhält, und somit eine doppelte Expression des *SNURF-SNRPN*-Gens. Bei biallelischer *UBE3A*-Expression wäre das Verhältnis entsprechend zweifach so hoch. Bei präferentiell maternaler Expression von *UBE3A* wäre die Menge an *UBE3A*-Transkript weitaus geringer und das Verhältnis *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* Transkript entsprechend mehr als zweifach so hoch. Das Verhältnis der beiden Transkripte lag bei Patient AS-ID2 bei 1.09 und bei Patientin AS-ID71 bei 1.22 (Mittelwert: 1.16). Verglichen mit den Werten der Normalpersonen NP1, NP2 und NP3 (0.38, 0.57 und 0.62; Mittelwert 0.52) weisen die Daten eher auf biparentale Expression hin. Allerdings kann eine präferentiell maternale Expression nicht ausgeschlossen werden.

3.2.10.2 Expressionsanalyse von Patienten mit Angelman-Syndrom und unbekanntem molekulargenetischen Defekt

Mit Ausnahme der snoRNA-Gene, deren Expression über das Wirtsgen gesteuert wird, weisen paternal exprimierte Gene in der Region 15q11-q13 im 5'-Bereich eine differentiell methylierte Region auf, die die Expression elternspezifisch reguliert. Die maternal exprimierten Gene (*UBE3A* und *ATP10C*) dagegen zeigen keine differentielle Methylierung und es muß von einem alternativen Mechanismus ausgegangen werden. Möglich wäre hier eine Regulierung durch das *SNURF-SNRPN* Transkript. Im Gehirn, wo eine Inaktivierung des paternalen *UBE3A* Transkripts vorliegt, wird *SNURF-SNRPN* sehr stark und nur vom paternalen Allel exprimiert, während im Blut zumindest der Antisense Bereich zu *UBE3A* sehr schwach exprimiert wird, was in Abschnitt 3.2.9 gezeigt werden konnte. Eine Hochregulierung der Expression von *SNURF-SNRPN* könnte in Hirnzellen in einer Repression von *UBE3A* resultieren und zu einem AS führen.

In einer Gruppe von Patienten mit Verdacht auf AS (ca. 20%) konnte bisher keine der bekannten Ursachen nachgewiesen werden. Es wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit insgesamt acht solcher Patienten von sehr erfahrenen klinischen Genetikern unseres Instituts gesehen. Da eine klinische Überlappung zum Rett-Syndrom besteht (Watson *et al.*, 2001), wurde zunächst die DNA der Patienten hinsichtlich einer Mutation in dem dafür ursächlichen Gen *MeCP2* (*Methyl-CpG-binding protein 2*) (Amir *et al.*, 1999) untersucht. Drei der vier Exons des Gens kodieren für ein Protein, das an methylierte DNA bindet und eine Rolle bei der Transkriptionsinaktivierung spielt. Es wurde nach erfolgter PCR-Analyse das Produkt aufgereinigt und direkt mit einem ABIprism[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert. Für die Reaktionen und die Sequenzierungen wurden

die Primersequenzen von Cheadle *et al.* (2000) genutzt. Bei der Patientin SW wurde eine Mutation in Exon 4 identifiziert. An Position 473 kommt es zu einer heterozygoten Substitution eines Cytosins zu einem Thymin (Abb. 3.22), die in einem Austausch der Aminosäuren Threonin nach Methionin an Position 158 resultiert. Die anderen Patienten wiesen keine Mutation auf.

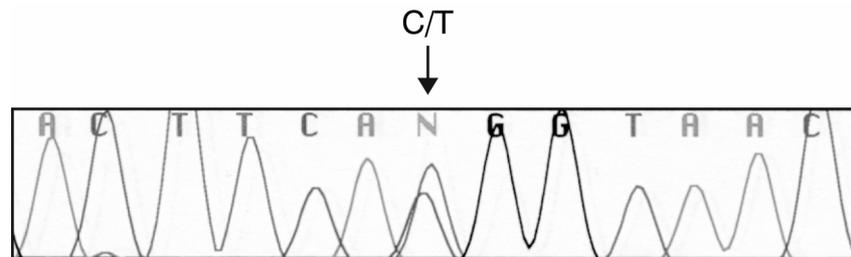


Abb. 3.22: Chromatogramm der Sequenzierung von *MeCP2* Exon 4 der Patientin SW. Der Pfeil weist auf den heterozygoten Cytosin (C) nach Thymin (T) Austausch (C473T) hin.

Zur Quantifizierung vom *SNURF-SNRPN* Transkript mittels QRT-PCR wurden zunächst für den distalen Bereich Primer und eine Sonde (*SNURF-SNRPN* Exon 142-143 Assay 1) generiert, da dieser Bereich in *antisense* Richtung zum *UBE3A* verläuft. Sowohl mit diesem Assay als auch mit einem zweiten Assay in derselben Region (*SNURF-SNRPN* Exon 142-143 Assay 2) war für eine QRT-PCR mit Blut verschiedener Normalpersonen die Fluoreszenzintensität zu schwach, um sie zuverlässig zu detektieren. Dies zeigte sich in den Amplifikations-Kurven, die keinen linearen Anstieg zeigten, wie es bei fetalem Gehirn als Ausgangsmaterial der Fall war (Abb. 3.23). Aufgrund der guten Ergebnisse mit RNA aus fetalem Gehirn konnte man davon ausgehen, dass die Primer und die Sonde gut und spezifisch binden konnten.

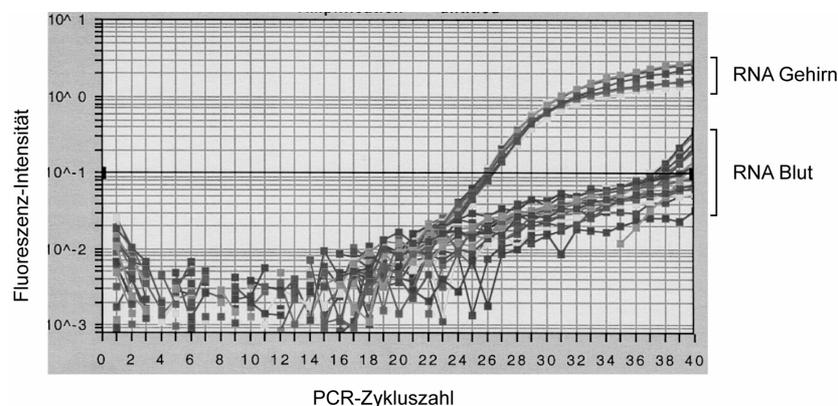


Abb. 3.23: Quantitative RT-PCR (*Real-time*-RT-PCR) für *SNURF-SNRPN* Exon 142-143 (Assay 1) an RNA aus fetalem Gehirn und Blut-RNA.

Um auswertbare Ergebnisse zu erhalten, nutzte ich Primer und Sonde für den Bereich *SNURF-SNRPN* Exons 57-58, der auch in Blut gut exprimiert wird. Es wurde eine QRT-PCR für *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* an RNA der sieben Patienten und RNA von vier Normalpersonen (NP4 bis NP7) durchgeführt, die alle mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit (siehe 2.2.2.1) präpariert worden waren. Es wurde mit den ermittelten Ausgangskonzentrationen (c_0) von *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* RNA jeder Person das Verhältnis der Expressionsstärke ermittelt. Die Werte der Patienten lagen zwischen 0.37 und 0.88 und die der Normalpersonen zwischen 0.39 und 1.37. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Normalpersonen festgestellt werden.

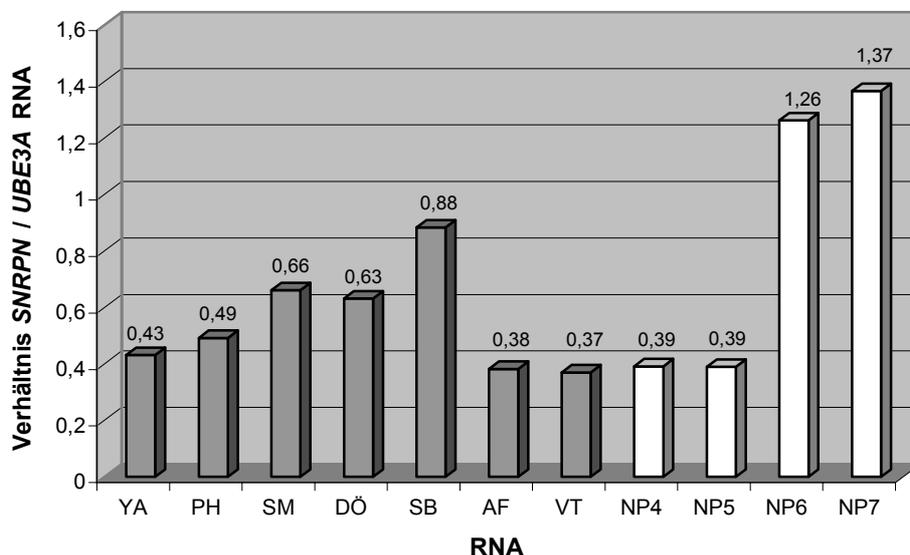


Abb. 3.24: Darstellung der QRT-PCR an RNA von sieben Patienten mit einem klinischen AS, bei denen die bisher bekannten Ursachen für AS ausgeschlossen worden waren, und von vier Normalpersonen. Gezeigt wird der Quotient aus *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* RNA.

3.2.10.3 Quantitative und allelspezifische Expressionsanalyse von Patienten mit Angelman-Syndrom und einer *UBE3A*-Mutation

AS wird unter anderem auch durch Mutationen im *UBE3A*-Gen verursacht, wobei alle bekannten Mutationen in einem vorzeitigen Terminationskodon resultieren. Bisher ist noch nicht untersucht worden, ob die mutierte mRNA effizient durch einen Mechanismus erkannt und eliminiert wird, der bekannt ist als *Nonsense* vermittelte mRNA Degradierung (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD). Man würde einen annähernd zweifachen Anstieg vom Verhältnis von *SNURF-SNRPN* zu *UBE3A* RNA bei Patienten mit einer

UBE3A-Mutation im Vergleich zur Normalperson erwarten, wenn das mutierte Transkript dem NMD unterliegt, denn die Menge von *SNURF-SNRPN* RNA ist bei ihnen unverändert, während die Menge von *UBE3A* RNA durch NMD um annähernd die Hälfte reduziert ist. Die quantitative RT-PCR könnte dann für eine Voruntersuchung genutzt werden für Patienten, bei denen bereits eine *de novo* Deletion, eine UPD und ein Imprinting-Defekt ausgeschlossen worden waren. Findet man im Vergleich mit der Normalperson eine Verschiebung des Verhältnisses, würde eine Mutationssuche folgen.

Es wurde im Rahmen der unter 3.2.8 beschriebenen QRT-PCR eine Untersuchung an RNA von vier Patienten durchgeführt, die eine Mutation im *UBE3A*-Gen haben. Patient AS-U1 hat eine 2 bp-Deletion in Exon 10 und Patient AS-U2 eine 4 bp-Deletion in Exon 12. Bei den Geschwistern AS-U3a und AS-U3b resultiert eine Substitution von Guanin zu Adenin in Exon 15 in dem Stopkodon TGA. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Patientengruppe zu den Normalpersonen im Verhältnis *SNURF-SNRPN* zu *UBE3A* RNA festgestellt werden (Abb. 3.25).

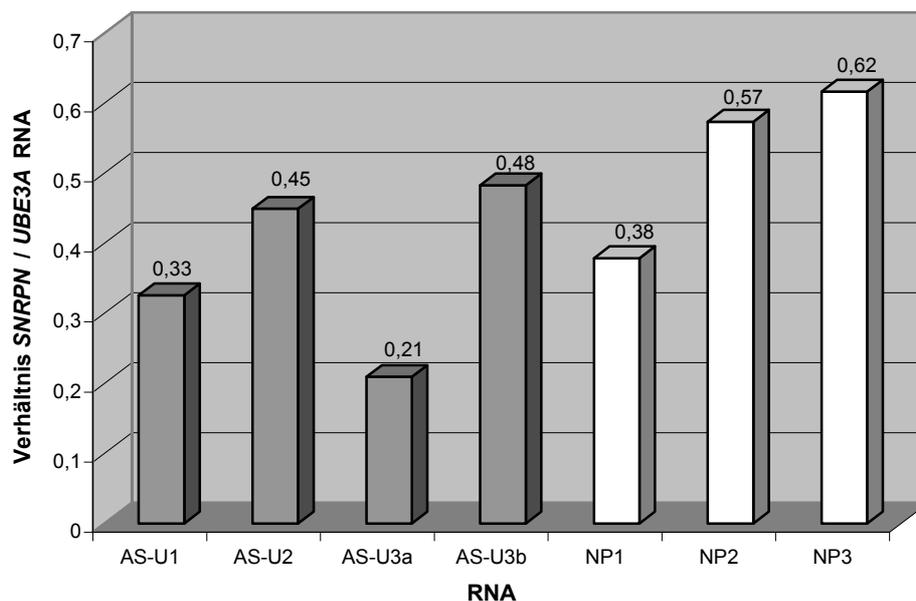


Abb. 3.25: Darstellung der QRT-PCR an RNA von vier Patienten mit AS durch Mutationen im *UBE3A*-Gen. Aufgetragen ist der Quotient aus *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* Transkript.

