

Implementierung hochauflösender molekulargenetischer Methoden zur Klärung der Pathophysiologie des Silver-Russell-Syndroms

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Sabrina Spengler
aus Dorsten

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 Summary | 3 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1 Phänotyp und Häufigkeit des SRS | 5 |
| 2.2 Genomisches Imprinting und Imprinting-erkrankungen | 7 |
| 2.3 (Epi)genetische Veränderungen und Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim SRS | 9 |
| 2.3.1 Chromosom 7 | 10 |
| 2.3.2 Chromosom 11 | 13 |
| 2.3.3 Multilocus-Methylierungsdefekte (MLMD) | 17 |
| 2.3.4 Chromosomale Aberrationen beim SRS | 19 |
| 2.4 Zielsetzung | 21 |
| 3. Material und Methoden | 24 |
| 3.1 Material | 24 |
| 3.1.1 Geräte und Zubehör | 24 |
| 3.1.2 Chemikalien | 25 |
| 3.1.3 Oligonukleotide | 26 |
| 3.1.4 Feinchemikalien und Enzyme | 27 |
| 3.1.5 Probanden-Kollektive | 28 |
| 3.1.5.1 Klinisches Scoring-System | 28 |
| 3.2 Methoden | 29 |
| 3.2.1 DNA-Isolation und –Aufreinigung | 29 |
| 3.2.1.1 DNA-Isolation | 29 |
| 3.2.1.2 DNA-Aufreinigung | 29 |
| 3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 30 |
| 3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung | 31 |
| 3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese | 32 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.2 | Hochauflösende Kapillargelelektrophorese | 33 |
| 3.2.4 | Mikrosatelliten-Analyse | 34 |
| 3.2.5 | Direkte Sequenzierung nach Sanger | 35 |
| 3.2.5.1 | Mutationsscreening des <i>ZFP57</i> -Gens | 36 |
| 3.2.5.2 | Mutationsscreening des <i>HMGA2</i> -Gens | 37 |
| 3.2.5.3 | Mutationsscreening der <i>GRB10</i> -CPGI2 | 37 |
| 3.2.6 | Restriktionsverdau | 38 |
| 3.2.7 | Bisulfit-Behandlung genomischer DNA | 40 |
| 3.2.8 | MS-PCR | 41 |
| 3.2.8.1 | MS-PCR für den <i>MEST</i> -Locus auf Chromosom 7 | 42 |
| 3.2.8.2 | MS-PCRs für den <i>GRB10</i> -Locus auf Chromosom 7 | 42 |
| 3.2.8.3 | MS-PCR für den <i>MEG3</i> -Locus auf Chromosom 14 | 43 |
| 3.2.8.4 | MS-PCR für den <i>PLAGL1</i> -Locus auf Chromosom 6 | 43 |
| 3.2.9 | MS-SNuPE | 44 |
| 3.2.10 | MLPA | 47 |
| 3.2.10.1 | MS-MLPA | 48 |
| 3.2.10.2 | MLPA-Sondendesign | 49 |
| 3.2.11 | DNA-Mikroarrays | 50 |
| 3.2.11.1 | Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 | 53 |
| 3.2.11.2 | Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array | 55 |
| 3.2.12 | Quantitative Real-Time PCR | 56 |
| 4. | Ergebnisse | 58 |
| 4.1 | Mutationsanalysen | 58 |
| 4.1.1 | Mutationsanalyse des Gens <i>ZFP57</i> | 58 |
| 4.1.1.1 | Bekannte SNPs des Gens <i>ZFP57</i> | 59 |
| 4.1.1.2 | Unbekannte Variante g.124723C>T | 60 |
| 4.1.2 | Mutationsanalyse des Gens <i>HMGA2</i> | 60 |
| 4.1.3 | Mutationsanalyse der <i>GRB10</i> -CPGI2 | 61 |
| 4.1.3.1 | Nachweis unbekannter Varianten in der <i>GRB10</i> -CPGI2 | 62 |
| 4.2 | Nachweis von (Epi)mutationen bei SRS-Patienten | 63 |
| 4.2.1 | Nachweis von ICR1-Hypomethylierungen mittels MS-MLPA an Mundschleimhaut-DNA | 63 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.2 Etablierung einer MS-PCR für den <i>GRB10</i> -Locus in 7p12 | 65 |
| 4.2.3 Etablierung von MS-SNuPE zum Nachweis von Epimutationen | 67 |
| 4.2.3.1 Etablierung der PCRs und der Primerverlängerungsreaktionen | 68 |
| 4.2.3.2 Berechnung und Normierung der Methylierungsindizes | 69 |
| 4.2.3.3 Validierung des MS-SNuPE Assays an Patientenproben | 70 |
| 4.2.3.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse | 74 |
| 4.2.3.5 Titration mit vollmethylierter und unmethylierter DNA | 75 |
| 4.3 Mikroarray-Analytik | 76 |
| 4.3.1 Software-Etablierung und Array-Auswertung | 76 |
| 4.3.1.1 Genotyping Console | 76 |
| 4.3.1.2 Chromosome Analysis Suite | 78 |
| 4.3.2 Etablierung des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 | 81 |
| 4.3.3 Nachweis submikroskopischer Imbalancen bei den SRS-Patienten | 82 |
| 4.3.3.1 Imbalancen bei den SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung | 83 |
| 4.3.3.2 Imbalancen bei idiopathischen SRS-Patienten | 85 |
| 4.3.3.2.1 Pathogene Imbalancen | 86 |
| 4.3.3.2.2 Imbalancen mit unklarer klinischer Signifikanz | 91 |
| 4.3.3.3 Nachweis von Mikrodeletionen/-Duplikationen in der geprägten Region 11p15.5 | 92 |
| 4.3.3.4 Vergleich der CNVs bei einem eineiigen Zwillingspärchen | 93 |
| 4.3.4 Nachweis partieller Isodisomien an geprägten Loci bei den SRS-Patienten | 94 |
| 4.3.5 Etablierung des Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array | 95 |
| 4.4 Einzelkasuistiken | 97 |
| 4.4.1 Nachweis einer isolierten <i>GRB10</i> -Hypermethylierung sowie einer 20p13-Deletion bei SRS-Patient M7870 | 97 |
| 4.4.2 Nachweis einer paternalen Deletion des <i>MEST</i> -Locus in 7q32 bei SRS-Patient M9475 | 99 |
| 5. Diskussion | 102 |
| 5.1 Mutationsanalysen einzelner Gene und Regionen | 102 |
| 5.1.1 Bedeutung von <i>ZFP57</i> für die Ätiologie des SRS | 102 |
| 5.1.2 Bedeutung von <i>HMGA2</i> für die Ätiologie des SRS | 103 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.3 Relevanz genomischer Mutationen der <i>GRB10</i> -CPGI2 für die Ätiologie des SRS | 104 |
| 5.2 Nachweis von (Epi)mutationen bei SRS-Patienten | 105 |
| 5.2.1 Ausschluss gewebespezifischer Mosaik der ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten und Mundschleimhaut | 105 |
| 5.2.2 Analyse des <i>GRB10</i> -Locus mittels MS-PCR | 106 |
| 5.2.3 Verwendung von MS-SNuPE zur Analyse multipler geprägter Loci | 107 |
| 5.3 Verwendung von DNA-Mikroarrays zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen | 110 |
| 5.4 Häufigkeit und Relevanz submikroskopischer genomischer Imbalancen und partieller Isodisomien für das SRS | 112 |
| 5.4.1 Bedeutung für die Ätiologie bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung | 112 |
| 5.4.2 Bedeutung für die Ätiologie bei idiopathischen Patienten | 114 |
| 5.4.3 Relevanz von Mikrodeletionen/-duplikationen in der geprägten Region 11p15.5 | 119 |
| 5.4.4 Bedeutung somatischer CNV-Mosaik für das SRS | 120 |
| 5.4.5 Bedeutung partieller Isodisomien an geprägten Loci bei den SRS-Patienten | 120 |
| 5.5 Bedeutung (epi)genetischer Veränderungen auf Chromosom 7 für das SRS | 121 |
| 5.6 Ausblick | 122 |
| 6. Anhang | 125 |
| 7. Literaturliste | 143 |
| 7.1 In dieser Arbeit zitierte Internetseiten und öffentliche Datenbanken | 143 |
| 7.2 In dieser Arbeit zitierte Publikationen | 143 |
| 7.3 Eigene Publikationen | 154 |

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Adenin |
| Bp | Basenpaare |
| BWS | Beckwith-Wiedemann-Syndrom |
| C | Cytosin |
| CDKN1C | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i> |
| ChAS | <i>Chromosome Analysis Suite</i> |
| Chr. | Chromosom |
| CNV | <i>copy number variation</i> |
| CPGI | CpG-Insel |
| CTCF | <i>CCCTC-binding factor</i> |
| ddNTP | Didesoxynukleotidtriphosphat |
| DECIPHER | <i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i> |
| del | Deletion |
| DGV | <i>Database of Genomic Variants</i> |
| DMR | <i>differentially methylated region</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dup | Duplikation |
| EDTA | Ethylendiamintetracetat |
| FISH | Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung |
| F-Primer | <i>forward-Primer</i> |
| G | Guanin |
| GOM | <i>gain of methylation</i> |
| GRB10 | <i>growth factor receptor bound protein gene 10</i> |
| hg | <i>human genome</i> |
| ICR | <i>imprinting center region</i> |
| IGF1R | <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> |
| IGF2 | <i>insulin-like growth factor 2</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|----------------------------------------------------------------|
| IGF2P0 | IGF2 DMR |
| IGF2R | <i>insulin-like growth factor 2 receptor</i> |
| IUGR | <i>intrauterine growth retardation</i> |
| kb | Kilobasenpaare |
| KCNQ1OT1/LIT1 | <i>KCNQ-overlapping transcript 1</i> |
| LOH | <i>loss of heterozygosity</i> |
| LOI | <i>loss of imprinting</i> |
| LOM | <i>loss of methylation</i> |
| MAPD | <i>median absolute pairwise difference</i> |
| mat | maternal |
| Mb | Megabasenpaare |
| MEG3 | <i>maternally expressed gene 3</i> |
| MI | Methylierungsindex |
| MLMD | <i>multilocus methylation defect</i> |
| MLPA | <i>multiplex ligation-dependend probe amplification</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MS | methylierungs-spezifisch |
| MS-SNuPE | <i>methylation-specific single nucleotide primer extension</i> |
| NCBI | National center for biotechnology information |
| OMIM | <i>Online mendelian inheritance in man</i> |
| PAA | Polyacrylamid |
| pat | paternal |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PEG1/MEST | <i>paternal expressed gene 1/mesoderm specific transcript</i> |
| PLAGL1 | <i>pleomorphic adenoma gene-like 1</i> |
| PNGR | <i>postnatal growth retardation</i> |
| pter | terminales Ende des p-Arms |
| PV | Primerverlängerungsreaktion |
| qPCR | quantitative PCR |
| qter | terminales Ende des q-Arms |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| R-Primer | <i>reverse Primer</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--------------------------------------------|
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| SRS | Silver-Russell Syndrom |
| T | Thymin |
| TA | Annealing-Temperatur |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA |
| TNDM | transienter neonataler Diabetes mellitus |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Tris HCl | Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid |
| UPD | Uniparentale Disomie |
| upd(6)pat | paternale UPD6 |
| upd(7)mat/pat | maternale/paternale UPD 7 |
| upd(14)mat/pat | maternale/paternale UPD14 |
| WT | Wildtyp |

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS; OMIM #180860) ist eine klinisch und genetisch heterogene Imprintingkrankung, die durch eine schwere prä- und postnatale Wachstumsretardierung, eine relative Makrozephalie, ein dreieckförmiges Gesicht, Asymmetrien des Körpers und/oder der Extremitäten sowie eine Klinodaktylie der fünften Finger gekennzeichnet ist. Eine molekulargenetische Bestätigung des klinischen Befundes ist derzeit nur bei etwa der Hälfte der Patienten möglich: Während bei 7-10 % der Patienten eine maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 7 (upd(7)mat) nachgewiesen werden kann, wird bei ca. 40 % der Patienten eine Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 beobachtet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Implementierung hochauflösender molekulargenetischer Analyseverfahren zur weiteren Abklärung der Pathophysiologie des SRS beizutragen. Dazu wurden genomische Mutationsanalysen, methylierungs-spezifische Tests sowie Mikroarray-Analysen an einem Kollektiv aus 42 Patienten mit klinischer Diagnose SRS aber ungeklärter Ätiologie („idiopathische SRS“) sowie 31 SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 durchgeführt. Des Weiteren wurden zwei Einzelpatienten aus der SRS-Routinediagnostik mit (Epi)mutationen auf Chromosom 7 näher untersucht.

Aufgrund von Literaturberichten (Mackay et al., 2008; Shiura et al., 2009; Lynch et al., 2011), die auf eine pathogenetische Relevanz für das SRS hindeuteten, wurden die Gene *ZFP57* und *HMGA2* sowie die *GRB10-CPGI2* auf genomische Mutationen untersucht. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten SRS-Patienten konnten jedoch keine pathogenen Veränderungen nachgewiesen werden (Spengler et al., 2009; 2010), so dass ein relevanter kausaler Zusammenhang zwischen Mutationen in diesen Faktoren und dem SRS nicht wahrscheinlich ist.

Da bei etwa 50 % der SRS-Patienten (Epi)mutationen an geprägten Loci nachweisbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass zumindest bei einem Teil der idiopathischen Patienten ebenfalls Epimutationen vorliegen, die mit den derzeit verwendeten Detektionsverfahren nicht erfasst werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit einerseits Methylierungsanalysen an einem bisher nicht routinemäßig untersuchten Gewebe durchgeführt. Des Weiteren wurden neue Methoden zum Nachweis von Epimutationen bei den SRS-Patienten entwickelt und etabliert. Zur Detektion gewebe-spezifischer Mosaik wurde zusätzlich zur routinemäßig

untersuchen DNA aus Lymphozyten die DNA aus Mundschleimhaut von SRS-Patienten mit Epimutation und idiopathischen SRS-Patienten untersucht. Die Ergebnisse aus Lymphozyten-DNA beider Patientengruppen konnten in der Mundschleimhaut-DNA bestätigt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Veränderung immer beide Gewebe betrifft (Spengler et al., 2011). Zum Nachweis einer upd(7)mat sowie isolierter Methylierungsstörungen wurde in der Vergangenheit eine methylierungs-spezifische (MS)-PCR für den *MEST*-Locus in 7q32 verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere MS-PCR zur Identifizierung segmentaler uniparentaler Disomien sowie von Epimutationen des *GRB10*-Locus in 7p12 etabliert. Daraufhin wurde bei einem von 31 Patienten eine isolierte Hypermethylierung identifiziert. Es ist daher davon auszugehen, dass eine solche Epimutation ein eher seltener Befund beim SRS ist. Aufgrund der Beobachtung von Multilocus-Methylierungsdefekten (MLMD) bei Patienten mit verschiedenen Imprintingkrankungen wurde ein MS-SNuPE (methylation-specific single nucleotide primer extension) Assay zum Nachweis von MLMD bei SRS-Patienten etabliert. Dieser erlaubt zukünftig die parallele Analyse und Quantifizierung des Methylierungszustandes der acht am häufigsten bei MLMD betroffenen Loci in einem Ansatz. Außerdem wird die Detektion schwach ausgeprägter Epimutations-Mosaik, die mit den bisher verwendeten, weniger sensitiven Verfahren unentdeckt bleiben, ermöglicht.

Um Hinweise auf neue Kandidatenregionen für das SRS zu erhalten wurden in der vorliegenden Arbeit genomweite Analysen mit DNA-Mikroarrays durchgeführt. In ersten Screening-Studien waren bereits bei einigen Patienten mit SRS-typischem Phänotyp submikroskopische (< 3 Mb) Imbalancen identifiziert worden (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010). Zum systematischen Nachweis dieser Veränderungen im eigenen SRS-Kollektiv wurden hochauflösende Arraysysteme sowie die zugehörige Analysesoftware etabliert. Mit dem Affymetrix SNP6.0 Array wurden die 31 Patienten mit ICR1-Hypomethylierung sowie 42 idiopathische Patienten untersucht. Während in der Gruppe der Epimutationsträger keine offensichtlich klinisch relevanten Veränderungen gefunden werden konnten, wurden in einem erheblichen Anteil der idiopathischen SRS-Patienten (21,4 %) pathogene submikroskopische Imbalancen nachgewiesen. Bei weiteren 11,9 % der Patienten wurden Kopienzahlveränderungen mit derzeit unklarer klinischer Signifikanz identifiziert. Zusammenfassend ist daher nach Ausschluss der bekannten (Epi)mutationen auf den Chromosomen 7 und 11 eine routinemäßige Array-Analyse zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen bei SRS- und SRS-ähnlichen Patienten indiziert.

1.2 Summary

Silver Russell syndrome (SRS; OMIM #180860) is a clinically and genetically heterogeneous imprinting disorder characterized by severe pre- and postnatal growth retardation, a relative macrocephaly, a triangular face, asymmetry of the body and/or the limbs, and a clinodactyly of the fifth digits. A molecular genetic confirmation of the clinical diagnosis is currently feasible in approximately half of the patients: While in 7-10 % of patients a maternal uniparental disomy of chromosome 7 (upd(7)mat) is detectable, in ca. 40 % of patients a hypomethylation of the ICR1 in 11p15 can be observed.