Da die Patienten einen heterozygoten Sequenzunterschied aufweisen, war es möglich, diesen Unterschied für eine allelspezifische Expressionsanalyse zu nutzen. Es wurden spezifische 5'-Primer für eine PCR an DNA (MutEx10dF, MutEx12dF, MutEx15dF) und für eine RT-PCR an RNA (MutEx10rF, MutEx12rF, MutEx15rF) generiert, um den

Bereich der jeweiligen Mutation zu amplifizieren. Als 3'-Primer wurde ein gemeinsamer Primer für PCR und RT-PCR genutzt (MutEx10R, MutEx12R, MutEx15R). Sowohl für Exon 10 als auch für Exon 15 liegt die Mutation zu nah an der Exon-Intron-Grenze (11 bzw. 10 bp entfernt), um die gleichen Primer für PCR und RT-PCR verwenden zu können. Da Exon 12 ebenfalls in einem Pseudogen von *UBE3A* enthalten ist (Kishino und Wagstaff, 1998), mussten auch hier verschiedene Primerpaare für DNA und RNA generiert werden. Es wurde darauf geachtet, dass das PCR- und das RT-PCR-Produkt eine vergleichbare Größe haben, um Amplifikationsunterschiede auszuschließen (Tabelle 2.6).

Die beiden Patienten AS-U1 und AS-U2 haben eine Deletion in Exon 10 bzw. Exon 12 des *UBE3A*-Gens, so dass eine Fragmentgrößen-Analyse durchgeführt werden konnte. Der reverse Primer hatte jeweils am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Es wurde eine RT-PCR an RNA sowie eine PCR an DNA der Patienten durchgeführt und die Produktgrößen auf einem ABIprism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert, wobei die Fluoreszenz des Farbstoffs genutzt wurde. Für die PCR wurden zusätzlich zu 35 Reaktions-Zyklen auch 20 Zyklen gewählt, um die Messung im exponentiellen Bereich der PCR durchzuführen. Im Vergleich zur DNA-Analyse konnte in der RT-PCR bei Patient AS-U1 ein um 50% (20 Zyklen) bzw. 53% (35 Zyklen) und bei Patient AS-U2 ein um 39% (20 Zyklen) bzw. 48% (35 Zyklen) vermindertes Verhältnis von normaler RNA zu mutierter RNA ermittelt werden. Da die Signale bei der RT-PCR mit 20 Zyklen bei Patient AS-U2 allerdings sehr schwach waren, sollte dieser Prozentwert vernachlässigt werden. Somit weisen beide Patienten ein um 50% verringertes Produkt-Integral des deletierten Allels auf.

Die Geschwister AS-U3a und AS-U3b sind heterozygot für eine G nach A Substitution in Exon 15 und es war daher keine Fragmentlängen-Analyse möglich. Die Quantifizierung der allelspezifischen Expression wurde mittels Sequenzierung durchgeführt. Die PCR bzw. RT-PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt, die Produkte aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierungen zeigten bei beiden Patienten vergleichbare Integrale für die Allele bei dem PCR-Produkt (DNA) und dem RT-PCR-Produkt (RNA) (Abb. 3.26 B). Es gibt also keinen Hinweis auf verminderte Expression oder Degradierung der mRNA.

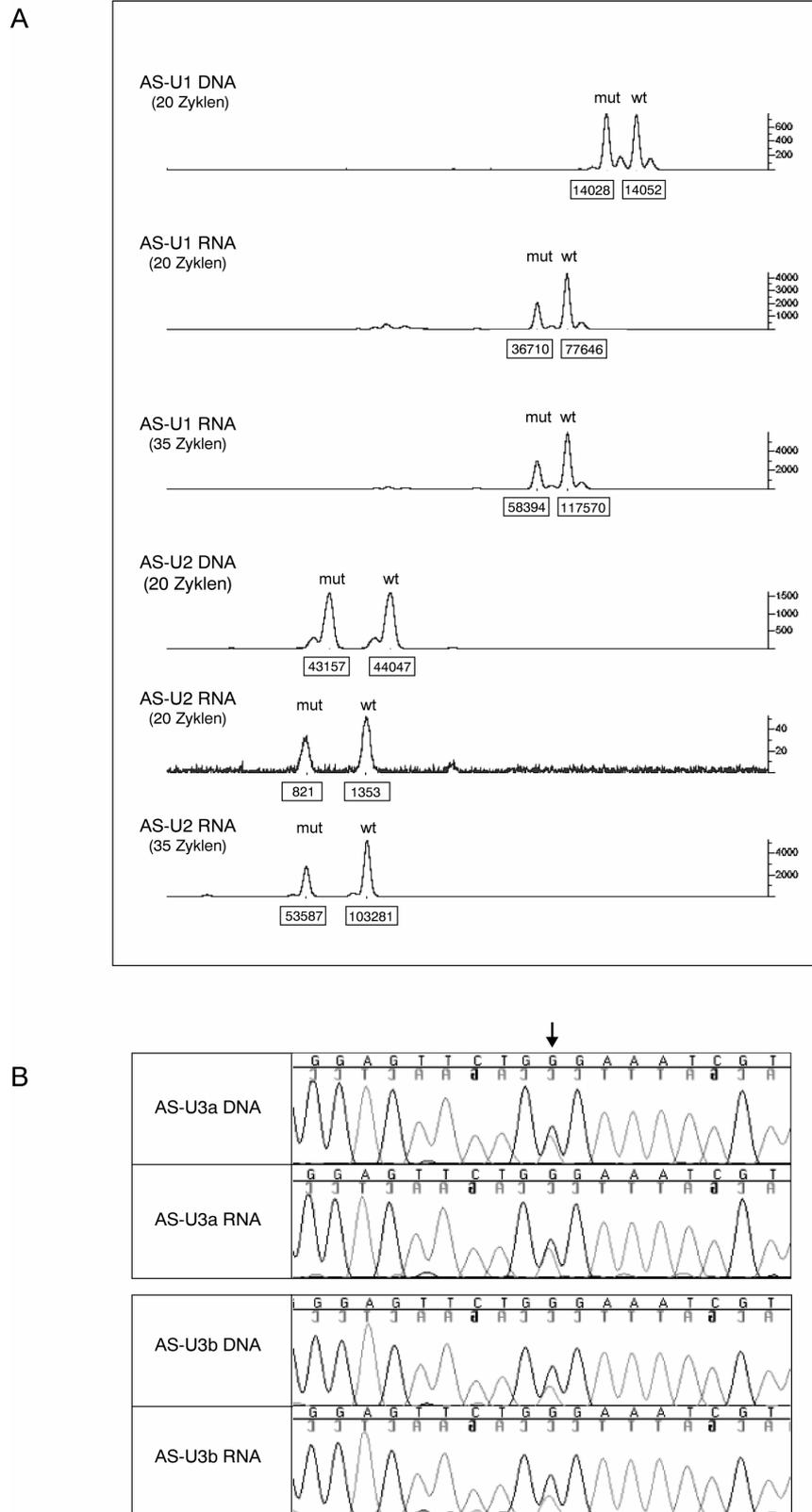


Abb. 3.26: Ergebnis der allelspezifischen Expressionsanalyse **A.** Die RT-PCR-Analyse für *UBE3A* Exon 10 an DNA und RNA von Patient AS-U1 und für *UBE3A* Exon 12 an DNA und RNA von Patient AS-U2 zeigt in beiden Patienten ein vermindertes Produktintegral des mutierten Allels (mut) gegenüber dem Wildtyp-Allel (wt). **B.** Die Chromatogramme der Sequenzierung von *SNURF-SNRPN* Exon 15 an DNA und RNA von AS-U3a und dessen Schwester AS-U3b zeigen annähernd vergleichbare Signale.

4. DISKUSSION

Differentielle DNA-Methylierung ist ein Hauptmerkmal geprägter Regionen. In der Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom-Region auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q11-q13) wurde an verschiedenen Loci elternspezifische Methylierung nachgewiesen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine detaillierte Analyse des Methylierungsmusters verschiedener Loci bei vier Patienten mit atypischem AS bzw. PWS durchgeführt, die in der Routine-Diagnostik durch eine auffällige Methylierung an einem von zwei untersuchten Loci aufgefallen waren. Des Weiteren sollte eine ausgedehnte Suche nach exprimierten Sequenzen distal vom *SNURF-SNRPN*-Gen neuen Aufschluss über diesen komplexen Locus geben und zur Identifizierung von einem oder mehreren Wirtsgenen für snoRNA-Gene führen, die in dieser Region lokalisiert sind.

4.1 Die Methylierungsauffälligkeiten bei Patienten mit atypischem AS und PWS können nur einzelne Loci in 15q11-q13 betreffen

Die elternspezifische Methylierung in der Region 15q11-q13 kann für die Diagnostik genutzt werden, da mit Ausnahme von *UBE3A*-Mutationen bei AS alle bekannten Defekte für ein AS bzw. PWS in einem abnormalen Methylierungsmuster resultieren. Obwohl mehrere Loci in der Region 15q11-q13 nachgewiesen werden konnten, die mit differentieller Methylierung assoziiert sind, wird in der Routinediagnostik in der Regel die Methylierung der Loci *SNURF-SNRPN* Exon 1 und/oder *D15S63* (PW71) untersucht (Dittrich *et al.*, 1993; Sutcliffe *et al.*, 1994). Es konnte in der Promotionsarbeit von Claudia Färber für Patienten mit PWS bzw. AS und einem Imprinting-Defekt mit und ohne Deletion des Imprinting-Centers (IC) gezeigt werden, dass sich das abnormale Methylierungsmuster über die gesamte geprägte Region erstreckt. Dabei haben Patienten mit PWS nur eine maternale Bande und Patienten mit AS nur eine paternale Bande. Die Methylierung des falsch geprägten Chromosoms verhält sich genau reziprok, so dass Loci, die normalerweise unmethyliert bzw. methyliert sind, bei diesen Patienten methyliert bzw. unmethyliert sind.

Die vier Patienten LE, FB, MK und MC haben ebenso wie die Patienten mit einem Imprinting-Defekt biparentale Chromosomen 15, zeigten aber ein abweichendes Methylierungsmuster für eine methylierungssensitive Restriktionsschnittstelle am Locus *D15S63*, während am *SNURF-SNRPN* Exon 1 ein normales Methylierungsmuster

nachgewiesen werden konnte. Solche Methylierungsmuster scheinen ein eher selteneres Phänomen zu sein, denn bei der Untersuchung der Methylierung der *CfoI*-Schnittstelle von *DI5S63* (PW71/u1A) bei 48 Patienten mit AS, bei denen ein bekannter Defekt ausgeschlossen worden war, wurde bei allen ein normales Methylierungsmuster identifiziert (persönliche Mitteilung von Dr. Karin Buiting).

Interessanterweise konnte das jeweilige Methylierungsmuster nicht eindeutig mit den Verdachtsdiagnosen der vier Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Zwei der Patienten (LE und FB) hatten ein AS-ähnliches Muster an der *CfoI*-Schnittstelle von Locus *PW71/u1A*, während bei ihnen die Verdachtsdiagnose PWS vorlag. Es wurden zwar Patienten beschrieben, die molekular-genetisch einen Imprinting-Defekt auf dem mütterlichen Chromosom 15 haben, also molekular-genetisch in die Kategorie AS fallen, klinisch aber überlappende Symptome zum PWS aufweisen wie z. B. Adipositas, muskuläre Hypotonie und milde mentale Retardierung (Gillesen-Kaesbach *et al.*, 1999), die Patienten LE und FB passen klinisch allerdings nicht in diese Patientengruppe, denn beide Patienten wiesen bei der Geburt keine muskuläre Hypotonie auf. Die anderen beiden Patienten (MK und MC) zeigten an derselben *CfoI*-Restriktionsschnittstelle ein PWS-ähnliches Methylierungsmuster, während sie eher Symptome eines AS haben. Im Gegensatz zu Patient MK, der ein eher typisches AS zeigt, weisen bei Patientin MC nur wenige Symptome auf ein AS hin. Gerade in der Neugeborenen- und frühkindlichen Phase ist die klinische Diagnose des AS sehr schwierig, da sich der charakteristische Phänotyp erst im Laufe der ersten Lebensjahre entwickelt. Die Entwicklung beider Patienten wurde allerdings von erfahrenen klinischen Genetikern über mehrere Jahre hinweg beobachtet. Interessanterweise wurde an keinem anderen der untersuchten Loci ein aberrantes Methylierungsmuster bei den Patienten LE und FB identifiziert. Auch die *HpaII*-Schnittstelle, die sich 1.3 kb weiter distal von der *CfoI*-Schnittstelle innerhalb des *DI5S63*-Locus befindet, zeigte eine normale Methylierung. Für den Locus *DI5S63* wurde eine 28 kb große Deletion beschrieben, die zu keinem auffälligen Phänotyp führt (Buiting *et al.*, 1999; Silverstein *et al.*, 2001). Da diese neutrale Variante aber den gesamten Locus einschließt, würde eine solche Deletion die Methylierungsauffälligkeit von LE und FB nicht erklären. Bei den Patienten MK und MC sind auch Loci methylierungsauffällig, die durch diese neutrale Deletion nicht betroffen wären (YR9AB und Y48.5 bei Patient MK; u1D, u1B, 71.19.12, YR9ab, Y48.5 und YL48E bei Patientin MC). Deshalb kann eine solche Variante den Befund in diesen Patienten nicht erklären.

Möglich wäre, dass die Methylierungsänderung die klonale Komplexität des peripheren Bluts widerspiegelt. LaSalle *et al.* (1998) konnten zeigen, dass das Methylierungsmuster innerhalb individueller Zellklone nicht immer erhalten bleibt und somit einer klonalen Heterogenität unterliegt. Aufgrund der Immunfunktion ist das periphere Blut ohnehin sehr komplex und somit könnte die Auffälligkeit bei LE und FB ein Problem dieser Komplexität und nicht des Imprintings sein. Diese Erklärungen könnten auch für die Patienten MK und MC zutreffen. Allerdings betrafen die Methylierungsauffälligkeiten bei MK drei weitere Loci außer der *CfoI*-Schnittstelle an *D15S63* und bei Patientin MC sieben weitere Loci. Es ist möglich, dass das Imprint in der Keimbahn umgeschaltet, dann allerdings nicht korrekt über die gesamte Region 15q11-q13 weitergeleitet worden ist. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass *in trans* wirkende Faktoren defekt sind. Solche Faktoren würden dann vermutlich aber auch in anderen geprägten Regionen zu Effekten in der Methylierung führen. Zumindest für das maternal methylierte CpG *island* (*KvDMR1* oder *DMR2*) im Intron 10 von Locus *KCNQ1* in der Beckwith-Wiedemann-Syndrom-Region auf Chromosom 11 konnte für alle vier Patienten eine normale Methylierung gezeigt werden. Es konnte also keine Erklärung für die Methylierungsauffälligkeit gefunden werden, die mit dem atypischen Phänotyp des PWS bzw. AS assoziiert ist.

4.2 Das *SNURF-SNRPN* Gen ist eine sehr komplexe Transkriptionseinheit

Durch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse konnte ich zeigen, dass das *SNURF-SNRPN*-Gen ein weitaus komplexerer Locus ist als bisher angenommen. Das ursprünglich beschriebene *SNURF-SNRPN*-Gen umfasste 10 Exons, die für ein 1.4 kb umfassendes bicistronisches Transkript kodieren (Gray *et al.*, 1999a). Die Identifizierung erster alternativer 3'-Exons (*SNURF-SNRPN* Exons 10a-20) führte zu der Annahme, dass das *SNURF-SNRPN*-Gen Teil einer komplexen Transkriptionseinheit ist (Buiting *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden weitere 3'-Exons identifiziert und die Zahl der Exons des *SNURF-SNRPN*-Gens konnte auf insgesamt 151 erhöht werden, die in multiplen alternativen Spleißvarianten genutzt werden. Die drei Exons 59, 60 und 61 repräsentieren kein eigenständiges Gen (*IPW*), wie ursprünglich von Wevrick *et al.* (1994) postuliert worden war, sondern sind Teil dieser Transkriptionseinheit, wobei die Exons selber alternativ in verschiedenen Isoformen genutzt werden. Exprimiert wird die gesamte Transkriptionseinheit ausschließlich vom väterlichen Allel. Die Northern-Blot Analysen ergaben keine distinkten Banden, was vermutlich durch die Größe des Transkripts, durch die geringe Expression, die hohe

Instabilität der RNA, oder durch die große Anzahl alternativer Spleißvarianten erklärt werden kann.

Die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit überlappt im distalen Bereich in Antisense Richtung mit dem *UBE3A*-Gen. Es wurde bereits durch Rougeulle *et al.* (1998) ein Antisense Transkript zu *UBE3A* beschrieben, allerdings handelte es sich hier um ein ungespleißtes Fragment von ca. 20 kb, das mit dem Exon 144 überlappt. Es konnten auch an anderen Positionen der Transkriptionseinheit (Exons 12, 16, 20 und 61) alternative Varianten identifiziert werden, die colinear in genomischer DNA exprimiert werden, während interne Spleißdonor- und akzeptorstellen auch zu verkürzten Varianten führen. Eine ähnliche Situation findet sich auch in der orthologen Region der Maus auf Chromosom 7. Während Chamberlain *et al.* (2001) ein unprozessiertes Antisense Transkript zu *Ube3a* identifizierten, wiesen Datenbank-Analysen auf eine prozessierte Variante mit distinkten Exons hin (Mitteilung von Dr. Karin Buiting und Dr. Marc Lalonde). Die parallele Existenz einer gespleißten und einer ungespleißten Form wurde auch für das murine *Xist* Antisense Transkript, *Tsix*, beschrieben (Lee *et al.*, 1999; Sado *et al.*, 2001).

4.2.1 Die Transkriptionseinheit dient als Wirtsgen für die verschiedenen snoRNA-Gene in 15q11-q13

Sowohl die *SNURF-SNRPN* Exons 11-20 (Wirth *et al.*, 2001) als auch die neu identifizierten Exons sind nicht kodierend, so dass die Funktion der Transkriptionseinheit ab Exon 11 nicht die Synthetisierung eines Proteins ist. Eine Funktion der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit ist die Aktivierung von kleinen nucleolären RNAs (*small nucleolar RNAs*; snoRNAs), deren Gene in die Region zwischen *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* kartiert werden konnten (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a). Alle snoRNA-Gene in dieser Region werden ausschließlich vom väterlichen Chromosom exprimiert, was sich durch die elternspezifische Expression der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit erklären läßt, denn die Expression des Wirtsgens bedingt die Expression der snoRNA-Gene. Bei Säugetieren liegen die Gene von snoRNAs in der Regel in den Introns von ubiquitär exprimierten Genen und werden durch den Spleißprozess und anschließendes exonukleolytisches Schneiden freigesetzt und aktiviert (Cafarelli *et al.*, 1996; Cavaillé und Bachellerie, 1996). Bisher wurde die Anwesenheit nur eines snoRNA-Gens pro Intron in der Literatur beschrieben. Und wirklich liegen die snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13, die entweder als Einzelkopie-Gene (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*), als

duplizierte Sequenzen (*HBII-438A* und *HBII-438B*) oder als Multigen-Cluster mit 27 Kopien (*HBII-85*) und mit 47 Kopien (*HBII-52*) vorliegen, bis auf wenige Ausnahmen vereinzelt in den Introns der Transkriptionseinheit. Die Tatsache, dass auch für snoRNA-Gene, die nach meinen ersten Untersuchungen in einem Exon oder mit einem zweiten snoRNA-Gen in einem Intron lagen, nachträglich alternative Transkriptionsvarianten identifiziert werden konnten, die zur Freisetzung der snoRNA führen würden (3.2.5.), lässt vermuten, dass es auch für die *HBII-85*-Genkopie in Exon 25 und die jeweils zwei *HBII-52* Genkopien in Intron 37 und Intron 39 alternative Varianten gibt, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Da viele der durchgeführten PCR-Reaktionen zu multiplen Produkten führten, die sich nicht alle klonieren ließen, ist es wahrscheinlich, dass Spleißvarianten unentdeckt blieben.

Die Schwierigkeiten bei Amplifikationen in der Region lassen sich durch die hohe Sequenzhomologie der Exons erklären. Gerade im Bereich des *HBII-52*-Genclusters fiel eine außergewöhnliche Organisation der Exons auf, denn es wechselten sich meist Exons mit einer Größe von ca. 40 bp mit Exons von ca. 130 bp ab, in deren überspannten Introns je eine snoRNA-Kopie enthalten ist (Abb. 4.1).

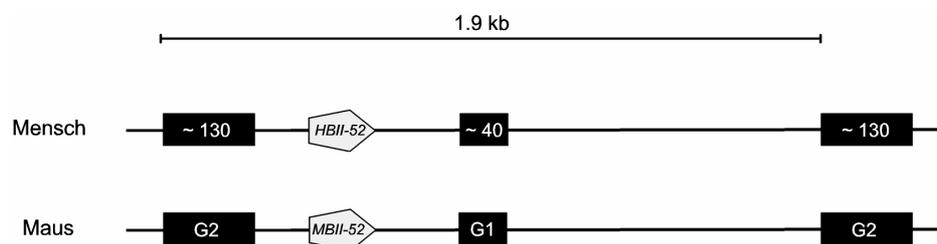


Abb. 4.1: Schematische Organisation der repetitiven Einheiten des *HBII-52* Clusters in der humanen Region 15q11-q13 und des *MBII-52* Clusters in der orthologen Mausregion auf Chromosom 7, die jeweils 1.9 kb umfassen. Die Exons der Transkriptionseinheit sind als schwarze Boxen dargestellt und die snoRNA-Gene im Intron (*HBII-52* und *MBII-52*) als weiße Fünfecke.

Auch die intronischen Bereiche zeigten alternierende Größen von ca. 1300 bp und 380 bp. Das stimmt mit den Beobachtungen von Cavallé *et al.* (2000) überein, der 1.9 kb große repetitive Einheiten beschrieben hat. Interessanterweise wurde in der Maus eine vergleichbare Organisation festgestellt (Cavallé *et al.*, 2000). Die Kopien des *MBII-52*-Genclusters sind in dem Bereich distal der Exons von *Ipw* lokalisiert, das ursprünglich als eigenständiges Gen angesehen wurde (Wevrick und Francke, 1997). Es stellte sich allerdings heraus, dass es sich bei dem sogenannten *Ipw* Exon G nicht wie bisher angenommen um ein einzelnes Exon handelte, sondern um repetitive Exons, die jeweils

durch ein Intron unterbrochen werden, in dem eine *MBII-52*-Genkopie eingebunden ist. Diese Sequenzeinheit aus zwei Exons (G1 und G2) und einem Intron mit eingebundener snoRNA-Kopie umfasst ebenfalls 1.9 kb und wiederholt sich (Abb. 4.1). Diese vergleichbare Organisation ist umso erstaunlicher, da die Sequenzen der *SNURF-SNRPN* Exons 59 bis 61 (ursprüngliches *IPW* Gen) und die Exons G1 und G2 in der Maus nur eine geringe Sequenzidentität zeigen. Im Gegensatz dazu sind die Genkopien des *HBII-52* bzw. *MBII-52* Genclusters zu 97% identisch.

Wie in der Maus liegen proximal des *HBII-52*-Clusters die Genkopien des *HBII-85* Clusters, die allerdings weniger konserviert sind (80% Identität) (Cavallé *et al.*, 2000). Die Exonsequenzen des Wirtsgens sind in diesem Bereich nicht konserviert (persönliche Mitteilung von Dr. Karin Buiting). Also kann man sagen, dass die Anordnung und die Sequenz der snoRNA-Gene stark konserviert ist, die Sequenz des Wirtsgens dagegen nicht. Durch einen Sequenzvergleich der 27 *HBII-85*-Kopien, ließen sich drei Gruppen mit ähnlichen Sequenzmotiven bilden (Abb. 4.2) (Runte *et al.*, 2001a).

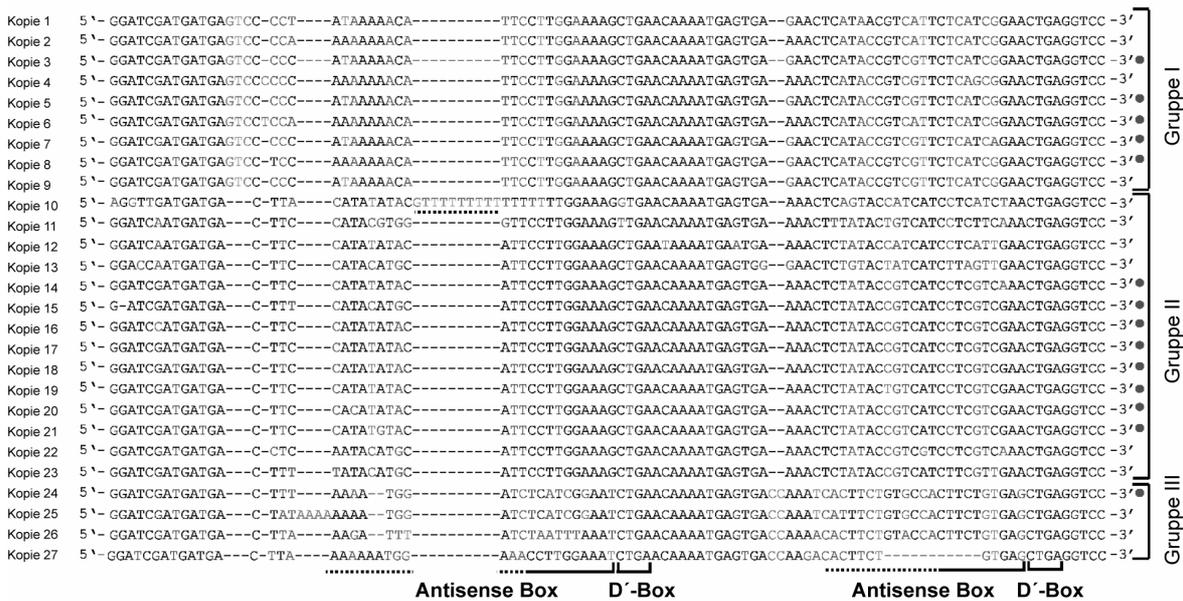


Abb. 4.2: Sequenz-Vergleich der 27 *HBII-85* Genkopien. Sequenzunterschiede sind in grau dargestellt. Die Sequenzmotive (Antisense Box, D'-Box) sind unterhalb der Sequenz abgegrenzt. Die 27 Genkopien können in drei Gruppe eingeteilt werden (Gruppe I bis Gruppe III).