The aim of this study was to contribute to the understanding of the pathophysiology of the SRS by implementation of high resolution molecular genetic techniques. For this purpose analyses of genomic mutations, methylation-specific tests as well as microarray analyses were performed in a study cohort of 42 patients with clinical diagnosis of SRS but unknown etiology (“idiopathic SRS”) and 31 SRS patients with ICR1-hypomethylation. Additionally, two single patients from SRS routine diagnostics carrying (epi)mutations on chromosome 7 were analysed.

Due to reports in the literature indicating a pathogenic relevance for the SRS (Mackay et al., 2008; Shiura et al., 2009; Lynch et al., 2011) the genes *ZFP57* and *HMGA2* as well as the *GRB10-CPGI2* were screened for genomic mutations. However, in the patients analysed in this study no pathogenic variants were detectable (Spengler et al., 2009; 2010). Thus a relevant causal relationship between mutations in these factors and SRS is unlikely.

The identification of (epi)mutations at imprinted loci in approximately 50 % of SRS patients leads to the assumption that at least some of the idiopathic patients also carry epimutations which are not detectable with the currently applied analysis methods. Therefore, on the one hand methylation analyses in a tissue not routinely tested so far were performed in this study. Furthermore, new methods for the detection of epimutations in the SRS patients were developed and established. For the identification of tissue-specific mosaicism buccal smear DNA of SRS patients with epimutation and idiopathic SRS patients was analysed in addition to the routinely tested lymphocyte DNA. The results in lymphocyte DNA of both patient subgroups could be confirmed in buccal smear DNA (Spengler et al., 2011). Therefore it can be assumed that the epimutation always affects both tissues. For the detection of upd(7)mat as well as isolated methylation defects a methylation-specific (MS)-PCR for the *MEST* locus in 7q32 was used in the past. In this study an additional MS-PCR for the identification of

segmental uniparental disomies as well as epimutations at the *GRB10* locus in 7p12 was established. An isolated hypermethylation was identified in one out of 31 patients; therefore it can be assumed that this type of epimutation is a rare finding in SRS. Due to the observation of multilocus methylation defects (MLMD) in patients with various imprinting disorders a MS-SNuPE (methylation-specific single nucleotide primer extension) assay was established for the detection of MLMD in SRS patients. In the future, this assay will allow the parallel analysis and quantification of methylation at the eight loci most commonly affected in MLMD in one approach. Furthermore the detection of low-level epimutation mosaicism, which escapes the currently used, less sensitive methods, is possible with this technique.

To obtain evidence for new SRS candidate regions genome-wide analyses with DNA microarrays were performed. In first screening studies submicroscopic (< 3 Mb) imbalances had been identified in several patients with typical SRS phenotype (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010). For the systematic detection of such imbalances in our own SRS cohort high resolution arrays as well as the necessary analysis software were implemented. Using the Affymetrix SNP6.0 array the 31 patients with ICR1-hypomethylation as well as the 42 idiopathic patients were analyzed. While in the group of the epimutation carriers no obviously clinically relevant aberration could be found, pathogenic submicroscopic imbalances were detected in a considerable proportion of idiopathic SRS patients (21.4 %). In further 11.9 % of patients copy number alterations with so far unknown clinical significance were identified. In summary, performing array analyses for the detection of submicroscopic imbalances is indicated in routine diagnostics after exclusion of the known (epi)mutations of chromosomes 7 and 11 in SRS- and SRS-like patients.

2. Einleitung

2.1 Phänotyp und Häufigkeit des SRS

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS; OMIM #180860) gehört zur Gruppe der Imprintingkrankungen und ist sowohl durch ein breites klinisches Spektrum als auch durch Heterogenie gekennzeichnet. Erstmals beschrieben wurde dieses Syndrom in den 50er Jahren durch die Kinderärzte Silver und Russell (Silver et al., 1953; Russell, 1954). Neben einer schweren prä- und postnatalen Wachstumsretardierung (< 3. Perzentile) zählen eine relative Makrozephalie, ein dreieckförmiges Gesicht mit prominenter Stirn und schmalem Kinn, Asymmetrien des Körpers und/oder der Extremitäten infolge einer Hemihypotrophie sowie eine Klinodaktylie der fünften Finger zu den typischen klinischen Merkmalen des SRS (zur Übersicht: Wollmann et al., 1995) (s. Abb. 2.1).



Abb. 2.1: 6-jähriger Junge mit SRS (Eggermann et al., 2005b)

Fütterungsschwierigkeiten bei Säuglingen führen oft dazu, dass eine Sondenernährung in den ersten Lebensmonaten erforderlich ist. Ohne Wachstumshormonbehandlung erreichen Männer im Durchschnitt eine Größe von ca. 151 cm und Frauen von ca. 140 cm (Wollmann et al., 1995).

Eine Übersicht über die weiteren bei SRS-Patienten beobachteten Merkmale ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

| | Diagnostische Charakteristika | Zusätzliche Merkmale | Einzelbefunde |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wachstum | <ul style="list-style-type: none"> - IUGR - Kleinwuchs | <ul style="list-style-type: none"> - Verzögertes Knochenalter | <ul style="list-style-type: none"> - Verzögerter Fontanellen-Verschluss |
| Kraniofaziale Auffälligkeiten | <ul style="list-style-type: none"> - Kleines, dreieckförmiges Gesicht - Prominente Stirn - Herabhängende Mundwinkel - Relative Makrozephalie | <ul style="list-style-type: none"> - Tief angesetzte Ohren/Ohranomalien - Zahnfehlstellungen - Hoher Gaumen/Gaumenspalte | <ul style="list-style-type: none"> - Antevertierte Nares - Blaue Skleren - Epikanthus - Congenitale Ptose der Oberlider - Verschmolzene Augenbrauen |
| Körper und Extremitäten | <ul style="list-style-type: none"> - Klinodaktylie der 5. Finger - Brachydaktylie der 5. Finger - Asymmetrie der Extremitäten - Hemihypertrophie des Stamms/der Extremitäten | <ul style="list-style-type: none"> - Partielle kutane Syndaktylie zwischen 2. und 3. Zehen - Muskuläre Hypotonie/Hypertrophie - Hypospadie - Cryptorchismus | <ul style="list-style-type: none"> - Café-au-lait-Flecken - Kurzer Hals - Vierfingerfurche |

Tab. 2.1: Leitsymptome des SRS aus Eggermann et al. (2006).

Aufgrund des breiten klinischen Spektrums sowie einer Abschwächung vor allem der fazialen Auffälligkeiten im Erwachsenenalter ist eine sichere Diagnosestellung alleine auf der Basis der klinischen Symptomatik schwierig. Die Häufigkeit des SRS wird auf 1:10.000 geschätzt (Monk et al., 2002). In Folge der o. g. Problematik ist eine genaue Einschätzung der tatsächlichen Häufigkeit des SRS jedoch kaum möglich.

2.2 Genomisches Imprinting und Imprintingkrankungen

Als elterliche Prägung oder genomisches Imprinting wird die gezielte Expression bestimmter Gene nur von einem elterlichen Allel bezeichnet (zur Übersicht: Horsthemke, 2010). Beim Menschen sind bisher etwa 60 solcher geprägten Gene bekannt. Diese sind häufig in Clustern angeordnet, in denen die Genexpression über so genannte Imprinting-Kontrollzentren (ICR = imprinting control region) reguliert wird. Die auch als differentiell methylierte Regionen (DMRs) bezeichneten Loci werden abhängig von ihrer elterlichen Herkunft bereits in der Keimbahn unterschiedlich methyliert. Durch diese unterschiedliche DNA-Methylierung sowie Histonmodifikationen werden Veränderungen in der Chromatinstruktur herbeigeführt, die in einer allel-spezifischen Expression resultieren. Nach der „Konflikt-Hypothese“ (Haig et al., 1991) haben paternal exprimierte Gene im Allgemeinen eine wachstumsfördernde Funktion, während maternal exprimierte Faktoren wachstumshemmend wirken (Wilkins et al., 2003). Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Regulation von Wachstum und Entwicklung, kann eine gestörte Expression eines oder mehrerer dieser Faktoren zu verschiedenen Imprintingkrankungen führen (zur Übersicht: Horsthemke, 2010).

Die Expression geprägter Gene kann bspw. durch Duplikationen, Deletionen, uniparentale Disomien (UPDs) oder isolierte Methylierungsstörungen an geprägten Loci gestört werden (s. Tab. 2.2). Kürzlich wurde berichtet, dass die verschiedenen geprägten Faktoren einander im Rahmen eines komplexen Netzwerks gegenseitig regulieren (Gabory et al., 2009). Es ist also denkbar, dass ein Imprintingdefekt an einem Locus eine Fehlregulation weiterer geprägter Faktoren zur Folge haben könnte. Als UPD wird die Vererbung beider Homologen eines Chromosomenpaares von einem Elternteil bezeichnet. UPDs können entweder als Hetero- oder Isodisomien oder als Mischung aus beiden vorliegen. Bei einer uniparentalen Isodisomie (UPID) liegen zwei Kopien desselben elterlichen Chromosoms vor, während bei einer uniparentalen Heterodisomie (UPHD) ein Homologen-Paar von einem Elternteil vererbt wird. Neben den vollständigen UPDs ganzer Chromosomen wurden auch segmentale UPDs beschrieben, die nur einen bestimmten chromosomalen Abschnitt betreffen. Infolge einer UPD können klinische Auffälligkeiten z. B. durch Mutationen in rezessiven Genen in isodisomen Abschnitten oder durch eine veränderte Expression geprägter Gene verursacht werden. Beim Menschen wurden maternale und/oder paternale UPDs der Chromosomen 6, 7, 11, 14, und 15 als Ursache für verschiedene Imprintingkrankungen identifiziert (zur Übersicht: Yamazawa et al., 2010) (s. Tab. 2.2).

| Erkrankung | Häufigkeit | Locus | (Epi)mutationen | Charakteristische Symptome |
|------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Transienter neonataler Diabetes mellitus | 1/800.000 | PLAGL1 (6q24) | - upd(6)pat - paternale Duplikationen - aberrante Methylierung | transienter Diabetes, pränatale Wachstumsretardierung, Makroglossie |
| Silver-Russell-Syndrom | 1/10.000 | MEST/GRB10 (7q32/7p12) IGF2/H19(11p15) | - upd(7)mat - upd/dup(11p15)mat - ICR1 Hypomethylierung | prä- und/oder postnatale Wachstumsretardierung, rel. Makrozephalie, Asymmetrie, dreieckiges Gesicht |
| Beckwith-Wiedemann-Syndrom | 1/15.000 | IGF2/H19 (11p15) KCNQ1/ CDKN1C (11p15) | - upd(11p15)pat - Methylierungsstörungen beider ICRs - Punktmutationen | prä- und postnataler Großwuchs, Organomegalie, Omphalozele, neonatale Hypoglykämie, Hemihypertrophie |
| UPD(14)mat-Syndrom/Temple Syndrom | selten | DLK1/GTL2 (14q32) | - upd(14)mat - paternale Deletionen - aberrante Methylierung | prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Hypotonie, Skoliose, frühzeitige Pubertät |
| UPD(14)pat-Syndrom | selten | 14 | - upd(14)pat - aberrante Methylierung | pränatale Wachstumsretardierung, Polyhydramnion, Abdomen- und Thoraxwanddefekte, glockenförmiger Thorax |
| Angelman-Syndrom | 1/20.000- 1/12.000 | 15q11-q13 UBE3A | - maternale Deletionen - upd(15)pat - aberrante Methylierung | mentale Retardierung, Mikrozephalie, keine Sprache, unmotiviertes Lachen, Ataxie, Krämpfe, Skoliose |
| Prader-Willi-Syndrom | 1/25.000- 1/10.000 | 15q11-q13 | - paternale Deletionen - upd(15)mat - aberrante Methylierung | mentale Retardierung, neonatale Hypotonie, Wachstumsretardierung, Hypogonadismus, Hypopigmentierung, Adipositas/Hyperphagie |

Tab. 2.2: Übersicht über die beim Menschen bekannten Imprintingerkrankungen.

2.3 (Epi)genetische Veränderungen und Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim SRS

Die Heterogenität der bei Patienten mit Verdacht auf SRS nachgewiesenen (epi)genetischen Veränderungen spiegelt die klinische Variabilität dieses Syndroms wider. In der Regel tritt das SRS sporadisch auf, wenige familiäre Fälle mit unklarem Vererbungsmodus sind bisher berichtet worden (zur Übersicht: Hitchins et al., 2001). Im Wesentlichen können zur Zeit zwei molekulare Subgruppen beim SRS unterschieden werden: Während bei 7-10 % der Patienten eine maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 7 (upd(7)mat) nachgewiesen werden kann, wird bei ca. 40 % der Patienten eine Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 beobachtet. Außerdem wurden bei mehreren Patienten mit SRS-Phänotyp strukturelle Aberrationen verschiedener chromosomaler Bereiche beschrieben. Bei den restlichen etwa 50 % der Fälle können derzeit keine (epi)genetischen Veränderungen nachgewiesen werden.

Vergleichende Studien geben Hinweise auf eine variable Ausprägung der SRS-Merkmale in den beiden oben genannten molekularen Subgruppen (zur Übersicht: Wakeling, 2011). Die meisten Patienten mit ICR1-Hypomethylierung zeigen einen typischen SRS-Phänotyp mit intrauteriner und postnataler Wachstumsrestriktion, den charakteristischen kraniofazialen Merkmalen sowie häufig Asymmetrien (Blick et al., 2006; Netchine et al., 2007; Binder et al., 2008; Kotzot, 2008; Bartholdi et al., 2009; Bruce et al., 2009; Wakeling et al., 2010). Patienten mit upd(7)mat weisen dagegen generell einen milderen bzw. weniger klassischen SRS-Phänotyp auf, bei dem die typische Fazies sowie Asymmetrien seltener beobachtet werden. Im Gegensatz zu Patienten mit ICR1-Hypomethylierung treten bei dieser Patientengruppe häufiger Lern- und Sprachschwierigkeiten auf. Da es jedoch Ausnahmen von diesen Beobachtungen gibt, ist eine Einordnung der Patienten in die beiden Gruppen alleine auf der Basis klinischer Beobachtungen oft nicht möglich (Kotzot, 2008; Bartholdi et al., 2009).

Nichtsdestotrotz wurden zur besseren Einordnung von SRS-Patienten anhand der klinischen Symptomatik und insbesondere zur Abgrenzung von Patienten mit isolierten Wachstumsstörungen verschiedene Scoring-Systeme vorgeschlagen (Price et al., 1999; Netchine et al., 2007; Bartholdi et al., 2009).

2.3.1 Chromosom 7

Auf der Basis der bisher bei SRS-Patienten nachgewiesenen genetischen Veränderungen werden derzeit zwei Bereiche mit geprägten Genen als Kandidatenregionen auf Chromosom 7 diskutiert (zur Übersicht: Abu-Amero et al., 2008). Erste Hinweise für eine Beteiligung Chromosom 7-kodierter Faktoren an der Ätiologie des SRS lieferte die Entdeckung von SRS-Patienten mit einer upd(7)mat (zur Übersicht: Kotzot et al., 1995). An mehreren Kollektiven mit SRS-Patienten durchgeführte Screening-Studien ergaben eine Häufigkeit von 5-10% für die upd(7)mat und bestätigten damit eine Beteiligung auf Chromosom 7 lokalisierter Faktoren an der Ätiologie des SRS (Kotzot et al., 1995; Eggermann et al., 1997; Preece et al., 1997). Der genaue pathogenetische Mechanismus, der bei Vorliegen einer upd(7)mat zur Ausprägung eines SRS führt, ist derzeit unklar. Vermutet wurden u. a. Mutationen in einem bisher nicht identifizierten rezessiven Faktor, die durch eine UPID im homozygoten Zustand vorliegen. Allerdings wurden neben Isodisomien auch Heterodisomien bei den Patienten gefunden und bisher konnte kein gemeinsamer isodisomer Bereich identifiziert werden (Preece et al., 1997). Ebenfalls diskutiert wurde das Vorliegen eines Trisomie-7 Mosaiks, jedoch ergaben sich außer in plazentalem Gewebe keine Hinweise dafür (zur Übersicht: Kotzot et al., 2000). Die mittlerweile allgemein anerkannte Erklärung für den Phänotyp der SRS-Patienten mit upd(7)mat ist daher eine gestörte Expression geprägter Gene. Derzeit werden für das SRS zwei Kandidatenregionen mit geprägten Genen auf Chromosom 7 diskutiert (s. Abb. 2.2), der *GRB10*-Locus in 7p12 und der *MEST*-Locus in 7q32. Neben diesen beiden wurde ein weiterer geprägter Locus in 7q21 identifiziert (Grabowski et al., 2003). Mutationen im dort lokalisierten *SGCE*-Gen sind mit dem Myoklonus-Dystonie-Syndrom assoziiert (Asmus et al., 2002).

Kandidatenregion in 7p12

Erste Hinweise auf eine Beteiligung der Region 7p11.2-p13 lieferte die Identifizierung von Duplikationen sowie Inversionen und Translokationen, die diese Region betrafen, bei einigen Patienten mit SRS bzw. SRS-ähnlichem Phänotyp (zur Übersicht: Monk et al., 2002). Während bei den meisten dieser Patienten maternales Material dupliziert war, war die Duplikation bei einer Patientin paternalen Ursprungs (Joyce et al., 1999). Aufgrund dieser Befunde wird vermutet, dass entweder die Überexpression eines geprägten, maternal

exprimierten Wachstumsregulators oder die durch die partielle Trisomie erhöhte Dosis eines nicht geprägten Faktors zur Ausprägung der SRS-Merkmale bei den Patienten führen.

Innerhalb der Region 7p11.2-p13 sind einige Gene, die bei der Regulation von Wachstumsprozessen eine Rolle spielen, lokalisiert (s. Abb. 2.2). Dazu gehören das geprägte Gen *GRB10* (*growth factor receptor bound protein 10*) sowie die Gene *IGFBP1* und *IGFBP3* (*insulin-like growth factor binding proteins 1* und *3*). Der interessanteste Kandidat für die Ätiologie des SRS ist das zytoplasmatische Adaptorprotein GRB10. Eine der bisher für GRB10 *in-vivo* nachgewiesenen Funktionen ist die negative Regulation der IGF-Wachstumskaskade über eine Interaktion mit Tyrosinkinase Rezeptoren wie IR (*insulin receptor*), IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) sowie EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Shiura et al., 2005; Wang et al., 2007). Außerdem gibt es Hinweise für eine Beteiligung dieses Faktors an einem weiteren, IGF2-unabhängigen fetalen Signalweg zur Wachstumsregulation (Charalambous et al., 2003). Bei Säugern wurde für das Gen *GRB10* ein sehr komplexes Expressionsmuster mit verschiedenen gewebespezifischen Isoformen nachgewiesen, die entweder vom paternalen oder vom maternalen Allel exprimiert werden. Bei Mäusen wird *Grb10* in nahezu allen Geweben maternal exprimiert, lediglich im Gehirn erfolgt eine Expression vom paternalen Allel. Erste Hinweise auf eine wachstumshemmende Funktion von *Grb10* wurden bei Mäusen gefunden: Während sowohl eine Überexpression von *Grb10* als auch eine Deletion des paternalen Allels zu intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierung führen (Shiura et al., 2005; 2009), resultiert eine Deletion des maternalen Allels in fetalem und plazentalem Großwuchs (Charalambous et al., 2003; Wang et al., 2007). Das Expressionsmuster von *GRB10* beim Menschen unterscheidet sich wesentlich von dem bei der Maus. Während die Expression im fetalen Gehirn ebenfalls vom paternalen Allel erfolgt, wird eine Isoform in Skelettmuskeln von der maternalen Kopie abgelesen. In allen übrigen untersuchten embryonalen Geweben wurde eine biallelische Expression nachgewiesen (Blagitko et al., 2000). Eine Beteiligung von *GRB10* an der Ätiologie des SRS erschien daher unwahrscheinlich (McCann et al., 2001). Kürzlich wurde jedoch in einer Studie von Monk et al. (2009) die Expression des maternalen Allels in menschlichen Plazenta-Trophoblasten nachgewiesen. Sowohl aufgrund seines komplexen Imprinting-Status als auch durch seine Beteiligung an wachstumsregulierenden Signalwegen bleibt *GRB10* ein interessanter Kandidat für die Ätiologie des SRS, obwohl bisher weder Punktmutationen noch isolierte Methylierungsstörungen bei SRS-Patienten gefunden wurden (Mergenthaler et al., 2001; Arnaud et al., 2003; Monk et al., 2003).

Kandidatenregion in 7q32

Neben vollständigen maternalen UPDs des Chromosoms 7 wurde bei einigen Patienten eine segmentale UPD des langen Arms (upd(7q)mat) beschrieben (Hannula et al., 2001; Reboul et al., 2006; Eggermann et al., 2008b) (s. Abb. 2.2). Anhand der bisher berichteten Fälle mit upd(7q)mat lässt sich die für das SRS relevante Region auf dem langen Arm von Chromosom 7 auf den Bereich von 7q31-qter eingrenzen. Innerhalb dieses Bereichs sind die geprägten Gene *MEST* (*mesoderm-specific transcript*), *CPA4* (*carboxypeptidase A4*) und *COPG2* (*coatomer protein complex subunit gamma 2*) sowie zwei geprägte nicht-kodierende RNAs (*MESTIT1*, *CIT1/COPG2IT1*) lokalisiert. Das paternal exprimierte Gen *MEST* war das erste geprägte Gen, das auf Chromosom 7 identifiziert wurde (Kobayashi et al., 1997). Aufgrund seines Imprinting-Status und einer starken Expression im Mesoderm von Mausembryos wurde es als Kandidatengen für das SRS vorgeschlagen. Bisher konnten aber keine pathogenen Veränderungen innerhalb der oben genannten Gene nachgewiesen werden (zur Übersicht: Abu-Amero et al., 2008). Auch isolierte Imprinting-Mutationen am *MEST*-Locus konnten nicht detektiert werden (Schönherr et al., 2007a).

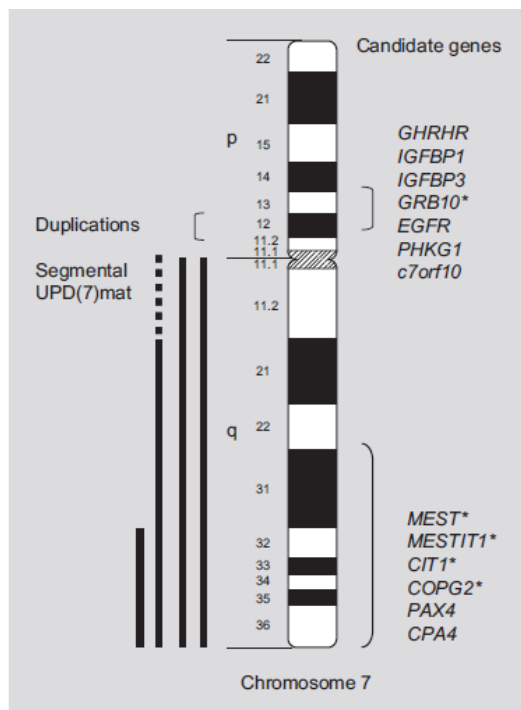


Abb. 2.2: Übersicht über die SRS-Kandidatenregionen auf Chromosom 7 sowie die bisher beschriebenen Fälle mit segmentaler upd(7q)mat (Eggermann, 2009).

2.3.2 Chromosom 11

Erste Hinweise für eine Beteiligung der Region 11p15 an der Ätiologie des SRS lieferte der Nachweis von maternalen Duplikationen dieser Region bei wachstumsretardierten Patienten. Vier von sechs Patienten zeigten zusätzlich zu einer intrauterinen und postnatalen Wachstumsverzögerung weitere SRS-Merkmale (zur Übersicht: Eggermann et al., 2005a). Interessanterweise kann bei einigen Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), einem Großwuchssyndrom, eine gegensätzliche Beobachtung gemacht werden: Bei diesen liegt eine Duplikation paternalen 11p15-Materials vor. Zu den (epi)genetischen Veränderungen, die bei BWS-Patienten nachweisbar sind (zur Übersicht: Enklaar et al., 2006) gehören in mehr als 50 % der Fälle Methylierungsstörungen in 11p15. Die aufgrund dessen auch bei SRS-Patienten durchgeführte Suche nach Epimutationen in der Region 11p15 führte zum Nachweis von Hypomethylierungen der ICR1 bei 38-63 % der Fälle (Gicquel et al., 2005; Blik et al., 2006; Netchine et al., 2007; Eggermann et al., 2008a). In Tabelle 2.3 ist eine Übersicht über die bei Patienten mit SRS und BWS nachweisbaren (Epi)mutationen in der Region 11p15 zusammengefasst.

| 11p15 (Epi)mutation | Häufigkeit beim BWS | Häufigkeit beim SRS |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| upd(11p15) | paternal: 10-20 % | maternal: 1 Fall |
| dup(11p15) | paternal: 1-2 % | maternal: 1-2 % |
| Epimutation in der ICR1 | Hypermethylierung: 2-7 % | Hypomethylierung: ~ 40 % |
| (Epi)mutation in der ICR2 | Hypomethylierung: ~ 50 % CDKN1C-Mutationen: 5-10 % der sporadischen Fälle | Duplikation: ein Einzelfall und eine Familie mit fünf Betroffenen |

Tab. 2.3: Übersicht über die (epi)genetischen Veränderungen in der Region 11p15 bei SRS- und BWS-Patienten (dup = Duplikation).

Innerhalb der Region 11p15 sind zwei Cluster mit geprägten Gene lokalisiert, deren Expression über zwei verschiedene Imprinting-Zentren, die ICR1 und die ICR2, reguliert wird (s. Abb. 2.3). Diese beiden Imprinting-Zentren spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle fetaler Wachstumsprozesse.

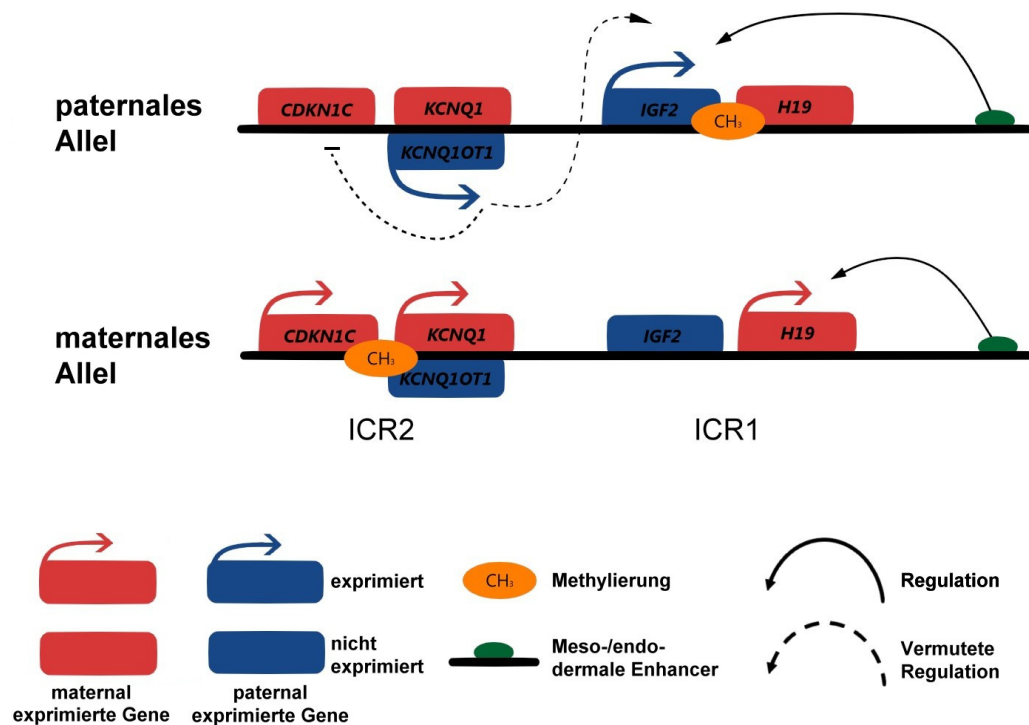


Abb. 2.3: Schematische Übersicht über die Regulation der Genexpression in der Region 11p15.

Telomerische Imprintingregion ICR1

Die ICR1, die oft auch als *H19* DMR bezeichnet wird, kontrolliert über eine differentielle Chromatinarchitektur die reziproke Expression der Gene *H19* und *IGF2* (*insulin like growth factor 2*). Beide Gene werden während der Embryonalentwicklung endo- und mesodermal exprimiert und konkurrieren um dieselben Enhancer. Innerhalb der ICR1 befinden sich sieben Bindestellen für das Zinkfinger-Protein CTCF, die nur auf dem unmethylierten, maternalen Allel für den regulatorischen Faktor zugänglich sind. Durch die CTCF-Bindung wird die Chromatinstruktur so verändert, dass auf dem maternalen Allel eine Interaktion des Enhancers mit dem *IGF2*-Promotor und damit die Expression von *IGF2* verhindert und gleichzeitig die Expression von *H19* gefördert wird.

Der paternal exprimierte Faktor IGF2 ist in fetalen Wachstums- und Entwicklungsprozessen involviert (Dechiara et al., 1990; Constância et al., 2002) und hat eine wachstumsfördernde Wirkung.

Die genaue Funktion des maternal exprimierten Gens *H19* ist hingegen bisher noch unklar. *H19* resultiert in einer 2,3 kb langen, nicht-kodierenden RNA sowie einer microRNA (Juan et al., 2000; Cai et al., 2007). In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden Hinweise auf eine Funktion der *H19* microRNA in der posttranskriptionalen Regulation spezifischer mRNAs während der Vertebratenentwicklung gefunden (Cai et al., 2007). Außerdem wird eine Funktion von *H19* als *trans*-regulierender Faktor in einem Netzwerk aus geprägten Genen vermutet, die das fetale Wachstum kontrollieren (Gabory et al., 2009).

Bei etwa 40 % der SRS-Patienten kann eine Hypomethylierung der ICR1 beobachtet werden. Während bei den meisten dieser Patienten die DMRs von *H19* und *IGF2* gleichermaßen von der Epimutation betroffen sind, wurden bei einzelnen SRS-Patienten sowohl isolierte Hypomethylierungen der *H19* DMR als auch der *IGF2* DMR (*IGF2P0*) berichtet (Bartholdi et al., 2009). Bei einigen Patienten wurden im Zusammenhang mit der isolierten Hypomethylierung der *IGF2* DMR paternale Mikrodeletionen der ICR1 mit Bruchpunkten in der *H19/IGF2*-Enhancer-Region beobachtet (Gronskov et al., 2011). Bei 2-7 % der BWS-Patienten liegt die gegensätzliche Epimutation, eine Hypermethylierung der ICR1, vor. Außerdem wurden bei einigen BWS-Patienten Mikrodeletionen, die die ICR1 betrafen, beschrieben (zur Übersicht: Demars et al., 2011a, 2011b).

Diese epigenetischen Veränderungen sollten bei den SRS-Patienten zu einer verringerten und bei den BWS-Patienten zu einer gesteigerten Expression des wachstumsfördernden Faktors *IGF2* führen. Tatsächlich wurde in Fibroblasten-Kulturen von SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung eine verringerte *IGF2*-Expression (Gicquel et al., 2005) und in Gewebeproben von BWS-Patienten mit der gegensätzlichen Epimutation eine Überexpression von *IGF2* beobachtet (Weksberg et al., 2003). Im Serum wurde jedoch weder bei BWS- noch bei SRS-Patienten ein veränderter *IGF2*-Spiegel nachgewiesen (Schneid et al., 1997; Netchine et al., 2007). Man geht daher davon aus, dass die ICR1-Hypomethylierung keinen Einfluss auf die *IGF2*-Sekretion bei SRS-Patienten hat. Möglicherweise führt sie aber zu einer verminderten autoparakrinen Aktivität beim Fetus.

Da die ICR1-Hypomethylierung bei den SRS-Patienten als Mosaik vorliegt, wird von einer postzygotischen Entstehung der Epimutation ausgegangen. Klinisch wird das Vorliegen eines Mosaiks durch die Hemihypotrophie reflektiert, die bei den meisten Patienten mit ICR1-Hypomethylierung auftritt. Die Ergebnisse von Zwillingsstudien bestätigen das Vorliegen von (gewebespezifischen) Mosaiken bei den SRS-Patienten: Gicquel et al. berichteten 2005 über diskordante, eineiige Zwillinge, die beide eine ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten

aufwiesen, während die Epimutation in Hautfibroblasten nur beim betroffenen Zwilling nachweisbar war. Ähnliche Beobachtungen wurden bei diskordanten BWS-Zwillingen mit Hypomethylierungen der ICR2 beschrieben (Weksberg et al., 2002; Blik et al., 2009a).

Zentromerische Imprintingregion ICR2

Die zentromerische ICR2 (*KCNQ1OT1* DMR) reguliert die Expression der Gene *CDKN1C* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1 C*), *KCNQ1* (*potassium channel KQT-family member 1*) sowie *KCNQ1OT1* (*KCNQ1-overlapping transcript 1*). Die Expression von *KCNQ1* und *CDKN1C* erfolgt vom maternal methylierten Allel, während auf dem paternalen, unmethylierten Allel die nicht-kodierende RNA *KCNQ1OT* (*LIT1*) exprimiert wird, die wahrscheinlich die Expression von *CDKN1C* inhibiert. Punktmutationen in *CDKN1C* werden bei 40 % der familiären und 5-10 % der sporadischen BWS-Fälle nachgewiesen. Während bei weiteren 50 % der BWS-Patienten außerdem eine Hypomethylierung der ICR2 beobachtet werden kann, sind bei SRS-Patienten bisher kaum isolierte epigenetische Veränderungen dieser Region berichtet. Den ersten Hinweis für eine Beteiligung der ICR2 an der Ätiologie des SRS lieferte die Identifizierung einer maternalen Duplikation in 11p15 bei einem SRS-Patienten, die nur auf die ICR2 beschränkt war (Schönherr et al., 2007b). Bei der klinisch unauffälligen Mutter wurde die Duplikation ebenfalls nachgewiesen, war hier jedoch paternalen Ursprungs. Kürzlich wurde eine weitere Familie mit einer auf die ICR2 beschränkten Duplikation beschrieben (Bonaldi et al., 2011). Die Duplikation wurde über drei Generationen weitervererbt und war immer mit einem SRS-Phänotyp assoziiert, wenn sie von der Mutter weitergegeben wurde. Bei allen oben genannten. Fällen waren unter anderem die maternal exprimierten Gene *KCNQ1* und *CDKN1C* sowie das paternal exprimierte Gen *KCNQ1OT1* von der Duplikation betroffen. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Dosis des negativen Zellzyklusregulators *CDKN1C* den SRS-Phänotyp bei den Patienten verursacht. Neben den Patienten mit maternaler Duplikation der ICR2 wurden außerdem einige SRS-Patienten mit einer Hypomethylierung, die sowohl die ICR1 als auch die ICR2 in 11p15 betraf, beschrieben (Azzi et al., 2009; Begemann et al., 2010) (s. 2.3.3).