Expressionsstudien von Prof. Dr. Alexander Hüttenhofer haben gezeigt, dass die Expressionsstärke der einzelnen Gruppen mit der Anzahl der Kopien korreliert, so dass man davon ausgehen kann, dass mit Ausnahme von drei degenerierten Kopien alle snoRNA-Kopien exprimiert werden (Runte *et al.*, 2001a). Ähnliches ergaben Studien für

die *HBII-52*-Kopien. Auch hier sind die drei distalsten Kopien degeneriert. Wichtig für die Funktion der RNA-Modifizierung ist das Antisense-Element einer snoRNA. Dies ist der komplementäre Bereich zu der RNA, die modifiziert werden soll. Es ergeben sich für die Funktion des *HBII-85*-Clusters zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten nur einige der snoRNA-Kopien aktiv sein, aber es ist auch möglich, dass alle Kopien aktiv sind und jeweils verschiedene Ziel-RNAs haben. Allerdings unterscheiden sich die Antisense-Elemente innerhalb des *HBII-85* Clusters und es konnte für keine der drei Gruppen bisher eine komplementäre Sequenz in der Datenbank identifiziert werden.

Eine paternale Deletion der Region zwischen *Snurf-Snrpn* und *Ube3a*, die alle C/D Box snoRNA-Gene mit einschließt, führt zu einem PWS-ähnlichen Phänotyp in Mäusen (Hypotonie, Wachstumsverzögerung, z. T. Letalität) (Tsai *et al.*, 1999a). Dies weist auf ein Gen bzw. Gene in dieser Region hin, das bzw. die zum PWS beitragen. Deletionen zwischen den ursprünglichen *Ipw*-Exons und dem Gen für den GABA-Rezeptor B3 (*Gabrb3*), das distal von der geprägten Region liegt, haben allerdings keine phänotypischen Auswirkungen, wenn sie über die väterliche Keimbahn weitergegeben werden (Nicholls *et al.*, 1999). Eine vergleichbare Deletion in einer Familie mit Bruchpunkten distal der *SNURF-SNRPN* Exons 59-61 und innerhalb des *GABRB3*-Gens führt nach paternalen Transmission zu keinem auffälligen Phänotyp (Saitoh *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1993). Somit liegen das *HBII-85*-Gencluster und auch die Gene *HBII-13*, *HB-II436* und *HBII-438A* in einer kritischen Region für das PWS, während das *HBII-52*-Gencluster und *HBII-438B* außerhalb dieser kritischen Region liegen und als Kandidatengene für PWS nicht in Betracht kommen. Allerdings hat das Antisense-Element der hoch konservierten *HBII-52* Genkopien eine 18 bp große Komplementarität zu der mRNA des Serotonin-Rezeptors 2C (Cavaillé *et al.*, 2000). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Gekopien dieses Clusters eine Rolle bei der kovalenten Modifizierung dieser RNA spielen könnten. Erstaunlicherweise ist das dazugehörige Gen, das auf dem X-Chromosom liegt, selber ein Wirtsgen, denn das zweite Intron beinhaltet das Gen für die snoRNA HBI-36 (Cavaillé *et al.*, 2000).

In einer Region auf Chromosom 14 (14q32) und auch in der orthologen Region der Maus auf Chromosom 12 wurden ebenfalls snoRNA-Gene identifiziert, die dem Imprinting unterliegen (Cavaillé *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2002). Sie werden ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert und gehören ebenso wie die snoRNAs in der PWS/AS-Region zur Gruppe der C/D-Box snoRNAs. Die snoRNA-Gene liegen auch in der Region 14q32 in Multigeneinheiten vor (14q(I) mit 9 Kopien und 14Q(II) mit 31 Kopien) und werden

sowohl in der Maus als auch beim Menschen aus den Introns einer komplexen Transkriptionseinheit gespleißt. Beim Menschen werden die snoRNAs aus dem Locus *MEG8* distal der elternspezifisch exprimierten Gene *DLK1* und *GTL2* prozessiert und in der Maus aus der RNA des *Rian*-Gens. Beide Gene werden nicht translatiert und zeigen keinerlei Sequenzähnlichkeit. Zumindest für das *MEG8*-Gen ist bekannt, dass die repetitiven Exons in alternativen Spleißvarianten genutzt werden. Insofern weisen die beiden Region 15q11-q13 und 14q32 ähnliche snoRNA-Gencluster auf, die aus komplexen Transkriptionseinheiten prozessiert werden. Im Gegensatz zu den snoRNA-Genen sind die Wirtsgene stark divergent zu den orthologen Mausequenzen, wobei die Organisation vergleichbar ist. Allerdings ist die Ähnlichkeit der snoRNA-Gene in der PWS/AS-Region (*HBII-85*-Kopien 90.2%; *HBII-52*-Kopien 93.5%) noch größer als die in der Region 14q32 (14q(I) 82.3%; 14q(II) 80.8%) (Cavaillé *et al.*, 2002). Dieser nicht so hohe Selektionsdruck könnte dafür sprechen, dass sie eher eine regulatorische Funktion haben als die Funktion der Modifizierung von ribosomaler RNA.

4.2.2 Die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit startet am Imprinting-Center

Die Transkription der Exons 1 bis 10 des *SNURF-SNRPN*-Gens startet am Promotor vor Exon 1 und somit im IC (Gray *et al.*, 1999a). Es wurden allerdings Spleißvarianten mit weiteren 5'-Exons des Gens identifiziert (IC/*SNRPN*-Transkripts), die von alternativen Startexons gestartet werden. Bisher gibt es keinen Hinweis, ob diese 5'-Exons in einer transkriptionalen Verbindung mit den nicht-kodierenden 3'-Exons stehen. Zumindest das gemeinsame Auftreten der Exons 1 und 14 in alternativen Spleißvarianten konnte durch RT-PCR gezeigt werden (RT-L1 und RT-L2) (Wirth *et al.*, 2001), so dass man bis dahin von einer Transkriptionseinheit ausgehen kann, deren Transkription in Exon 1 startet und zu multiplen Spleißvarianten führt. Obwohl die Exons der die IC/*SNRPN*-Transkripte auf *SNURF-SNRPN* Exon 2 gespleißt werden (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Transkription bestimmter Isoformen an den Exons u1A oder u1B gestartet wird. Allerdings konnte ich durch RT-PCR- und RACE-Experimente mit Primern in u1A, u1B und *SNURF-SNRPN* Exon 15 keine Isoform identifizieren, die zu einer Verbindung zwischen den alternativen 5'-Exons und den nicht-kodierenden *SNURF-SNRPN* Exons geführt hätte. Allerdings wurde bei der quantitativen RT-PCR für die *SNURF-SNRPN* Exons 57 bis 58 ein Verlust der Expression der Transkriptionseinheit bei zwei Patienten (PWS I-AT und PWS L-AT) festgestellt, die eine IC-Deletion auf ihrem paternalen Chromosom 15 haben, die die beiden Startexons u1A

und u1B sowie die alternativen 5'-Exons nicht mit einschließt. Der distale Bruchpunkt liegt in Exon 20. Daher ist sehr wahrscheinlich, dass die Transkription der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit am IC gestartet wird. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die IC-Deletion einen indirekten Effekt auf einen bisher nicht identifizierten Promotor strangabwärts hat. Da die Expression der Transkripte, die die Exons 59 bis 148 enthalten, im Blut sehr niedrig ist, kann ein alternativer Promotor distal von Exon 59 nicht ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es bisher keinen Hinweis auf einen weiteren Promotor in diesem Bereich. Diese Daten werden durch Experimente in der Maus gestützt, die zeigen konnten, dass eine Deletion des murinen IC im Verlust eines paternal exprimierten, ungespleißten *Ube3a* Antisense Fragments resultiert (Chamberlain *et al.*, 2001).

4.2.3 *SNURF-SNRPN* ist ein Antisense-Transkript zu *UBE3A*

Die snoRNAs, die aus der *SNURF-SNRPN* RNA prozessiert werden, zeigen eine distinkte Expression in verschiedenen Geweben (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a). Die snoRNA-Gene *HBII-436* und *HBII-13* werden sehr stark im Gehirn, in der Lunge und der Niere exprimiert, aber weniger stark auch in anderen Geweben wie z. B Muskel, Herz und Leber. *HBII-438A* proximal von *HBII-85* und *HBII-438B* distal von *HBII-52* sind Duplikationen und somit identisch in ihrer Sequenz. Daher lässt sich deren Expression nicht getrennt voneinander untersuchen. Ihr Expressionsmuster ist dem des *HBII-85* Genclusters vergleichbar mit starker Expression im Gehirn und in der Niere und schwächerer Expression in Leber und Herz. In der Arbeit von Wirth *et al.* (2000) wurde aufgezeigt, dass *HBII-85* ebenfalls im Blut exprimiert. Im Gegensatz dazu werden die 47 Genkopien des *HBII-52*-Clusters spezifisch im Gehirn exprimiert, so dass eine zunehmende gehirnspezifische Expression der snoRNA Gene in der Region 15q11-q13 von Centromer in Richtung Telomer beobachtet werden kann.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen an RNA aus peripherem Blut und fetalem Gehirn, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass die gewebespezifische Expression von Spleißvarianten in bestimmten Bereichen der *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit mit der der snoRNAs vergleichbar ist, die in diesen Regionen exprimiert werden (Abb. 4.3). Die Produkte der RT-PCR-Analyse für die Exons 1 bis 2 waren von annähernd gleicher Intensität. Dieses Ergebnis stimmt mit Northern-Blot Analysen überein, die eine ubiquitäre Expression des *SNURF-SNRPN* Gens für die Exons 1 bis 10 zeigten (Buiting *et al.*, 1996; Dittrich *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1999a). Für die

RT-PCR an Exon 57 bis 58 distal des *HBII-85*-Genclusters wurde eine vergleichbare Expression gefunden. Die Northern-Blot-Analysen für die *HBII-85* Kopien wiesen dagegen auf eine hauptsächliche Expression im Gehirn hin (Cavaillé *et al.*, 2000), allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt die Expression im peripheren Blut nicht untersucht, so dass ein Vergleich dieser beiden Gewebe nicht möglich ist. Interessanterweise wurde für die flankierenden *SNURF-SNRPN* Exons des gehirnspezifisch exprimierten *HBII-52*-Clusters (Exons 63 bis 65 und Exons 142 bis 143), und auch für die Exons 147 bis 148 im 3'-Bereich eine eher gehirnspezifische Expression gefunden. Für die Exons 142 bis 143 und Exons 147 bis 148 konnte nur durch eine Reamplifizierung eine schwache Expression auch im Blut nachgewiesen werden. Die cDNA-Klone, mit denen verschiedene Exons der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit identifiziert wurden, weisen auf eine Expression dieses distalen Bereichs auch in anderen Geweben hin, aber es kann keine Aussage über die Expressionsstärke gemacht werden. Die schwache Repräsentation der distalen Region in der cDNA-Bibliothek aus humaner Niere mit nur einem Klon gegenüber 16 Klonen aus der proximalen Region ist auffällig und könnte die schwächere Expression des distalen Bereichs in diesem Gewebe widerspiegeln. Somit ist die Gewebeverteilung der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 und deren Wirtsgenexons erwartungsgemäß vergleichbar.