2.3.3 Multilocus-Methylierungsdefekte (MLMD)

Es ist seit langem bekannt, dass mit bestimmten Imprintingkrankungen (Epi)mutationen an bestimmten, für die Erkrankung spezifischen Loci assoziiert sind. In den letzten Jahren wurden jedoch Patienten mit Methylierungsstörungen, die mehrere geprägte Loci betrafen, beschrieben (multilocus methylation defect, MLMD). Erstmals wurde MLMD bei Patienten mit transientem neonatalem Diabetes mellitus (TNDM) berichtet (Mackay et al., 2006; 2008). Diese wiesen zusätzlich zu einer Hypomethylierung des krankheits-spezifischen *PLAGL1*-Locus in 6q24 weitere Hypomethylierungen an anderen maternal geprägten Loci auf. Diese Beobachtung wurde als maternales Hypomethylierungs-Syndrom (MHS) bezeichnet. Bei einigen MHS-Patienten wurden homozygote oder compound-heterozygote Mutationen im *ZFP57*-Gen nachgewiesen (Mackay et al., 2008). *ZFP57* ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, für den eine funktionelle Interaktion mit STAT3 und POU5F1 berichtet wurde. Die genaue Funktion von *ZFP57* ist derzeit noch unklar, der unterschiedliche Mosaikanteil der Hypomethylierung bei Patienten mit *ZFP57*-Mutationen gibt jedoch einen Hinweis auf eine Funktion des Faktors in der Aufrechterhaltung von maternalen und paternalen Methylierungssignalen nach der Befruchtung (Li et al., 2008). Während bei TNDM-Patienten mit *ZFP57*-Mutationen nur maternal methylierte Loci betroffen waren, wurden bei *Zfp57*-defizienten Mäusen Hypomethylierungen sowohl maternal als auch paternal geprägter DMRs beobachtet (Li et al., 2008).

Mittlerweile wurde MLMD auch bei einigen Patienten mit BWS und SRS sowie einem Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (PWS) beschrieben (Arima et al., 2005; Rossignol et al., 2006; Azzi et al., 2009; Blik et al., 2009a, 2009b; Turner et al., 2010; Baple et al., 2011; Begemann et al., 2011). Im Gegensatz zum MHS bei den TNDM-Patienten waren bei diesen Patienten sowohl maternal als auch paternal geprägte Loci betroffen. Zu den maternal geprägten Loci gehören *KCNQ1OT1* (ICR2, 11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *PLAGL1* (6q24) sowie *IGF2R* (6q25). Paternal methyliert sind die Loci *H19* und *IGF2P0* (ICR1, 11p15) sowie *MEG3* (14q32). MLMD wurde bisher nur bei Patienten mit einer Hypomethylierung am krankheits-spezifischen Locus nachgewiesen, während bei BWS-Patienten mit Hypermethylierung der ICR1 keine weiteren Methylierungsstörungen an geprägten Loci beobachtet werden konnten (Azzi et al., 2009). Eine Übersicht über die bei MLMD-Patienten mit verschiedenen Imprintingkrankungen betroffenen Loci ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Interessanterweise zeigten MLMD-Patienten, bei denen in Lymphozyten eine gleichartige Hypomethylierung beider ICRs in 11p15 nachgewiesen wurde, entweder einen SRS- oder einen BWS-Phänotyp (Azzi et al., 2009). Als Ursache für diese Beobachtung wird ein dominanter Effekt der am stärksten ausgeprägten Hypomethylierung vermutet, wodurch die Ausprägung der mit den zusätzlichen Epimutationen assoziierten Merkmale unterdrückt wird. Da die bisherigen Analysen an DNA aus Lymphozyten durchgeführt wurden, ist außerdem eine bisher unentdeckte Mosaikverteilung der Epimutationen in anderen Geweben denkbar, die zu einer variablen Ausprägung des Phänotyps führen könnte.

Bei 9,5 % der SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung sind Methylierungsstörungen an weiteren geprägten Loci nachweisbar (Azzi et al., 2009). Die derzeit in der Routinediagnostik bei Patienten mit klinischem Verdacht auf SRS verwendeten Nachweisverfahren beschränken sich jedoch auf die beiden DMRs auf Chromosom 7 (*MEST*, *GRB10*) sowie die *H19* DMR und die *KCNQ1OT1* DMR auf Chromosom 11, so dass Patienten mit MLMD möglicherweise der Detektion entgehen.

| Syndrom | Gesamtzahl | Haupt-epimutation | Häufigkeit von MLMD/MHS | weitere betroffene Loci | Literatur |
|---------|------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| TNDM | 12 | PLAGL1 LOM | 50.0% (6/12) | GRB10, MEST, ICR2 | Mackay et al., 2006 |
| BWS | 40 | ICR2 LOM | 25% (10/40) | IGF2R, MEST, SNRPN | Rossignol et al., 2006 |
| BWS | 81 | ICR2 LOM | 21.0% (17/81) | PLAGL1, IGF2R, GRB10, MEST, GNAS/NESPAS | Blik et al., 2009 |
| | 20 | ICR1 GOM | 0 | keine | |
| BWS | 68 | ICR2 LOM | 23.5% (16/68) | PLAGL1, IGF2R, MEST, ICR1, SNRPN | Azzi et al., 2009 |
| SRS | 23 | ICR1 LOM | 8.7% (2/23) (+2) | IGF2R, GRB10, ICR2, GNAS/NESPAS | Turner et al., 2010 |
| SRS | 74 | ICR1 LOM | 9.5% (7/74) | PLAGL1, IGF2R, MEST, ICR2, DLK1, SNRPN | Azzi et al., 2009 |
| SRS | 65 | ICR1 LOM | 7.7% (5/65) | IGF2R, MEST, ICR2, DLK1 | Begemann et al., 2010 |
| PWS/BWS | 1 | SNRPN LOM | - | ICR1, ICR2, GNAS/NESPAS | Baple et al., 2011 |

Tab. 2.4: Übersicht über die bei MLMD-Patienten mit verschiedenen Imprintingkrankungen betroffenen Loci (LOM: loss of methylation, GOM: gain of methylation).

2.3.4 Chromosomale Aberrationen beim SRS

Zusätzlich zu den oben beschriebenen häufigen (epi)genetischen Veränderungen auf den Chromosomen 7 und 11 wurden bei einzelnen Patienten mit SRS oder SRS-ähnlichem Phänotyp auch mikroskopisch sichtbare, strukturelle Umbauten verschiedener anderer Chromosomen beschrieben (s. Abb. 2.4). Die diagnostischen Kriterien für das SRS wurden in der Regel jedoch nur von Patienten mit Umbauten erfüllt, die die Chromosomen 7, 11 und 17 betrafen. Die übrigen Patienten zeigten keinen einheitlichen Phänotyp, sondern wiesen häufig zusätzliche, für das SRS atypische Merkmale auf (zur Übersicht: Abu-Amero et al., 2008). Auch wurden die meisten Aberrationen nur in einzelnen Patienten beschrieben, so dass ein funktioneller Zusammenhang dieser Veränderungen mit der Ätiologie des SRS unwahrscheinlich ist. Es ist daher anzunehmen, dass ein Großteil dieser Umbauten eher Zufallsbefunde auf der Grundlage eines SRS-ähnlichen Phänotyps bei den Patienten sind. Lediglich die oben genannten Duplikationen in 7p11.2-p13 und 11p15 sowie Deletionen der chromosomalen Region 15q26 stellen häufigere, rekurrente Befunde dar.

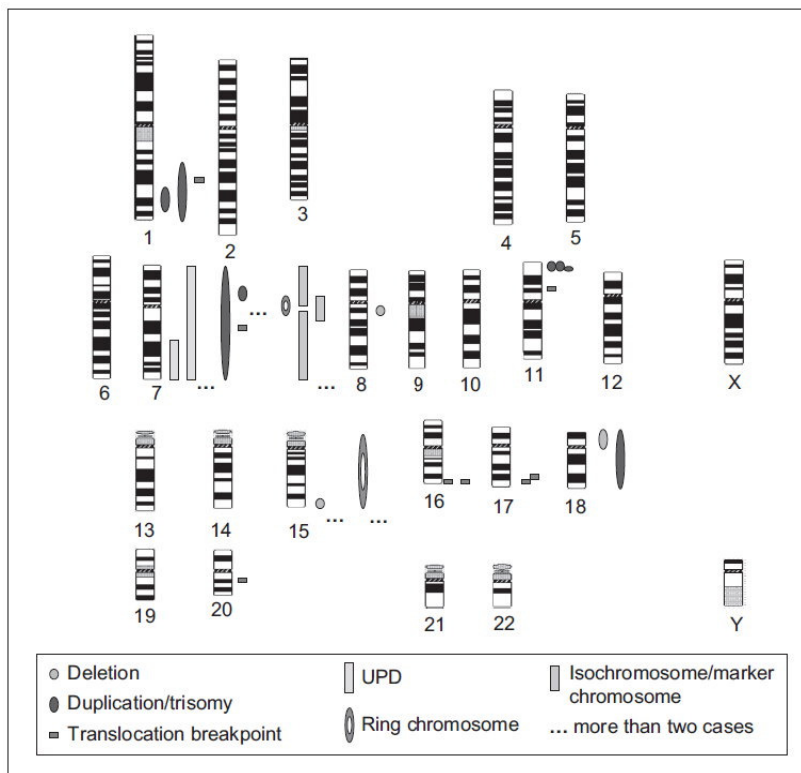


Abb. 2.4: Schematische Übersicht über die bei Patienten mit SRS oder SRS-ähnlichem Phänotyp nachgewiesenen, mikroskopisch darstellbaren chromosomalen Aberrationen (Eggermann, 2009).

Mit dem Einsatz der molekularen Karyotypisierung mittels Mikroarray-Analysen wurden kürzlich in ersten Screening-Studien auch Patienten mit SRS-typischem Phänotyp identifiziert, die submikroskopische (< 3 Mb) Imbalancen trugen (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010). Von den dabei entdeckten Imbalancen können eine 15q26- sowie eine 12q14-Mikrodeletion als relevant für den SRS-Phänotyp der Patienten eingestuft werden, da sie mehrfach bei Patienten mit SRS-Merkmalen nachgewiesen wurden.

Chromosomale Region 15q26

Das 1966 von Jacobsen erstmals beschriebene Ringchromosom-15-Syndrom weist einige klinische Parallelen mit dem SRS auf (Butler et al., 1988): Bei Patienten mit r(15) findet man ebenfalls eine prä- und postnatale Wachstumsverzögerung, eine dreieckige Gesichtsform sowie Klinodaktylien der fünften Finger. Weitere für das SRS atypische klinische Auffälligkeiten, die bei Patienten mit r(15) beobachtet werden können, sind eine Mikrozephalie, Herzfehler sowie eine variabel ausgeprägte mentale Retardierung.

Der Nachweis von heterozygoten Mikrodeletionen bei einigen Patienten mit r(15), die unter anderem das in 15q26.3 lokalisierte *IGF1R*-Gen betrafen, führte zu der Annahme, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Haploinsuffizienz dieses Gens und der bei den Patienten beobachteten Wachstumsstörung besteht (zur Übersicht: Tümer et al., 2004). Der IGF1-Rezeptor ist eine wichtige Komponente der IGF-Wachstumskaskade, der die biologischen Effekte der Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 während des prä- und postnatalen Wachstums vermittelt. Neben größeren terminalen Deletionen der Region 15q26-qter wurden in letzter Zeit auch kleinere, interstitielle Deletionen sowie intragenische Deletionen und Punktmutationen des *IGF1R*-Gens bei Patienten mit Wachstumsretardierung beschrieben (Veenma et al., 2010; Choi et al., 2011). In einer Screening-Studie mit 100 Kindern mit Wachstumsretardierung ungeklärter Ätiologie wurden bei zwei Patienten heterozygote Mikrodeletionen, die das *IGF1R*-Gen ganz oder teilweise betrafen, nachgewiesen (Ester et al., 2009). Damit ist eine nicht zu vernachlässigende Häufigkeit solcher Mikrodeletionen bei wachstumsretardierten Patienten anzunehmen. Eine partielle Trisomie 15q26.1-qter mit Duplikation des *IGF1R*-Gens infolge einer balancierten, familiären Translokation t(13;15)(q34;q26.1) wurde hingegen bei einem Patienten mit postnatalem Großwuchs gefunden, so dass anzunehmen ist, dass die IGF1R-Dosis einen direkten Effekt auf das Wachstum hat (Nagai et al., 2002).

Chromosomale Region 12q14

Insgesamt wurden bisher 13 Patienten mit dem 12q14-Mikrodeletionssyndrom beschrieben (Menten et al., 2007; Byusse et al., 2009; Mari et al., 2009; Spengler et al., 2010; Lynch et al., 2011). Zu den charakteristischen Merkmalen dieses Syndroms zählen Wachstumsretardierung, Trinkschwäche bei Säuglingen, Osteopoikilose sowie mentale Retardierung. Bei vier der bisher berichteten Patienten wurde initial die Verdachtsdiagnose SRS gestellt. Die Deletionsgröße war bei den 13 Patienten sehr variabel. Während bei allen Patienten, bei denen das Gen *HMGA2* (*high mobility group at-hook 2*) von der Deletion betroffen war, eine Wachstumsretardierung beobachtet wurde, zeigten Patienten, bei denen die Deletion *HMGA2* nicht einschloss, ein normales Wachstum. Aufgrund dieser Beobachtung ist ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Haploinsuffizienz dieses Gens und dem SRS-ähnlichen Phänotyp der Patienten denkbar. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Identifizierung einer intragenischen Deletion in *HMGA2* bei einem Patienten mit idiopathischer Wachstumsretardierung untermauert (Byusse et al., 2009). Für den Transkriptionsregulator *HMGA2* wird eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung vermutet, da eine starke und ubiquitäre Expression in fetalen Geweben nachgewiesen werden konnte (Rogalla et al., 1996). Mutationen, die zum Funktionsverlust des Proteins führen, verursachen bei Mäusen einen Kleinwuchsphänotyp (Zhou et al., 1995).

2.4 Zielsetzung

Derzeit kann bei ca. 40 % der SRS-Patienten eine (Epi)mutation in der Region 11p15 und bei weiteren 7-10 % eine upd(7)mat identifiziert werden, während bei den übrigen 50 % keine dieser (epi)genetischen Veränderungen nachweisbar ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Implementierung neuer, hochauflösender Analyseverfahren die Pathophysiologie des SRS weiter aufzuklären. Dazu war die Durchführung genomischer Mutationsanalysen, methylierungs-spezifischer Analysen sowie Mikroarray-Analysen an einem Kollektiv aus 42 Patienten mit klinischer Diagnose SRS aber ungeklärter Ätiologie („idiopathische SRS“) sowie 31 SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 vorgesehen.

Aufgrund von Literaturberichten, die auf eine pathogenetische Relevanz für das SRS hindeuteten, sollten die Gene *ZFP57* und *HMGA2* sowie die *GRB10*-CPGI2 auf das Vorliegen genomischer Mutationen untersucht werden. Bei TNDM-Patienten wurden Mutationen in *ZFP57* als Ursache für Hypomethylierungen an multiplen geprägten Loci identifiziert (Mackay et al., 2008). Zum Nachweis genomischer Mutationen sollte *ZFP57* bei SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung analysiert werden. Mikrodeletionen, die das Gen *HMGA2* betrafen, wurden bei Patienten mit Wachstumsretardierung und SRS-ähnlichem Phänotyp beschrieben (zur Übersicht: Lynch et al., 2011). Daher sollte dieses Gen bei den idiopathischen SRS-Patienten zum Nachweis genomischer Mutationen analysiert werden. Da kürzlich gezeigt wurde, dass paternale Deletionen in der *Grb10* DMR (*GRB10*-CPGI2) bei Mäusen zu einer prä- und postnatalen Wachstumsretardierung führen (Shiura et al., 2009), war außerdem eine Analyse der *GRB10*-CPGI2 zum Nachweis von Deletionen oder Punktmutationen bei einigen SRS-Patienten geplant.

Des Weiteren war in der vorliegenden Arbeit die Etablierung und Anwendung verschiedener methylierungs-spezifischer Analysemethoden zum Nachweis bisher nicht identifizierter Epimutationen bei den SRS-Patienten vorgesehen. Da bei etwa 50 % der SRS-Patienten (Epi)mutationen an geprägten Loci nachweisbar sind, ist die Vermutung nahe liegend, dass bei einem Teil der idiopathischen Patienten ebenfalls Epimutationen vorliegen, die mit den bisher verwendeten Detektionsverfahren nicht erfasst werden konnten.