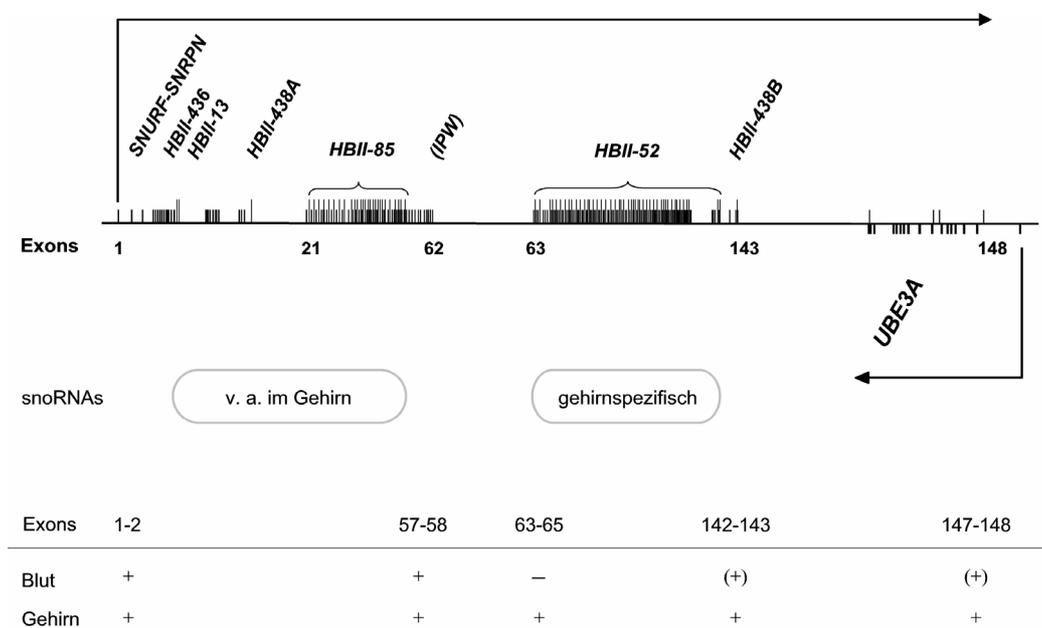


Abb. 4.3: Darstellung der vergleichbaren Expressionsmuster der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a), die in der Übersicht als lange vertikale Linien dargestellt, und der Exons der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit, die durch kurze vertikale Linien repräsentiert sind. Die Exons des *UBE3A*-Gens sind unterhalb der horizontalen Linie dargestellt. Im proximalen Bereich werden die snoRNA-Gene sehr stark im Gehirn exprimiert und *HBII-52* im distalen Bereich gehirnspezifisch. Die Expression der *SNURF-SNRPN* Exons im Blut und Gehirn, die an verschiedenen Positionen untersucht wurde, korreliert mit der Expression der snoRNA-Gene.

Der 3'-Bereich von *SNURF-SNRPN*, wo die Exons hauptsächlich im Gehirn exprimiert werden, überlappt in antisense Richtung mit dem *UBE3A*-Gen. Monoallelische Expression des *UBE3A*-Gens vom maternalen Allel wurde für bestimmte Gehirnbereiche beschrieben, während es in anderen Geweben wie dem peripheren Blut biallelisch exprimiert werden soll (Vu und Hoffman, 1997; Rougeulle *et al.*, 1997).

Analysen durch RNA-Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von Herzing *et al.* (2002) wiesen auf eine präferentielle Expression des maternalen Allels von *UBE3A* in Fibroblasten, Lymphozyten und neuronalen Vorläuferzellen hin. Wir konnten dieses Ergebnis durch zwei unabhängige Experimente nicht bestätigen. Einerseits wurde das Verhältnis von *SNURF-SNRPN*-RNA zu *UBE3A*-RNA mittels quantitativer RT-PCR (*Real-time* RT-PCR) von zwei Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt bestimmt. Im Gegensatz zu den Normalpersonen haben diese Patienten aufgrund der falschen Prägung des maternalen Chromosoms 15 zwei funktionell paternale Chromosomen und somit eine doppelt so hohe Expression vom paternal exprimierten *SNURF-SNRPN*-Gen (Abb. 4.4).

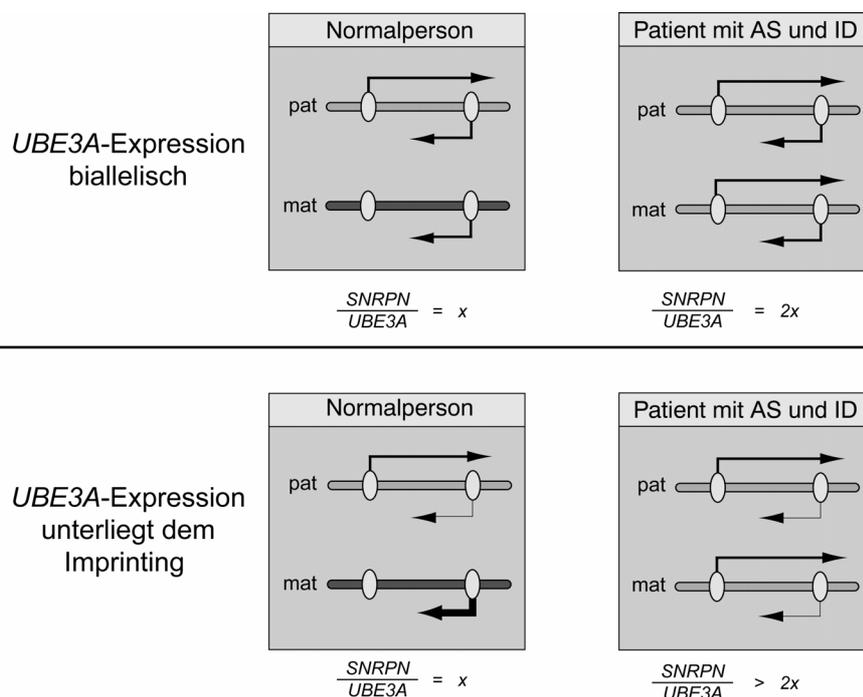


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Expression von *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* bei einer Normalperson und einem Patient mit AS und einem Imprinting-Defekt (ID). Dargestellt sind die beiden Möglichkeiten der biallelischen und der präferentiell geprägten Expression von *UBE3A* im Blut. Die hell- bzw. dunkelgraue Farbe kennzeichnet paternale bzw. maternale Prägung. Die Expressionsrichtungen von *SNURF-SNRPN* (vorderes Oval) und *UBE3A* (hinteres Oval) sind durch Pfeile dargestellt. pat, paternales Chromosom; mat, maternales Chromosom.

Im Falle einer biallelischen Expression von *UBE3A* im Blut sollte deshalb ein zweifach erhöhtes Verhältnis resultieren. Bei präferentiell maternaler Expression, wie sie von Herzing *et al.* (2002) beschrieben wurde, wäre die Expression von *UBE3A* weitaus geringer und der Imprinting-Defekt würde zu einem Verhältnis von *SNURF-SNRPN* zu *UBE3A* Transkript führen, das mehr als zweifach erhöht ist (Abb. 4.4). Die Ergebnisse der quantitativen *Real-time* RT-PCR weisen auf biallelische Expression von *UBE3A* hin. Da allerdings das Verhältnis von Patientin AS ID-71 geringfügig höher war als das von Patient AS ID-4, kann eine präferentiell maternale Expression im Blut, wie sie von Herzing *et al.* (2002) beschrieben wird, jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist sie mit quantitativer *Real-time* PCR nicht detektierbar.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Expression von *UBE3A* in Blut war die Analyse des Verhältnisses von dem mutierten maternalen Allel zu dem paternalen Wildtyp-Allel in AS-Patienten mit einer *UBE3A*-Mutation. Die Untersuchung der allelspezifischen Expression zeigte keine erhöhte RNA-Menge des mutierten Allels, was man bei einer präferentiellen Expression des Gens vom maternalen Allels erwartet hätte. Zwei der Patienten haben eine Deletion: Patient AS-U1 eine 2 bp-Deletion in Exon 10 und Patient AS-U2 eine 4 bp-Deletion in Exon 12. Bei Patient AS-U1 resultierte die Deletion nach 47 bp im Exon 10 im Terminationscodon und bei Patient AS-U2 nach bereits 17 bp im Exon 12. Die Methode zur Quantifizierung war die Fragmentlängenanalyse, wobei das Produkt der PCR an DNA bzw. RT-PCR an RNA der Patienten durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer sichtbar gemacht wurde. Man konnte bei AS-U1 eine um annähernd 50% verminderte Expression des mutierten Allels erkennen. Die beiden Geschwister AS-U3a und AS-U3b haben eine Basensubstitution im Exon 15 des *UBE3A*-Gens, die unmittelbar zu einem Terminationscodon führt. Da diese Mutation nicht zu einer Längenveränderung des PCR-Produkts führt, wurde die Methode der Sequenzierung für die Quantifizierung genutzt. Bei beiden Patienten wurde ein vergleichbares Verhältnis der beiden Allele bei der PCR und der RT-PCR detektiert, wobei nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass sich die Methode zum Quantifizieren eignet. Auffällig ist allerdings, dass die Signalhöhen bei der Patientin AS-U3b insgesamt niedriger sind als die von AS-U3a. Dieses legt die Vermutung nahe, dass mit der Methode ebenfalls quantifiziert werden kann und dass das mutierte maternale Allel nicht geringer exprimiert wird. Die quantitative RT-PCR Analyse (*Real-time* RT-PCR) war bei allen vier Patienten unauffällig, wobei die beiden Allele allerdings nicht differenziert untersucht wurden.

Offensichtlich ist diese Analyse aber nicht ausreichend sensitiv, um Änderungen von 25% im Verhältnis von *SNURF-SNRPN* zu *UBE3A* Transkript zu detektieren.

Die fehlende bzw. die mäßige Reduktion der mutierten *UBE3A*-Transkripte in den vier Patienten weist darauf hin, dass diese Transkripte nicht effizient durch die *Nonsense*-vermittelte mRNA Degradierung (*nonsense mediated mRNA decay*, NMD) entfernt werden. Durch diesen Mechanismus werden Transkripte, die ein vorzeitiges Terminationskodon aufgrund einer *Nonsense*-Mutation (Punktmutation) oder Leserasterverschiebung (Deletion, Insertion oder kryptische Spleißstellen) aufweisen, erkannt und degradiert, um die Translation eines trunkierten Proteins zu vermeiden. Bisher sind keine Untersuchungen bekannt, die sich mit NMD bei *UBE3A*-Mutationen beschäftigen. Eine RNA-Degradierung durch NMD erfolgt in der Regel, wenn sich das Terminationskodon mindestens 50 bp vor dem letzten Exon-Exon-Übergang in der mRNA befindet (Zhang *et al.*, 1998). Dieses ist für alle drei Mutationen der Fall. Die vorzeitigen Stopkodons befinden sich in Exon 10 (AS-U1), in Exon 12 (AS-U2) und in Exon 15 (AS-U3a und AS-U3b) des 16 Exons umfassenden *UBE3A*-Gens. Die Stopmutation in Exon 15 ist mit 135 bp ausreichend weit vom letzten Intron entfernt. Es ist zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unklar, warum einige Gene dem NMD entgehen, während in den meisten Fällen das mutierte Transkript effizient aus der Zelle entfernt wird. Das Spleißen spielt eine wichtige Rolle bei NMD und es werden Proteine diskutiert, die als Komplex (*exon junction complex*) an die gespleißte RNA binden. Durch die Position dieser Proteine wird möglicherweise ein vorzeitiges Stopcodon erkannt und die RNA degradiert (Le Hir *et al.*, 2001; Lykke-Andersen, 2001; Schell, 2002).

Die quantitative RT-PCR wäre bei Degradierung mutierter *UBE3A*-Transkripte durch einen qualitätssichernden Mechanismus wie z. B. NMD eine effiziente Methode, um AS-Patienten nach Änderungen in der Expression zu untersuchen, die keine Methylierungsauffälligkeiten zeigen. Die Suche nach Mutationen im *UBE3A*-Gen ist sehr zeitaufwendig und die Rate der Detektion von Mutationen ist bei sporadischen Fällen sehr niedrig (Malzac *et al.* 1998; Baumer *et al.* 1999; Fang *et al.*, 1999). Dies ist allerdings nicht möglich, da die mutierte RNA von *UBE3A* offensichtlich nicht dem NMD unterliegt.

Es ist bisher nicht klar, wie die differentielle Expression von *UBE3A* reguliert wird. Mit Ausnahme der snoRNA-Gene weisen alle paternal exprimierte Gene in der PWS/AS-Region (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN*) ihrem 5'-Bereich eine differentiell methylierte Region (DMR) auf. Methylierung ist in dieser Region mit dem inaktiven Status

des jeweiligen Gens assoziiert. Im 5'-Bereich von *UBE3A* dagegen und auch vom *ATP10C*-Gen ca. 200 kb weiter telomerisch konnte eine solche DMR bisher nicht identifiziert werden. *ATP10C* wird ebenfalls monoallelisch vom maternalen Chromosom 15 exprimiert, wobei auch bei diesem Gen die Prägung auch auf bestimmte Gewebe beschränkt ist (Herzing *et al.*, 2001). Es wurde von Meguro *et al.* (2001b) beschrieben, dass *UBE3A* in einer monochromosomalen Hybrid-Zelllinie methyliert ist, die ein paternales Chromosom 15 enthält, aber unmethyliert in einer Hybrid-Zelllinie, die nur das maternale Chromosom 15 enthält. Exprimiert wurde *UBE3A* in beiden Zelllinien. Dieses Methylierungsimprint konnte aber durch Experimente in anderen unabhängigen Laboratorien nicht bestätigt werden (Lossie *et al.*, 2001; persönliche Mitteilung von A.C. Lossie und D.J. Driscoll).

Es ist auffällig, dass die distalen Exons von *SNURF-SNRPN* in den Geweben sehr stark exprimiert werden, in denen *UBE3A* monoallelisch vom maternalen Chromosom exprimiert wird wie z. B. dem Gehirn, so dass man eine Rolle von *SNURF-SNRPN* bei der Regulierung der *UBE3A*-Expression postulieren könnte. Diese Annahme wird durch neueste Daten von Yamasaki *et al.* (2003) gestützt, die reziprokes Imprinting vom murinen *Ube3a*-Gen und einem ungespleißten Fragment des *Ube3a* Antisense Transkripts beschreiben. In undifferenzierten Zellen des Telencephalons unterliegt *Ube3a* nicht dem Imprinting und wird biallelisch exprimiert. Expression des *Ube3a* antisense Transkripts wurde in diesen Zellen nicht nachgewiesen. Nach der Differenzierung zu Gliazellen wird *Ube3a* weiterhin biallelisch exprimiert, während das Antisense Transkript nicht exprimiert wird. Entwickeln sich aus den Vorläuferzellen allerdings Neuronen, wird *Ube3a* ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert und das Antisense Transkript vom paternalen Allel. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine paternale Deletion des IC zum Verlust des ungespleißten *Ube3a* Antisense Transkripts führt und in einer biallelischen Expression vom *Ube3a*-Gen resultiert (Chamberlain *et al.*, 2001).

Interessanterweise sind in den meisten chromosomalen Regionen, die dem Imprinting unterliegen, auch Gene für nicht-kodierende Antisense RNAs lokalisiert, die meist vom paternalen Chromosom exprimiert werden (Wutz *et al.*, 1997; Mitsuya *et al.*, 1999; Smilnich *et al.*, 1999; Hayward und Bonthron, 2000; Lee *et al.*, 2000b; Li *et al.*, 2000; Okutsu *et al.*, 2000; Wroe *et al.*, 2000; Nakabayashi *et al.*, 2002; Reik und Walter, 2001; Rougeulle und Heard, 2002). In einer Maus-Studie konnte eine direkte Rolle eines nicht-kodierenden Gens bei der Regulierung der Expression eines Protein-kodierenden Gens beschrieben werden. Die genomische Prägung des murinen *Igf2r*-Gens ist abhängig von

einem *CpG-island* im Intron 2 dieses Gens, das der Startpunkt für die Expression des ungespleißten, nicht-kodierenden Antisense Transkripts *Air* ist (Wutz *et al.*, 1997). Sleutels *et al.* (2002) konnten durch Einbau eines vorzeitigen Polyadenylierungssignals in *Air* zeigen, dass die Verkürzung des *Air* Transkripts mit der Aktivierung der Expression von drei verschiedenen Genen korreliert, wobei die Methylierung und die differentielle Expression von *Air* durch die Insertion nicht beeinflusst wird. Da nur eines dieser Gene von *Air* überlappt wird, diskutieren die Autoren einen Mechanismus, wobei der Promotor des überlappten Gens inaktiviert wird. Dadurch könnte ein bestimmter Chromatinstatus induziert werden, der sekundär weitere Gene inaktiviert. Alternativ könnte die nicht-kodierende RNA Repressor-Proteine rekrutieren, die zur Inaktivierung von Genen in der Region führen. Eine Deletion des DMR2 des Antisense Gens *KCNQ1OT1* in der Region 11q15.5 führt zur Aktivierung der Expression des überlappenden Gens *KCNQ1* und eines weiteren Gens, *CDKN1C* (Horike *et al.*, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2002) und die Vermutung liegt nahe, dass *KCNQ1OT1* ein negativer Regulator für die Prägung einer Domäne in 11q15.5 ist. Auch bei der Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen somatischen Zellen wird eine korrelierte Expression eines Transkripts (*Xist*) und dessen Antisense Transkripts, *Tsix*, beschrieben. Das *Xist*-Gen wird ausschließlich von dem inaktiven X-Chromosom exprimiert. Das untranslatierte Produkt akkumuliert *in cis* und führt so zur Inaktivierung des Chromosoms (Boumil und Lee, 2001; Avner und Heard, 2001), allerdings nur bei einer fehlenden Expression von *Tsix* (Lee *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine quantitative Analyse des *SNURF-SNRPN* Transkripts und des *UBE3A* Transkripts bei acht Patienten im Vergleich zu Normalpersonen durchgeführt, um zu prüfen, ob eine Verschiebung der Expression vorliegt. Die Patienten zeigten klinisch ein AS, es konnte aber keiner der bekannten Defekte (Deletion von 15q11-q13, paternale UPD, Imprinting-Defekt, *UBE3A*-Mutation) nachgewiesen werden. Bei einem dieser Patienten wurde eine Mutation im *MeCP2*-Gen identifiziert. Defekte in diesem Gen sind mit dem Rett-Syndrom assoziiert. Watson *et al.* (2001) haben bereits auf eine Überlappung dieser beiden Krankheitsbilder hingewiesen. Die relative Quantifizierung von *SNURF-SNRPN* RNA und *UBE3A* RNA durch *Real-time* RT-PCR bei den verbleibenden sieben Patienten hat keine Auffälligkeit gezeigt. Es ist natürlich möglich, dass die Expression beider Gene in gegensätzliche Richtung verändert ist (stärkere Expression bei dem einen gegenüber schwächerer Expression bei dem anderen Gen), so dass sich die Veränderung beim relative Verhältnis wieder aufhebt. Verschiedene Publikationen zeigen, dass sich die differentielle Expression von *UBE3A* nur auf wenige

Die paternale Expression der Gene proximal vom IC wird durch differentielle DNA-Methylierung reguliert, die durch das IC etabliert wird. Die Expression des *UBE3A*-Gens, die in bestimmten Hirnregionen spezifisch vom maternalen Chromosom ist, könnte durch gehirnspezifische, paternal exprimierte *SNURF-SNRPN*-Transkripte reguliert werden, deren Expression am IC gestartet wird. Möglich ist, dass die *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit noch bis zum *ATP10C*-Gen weitergeführt werden kann, um auch die gewebespezifische maternale Expression dieses Gens zu regulieren. Bisher gibt es dafür jedoch keine Hinweise, da die Sequenzinformationen bisher nicht ausreichend waren. In diesem Modell wäre also *SNURF-SNRPN* das zentrale Gen, das die elternspezifische Transkription in beiden Richtungen steuert. Die gesamte Region wäre auf dem paternalen Chromosom offen und zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie und geschlossen auf dem maternalen Chromosom. Das asynchrone Replikationsmuster, das für diese und andere geprägte Regionen beschrieben wurde (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994), unterstützt dieses Modell.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Region 15q11-q13 enthält zwei unterschiedlich geprägte Gencluster, die der koordinierten Kontrolle eines Imprinting-Centers (IC) unterliegen. Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) wird durch den Verlust der Expression paternal exprimierter Gene in dieser Region verursacht, die mit Ausnahme von Genen für kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) eine elternspezifisch methylierte Region aufweisen. Der Funktionsverlust des *UBE3A*-Gens, das im Gehirn maternal exprimiert wird, führt zum Angelman-Syndrom (AS). Eine eher seltene Ursache für die Inaktivierung von Genen in dieser Region sind Imprinting-Defekte, die sich durch ein falsches Methylierungsmuster in der gesamten Region 15q11-q13 auszeichnen. In dieser Arbeit wurden vier Patienten mit Verdacht auf PWS bzw. AS vorgestellt, die Methylierungsauffälligkeiten an nur wenigen Loci in 15q11-q13 zeigen, die jedoch nicht direkt mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden konnten. Eine mögliche Ursache könnte nicht-korrektes Weiterleiten der Prägung in dieser Region sein.

Das paternal exprimierte *SNURF-SNRPN*-Gen ist Teil des IC und ein sehr komplexer Locus. In den letzten Jahren wurden weitere, nicht-kodierende 3'-Exons identifiziert (Exons 10a bis 20). In der vorliegenden Arbeit wurde nach weiteren exprimierten Sequenzen distal von *SNURF-SNRPN* gesucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *SNURF-SNRPN* Teil einer komplexen Transkriptionseinheit mit mindestens 151 Exons ist, die in multiplen Spleißvarianten genutzt werden. Eine IC-Deletion auf dem paternalen Chromosom führt zum kompletten Verlust der Expression dieser Transkriptionseinheit, die auch als Wirtsgen für verschiedene snoRNAs dient. Die snoRNA-Gene liegen bis auf wenige Ausnahmen einzeln in den Introns von *SNURF-SNRPN*.

Transkriptvarianten, die die distalsten Exons enthalten, werden präferentiell im Gehirn gebildet. In diesem Bereich überlappt die Transkriptionseinheit in Antisense Orientierung mit dem *UBE3A*-Gen. Die Antisense RNA könnte an der Stilllegung des väterlichen *UBE3A*-Allels im Gehirn beteiligt sein. Im Blut sind diese Transkriptvarianten kaum vorhanden und *UBE3A* wird in diesem Gewebe biallelisch exprimiert.

6. LITERATUR

- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**: 75-78.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* **23**: 185-188.
- 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.
- Angulo M, Castro-Mangana M, Uy J, Rosenfeld W (1992) Growth hormone evaluation and treatment in Prader-Willi syndrome. NATO ASI Series (Ed. by SB Cassidy) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, *Cell Biol* **61**: 171-174.
- 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.
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2001) A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* **10**: 1475-1483.
- Avner P und Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* **2**: 59-67.
- Bachelier JP und Cavaillé J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 257-261.
- Barlow DP (1995) Gametic imprinting in mammals. *Science* **270**: 1610-1613.
- Barton SC, Surani MAH, Norris ML (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**: 374-376.
- Baumer A, Balmer D, Schinzel A (1999) Screening for *UBE3A* gene mutations in a group of Angelman syndrome patients selected according to non-stringent clinical criteria. *Hum Genet* **105**: 598-602.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396.
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**: 2395-2402.
- 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 AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213.
- Birnboim HC und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

- 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.
- Boumil RM und Lee JT (2001) Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* **10**: 2225-2232.
- Bour'his D, Xu GL, Lin Cs, Bollman B, Bestor TH (1999) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539.
- Browne CE, Dennis NR, Maher E, Long FL, Nicholson JC, Sillibourne J, Barber JC (1997) Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* **61**: 1342-1352.
- Bürger J, Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, Reis A (1997) Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **61**: 88-93.
- 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 USA* **89**: 5457-5461.
- Buiting K, Dittrich B, Groß S, Greger V, Lalande M, Robinson W, Mutirangura A, Ledbetter D, Horsthemke B (1993) Molecular definition of the Prader-Willi syndrome chromosome region and orientation of the *SNRPN* gene. *Hum Mol Genet* **2**: 1991-1994.
- 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, Dittrich B, Ende S, Horsthemke B (1996) Identification of novel 3' exons of the human *SNRPN* gene. *Genomics* **40**: 132-137.
- Buiting K, Groß S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B (1998a) Expressed copies of the *MN7 (DI5S37)* gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 247-253.
- Buiting K, Dittrich B, Groß S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AMW, Halley DJJ, Schrandt-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalande M, Nicholls RD, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B (1998b) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: Implications for imprint switch models, genetic counseling and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **63**: 170-180.
- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999a) A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* **105**: 665-666.
- Buiting K, Dittrich B, Dworniczak B, Lerer I, Abeliovich D, Cottrell S, Temple IK, Harvey JF, Lich C, Groß S, Horsthemke B (1999b) A 28 kb deletion spanning *DI5S63 (PW71)* in five families: a rare neutral variant. *Am J Hum Genet* **65**: 1588-1594.

- Buiting K, Färber C, Kroisel P, Wagner K, Brueton L, Robertson ME, Lich C, Horsthemke B (2000) Imprinting centre deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Clin Genet* **58**: 284-290.
- Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcom 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-Maari O, Horsthemke B (2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndrome: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* **72**: 571-577.
- Bunday S, Hardy C, Vickers S, Kilpatrick MW, Corbett JA (1994) Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. *Dev Med Child Neurol* **36**: 736-742.
- Butler MG und Palmer CG (1983) Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**: 1285-1286.
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG (1986) Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **23**: 793-809.
- Butler MG (1990) Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* **35**: 319-332.
- Cafarelli E, Fatica A, Prislei S, De Gregorio E, Fragapane P, Bozzoni I (1996) Processing of the intron encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J.*, **15**, 1121-1131.
- Cassidy S, Conroy J, Becker L, Schwartz S (1996) Paternal duplication of 15q11-q13 in a hypotonic, developmentally delayed child without Prader-Willi or Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **62**: 205-212.
- Cattanach BM, Barr JA, Evans EP, Burtenshaw M, Beechey V, Leff SE, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Jones J (1992) A candidate mouse model for Prader-Willi syndrome which shows an absence of *SNRPN* expression. *Nat Genet* **2**: 270-274.
- Cattanach BM und Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**: 496-498.
- Cattanach BM, Barr JA, Beechey CV, Martin J, Noebels J, Jones J (1997) A candidate model for Angelman syndrome in the mouse. *Mamm Genome* **8**: 472-478. Erratum **8**: 877.
- Cavaillé J und Bachellerie J-P (1996) Processing of fibrillarin associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie*, **78**, 443-456.
- Cavaillé J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Hüttenhofer A (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14311-14316.
- Cavaillé 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.