Zum Nachweis der ICR1-Hypomethylierung, die bei ca. 40 % der SRS-Patienten beobachtet werden kann und aufgrund ihrer postzygotischen Entstehung wahrscheinlich als Mosaik vorliegt, wird derzeit in der Routinediagnostik eine Methylierungsanalyse an DNA aus Lymphozyten durchgeführt. Zur Identifikation gewebe-spezifischer Mosaik, die momentan möglicherweise der Detektion entgehen, sollte nun DNA aus Mundschleimhaut von idiopathischen SRS-Patienten untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Epimutation bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten in der Mundschleimhaut ebenfalls beobachtet werden kann.

Die upd(7)mat-Diagnostik wurde bisher mit einer methylierungs-spezifischen(MS)-PCR für den *MEST*-Locus in 7q32 und gegebenenfalls anschließender Mikrosatelliten-Analyse zur Bestätigung auffälliger Befunde durchgeführt. Zur Unterscheidung segmentaler von vollständigen UPDs sowie zum Nachweis isolierter Methylierungsveränderungen am *GRB10*-Locus in 7p12 wurde in der vorliegenden Arbeit eine MS-PCR für diesen Locus etabliert.

Außerdem war ein Screening an idiopathischen Patienten zur Detektion isolierter Methylierungsdefekte in *GRB10* geplant.

Bei Patienten mit verschiedenen Imprintingkrankungen wurden in letzter Zeit zunehmend auch Methylierungsstörungen an weiteren Loci zusätzlich zum krankheitsspezifischen Locus berichtet. Da die bisher zum Nachweis von Methylierungsdefekten verwendeten Verfahren entweder auf einzelne Loci beschränkt waren oder keine genaue Quantifizierung der Methylierung erlaubten, war in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung einer effizienteren Methode zum Nachweis von MLMD bei den SRS-Patienten geplant. Diese sollte auf der MS-SNuPE (methylation specific single nucleotide primer extension)-Technologie basieren, die eine parallele Analyse und genaue Quantifizierung des Methylierungszustandes an mehreren CpGs in einem Ansatz ermöglicht. Des Weiteren sollte diese Methode die Detektion schwach ausgeprägter Epimutations-Mosaik ermöglichen, die mit den bisher verwendeten Verfahren nicht erfasst werden konnten.

Um Hinweise auf neue Kandidatenregionen für das SRS zu erhalten, war die Durchführung genomweiter Analysen mit DNA-Mikroarrays in der vorliegenden Arbeit vorgesehen. In ersten Screening-Studien waren bereits bei einigen Patienten mit SRS-typischem Phänotyp submikroskopische (< 3 Mb) Imbalancen identifiziert worden (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010). Zum Nachweis dieser Veränderungen im eigenen SRS-Kollektiv wurden zwei hochauflösende Arraysysteme sowie die zugehörige Analysesoftware etabliert und auf ihre Anwendbarkeit getestet. Mittels Array-Analytik war einerseits bei den SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung die Suche nach Hinweisen auf neue Kandidatengene, die an der Setzung und/oder Aufrechterhaltung von Methylierungssignalen beteiligt sind, geplant. Außerdem sollte die Mikroarray-Analytik zur Identifizierung kausaler Imbalancen im Kollektiv der idiopathischen SRS-Patienten führen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

| | |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autoklav | HV-85, HD-Tek, Süßen, D |
| Brutschrank | Kendro, Heraeus, Hanau, D |
| Elektrophoresegeräte | Gelkammer Multi Sub Screen, Biozym, Hess. Oldendorf, D Sequencing System Model SA, Life Technologies, Gibco BRL, Groningen, NL |
| Elektrophoresezubehör | Gelträger 26x20 cm & 20-Zahn-Kämme, Dichtungsbarrieren, Biozym, Hess. Oldendorf, D Gelträger 20x20 cm & 22-Zahn-Kämme, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D Gelträger 7x10 cm & 8-Zahn-Kämme, Blue Marine 100, Serva, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D |
| Geldokumentation | Imaging-System Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, USA |
| Heizblock | Unitek TM HBS-130/E, peqlab, Erlangen, D Techne Dry Block® DB 3D, Techne (Cambridge) LTD, Duxford Cambridge, UK |
| Magnetrührer | Ikamag RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen, D |
| Magnetständer | MagnaRack TM , Invitrogen, Karlsruhe, D 96 well Magnetic-Ring Stand, Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| Mikrowelle | Boxford |
| Photometer | Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, D |
| Pipetten | Pipetman P10, P20, P100, P1000, Gilson, Villiers-le-Bel, F |
| Schüttelapparat | GFL 3015 & GFL 3005, Burgwedel, D ThermoshakeTH0500, Gerhardt GmbH & CoKG, Königswinter, D |
| Sequenzierer und Zubehör | ABI Prism [®] 310 und 3130, Applied Biosystems, Weiterstadt, D Sequenzierzubehör, Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt, D |
| Spannungsgeräte | Electrophoresis Power Supply PS 304, Gibco BRL, Groningen, NL |

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| | Electrophoresis Power Supply PS 3002, Gibco BRL, Groningen, NL |
| Thermocycler | PTC 100 & PTC 200 DNA Engine MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf, D |
| Thermomixer | Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg, D |
| Waagen | BP 2100 & BP615, Sartorius AG, Göttingen, D |
| Wasserbad | GFL 1086, Burgwedel, D Lauda E200 ecoline R206, Lauda-Königshofen, D |
| Whatman-Papier | Whatman Gb002, Schleicher & Schüll, Dassel, D |
| Vakuumpumpe | Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D |
| Zentrifugen | Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, D Biofuge fresco, Kendro, Osterode, D |

3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien trugen die Qualitätsbezeichnung p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Applichem, Darmstadt, D
- Bio-Rad, Hercules, USA
- Biozym, Oldendorf, D
- Boehringer, Mannheim, D
- Dianova, Hamburg, D
- ICN Biomedicals, Ohio, USA
- Invitrogen, Karlsruhe, D
- Merck, Darmstadt, D
- Promega, Mannheim, D
- Riedel-de Haen, Seelze, D
- Roth, Karlsruhe, D
- Serva, Heidelberg, D
- Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, D
- USB, Cleveland, USA
- Zymo Research, CA, USA

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer (Startermoleküle) wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH Ebersberg bezogen.

Die Sequenzen der Gene *ZFP57* und *HMGA2* wurden über die NCBI-Datenbank erhalten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zur Auswahl der Primer für die Sequenzierungen wurden die Sequenzen gi:19572781 für *ZFP57* bzw. gi:89035619 für *HMGA2* verwendet (s. Tab. 6.1 und 6.2 im Anhang). Die Sequenz der CpG-Insel 2 von *GRB10* (*GRB10*-CPGI2) wurde über die UCSC-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) erhalten (s. Tab. 6.3 im Anhang). Alle Primer für die Sequenzierungen wurden mit Hilfe der Online-Software Primer 3 v. 0.4.0 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) ausgewählt.

Die Sequenzen der Primer für die MS-PCRs am *GRB10*-Locus in 7p12-p11.2 zur upd(7)mat-Diagnostik wurden einem Artikel von nach Mackay *et al.* (2008) entnommen. Die Primersequenzen und die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.5 und 6.18 im Anhang zusammengefasst.

Für die Auswahl der PCR-Primer für die MS-SNuPE wurde entweder zunächst eine virtuelle Bisulfitbehandlung mit der Online-Software BiQ Analyzer (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/BiConverter/index.php>) durchgeführt und dann die Primer mit Hilfe der Online-Software Primer 3 v. 0.4.0 ausgewählt oder die Primer wurden direkt mit Hilfe der Methyl Primer Express[®] Software Version 1.0 (Applied Biosystems) ausgewählt. Die Primer für die Primerverlängerungsreaktionen wurden manuell anhand der zuvor virtuell Bisulfit-konvertierten Sequenz herausgesucht. Die Primer für die MS-SNuPE-Analysen sind in den Tabellen 6.9 und 6.10 im Anhang aufgelistet.

Die Primersequenzen für die Mikrosatelliten-Analysen entsprechen den Angaben der UCSC-Datenbank.

Die Primer für die quantitativen PCR-Analysen zur Bestätigung der Array-Ergebnisse wurden mit Hilfe der Online-Software Primer 3 v. 0.4.0 ausgewählt und sind in Tabelle 6.11 im Anhang zusammengefasst.

Die benötigten Oligonukleotide für die selbst generierten MLPA-Sonden wurden von der Firma IDT[®] Integrated DNA Technologies bezogen.

3.1.4 Feinchemikalien und Enzyme

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bisulfit-Kit | EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research, Orange, USA |
| DNA-Isolations-Kits | innuPREP Swab DNA Kit, analytikjena, Jena, D QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, D QIAamp DNA Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, D |
| Hi-Di™ Formamid | Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| Längenstandard | 100 bp-Leiter & 50 bp-Leiter, 1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D GeneScan™-500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems, Weiterstadt, D GeneScan™-120 LIZ Size Standard, Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| Ligase | 10x T4 DNA Ligase, New England Biolabs, Frankfurt/Main, D |
| Magnetische Beads | Agencourt AMPure XP Reagent, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D |
| Methylierte und Unmethylierte DNA | EpiTect PCR Control DNA Set, QIAGEN, Hilden, D |
| MS-SnuPE-Kit | Snapshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| Microarray-Kits | Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0, Affymetrix, Santa Clara, USA Cytogenetics Reagent Kit |
| MLPA-Kits | SALSA MLPA kit ME030 BWS/RSS und P300-Reference-2, MRC-Holland, Amsterdam, NL |
| Nukleotide | (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Je 100 mM, Invitrogen, Karlsruhe, D |
| PCR Reinigungskit | ExoSAP-IT®, USB Corporation, Cleveland, USA |
| PCRx Enhancer System | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Phosphatase | Shrimp Alkaline Phosphatase, Affimetrix/USB Corporation, High Wycombe |
| Real-Time PCR | QuantiTect SYBR® Green Kit; QuantiTect® Primer Assays, QIAGEN, Hilden, D SYBR-Green-Kit, Eurogentec, Seraing, B |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs, Frankfurt/Main, D FastDigest® Enzymes, Fermentas, St. Leon-Rot, D |

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Taq</i> -Polymerasen | AmpliTaq Gold [®] 360 Master Mix, Applied Biosystems, Weiterstadt, D <i>Taq</i> DNA Polymerase Recombinant & Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase, Invitrogen, Karlsruhe, D Multiplex PCR Kit, HotStar <i>Taq</i> -DNA Polymerase & <i>Taq</i> DNA Polymerase, QIAGEN, Hilden, D TITANIUM DNA Amplification Kit, Clontech, Mountain View, USA |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

3.1.5 Probanden-Kollektive

Das in der Arbeit verwendete Probandenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

- a) 42 Patienten mit klinischer Diagnose SRS mit ungeklärter Ätiologie („idiopathische SRS“), bei denen im Vorfeld eine Hypomethylierung in der Region 11p15 und eine upd(7)mat ausgeschlossen wurden
- b) 31 SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 in der Region 11p15
- c) Einzelkasuistiken aus der SRS-Routinediagnostik:
 - (1) ein Patient mit Mikrodeletion in 7q32 und SRS-Merkmalen
 - (2) ein SRS-Patient mit isolierter Hypermethylierung am GRB10-Locus und Mikrodeletion 20p13

Dieses Projekt wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums der RWTH Aachen genehmigt.

3.1.5.1 Klinisches Scoring-System

Zur standardisierten klinischen Charakterisierung der idiopathischen SRS-Patienten wurde das kürzlich von Bartholdi et al. (2009) vorgeschlagene Scoring-System mit einigen Modifikationen angewendet. Dazu wurden die Symptome der Patienten in fünf Gruppen aufgeteilt: Geburtsmaße, postnatale Entwicklung, Asymmetrie, faciale Merkmale sowie sonstige Merkmale. Aus den verschiedenen Gruppen wurden jeweils mindestens drei Merkmale beurteilt und je nach Auftreten mit 0-3 Punkten bewertet.

Im Gegensatz zu Bartholdi et al. wurde bei unseren Patienten das Vorliegen genitaler Fehlbildungen nicht in die Berechnung des Scores einbezogen, da dazu keine Daten vorlagen. Daher wurde ein maximaler Score von 14 statt 15 Punkten für unsere Patienten definiert. Da außerdem nicht von allen Patienten vollständige klinische Daten zur Verfügung standen, wurde ein prozentualer Score anstelle eines absoluten Scores berechnet. Patienten mit einem Score $\geq 53.3\%$ (entsprechend $\geq 8/15$ Punkten bei Bartholdi et al.) wurden als typische SRS-Patienten klassifiziert.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolation und –Aufreinigung

3.2.1.1 DNA-Isolation

Die zur Durchführung der beschriebenen Analysen verwendeten genomischen DNA-Proben aus Lymphozyten des peripheren Blutes standen bereits zur Verfügung und wurden zuvor entweder mittels Aussalzverfahren nach Miller et al. (1988) oder unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit bzw. Maxi Kit (QIAGEN) isoliert.

Weiterhin wurden für einige Analysen DNA-Proben aus Mundschleimhautabstrichen verwendet. Diese wurden mit dem innuPREP Swab DNA Kit (analytikjena) entsprechend den Herstellerangaben isoliert und in 10-20 μl A. dest. eluiert.

3.2.1.2 DNA-Aufreinigung

Für einige der im Folgenden beschriebenen Analyseverfahren, insbesondere für die Verwendung bei der Mikroarray-Analyse (s. 3.2.11) oder quantitativen PCR (s. 3.2.12), war eine Aufreinigung der DNA-Proben zur Entfernung PCR-inhibierender Stoffe notwendig. Hierzu wurde bei den meisten Proben unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN) eine Aufreinigung über Säulchen durchgeführt. Weiterhin wurden einige Proben durch eine Isopropanol- oder Ammoniumacetat-Fällung unter Verwendung folgender Reagenzien aufgereinigt:

Reagenzien zur Durchführung einer Isopropanolfällung:

Isopropanol

Ethanol 70%

Reagenzien zur Durchführung einer Ammoniumacetatfällung:7,5 M NH₄OAc

Ethanol 100%

Ethanol 80%

Glykogen (5 mg/ml)

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Vor der Durchführung der meisten molekulargenetischen Analysen ist zunächst eine gezielte Amplifikation eines oder mehrerer DNA-Fragmente nötig. Diese erfolgt mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) durch die Auswahl spezifischer Startermoleküle, so genannter Primer, die i. d. R. eine Länge von 20-25 bp aufweisen. Die PCR lässt sich in drei Reaktionsschritte einteilen, die bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen und zyklisch wiederholt werden: Zunächst erfolgt eine Denaturierung der genomischen DNA, wodurch im nächsten Schritt das Annealing der Primer an die Zielsequenz ermöglicht wird. Durch eine thermostabile DNA-Polymerase, z.B. *Taq*-Polymerase wird in der Elongationsphase vom Primer ausgehend ein neuer DNA-Strang durch den Einbau der vier desoxy-Nukleotid-tri-phosphate (dNTPs) synthetisiert. Diese werden komplementär zum Matrizenstrang eingebaut, wodurch eine Kopie des Zielfragments entsteht. Die häufige Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte und die Verwendung der neu synthetisierten Fragmente als zusätzliche Matrizen führen schließlich zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Moleküle mit der Zielsequenz.

Die Spezifität der PCR kann durch verschiedene Modifikationen der Reaktion verbessert werden: sowohl eine Veränderung der Annealing-Temperatur als auch der Magnesium-Konzentration sowie die Zugabe denaturierender Agenzien kann zu einer besseren Amplifikation des Zielfragments führen.

Durchführung

Für Standard-Anwendungen wird die Invitrogen Taq mit folgendem Ansatz verwendet:

| Reagenz | Menge [μ l] |
|---------------------------------|------------------|
| 10x PCR Puffer (ohne $MgCl_2$) | 2,5 |
| $MgCl_2$ (50 mM) | 0,75 |
| dNTPs (je 1,25 mM) | 4,0 |
| Primer F (10 mM) | 1,0 |
| Primer R (10 mM) | 1,0 |
| Invitrogen-Taq (5 U/ μ l) | 0,2 |
| A. dest. | 11,55 |
| DNA (20 ng/ μ l) | 4,0 |

Die Standard-PCR wird mit dem folgenden Programm im Thermocycler durchgeführt:

94°C 5' / (94°C 30'' / TA 30'' / 72°C 1') x 30-40 / 72°C 10'

Für spezielle Anwendungen und schwierig zu amplifizierende Fragmente werden jedoch andere Kits verwendet. Für die Amplifikation bisulfit-behandelter DNA werden beispielsweise aufgrund ihres hohen AT-Gehalts Kits mit Hotstart-Polymerasen benutzt.

3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation eines DNA-Fragments mit Hilfe der PCR kann eine gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes durchgeführt werden. Die DNA wandert hierbei aufgrund ihrer negativen Nettoladung im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungstrecke der DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare: kleine DNA-Fragmente können die Gelmatrix schneller durchqueren als große. Durch Mitführen eines Größenstandards aus DNA-Fragmenten bekannter Länge kann die Länge des PCR-Produkts abgeschätzt werden.