- Chaillet RJ, Knoll JHM, Horsthemke B, Lalande M (1991) The syntenic relationship between the critical deletion region for the Prader-Willi/Angelman syndromes and proximal mouse chromosome 7. *Genomics* **11**: 773-776.
- Chamberlain SJ und Brannan CI (2001) The Prader-Willi syndrome imprinting-center activates the paternally expressed murine *Ube3a* antisense transcript, but represses paternal *Ube3a*. *Genomics* **73**: 316-322.
- Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT (2002) CTCF, a candidate transcription-acting factor for X-inactivation choice. *Science* **295**: 345-347.
- Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, Cooper DN, Lynch S, Thomas N, Hughes H, Hulten M, Ravine D, Sampson JR, Clarke A. (2000) Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* **9**: 1119-1129.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-686.
- Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S (2001) An overview of the *MAGE* gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**: 5544-5551.
- 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.
- Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877-9886.
- Cook EH, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman, C, Lord C, Courchesne E (1997) Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* **60**: 928-934.
- Cotter PD, Kaffe S, McCurdy LD, Jhaveri M, Willner JP, Hirschhorn K (1997) Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* **70**: 74-79.
- Dean W, Santos F, Stoykovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001) Conservation of methylation reprogramming in the mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13734-13738.
- DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW (1998) Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**: 8505-8514.
- Dhar M, Webb LS, Smith L, Hauser L, Johnson D, West DB (2000) A novel ATPase on mouse chromosome 7 is a candidate for increased body fat. *Physiol Genomics* **4**: 93-100.

- Dittrich B, Buiting K, Groß S, Horsthemke B (1993) Characterization of a methylation imprint in the Prader-Willi syndrome chromosome region. *Hum Mol Genet* **2**: 1995-1999.
- Dittrich B, Buiting K, Groß S, Horsthemke B (1994) An insertion/deletion polymorphism at the *DI5S63* locus in the critical Prader-Willi syndrome region in 15q11-13. *Hum Genet* **94**: 583-584.
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the *SNRPN* gene. *Nat Genet* **14**: 163-170.
- Donlon TA (1988) Similar molecular deletions on chromosome 15q11.2 are encountered in both the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Hum Genet* **80**: 322-328.
- Eiholzer U, I'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K (2000) Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* **53**: 200-206.
- 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.
- Engel E (1993) Uniparental disomy revisited: the first twelve years. *Am J Med Genet* **46**: 670-674.
- Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) The chromosome 15 imprinting centre (IC) has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of *SNRPN* that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC deletion. *Hum Mol Genet* **2**: 337-343.
- Färber C, Groß S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B (2000) Identification of a testis-specific gene (*CI5ORF2*) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**: 174-183.
- Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham JM Jr, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL (1999) The spectrum of mutations in *UBE3A* causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* **8**: 129-135.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **137**: 266-267.
- Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ (2002) Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of *KvDMRI*. *Nat Genet* **32**: 426-431.
- Fragapane P, Prislei S, Michienzi A, Caffarelli E, Bozzoni I (1993) A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *EMBO J* **12**: 2921-2928.

- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8998-9002.
- Fulmer-Smentek S und Francke U (2001) Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader-Willi deletion region. *Hum Mol Genet* **10**: 645-652.
- Gabriel J, Gottlieb W, Garcia A, Rogan PK, Saitoh S, Nicholls RD (1994) A common insertion/deletion polymorphism in the Prader-Willi syndrome minimal critical region. *Hum Mol Genet* **3**: 1912.
- Gabriel J, Merchant M, Ohta T, Ji Y, Caldwell RG, Ramsey MJ, Tucker JD, Longnecker R, Nicholls RD (1999) A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9258-9263.
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in peribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**: 799-809.
- Gardiner-Garden M und Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.
- Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse *Necdin* gene results in early post-natal lethality. *Nat Gene*. **23**: 199-202.
- Gibson UEM, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**: 995-1001.
- Gillessen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B (1999) A previously unrecognized phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* **7**: 638-644.
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B, Driscoll DJ (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **2**: 1377-1382.
- Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999a) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5616-5621.
- Gray TA, Smithwick MJ, Schaldach MA, Martone DL, Graves JA, McCarrey JR, Nicholls RD (1999b) Concerted regulation and molecular evolution of the duplicated *SNRPN* and *SNRPN* loci. *Nucleic Acids Res* **27**: 4577-4585.
- Greally JM, Starr DJ, Hwang S, Song L, Jaarola M., Zemel S (1998) The mouse *H19* locus mediates a transition between imprinted and non-imprinted DNA replication patterns. *Hum Mol Genet* **7**: 91-95.
- Greger V, Woolf E, Lalande M (1993) Cloning of the breakpoints of a submicroscopic deletion in an Angelman syndrome patient. *Hum Mol Genet* **2**: 921-924.
- Gregory RI, Randall TE, Johnson CA, Khosla S, Hatada I, O'Neill LP, Turner BM, Feil R (2001) DNA Methylation is linked to deacetylation of histone H3 but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. *Mol Cell Biol* **21**: 5426-5436.
- Hall JG (1990) Genomic imprinting: Review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* **46**: 857-873.

- 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.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983-1993.
- Hayashi Y, Matsuyama K, Tagaki K, Sugiura H, Yoshikawa K (1995) Arrest of cell growth by *necdin*, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 317-324.
- Hayward BE und Bonthron DT (2000) An imprinted antisense transcript at the human *GNAS1* locus. *Hum Mol Genet* **9**: 835-841.
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL (2001) Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* **107**: 727-738.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real-time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994.
- Hendrich B und Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-6547.
- Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C (1991) Uniparental disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* **351**: 665-667.
- Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Ledbetter DH (2001) The human aminophospholipid-transporting ATPase gene *ATP10C* maps adjacent to *UBE3A* and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* **68**: 1501-1505.
- Herzing LB, Cook EH Jr, Ledbetter DH (2002) Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of *UBE3A* and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications. *Hum Mol Genet* **11**: 1707-1718.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7276-7280.
- Holliday R und Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232.
- Holton TA und Graham MW (1991) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucl Acids Res* **19**: 1156.
- Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz TC, Shirayoshi Y, Oshimura M (2000) Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 2075-2083.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560.
- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei M-G, Malzac P, Roëckel N, Taviaux S, Lefranc J-L, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) The human *necdin* gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* **17**: 357-361.

- Jeppesen P und Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289.
- Ji Y, Walkowicz M, 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 that is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**: 533-542.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **21**: 799-811.
- Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL (1999) Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **65**: 1-6.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**: 187-191.
- Jong MTC, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD (1999a) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **8**: 783-793.
- Jong MTC, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM, Nicholls RD (1999b) Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* **8**: 795-803.
- Kamel A, Margery V, Norstedt G, Thoren M, Lindgren AC, Bronnegard M, Marcus C (1995) Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. *Ped Res* **38**: 418-421
- Kaplan LC, Wharton R, Elias E, Mandell F, Donlon TA, Latt SA (1987) Clinical heterogeneity associated with deletions in the long arm of chromosome 15: Report of three new cases and their possible significance. *Am J Med Genet* **28**: 45-53.
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**: 157-165.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997) *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 70-73.
- Kishino T und Wagstaff J (1998) Genomic organization of the *UBE3A/E6-AP* gene and related pseudogenes. *Genomics* **47**: 101-107.
- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**: 1077-1088.
- Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD, Cedar H (1993) Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* **364**: 459-463.
- Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr, Lalonde M, Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**: 285-290.

- 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**: 149-155.
- Knoll JH, Glatt KA, Nicholls RD, Malcolm S, Lalande M (1991) Chromosome 15 uniparental disomy is not frequent in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **48**: 16-21.
- Knoll JHM, Cheng SD, Lalande M (1994) Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet* **6**: 41-45.
- Kotzot D, Scnmitt S, Bernasconi F, Robonson WP, Lurie IW, Ilyina H, Méhes K, Hamel BCJ, Otten BJ, Hergersberg M, Werder E, Schoenle E, Schinzel A (1995) Uniparental disomy 7 in Silver-Russel syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* **4**: 583-587.
- Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G (2002) Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am J Med Genet* **110**: 268-272.
- 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.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the *KRYPTONITE* histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560.
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* **21**: 2672-2681.
- LaSalle JM, Ritchie RJ, Glatt H, Lalande M (1998) Clonal heterogeneity at allelic methylation sites diagnostic for Prader-Willi and Angelman. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1675-1680.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan SB, Crawford JD (1981) Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **304**: 325-329.
- Ledbetter DH, Mascarello JT, Riccardi VM, Harper VD, Airhart SD, Strobel RJ (1982) Chromosome 15 abnormalities and the Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **34**:
- Lee PDK, Brannan CI, Hintz RL, Rosenfeld RG (1987) Growth hormone treatment of short stature in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol* **2**: 31-34.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D (1999) *Tsix*, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre. *Nat Genet* **21**: 400-404.
- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R (2000a) Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-Willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* **9**: 1813-1819.
- Lee YJ, Park CW, Hahn Y, Park J, Lee J, Yun JH, Hyun B, Chung JH (2000b) *Mit1/Lb9* and *Copg2*, new members of mouse imprinted genes closely linked to *Peg1/Mest(1)*. *FEBS Lett* **472**: 230-234.

- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Moore, M. J. (2001) The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* **20**, 4987-4997.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) Purification, sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**: 905-914.
- Li T, Vu TH, Zeng ZL, Nguyen BT, Hayward BE, Bonthron DT, Hu JF, Hoffman AR (2000) Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted *Gnas* locus. *Genomics* **69**: 295-304.
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**: 662-673.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Appl* **4**: 357-362.
- Loh EY, Elliott JF, Cwirla S, Lanier LL, Davis MM (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor delta chain. *Science* **243**: 217-220.
- Long FL, Duckett DP, Billham LJ, Williams DK, Crolla JA (1998) Triplication of 15q11-q13 with inv dup(15) in a female with developmental delay. *J Med Genet* **35**: 425-428.
- Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, Dong HJ, Chen P, Theriaque D, Hutson A, Nicholls RD, Zori RT, Williams CA, Driscoll DJ (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* **38**: 834-845.
- Lykke-Andersen J (2001) mRNA quality control: Marking the message for life or death. *Curr Biol* **11**, R88-91.
- MacDonald H und Wevrick R (1997) The *necdin* gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* **11**: 1873-1878.
- Magenis RE, Brown MG, Lacy DA, Budden S, Fafranchi S (1987) Is Angelman syndrome an alternate result of del(15)(q11-13)? *Am J Med Genet* **28**: 829-838.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JAL, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991) Uniparental disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**: 694-697.
- Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JM, Kukolich M, Williams C, Pagon RA, Ramsdell LA, Kishino T, Wagstaff J (1998) Mutation analysis of *UBE3A* in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **62**: 1353-1360.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Nicholls RD (1992) The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **326**: 1599-1607.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 74-77.

- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502.
- Maxwell ES und Fournier MJ (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* **35**: 897-934
- Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M (2001a) A novel maternally expressed gene, *ATP10C* encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* **28**: 19-20.
- Meguro M, Mitsuya K, Nomura N Masakazu K, Kashiwagi A, Nishigaki R, Yoshioka H, Mitsuyoshi N Oishi M, Oshimura M (2001b) Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes. *Hum Mol Genet* **10**: 383-394.
- 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 *KvLQTI* locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum Mol Genet* **8**: 1209-1217.
- 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.
- Muscatelli 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 alteration reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 3101-3110.
- Nakabayashi K, Bentley L, Hitchins MP, Mitsuya K, Meguro M, Minagawa S, Bamforth JS, Stanier P, Preece M, Weksberg R, Oshimura M, Moore GE, Scherer SW (2002) Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (*MESTIT1*) in the human *MEST* locus on chromosome 7q32. *Hum Mol Genet* **11**: 1743-1756.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by methyl-CpG binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal uniparental heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**: 281-285.
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* **14**: 194-200.
- Nicholls RD (1999) Incriminating gene suspects, Prader-Willi style. *Nat Genet* **23**: 132-134.
- Özcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (*SNRPN*), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* **2**: 265-269.
- Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989) One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5673-5677.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription blocking activity of vertebrate insulators. *Trends Genet* **17**: 520-527.

- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD (1999a) Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **64**: 385-396.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999b) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **64**: 397-413.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li e (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a und Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257.
- Okutsu T, Kuroiwa Y, Kagitani F, Kai M, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko Y, Yokomori K, Surani MA, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2000) Expression and imprinting status of human *PEG8/IGF2AS*, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J Biochem (Tokyo)* **127**: 475-483.
- 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.
- Pelczar P und Filipowicz W (1998) The host gene for intronic U17 small nucleolar RNAs in mammals has no protein-coding potential and is a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family. *Mol Cell Biol* **18**: 4509-4518.
- Pembrey M, Fennell SJ, van den Berghe J, Fitchett M, Summers D, Butler L, Clarke C, Griffiths M, Thompson E, Super M (1988) The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J Med Genet* **26**:73-77.
- Prader A, Labhart A, Willi H (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* **86**: 1260-1261.
- Razin A und Cedar H (1994) DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* **77**: 473-476.
- Reik W und Maher R (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* **13**: 330-334.
- Reik W und Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32.
- Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillessen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994) Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* **54**: 741-747.
- Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**: 9-25.
- Robinson WP (2000) Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* **22**: 452-459.
- Rougeulle C, Glatt H, Lalande M (1997) The Angelman syndrome candidate gene, *UBE3A/E6-AP*, is imprinted in brain. *Nat Genet* **17**: 14-15.
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontés M, Colleaux L, Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps *UBE3A* and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* **19**: 15-16.

- Rougeulle C und Heard E (2002) Antisense RNA in imprinting: spreading silence through *Air*. *Trends Genet* 18: 434-437.
- Runte M, Hüttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001a) The IC-*SNURF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum Mol Genet* 10 (23): 2687-2700.
- Runte M, Färber C, Lich C, Zeschnigk M, Buchholz T, Smith A, Van Maldergem L, Bürger J, Muscatelli F, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B, Buiting K (2001b) Comprehensive methylation analysis in typical and atypical PWS and AS patients with normal biparental chromosomes 15. *Eur J Hum Genet* 9: 519-526.
- Sado T, Wang Z, Sasaki H, Li E (2001b) Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. *Development* 128: 1275-1286.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saitoh S, Kubota T, Ohta T, Jinno Y, Niikawa N, Sugimoto T, Wagstaff J, Lalonde M (1992) Familial Angelman syndrome caused by imprinted submicroscopic deletion encompassing GABAA receptor beta 3-subunit gene. *Lancet* 339: 366-367.
- Saitoh S, Harada N, Jinno Y, Hashimoto K, Imaizumi K, Kuroki Y, Fukushima Y, Sugimoto T, Renedo M, Wagstaff J, et al (1994) Molecular and clinical study of 61 Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* 52: 158-163.
- Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, König R, Malcom S, Horsthemke B, Nicholls RD (1996) Minimal definition of the imprinting center and fixation of a chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7811-7815.
- Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, Conroy JM, Driscoll DJ, Gabriel J, Gillessen-Kaesbach G, Glenn CC, Greenswag LR, Horsthemke B, Kondo I, Kuwajima K, Niikawa N, Rogan PK, Schwartz S, Seip J, Williams CA, Nicholls RD (1997) Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* 68: 195-206.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83.
- Schell T, Kulozik AE, Hentze MW (2002) Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense mediated decay pathway. *Genome Biol* 3 (Reviews).
- Schinzel AA, Brecevic L, Bernasconi F, Binkert F, Berthet F, Wuilloud A, Robinson WP (1994) Intrachromosomal triplication of 15q11-q13. *J Med Genet* 31: 798-803.
- Schübeler D, Francastel C, Cimbara DM, Reik A, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev* 14: 940-950.
- Schuffenhauer S, Buchholz T, Stengel-Rutkowski S, Buiting K, Schmidt H, Meitinger T (1996) A familial deletion in the Prader-Willi syndrome region including the imprinting control region. *Human Mutation* 8: 288-292.

- Shimoda M, Morita S, Obata Y, Sotomaru Y, Kono T, Hatada I (2002) Imprinting of a small nucleolar RNA gene on mouse chromosome 12. *Genomics* **79**: 483-486.
- Silverstein S, Lerer I, Buiting K, Abeliovich D (2001) The 28-kb deletion spanning D15S63 is a polymorphic variant in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* **68**: 261-263.
- Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, Hillman D, McCarrey JR, Cedar H (1999) Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**: 929-932.
- Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER (1994) Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **31**: 749-753.
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* **415**: 810-813.
- Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, Smallwood AC, Joyce JA, Schofield PN, Reik W, Nicholls RD, Weksberg R, Driscoll DJ, Maher ER, Shows TB, Higgins MJ (1999) A maternally methylated CpG island in *KvLQTI* is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (14): 8064-8069.
- Smith J, Carpten M, Brownstein S, Gosh V, Magnuson D, Gilbert J, Trent J, Collins F (1995) An approach to genotyping errors caused by non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Res* **5**: 312-317.
- Smith CM und Steitz JA (1998) Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol* **18**: 6897-6909.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Stöger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP (1993) Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* **73**: 61-71.
- Spritz RA, Bailin T, Nicholls RD, Lee ST, Park SK, Mascari MJ, Butler MG (1997) Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet* **71**: 57-62.
- Strahl BD und Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Surani MAH, Barton SC, Norris ML (1994) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548-550.
- Surani A (1998) Imprinting and the Initiation of Gene Silencing in the Germ Line. *Cell* **93**: 309-312.
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL (1994) Deletions of a differentially methylated CpG island at the *SNRPN* gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* **8**: 52-58.
- Sutcliffe JS, Jiang Y, Galjaard R-J, Matsuura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanaach B, Ledbetter DH, Beaudet AL (1997) The E6-AP ubiquitin-protein ligase (*UBE3A*) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* **7**: 368-377.

- Tamaru H und Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283.
- Tate PH und Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 226-231.
- Tauber M, Barbeau C, Jouret B, Pienkowski C, Malzac P, Moncla A, Rochiccioli P (2000) Auxological and endocrine evolution of 28 children with Prader-Willi syndrome : Effect of GH therapy in 14 children. *Horm Res* **53**: 279-287.
- Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD, Shield JPH (1995) An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet* **9**: 110-112.
- Tsai T-F, Jiang Y, Bressler J, Armstrong D, Beaudet AL (1999a) Paternal deletion from *Snrpn* to *Ube3a* in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **8**: 1357-1364.
- Tsai T-F, Armstrong D, Beaudet AL (1999b) *Necdin*-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* **22**: 15-16.
- Tycko B (1997) DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat Res* **386**: 131-140.
- Tycowski KT, Shu MD, Steitz JA (1993) A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes Dev* **7**: 1176-1190.
- Uetsuki T, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1996) Structure and expression of the mouse *necdin* gene: Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* **271**: 981-924.
- Ungaro P, Christian SL, Fantes JA, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH (2001) Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* **38**: 26-34.
- Vu TH und Hoffman AR (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, *UBE3A*, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**: 12-13.
- Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J (2001) Angelman syndrome phenotype associated with mutations in *MECP2*, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* **38**: 224-228.
- Webb T, Clarke D, Hardy CA, Kilpatrick MW, Corbett J, Dahlitz M (1995) A clinical, cytogenetic, and molecular study of 40 adults with the Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* **32**: 181-185.
- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12** (Review issue); R61-R68.
- Wevrick R, Kerns JA, Francke U (1994) Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* **3**: 1877-1882.
- Wevrick R und Francke U (1997) An imprinted mouse transcript homologous to the human imprinted in Prader-Willi syndrome (*IPW*) gene. *Hum Mol Genet* **6**: 325-332.
- Williams CA, Zori RT, Stone JW, Gray BA, Cantu ES, Ostrer H (1990) Maternal origin of 15q11-13 deletions in Angelman syndrome suggests a role for genomic imprinting. *Am J Med Genet* **35**: 350-353.

- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JHM, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, Zori RT (1995) Angelman syndrome: a consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* **56**: 237-238.
- Williams CA, Lossie A, Driscoll D (2001) Angelman syndrome: mimicking conditions and phenotypes. *Am J Med Genet* **101**: 59-64.
- Wirth J, Back E, Hüttenhofer 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.
- Wroe SF, Kelsey G, Skinner JA, Bodle D, Ball ST, Beechey CV, Peters J, Williamson CM. (2000) An imprinted transcript, antisense to *Nesp*, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse *Gnas* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3342-3346.
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP (1997) Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **389**: 745-749.
- Xin Z, Allis CD, Wagstaff J (2001) Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi syndrome imprinting center. *Am J Hum Genet* **69**: 1389-1394.
- Xin Z, Tachibana M, Guggiari M, Heard E, Shinkai Y, Wagstaff J (2003) Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J Biol Chem* **278**: 14996-15000.
- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T (2003) Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of *Ube3a*. *Hum Mol Genet* **12**: 837-847.
- Yang T, Adamson TE, Resnick JL, Leff S, Wevrick R, Francke U, Jenkins NA, Copeland NG, Brannan CI (1998) A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat Genet* **19**: 25-31.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the *SNRPN* locus. *Eur J Hum Genet* **5**: 94-98.
- Zhang J, Sun X, Qian Y, Maquat LE (1998) Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* **4**: 801-815.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke nicht nur für die Überlassung des sehr interessanten Themas, sondern auch für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und für die unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft, sowie für die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm dafür, dass mir die Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen ermöglicht worden ist.

Aufrichtig bedanken möchte ich mich auch bei meiner unmittelbaren Betreuerin Frau Dr. Karin Buiting für ihre große Hilfsbereitschaft, für die vielen, vielen Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, und auch für die wissenschaftlichen Diskussionen. Unsere Zusammenarbeit war besonders freundschaftlich und sie schaffte es auch, mich in schwierigen und frustrierenden Zeiten zu motivieren.

Meinen Kolleginnen im 15-er Projekt Stephanie Groß, Christina Lich und Hülya Nazlican danke ich für die herzliche Atmosphäre und für ihre jederzeit gewährte Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ich danke besonders Stephanie Groß für die große Hilfe beim Durchmustern der Phagenbibliothek und Christina Lich für die vielen Hilfestellungen bei den Experimenten mit den methylierungsauffälligen Patienten. Hülya Nazlican danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und für das zügige Korrekturlesen dieser Promotionsarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach für die Hilfe bei der Kontaktierung und Materialbeschaffung verschiedener Patienten und für die kritische Durchsicht meiner klinischen Beschreibungen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Alexander Hüttenhofer für die gute Zusammenarbeit. Durch ihn und die snoRNAs habe ich eine für mich bisher unbekannte, aber äußerst interessante Seite der Genetik kennen gelernt. Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern kollaborierender Institute, die in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei meinem zeitweiligen Labornachbarn Herrn Dr. Michael Zeschnig für sein großes Interesse an meiner Arbeit und für die zahlreichen Ratschläge.

Allen hier nicht genannten und auch vielen ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich sehr für eine schöne Arbeitsatmosphäre, für die gute Zusammenarbeit und für das Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinem Vater für die immerwährende Unterstützung und für das große Interesse am Verlauf meiner Arbeit danken. Besonders bei meiner Schwester Corinna und auch bei meiner Freundin Sandra Uhlir möchte ich mich sehr für ihre Anteilnahme bedanken und für das Korrekturlesen von Teilen des Manuskripts. Und ganz besonders dankbar bin ich auch meinem Freund Dr. Rejko Krüger, der immer für mich da war und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat. All meinen Freunden danke ich ebenfalls für ihr Interesse.

LEBENS LAUF

MAREN RUNTE

02.09.1973	geboren in Detmold
1980 - 1984	Besuch der Glückauf-Grundschule in Siegen
1984 - 1985	Besuch des Fürst-Johann-Moritz-Gymnasiums in Siegen
1985 - 1993	Besuch des Städtischen Gymnasiums in Kamen Abschluss: Abitur
10/1993 - 08/1999	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. T. Epplen am Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum mit dem Thema: „Klonierung des <i>RDS/Peripherin</i> -Gens und Mutationssuche in diesem und weiteren Kandidatengen für die Progressive Retinaatrophie.“
08/1995 - 03/1997	Studentische Hilfskraft in der Transferstelle der Universität Dortmund
10/1996 - 11/1996	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Spezielle Zoologie der Ruhr-Universität Bochum
04/1997 - 07/1997 / 10/1997 - 11/1997	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Allgemeine und Neurobiologie der Ruhr-Universität Bochum
08/1997 - 10/1997	Volontariat im Rahmen des " <i>Philippine Endemic Species Conservation Project of the Frankfurt Zoological Society</i> " auf Panay/Philippinen
seit 12/1999	Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. B. Horsthemke am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung und Expressionsanalyse der *SNURF-SNRPN* Sense-*UBE3A* Antisense Transkriptionseinheit in der Prader-Willi-/Angelman-Syndrom-Region auf Chromosom 15“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Maren Runte befürworte.

Essen, den 08.07.2003

(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 08.07.2003

(Maren Runte)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 08.07.2003

(Maren Runte)