Für die Gelelektrophorese werden entweder Agarose- oder Polyacrylamid (PAA)-Gele je nach der benötigten Auftrennung verwendet. Mit Agarose-Gelen kann je nach Konzentration eine Auftrennung von Fragmenten mit einer Größe von 50 bp bis 50 kb erfolgen, während bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese Fragmente von 1-5.000 bp aufgetrennt werden können.

Dabei wird durch die Struktur der denaturierenden Polyacrylamid-Gele die Auftrennung von Fragmenten mit nur einem Basenpaar Längenunterschied ermöglicht.

3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg einer PCR zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit i. d. R. 1%ige Agarosegele zur gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte verwendet. Zur Überprüfung der Fragmentierungsreaktion bei der Mikroarray-Analyse wurden 3%ige Gele verwendet. Um die DNA-Fragmente im Gel zu visualisieren, werden Agarosegele mit Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden, so dass die DNA-Banden sichtbar werden.

Reagenzien zur Anfertigung eines 1%igen Agarosegels in den Gelträger-Maßen 25x20 cm

(Biozym):

| | | | | | |
|-------------------|------------|---------|---|--------|--------|
| Agarose | | | | | 3 g |
| Tris-HCl (pH 8,4) | (1,0 M) | 100 mM | } | 1x TBE | 300 ml |
| Borsäure | (0,9 M) | 90 mM | | | |
| EDTA | (0,01 M) | 1 mM | | | |
| Ethidiumbromid | (10 mg/ml) | 1 µg/ml | | | 60 µl |

Reagenzien zur Anfertigung eines 3%igen Agarosegels in den Gelträger-Maßen 20x20 cm

(Pharmacia Biotech):

| | | | | | |
|-------------------|------------|---------|---|--------|--------|
| Agarose | | | | | 9 g |
| Tris-HCl (pH 8,4) | (1,0 M) | 100 mM | } | 1x TBE | 300 ml |
| Borsäure | (0,9 M) | 90 mM | | | |
| EDTA | (0,01 M) | 1 mM | | | |
| Ethidiumbromid | (10 mg/ml) | 1 µg/ml | | | 60 µl |

Durchführung

Die Agarose wird mit dem TBE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst ist. Danach wird die Mischung zum Abkühlen für 20 Minuten auf den Schüttler gestellt. Während dessen wird

Ethidiumbromid zugegeben. Ist das flüssige Gel ausreichend abgekühlt, wird es in den mit Kämmen vorbereiteten Gelträger gegossen. Wenn das Gel auspolymerisiert ist, werden die Kämmen herausgezogen und das Gel wird in eine mit 1% TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Vor dem Auftragen werden die Proben mit Agarose-Blaupuffer versetzt, wodurch die Proben besser in die Taschen absinken und ein Herausdiffundieren verhindert wird. Der Blaupuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Agarose-Blaupuffer (100 ml):

| | | | | |
|-------------------|----------|-------|---------|-----------------------|
| Tris-HCl (pH 8,4) | (1,0 M) | } | 10x TBE | 10 ml |
| Borsäure | (0,9 M) | | | |
| EDTA | (0,01 M) | | | |
| Ficoll 400 | (20%) | 8% | | 40 ml |
| Bromphenolblau | (0,1%) | 0,01% | | 10 ml |
| Aqua dest. | | | | Restvolumen ad 100 ml |

5 µl des PCR-Produkts werden mit 5 µl Agarose-Blaupuffer versetzt. Die Elektrophorese wird bei 160 V je nach gewünschter Auftrennung für mindestens 20 min durchgeführt.

3.2.3.2 Hochauflösende Kapillargelelektrophorese

Für bestimmte Analysemethoden ist eine Auftrennung von Fragmenten mit einem Basenpaar Genauigkeit erforderlich. Die Analyse dieser Fragmente kann mit einem automatischen Analysegerät (AB3130) durchgeführt werden. Die Auftrennung erfolgt hierbei durch eine Kapillarelektrophorese mit einem denaturierendem PAA-Gel. Um die Fragmente detektierbar zu machen, können je nach Anwendung z. B. fluoreszenzmarkierte PCR-Primer oder ddNTPs verwendet werden. Im automatischen Analysegerät wird die Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers angeregt, über eine CCD-Kamera registriert und mit der entsprechenden Software ausgewertet. Hierdurch wird neben der genauen Identifizierung der Fragmente auch eine Quantifizierung durch die Messung der Fluoreszenzintensität ermöglicht. Dieses Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit beispielsweise für die Fragmentanalyse bei der Mikrosatelliten-Analyse (s. 3.2.4), der MS-PCR (s. 3.2.8), der MLPA (s. 3.2.10) und der MS-SNuPE (s. 3.2.9) sowie für die Analyse von Sequenzierungen (s. 3.2.5) verwendet.

Durchführung

Bei der Mikrosatelliten-Analyse, MS-PCR und MLPA wurden die Zielfragmente mittels PCR unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Abschätzung der Konzentration des PCR-Produktes auf einem 1%igen Agarosegel. Je nach Intensität der Bande wurde eine Verdünnung des PCR-Produktes mit A. dest hergestellt. Von dieser Verdünnung wurde 1 µl mit 0,5 µl GeneScanTM-500 LIZ Size Standard und 8,5 µl Hi-DiTM-Formamid versetzt. Die Fragmente wurden dann mittels Kapillargelelektrophorese auf dem automatischen Sequenzierer AB3130 aufgetrennt und mit der GeneMapper v4.0-Software analysiert.

Die Analyse von Sequenzierungen sowie von MS-SNuPE-Produkten mittels Kapillargelelektrophorese wird unter 3.2.5 bzw. 3.2.9 näher beschrieben.

3.2.4 Mikrosatelliten-Analyse

Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analyse kann die elterliche Herkunft beider Allele bestimmt werden. Sie wird zum Nachweis von Deletionen, Duplikationen und UPDs sowie zur Durchführung von Kopplungsanalysen angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrosatelliten-Analyse hauptsächlich zur Bestätigung und zum Nachweis des elterlichen Ursprungs von bei der Array-Analyse (s. 3.2.11) detektierten Kopienzahlvarianten durchgeführt.

Mikrosatelliten sind hoch repetitive, längenpolymorphe DNA-Abschnitte, in denen sich bis zu sechs Basenpaare in jeweils gleicher Reihenfolge stetig wiederholen. Bei hoch polymorphen Repeats liegt meist eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen auf den beiden elterlichen Allelen vor.

Zur Mikrosatelliten-Analyse wird eine PCR-Amplifikation mit Primern durchgeführt, die die Repeats flankieren. Die entstandenen Fragmente können mittels Kapillargelelektrophorese (s. 3.2.3.2) mit einer Genauigkeit von 1 bp nach ihrer Länge aufgetrennt werden, die mit der Anzahl der Repeats korreliert.

3.2.5 Direkte Sequenzierung nach Sanger

Die direkte Sequenzierung dient der Darstellung und Analyse der Basenabfolge einer Nukleinsäuresequenz zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen. Bei der Sequenzierung nach Sanger handelt es sich um ein Kettenabbruchverfahren, bei dem eine unvollständige Amplifikation des Zielfragments erfolgt. Im Gegensatz zur PCR wird hierbei entweder nur der F- oder R-Primer als Startermolekül verwendet und zusätzlich zu den dNTPs werden 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) in einer geringen Konzentration zugegeben. Da die ddNTPs keine 3'OH-Gruppe besitzen, welche zur Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen zwei Nukleotiden benötigt wird, kann die Synthese nach Einbau eines ddNTPs nicht fortgesetzt werden und es kommt zum Kettenabbruch. Das Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs ist so abgestimmt, dass durch die statistisch verteilten Unterbrechungen der Komplementärstrang-Synthese Fragmente jeder möglichen Länge entstehen, die jeweils um ein Nukleotid verkürzt sind. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der vier Basen, können diese bei der nachfolgenden Analyse unterschieden werden. Diese erfolgt mittels einer Kapillargelelektrophorese, bei der eine Auftrennung der Produkte anhand ihrer Länge im Abstand von 1 bp möglich ist. Die Analyse wird mit Hilfe eines automatischen Sequenzierapparates durchgeführt, welcher die Basensequenz als Elektropherogramm darstellt.

Durchführung

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um das zu sequenzierende Fragment zu amplifizieren. Anschließend wurde die Spezifität und Konzentration des PCR-Produktes mit einem 1%igen Agarosegel überprüft. Je nach Konzentration wurden 1,5-5 µl des PCR-Produktes mit ExoSAP-IT[®] (Affymetrix/USB) behandelt, um überschüssige Primer und dNTPs aus der PCR abzubauen. Zum PCR-Produkt wurden je 2 µl ExoSAP-IT[®] zugegeben, mit A. dest. auf 7 µl aufgefüllt und im Thermocycler folgendes Programm durchgeführt:

37°C 15' / 80°C 15' / 15°C

Zur Durchführung der Sequenzierreaktion wurden 1,5 µl Sequenziermix (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) und 1 µl des forward- oder reverse-Primers (10 µM) zu dem aufgereinigten PCR-Produkt (10 µl) gegeben. Im Thermocycler wurde folgendes Programm durchgeführt: 96°C 1' / (96°C 10'' / 50°C 5'' / 60°C 4') x 24

Anschließend erfolgte eine Fällung der Produkte aus der Sequenzier-PCR mit Natriumacetat und Ethanol unter Verwendung folgender Reagenzien:

| | |
|--------------------------|--------|
| Natriumacetat 3M, pH 4,8 | 10 µl |
| HPLC-Wasser | 80 µl |
| Ethanol 100% | 250 µl |
| Ethanol 70% | 500 µl |

Nach der Fällung wurde das DNA-Pellet mit 20 µl Hi-DiTM Formamid gelöst. Nun folgte die Kapillargelelektrophorese auf dem Sequenzierer (AB3130). Die Elektropherogramme wurden mit der Software Sequencing Analysis 5.2 oder SeqScape v2.5 ausgewertet.

3.2.5.1 Mutationsscreening des *ZFP57*-Gens

Zum Nachweis von Punktmutationen wurde bei 30 SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 eine direkte Sequenzierung des Gens *ZFP57* durchgeführt. Für die Amplifikation der Exons 2-6 wurde die unter 3.2.2 beschriebene Standard-PCR verwendet. Zur Verbesserung des PCR-Ergebnisses wurde für Exon 1 die QIAGEN Taq mit Q-Solution nach folgendem Ansatz verwendet:

| Reagenz | Menge [µl] |
|----------------------------------------------|------------|
| 10x PCR-Puffer incl. 15 mM MgCl ₂ | 2,5 |
| Q-Solution (5x) | 2,5 |
| dNTPs (je 1,25 mM) | 4,0 |
| Primer F (10 mM) | 1,0 |
| Primer R (10 mM) | 1,0 |
| QIAGEN-Taq (5 U/µl) | 0,125 |
| A. dest. | 7,375 |
| DNA (20 ng/µl) | 4,0 |

Genauere Angaben zu den Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang in den Tabellen 6.1 und 6.14 aufgeführt.

3.2.5.2 Mutationsscreening des *HMGA2*-Gens

Zum Nachweis von Punktmutationen wurde bei 20 idiopathischen SRS-Patienten eine direkte Sequenzierung der beiden Isoformen des Gens *HMGA2* durchgeführt. Für die Amplifikation der Fragmente wurde die unter 3.2.2 beschriebene Standard-PCR verwendet. Weitere Informationen zu den Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang in den Tabellen 6.2 und 6.15 zusammengefasst.

3.2.5.3 Mutationsscreening der *GRB10*-CPGI2

Zum Nachweis von Punktmutationen wurde bei 20 SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 und bei 20 idiopathischen SRS-Patienten eine direkte Sequenzierung der *GRB10*-CPGI2 durchgeführt. Da die Zielregion einen sehr hohen GC-Gehalt aufweist, wurde zur Amplifikation der Fragmente 1 und 2 die Platinum *Taq* Polymerase mit dem PCRx Enhancer System der Firma Invitrogen mit folgendem Ansatz verwendet:

| Reagenz | Menge [μ l] |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| 10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂ | 2,5 |
| MgSO ₄ (50 mM) | 0,75 |
| dNTPs (je 1,25 mM) | 4,0 |
| Primer F (10 mM) | 1,0 |
| Primer R (10 mM) | 1,0 |
| Platinum-Taq (5 U/ μ l) | 0,2 |
| 10x PCRx Enhancer Solution | Fragment1: 5,0 Fragment2: 7,5 |
| A. dest. | Fragment1: 5,0 Fragment2: 2,5 |
| DNA (20 ng/ μ l) | 4,0 |

Zur Amplifikation von Fragment 3 wurde der AmpliTaq Gold 360 Mastermix der Firma Applied Biosystems verwendet:

| Reagenz | Menge [μ l] |
|-----------------------------|------------------|
| AmpliTaQ Gold 360 Mastermix | 12,5 |
| Primer F (10 mM) | 1,5 |
| Primer R (10 mM) | 1,5 |
| A. dest. | 7,5 |
| DNA (20 ng/ μ l) | 2,0 |

Genauere Angaben zu den Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang in den Tabellen 6.3 und 6.16 aufgeführt.

3.2.6 Restriktionsverdau

Durch die Verwendung von Restriktionsenzymen kann die DNA an einer spezifischen Nukleotidsequenz geschnitten werden. Die Sequenzen, die von Restriktionsenzymen erkannt werden, sind in der Regel vier bis acht Basenpaare lang und enthalten ein Palindrom. Im Gegensatz zu den meisten Enzymen, die bei passender Erkennungssequenz immer schneiden, gibt es außerdem methylierungs-sensitive Enzyme, die nur unmethylierte Zielsequenzen schneiden können.

Der Restriktionsverdau kann u. a. zum direkten Mutationsnachweis verwendet werden, indem das Enzym so gewählt wird, dass die zu untersuchende Variante innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms lokalisiert ist. Dazu wird zunächst das DNA-Fragment, welches die Schnittstelle für das Enzym enthält, mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mit dem passenden Enzym verdaut und die Proben anschließend je nach Größe der zu erwartenden Fragmente auf einem Agarose- oder PAA-Gel aufgetragen. Anhand des entstehenden Fragmentmusters können Rückschlüsse auf das homo- oder heterozygote Vorliegen bzw. das Fehlen der Variante gezogen werden.

Weitere Anwendungen des Restriktionsverdaus in der vorliegenden Arbeit sind z. B. die Erzeugung überhängender Enden für die Ligation von Adaptor-Molekülen bei der Mikroarray-Analyse (s. 3.2.11) sowie die Bestimmung des Methylierungszustands der DNA

durch Verwendung eines methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym bei der MS-MLPA (s. 3.2.10.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis von Sequenzveränderungen im Gen *ZFP57* sowie in der *GRB10-CPGI2* die folgenden Restriktionsverdaue durchgeführt:

| Gen | Primer | Restriktions- enzym | Fragmentlänge (bp) | Fragmentlängen nach Verdau (bp) |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| ZFP57- Exon 6.2 | ZFP57_Ex6.2F & | <i>Taq</i> I | 700 | 652 |
| | ZFP57_Ex6.2R | | | 49 |
| GRB10- CPGI2 | GRB10-CPGI2-Seq2F & GRB10-CPGI2-Seq2R | <i>BsmF</i> I | 583 | 430 |
| | | | | 291 |
| | | | | 153 |
| | | | | 139 |

Reagenzien zum Ansatz der Restriktionsverdaue:

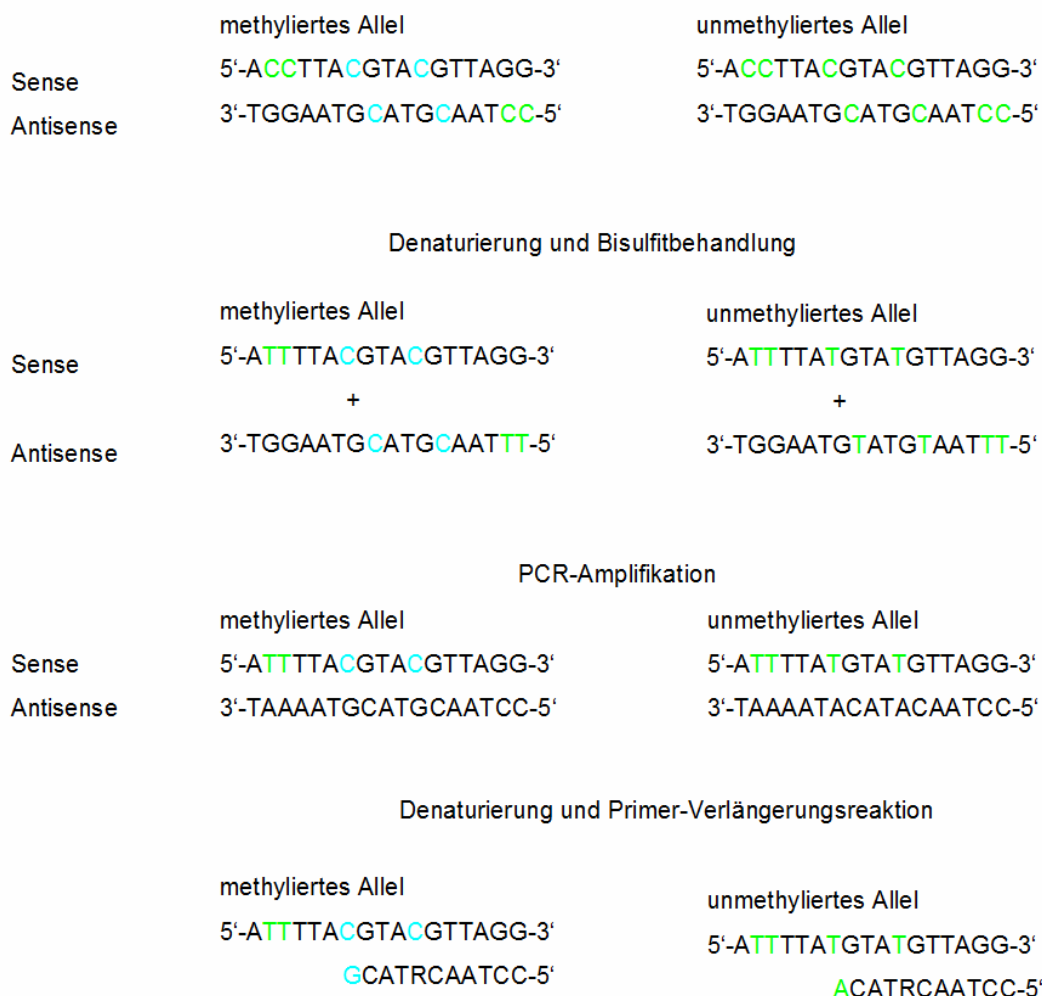
| | |
|-----------------------------|--------|
| PCR-Produkt | 10 µl |
| <i>Taq</i> I/ <i>BsmF</i> I | 6 U |
| 10x NEB-Puffer 4 | 1,5 µl |
| BSA (1 mg/ml) | 1,5 µl |
| Aqua dest. | 1,5 µl |

Durchführung

Die Restriktionsverdaue wurden bei 65°C für 2 1/2 Stunden mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 80°C für 20 min durchgeführt. Die Produkte des Verdaus mit *Taq* I wurden auf einem 3%igen Agarosegel bei 130 V für 2 1/2 Stunden, die Produkte des *BsmF* I Verdaus auf einem 1%igen Agarosegel für 1 h bei 180 V aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurden eine 50 bp bzw. 100 bp Leiter und ein unverdautes PCR-Produkt als Größenvergleich für den Verdau aufgetragen.

3.2.7 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA

Zur Analyse des Methylierungsstatus differenziell methylierter DNA-Abschnitte wird eine Bisulfitbehandlung der genomischen DNA durchgeführt. Durch eine Behandlung mit Natriumbisulfit werden dabei unmethylierte Cytosine deaminiert und so in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosine durch die Methylgruppe vor der Konvertierung geschützt werden. Es ergibt sich infolgedessen ein Sequenzunterschied zwischen dem methylierten und dem unmethylierten Allel, der als Basis für nachfolgende Analysen des Methylierungsstatus genutzt werden kann (s. Abb. 3.1).



blau: methyliert; grün: unmethyliert

Abb. 3.1: Schema zur Bisulfit-Behandlung genomischer DNA und MS-SNuPE-Reaktion (s. 3.2.9).

Durchführung

Die Bisulfitbehandlung erfolgte unter Verwendung des EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) entsprechend den Herstellerangaben. Für nachfolgende MS-PCR-Analysen (s. 3.2.8) wurden 200 ng, für die MS-SNuPE (s. 3.2.9) 500 ng genomische DNA eingesetzt. Die Bisulfit-Konvertierung wurde mit folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt: 98°C 10' / 53°C 30' / (53°C 6' / 37°C 30') x 8 / 4°C

Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde nach einer Aufreinigung über Säulen für MS-PCR-Analysen in 10 µl und für die MS-SNuPE in 15 µl Puffer eluiert.

3.2.8 MS-PCR

Durch die Wahl spezifischer Primer können in einer an Bisulfit-behandelter DNA durchgeführten methylierungs-spezifischen PCR (MS-PCR) DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrem Methylierungszustand gezielt amplifiziert werden (s. Abb. 3.1). So kann in einer Multiplex-PCR eine parallele Amplifikation des methylierten und des unmethylierten Allels erfolgen. Durch die anschließende Quantifizierung der PCR-Produkte für beide Allele kann der Methylierungszustand differentiell methylierter Loci ermittelt werden. Dies ermöglicht sowohl den Nachweis uniparentaler Disomien durch eine Analyse elterlich geprägter genomischer Regionen als auch den Nachweis isolierter Methylierungsveränderungen innerhalb dieser Bereiche.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MS-PCRs für die DMRs der geprägten Loci *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *MEG3* (14q32) sowie *PLAGL1* (6q24) wurden jeweils ein methylierungsunabhängiger, fluoreszenzmarkierter Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, sowie zwei methylierungs-spezifische Primer zur Amplifikation verwendet. Die Auftrennung und Quantifizierung der PCR-Produkte wurde mit dem automatischen Sequenzierer AB3130 und mit der GeneMapper v4.0-Software durchgeführt.

3.2.8.1 MS-PCR für den *MEST*-Locus auf Chromosom 7

Zum Nachweis einer upd(7)mat wurde eine MS-PCR für den *MEST*-Locus in 7q32 in Anlehnung an ein Protokoll von Moore *et al.* (2003) durchgeführt. Das PCR-Produkt für das paternale, unmethylierte Allel hat eine Größe von 104 bp, das für das maternal methylierte Allel ist 187 bp groß. Anhand der Fluoreszenzintensität der beiden PCR-Produkte können Veränderungen des Methylierungszustandes bzw. das Vorliegen einer upd(7)mat festgestellt werden.

Durchführung

Die MS-PCR wurde mit je 1 µl Bisulfit-behandelter DNA unter Verwendung des AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems) in einem 25 µl-Ansatz entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie das PCR-Programm sind im Anhang in den Tabellen 6.4 sowie 6.17 aufgeführt.

3.2.8.2 MS-PCRs für den *GRB10*-Locus auf Chromosom 7

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis einer upd(7)mat bzw. von isolierten Methylierungsveränderungen am *GRB10*-Locus in 7p12 zwei MS-PCRs (*GRB10_1*, *GRB10_2*) in Anlehnung an ein Protokoll von Mackay *et al.* (2008) etabliert. Die PCR-Produkte für das maternal methylierte und das paternal unmethylierte Allel haben bei der *GRB10_1*-PCR eine Größe von 185 bp bzw. 190 bp sowie bei der *GRB10_2*-PCR von 264 bp und 284 bp. Anhand der Fluoreszenzintensität der beiden PCR-Produkte können Veränderungen des Methylierungszustandes bzw. das Vorliegen einer upd(7)mat festgestellt werden. Außerdem können durch die kombinierte Analyse der MS-PCRs für die Loci *MEST* und *GRB10* segmentale UPDs identifiziert werden.

Durchführung

Die MS-PCRs wurden mit je 3 µl Bisulfit-behandelter DNA unter Verwendung der HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) in einem 25 µl-Ansatz entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie das PCR-Programm sind im Anhang in den Tabellen 6.5 sowie 6.18 aufgeführt.

3.2.8.3 MS-PCR für den *MEG3*-Locus auf Chromosom 14

Zum Nachweis von Methylierungsveränderungen am *MEG3*-Locus in 14q32 wurde eine MS-PCR in Anlehnung an ein Protokoll von Temple *et al.* (2007) durchgeführt. Hierbei entsteht für das paternale, methylierte Allel ein PCR-Produkt mit einer Größe von 193 bp, für das maternal unmethylierte Allel ist das PCR-Produkt 221 bp groß. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden PCR-Produkte können Veränderungen des Methylierungszustandes nachgewiesen werden.

Durchführung

Die MS-PCR für den *MEG3*-Locus wurde mit 1 µl Bisulfit-behandelter DNA unter Verwendung des AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems) in einem 25 µl-Ansatz entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie das PCR-Programm sind im Anhang in den Tabellen 6.6 sowie 6.19 aufgeführt.

3.2.8.4 MS-PCR für den *PLAGL1*-Locus auf Chromosom 6

Zum Nachweis von Methylierungsveränderungen am *PLAGL1*-Locus in 6q24 wurde eine MS-PCR in Anlehnung an ein Protokoll von Mackay *et al.* (2005) durchgeführt. Das PCR-Produkt für das paternale, unmethylierte Allel hat eine Größe von 188 bp, das für das maternal methylierte Allel ist 175 bp groß. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden PCR-Produkte können Veränderungen des Methylierungszustandes nachgewiesen werden.

Durchführung

Zur Durchführung der MS-PCR für den *PLAGL1*-Locus wurde das HotStarTaq DNA Polymerase-Kit (QIAGEN) in einem 25 µl-Ansatz nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie das PCR-Programm sind im Anhang in den Tabellen 6.7 sowie 6.20 aufgeführt.

3.2.9 MS-SNuPE

Die MS-SNuPE (methylation specific single nucleotide primer extension) ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung von Methylierungszuständen an Bisulfit-behandelter genomischer DNA und eignet sich durch die Kombinierbarkeit mehrerer Zielregionen in einem Multiplex-Ansatz besonders zum Nachweis von MLMD.

Das MS-SNuPE-Verfahren basiert auf der SNaPshot-Technologie der Firma Applied Biosystems, die eine parallele Genotypisierung von bis zu zehn SNPs (single nucleotide polymorphisms) in einer Reaktion ermöglicht (Gonzalzo et al., 1997; 2002; 2007). Hierbei wird nach einer (Multiplex-)PCR-Amplifikation der Zielfragmente eine Primerverlängerungsreaktion (PV) durchgeführt. Die Primer für die Verlängerungsreaktion werden dabei so gewählt, dass ihr 3'-Ende unmittelbar vor dem Polymorphismus hybridisiert, der analysiert werden soll. In Abhängigkeit vom Genotyp werden durch die DNA-Polymerase Fluoreszenz-gelabelte ddNTPs an das 3'-Ende des Primers gebunden. Durch die Didesoxy-Struktur der Nukleotide bricht die PV direkt nach dem Einbau eines Nukleotids ab. Die Detektion der Fragmente erfolgt über eine Kapillargelelektrophorese. In einen PV-Ansatz können mehrere Primer gleichzeitig eingesetzt werden, wenn diese nicht überlappend sind und einen Längenunterschied von mindestens 4 Nukleotiden haben. Um die Auftrennung zu verbessern kann die Länge der Primer durch Anhängen eines nicht-homologen 5'Tags modifiziert werden.

Die MS-SNuPE stellt eine Erweiterung der o. g. Methode für den Nachweis von Methylierungszuständen an Bisulfit-behandelter DNA dar. Sowohl für die PCR-Amplifikation als auch für die PV werden die Primer so gewählt, dass sie sowohl an das methylierte als auch das unmethylierte Allel gleichermaßen hybridisieren können. Dafür sollte die Hybridisierungssequenz möglichst keine CpGs enthalten, da diese differentiell methyliert werden. Wenn der Ausschluss von CpGs aufgrund des hohen GC-Gehalts der Zielfragmente nicht möglich ist, werden an den entsprechenden Stellen „Wobble“-Basen in die Primersequenz eingefügt. Um eine Amplifikation nicht konvertierter DNA zu vermeiden, werden die PCR-Primer so gewählt, dass sie an eine Zielsequenz hybridisieren, die mehrere Cytosine enthält, die nicht in CpGs lokalisiert sind. Diese sollten bei einer erfolgreichen Bisulfit-Behandlung auf beiden Allelen konvertiert werden und nur dann ein Annealing der PCR-Primer ermöglichen. Die Primer für die PV werden so gewählt, dass ihr 3'-Ende unmittelbar vor einem CpG hybridisiert (s. Abb. 3.1).

Durch eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der eingebauten ddNTPs kann der Methylierungszustand an diesem CpG bestimmt werden.

Durchführung:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Multiplex-MS-SNuPE Verfahren etabliert, das eine gleichzeitige Analyse der DMRs von acht Loci ermöglicht: *H19* (11p15), *IGF2P0* (11p15), *KCNQ1OT1* (11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *MEG3* (14q32), *PLAGL1* (6q24) sowie *IGF2R* (6q25). Dazu wurde zunächst eine Bisulfit-Behandlung mit 500 ng genomischer DNA durchgeführt, die konvertierte DNA wurde danach in 15 µl Puffer eluiert. Die Amplifikation der Zielfragmente erfolgte in zwei Multiplex-PCRs sowie einer Einzel-PCR unter Verwendung des Multiplex PCR Kits der Firma QIAGEN. Die Multiplex-PCRs wurden mit folgendem Ansatz durchgeführt (Primersequenzen sowie Zusammensetzung der Multiplex-PCRs siehe Anhang Tab. 6.9):

| Reagenz | Menge [µl] |
|----------------------|------------|
| QIAGEN Multiplex Mix | 12,5 |
| Q-Solution (5x) | 2,5 |
| Primer-Mix 1 oder 2 | 2,5 |
| A. dest. | 5,0 |
| Bisulfit-DNA | je 2,5 µl |

Die Einzel-PCR für den *IGF2R*-Locus wurde mit den folgenden Reagenzien angesetzt:

| Reagenz | Menge [µl] |
|----------------------|------------|
| QIAGEN Multiplex Mix | 12,5 |
| Q-Solution (5x) | 2,55 |
| IGF2R F/R (10 µM) | je 1,5 |
| A. dest. | 5,0 |
| Bisulfit-DNA | je 2,0 µl |

Für alle drei PCRs wurde das folgende Programm verwendet:

95°C 15' / (94°C 30'' / 56,5°C 90'' / 72°C 90'') x 35 / 72°C 10' / 15°C

Anschließend wurden je 2 µl aus den beiden Multiplex-PCRs mit 1 µl aus der Einzel-PCR gepoolt und mit ExoSAP-IT® aufgereinigt.

Die PV erfolgte mit dem SNaPshot Multiplex Kit der Firma Applied Biosystems entsprechend den Herstellerangaben. Für jeden der acht o. g. Loci wurden zwei CpGs untersucht. Dazu wurden zwei parallele PVs mit je acht Primern durchgeführt (s. Anhang Tab. 6.10). Es wurden ausschließlich reverse-Primer mit einen Längenunterschied von 4-6 bp und einer Hybridisierungssequenz von 25 bp verwendet. Um die erforderlichen Längenunterschiede zu erhalten, wurden einige der Primer mit einem t-Tag am 5'-Ende versehen.

Um eine unspezifische Anlagerung weiterer ddNTPs an die verlängerten Primer zu vermeiden, wurde nach der PV eine Behandlung mit 1U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) für 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 75°C für 15 min abgestoppt. Zur Auftrennung und Quantifizierung der PV-Produkte wurde eine Kapillargelelektrophorese mit dem automatischen Sequenzierer AB3130 durchgeführt. Die PV-Produkte wurden dazu zunächst 1:5 mit A. dest. verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 0,5 µl mit 9,4 µl Hi-Di™ Formamid sowie 0,1 µl GeneScan™-120 LIZ Size Standard versetzt und vor der Analyse für 3 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auswertung erfolgte mit der GeneMapper v4.0-Software unter Verwendung eines modifizierten Analyseprotokolls. Der Sequenzierer AB3130 wurde mit dem SNaPshot® Matrix Standard Set DS-02 (Applied Biosystems) für die Analyse der MS-SNuPE-Produkte kalibriert.

Zur Bestimmung des Methylierungsindex (MI) der Ziel-CpGs wurden die mit Hilfe der GeneMapper Software ermittelten Peakflächen für das methylierte und das unmethylierte Allel nach folgender Formel miteinander verrechnet:

$$\text{MI} = \frac{\text{methyliert}}{\text{methyliert} + \text{unmethyliert}}$$

Um den Vergleich der Ergebnisse aus den beiden PVs sowie aus verschiedenen Bisulfitbehandlungen zu ermöglichen, wurden die MIs der Patientenproben gegen den Mittelwert von drei Kontrollproben normiert. Hierzu wurde der Mittelwert der MIs der Referenzproben gleich 0,5 gesetzt.

3.2.10 MLPA

Mit der MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) kann durch die Auswahl spezifischer Sonden die Kopienzahl von bis zu 50 Zielfragmenten in einer einzigen Reaktion bestimmt werden. Durch eine Ligations-abhängige Amplifikation der Sonden können so Deletionen und Duplikationen in den Zielregionen nachgewiesen werden. Die Sonden bestehen jeweils aus zwei Oligonukleotiden, die unmittelbar benachbart an die Zielsequenz hybridisieren können. Für die PCR-Amplifikation enthalten beide Sondenstücke außerdem eine Primer-Sequenz am Ende, an die ein universelles Primerpaar binden kann. Damit die Fragmente bei der auf kapillargelektrophoretischer Auftrennung und Quantifizierung basierenden Analyse besser voneinander unterscheidbar sind, ist zusätzlich eine unterschiedlich lange Stuffer-Sequenz zwischen den hybridisierenden Sonden und die Primersequenz eingefügt, so dass Fragmente einer Länge von 130-480 bp entstehen.

Bei der MLPA erfolgt im ersten Reaktionsschritt eine Hybridisierung der beiden Sonden an die Zielsequenz. Diese ist jedoch nur möglich, wenn die Zielsequenz 100%ig komplementär zur Sondensequenz ist, d. h. schon eine Punktmutation im Zielbereich kann dazu führen, dass die Hybridisierung eines Sondenstücks fehlschlägt. Nach der Hybridisierung werden die beiden Sondenstücke durch eine thermostabile Ligase zusammenligiert. Die Ligation kann jedoch nur erfolgen, wenn beide Sondenstücke an ihre Zielsequenz gebunden sind. In der anschließenden PCR werden die Ligationsprodukte mit einem universellen Primerpaar amplifiziert. Dabei ist die Menge des entstehenden PCR-Produkts pro Sondenpaar proportional zur Menge der im Hybridisierungsschritt an die jeweilige Zielsequenz gebundenen und danach erfolgreich zusammenligierten Sonden. Liegt in der Zielregion eine Deletion oder Punktmutation vor, entsteht dadurch weniger PCR-Produkt, bei einer Duplikation der Zielsequenz verhält es sich entsprechend umgekehrt. Zur Auftrennung und Quantifizierung der PCR-Produkte für die verschiedenen Zielregionen wird eine Kapillargelektrophorese durchgeführt. Durch eine Fluoreszenzmarkierung der Primer kann so die Menge der PCR-Produkte bestimmt werden. Zum Nachweis von Deletionen und Duplikationen erfolgt einerseits eine Verrechnung der Fluoreszenzintensitäten für Zielregionen und Kontrollregionen innerhalb einer Probe. Zusätzlich wird eine Verrechnung von Patienten gegen mindestens drei gesunde Kontrollen durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass die DNA der Referenzproben möglichst aus demselben Gewebe isoliert worden sein sollte, da es sonst zu Problemen bei der Berechnung führen kann.

3.2.10.1 MS-MLPA

Eine spezielle Form der MLPA-Methode ist die methylierungs-spezifische (MS)-MLPA. Sie ermöglicht neben dem Nachweis von Kopienzahlveränderungen zusätzlich die Detektion von Methylierungsveränderungen in den gewählten Zielregionen. Dazu wird während der Ligationreaktion ein methylierungs-sensitives Restriktionsenzym (z. B. HhaI) in die Reaktion eingesetzt, welches nicht-methylierte DNA schneiden kann. Bei einer Untermethylierung in einer bestimmten Zielregion werden infolgedessen weniger Sondenmoleküle ligiert und in der anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert, so dass sich eine reduzierte Menge an PCR-Produkt ergibt. Dementsprechend wird bei einer Übermethylierung durch eine Ligation von mehr Sondenmolekülen mehr PCR-Produkt für das Zielfragment entstehen.

Mit der MS-MLPA können so bei den SRS-Patienten neben Deletionen/Duplikationen in der Zielregion 11p15 auch Methylierungsveränderungen in den beiden ICRs in 11p15 nachgewiesen werden. Außerdem kann durch eine kombinierte Analyse des Methylierungsstatus beider ICRs und der Kopienzahl in der Region 11p15 der Nachweis einer maternalen uniparentalen Disomie 11p15 erfolgen, da hier gleichzeitig eine Hypomethylierung der ICR1 und eine Hypermethylierung der ICR2 vorliegt.

Durchführung:

Die MS-MLPA für die Analyse der Region 11p15 bei den SRS-Patienten wurde mit dem Kit ME030-BWS/RSS der Firma MRC Holland nach den Herstellerangaben durchgeführt. In die Reaktion wurden pro Patient jeweils 500 ng genomischer DNA eingesetzt. Zur Analyse der Lymphozyten- bzw. Mundschleimhaut-DNA der SRS-Patienten wurden als Kontrollproben jeweils drei aus dem gleichen Gewebe isolierte DNAs verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel getestet. Die Auftrennung und Analyse der PCR-Produkte wurde mit dem automatischen Sequenzierer AB3130 und mit der GeneMapper v4.0-Software durchgeführt. Die vergleichende Quantifizierung zur Bestimmung von Kopienzahl und Methylierungsgrad der Zielfragmente erfolgte mit Hilfe der Coffalyser v9.4 Software der Firma MRC-Holland.

3.2.10.2 MLPA-Sondendesign

Mittlerweile sind zahlreiche kommerziell erhältliche (MS-)MLPA-Kits der Firma MRC Holland verfügbar. Die darin enthaltenen Sonden sind jedoch in der Regel so gewählt, dass sie eine Analyse der Zielregionen für bestimmte Erkrankungen erlauben. Zur Untersuchung von Bereichen, die dadurch nicht abgedeckt werden, können selbst generierte Sonden in Verbindung mit von der Firma angebotenen Referenz-Kits verwendet werden. Diese enthalten die für die MLPA-Analyse nötigen Kontrollfragmente. Dazu gehören Kontrollsonden, die in der Regel eine normale Kopienzahl aufweisen sowie Methylierungskontrollsonden, die eine Kontrolle des Restriktionsverdau bei der MS-MLPA ermöglichen. Sie sind gegen unmethylierte DNA-Bereiche gerichtet und sollten infolgedessen nach dem Verdau mit *Hha* I kein Signal mehr erzeugen.

Durchführung:

Das Design der eigenen MS-MLPA-Sonden wurde mit Hilfe der Anleitung „Designing synthetic MLPA probes“ der Firma MRC Holland (<http://www.mlpa.com>) durchgeführt. Als Referenzkit wurde das Kit P300-Reference-2 verwendet. Dieses enthält 15 Kontrollsonden für die Bestimmung der Kopienzahl sowie eine Methylierungskontrollsonde.

In der vorliegenden Arbeit wurden selbst generierte MLPA-Sonden für die Überprüfung der GRB10 DMR bei einem SRS-Patienten verwendet. Die Sequenzen der Sonden sind in Tabelle 6.8 im Anhang aufgeführt. Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma IDT[®] Integrated DNA Technologies bezogen.

Die Auswertung der MS-MLPA erfolgte mit der Software MLPA[®] der Firma JSI medical systems GmbH (Kippenheim, D) unter Verwendung eines modifizierten Panels für das Kit P300, in das die selbst generierten zusätzlichen Sonden integriert wurden.

3.2.11 DNA-Mikroarrays

Neben den o. g. (epi)genetischen Veränderungen sind bei einzelnen Patienten mit SRS-Merkmalen auch strukturelle chromosomale Veränderungen berichtet worden. Der Nachweis dieser Umbauten war bisher durch die Verwendung konventionell-zytogenetischer Methoden auf die Darstellung lichtmikroskopisch sichtbarer Veränderungen mit einer Größe von mehr als 5 Mb beschränkt. In den letzten Jahren wird zunehmend die Mikrorarray-Technologie eingesetzt, um submikroskopische chromosomale Veränderungen wie Deletionen und Duplikationen nachzuweisen.

Prinzip der Array-Analytik und Array-Typen

Bei DNA-Mikroarrays handelt es sich um Glasoberflächen, die in mehrere Hundert bis zu mehrere Millionen einzelne Felder unterteilt werden, auf die DNA-Moleküle mit unterschiedlichen Sequenzen, so genannte Marker, immobilisiert werden. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Amplifikation und einem Labeling der Patienten-DNA, der Hybridisierung der gelabelten Probe auf den Array und anschließender Detektion unterschiedlich starker Fluoreszenzsignale auf den einzelnen Feldern in Abhängigkeit von der Menge der gebundenen DNA-Moleküle.

Die Fluoreszenzintensitäten auf den einzelnen Feldern werden durch eine umfangreiche Bioinformatik untereinander verrechnet und so die Kopienzahl für die einzelnen Marker bestimmt bzw. Marker mit gleicher Kopienzahl zu Segmenten zusammengefasst. Durch die Verwendung spezieller Annotation Files, die Informationen zur genomischen Position jedes einzelnen Markers auf dem Array enthalten, können die Segmente entsprechenden Regionen im Genom zugeordnet werden.

Das tatsächliche Auflösungsvermögen eines Mikroarrays hängt von der Art, der Anzahl und der Verteilung der verwendeten Marker über das Genom ab. Derzeit werden sowohl BAC-Arrays, die mit Klonen einer Größe von 100-250 kb beschickt sind als auch Oligo-Arrays mit 25-85 bp großen Oligonukleotid-Markern verwendet. Der Vorteil der Verwendung kleinerer Marker liegt darin, dass eine höhere Auflösung und damit eine feinere Kartierung der Bruchpunkte erreicht werden kann, allerdings verringert sich mit abnehmender Größe der Oligos die Spezifität der einzelnen Marker und das Risiko von Fehlhybridisierungen nimmt zu. Deswegen werden bei Verwendung von Oligo-Arrays im Gegensatz zu BAC-Arrays keine Einzelmarker-Aussagen bewertet, sondern immer die Summe mehrerer Marker innerhalb

eines Bereichs. Abhängig von der Verteilung der Marker unterscheidet man außerdem Arrays, die durch eine gleichmäßige Verteilung der Marker das gesamte Genom abdecken und so genannte *targeted Arrays*, bei denen nur bestimmte genomische Bereiche, wie beispielsweise Regionen mit bekannten Mikrodeletionssyndromen abgefragt werden.

Je nach Arraytyp sind zur Berechnung von der Norm abweichender Kopienzahlen anhand von Unterschieden in der Fluoreszenzintensität einzelner Bereiche eine bestimmte Anzahl an Referenzproben nötig, deren Fluoreszenzintensität als normal definiert wird. Während bei der Array CGH ein direkter Vergleich von Patienten- und Kontrollprobe durch eine gleichzeitige Hybridisierung auf demselben Array erfolgt, muss bei SNP-Arrays ein in-silico Vergleich mit Referenzproben über eine bioinformatische Analyse erfolgen. Die dazu benötigten Referenzproben können entweder aus bereits durch andere Arbeitsgruppen analysierten Kollektiven wie dem HapMap-Kontrollkollektiv entnommen werden oder durch Durchführung von Array-Analysen im eigenen Labor mit einer bestimmten Anzahl von Kontrollproben erhalten werden. Letztere Verfahrensweise ist dann zu empfehlen, wenn der störende Einfluss eines spezifischen „Laborfingerabdrucks“ auf die Arraydaten vermieden werden soll, der zu einer erhöhten Anzahl falsch positiver Ergebnisse bei der Verrechnung mit externen Kontrollproben führen kann.

Nach der bioinformatischen Analyse der Rohdaten werden von der Software Qualitätsparameter ausgegeben, die Aufschluss über die Zuverlässigkeit der berechneten Daten geben. Bei den beiden unten genannten Arraysystemen sind für eine zuverlässige Bestimmung der Kopienzahl insbesondere zwei Parameter von Bedeutung, die ein Maß für die Streuung der Werte für die einzelnen Marker untereinander angeben: die MAPD (*Median Absolute Pairwise Difference*) und die *waviness sd*. Liegen diese Werte oberhalb eines bestimmten Grenzwertes, liegt ein erhöhtes Hintergrundrauschen beim analysierten Array vor, was auf Fehler bei der Durchführung des Versuchs oder Probleme mit der DNA-Qualität hinweist.

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Kopienzahlveränderungen, die mit Mikroarrays nachgewiesen werden, werden allgemein als *copy number variations* (CNVs) bezeichnet. Diese Bezeichnung ist neutral bezüglich der Pathogenität und Häufigkeit einer Veränderung. Man schätzt, dass es pro Person 12-250 CNVs unterschiedlicher Größe gibt, die insgesamt 40-360 Mb des Genoms betreffen. Die Bewertung einer CNV hinsichtlich ihrer Pathogenität ist ein komplexer Prozess, bei dem viele

Details zu beachten sind (s. Abb. 3.2). Dazu gehören der Vergleich mit eigenen und online verfügbaren Kontrollkollektiven wie der *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) und mit Datenbanken für bekannte Mikrodeletions-/duplikationssyndrome sowie Patientenbeschreibungen wie der DECIPHER-Datenbank (<http://decipher.sanger.ac.uk/>), eine Überprüfung des Gengehalts einer CNV sowie gegebenenfalls eine Analyse elterlicher Proben. Auf der Basis der so erhaltenen Informationen werden die CNVs in drei Kategorien eingeordnet: (wahrscheinlich) apathogene CNVs, klinisch relevante CNVs und solche mit unbekannter klinischer Signifikanz. Kopienzahlvarianten, die bereits in der DGV-Datenbank oder im eigenen Kontrollkollektiv nachgewiesen wurden, werden als apathogen eingestuft. Familiäre CNVs werden - unter der Voraussetzung, dass der vererbende Elternteil keinen ähnlichen Phänotyp aufweist wie das Kind - generell ebenfalls als eher apathogen gewertet. Aufgrund einer variablen Penetranz und/oder Expressivität kann jedoch auch eine von einem klinisch unauffälligen Elternteil vererbte CNV eine Relevanz für den Phänotyp des Kindes haben.

De-novo entstandene CNVs sollten zum Ausschluss falsch positiver Array-Ergebnisse mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden. Dazu wird je nach Größe und Position der CNV eine qPCR, Mikrosatelliten-Analyse, MLPA oder FISH durchgeführt.

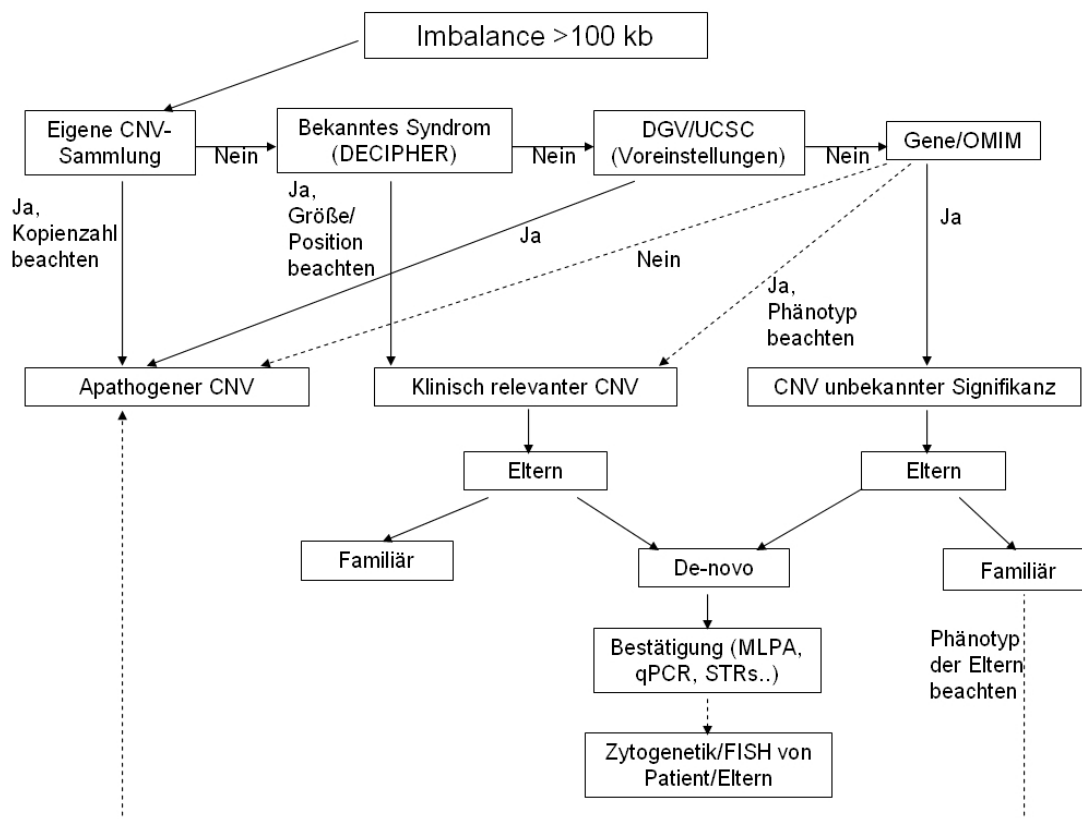


Abb. 3.2: Logarithmus zur Bewertung der Pathogenität von CNVs.

3.2.11.1 Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Im Rahmen einer vorangegangenen Studie (Spengler et al., 2010) wurde das Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Set zum Nachweis submikroskopischer chromosomaler Veränderungen bei SRS-Patienten verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Affymetrix Genome-Wide Human SNP-Array 6.0 etabliert, der mit einer fast vierfach höheren Auflösung eine zuverlässige Detektion von Veränderungen ab einer Größe von 100 kb erlaubt.

Der SNP6.0-Array ist mit ca. 1,8 Millionen 25-meren Oligonukleotid-Markern beschickt, die relativ gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Markern beträgt nur 700 bp, wobei aber die tatsächliche Markerabdeckung in verschiedenen Bereichen des Genoms hoch variabel ist. Etwa die Hälfte der Marker sind polymorphe SNP-Marker, die neben einer Bestimmung der Kopienzahl in den abgedeckten Regionen auch eine Genotypisierung ermöglichen. Dadurch können Homozygotieblöcke nachgewiesen werden, die beispielsweise zum Nachweis von uniparentalen Isodisomien dienen können.

Zur Vorbereitung der Proben wird in zwei parallelen Ansätzen zunächst ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Nsp* I bzw. *Sty* I durchgeführt. Dabei werden Schnittstellen mit 4-Basenpaar-Überhängen erzeugt, an die im nächsten Schritt Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz, so genannte Adaptoren, ligiert werden könnten. Diese dienen als Bindestellen für ein universelles Primerpaar, mit dem in der anschließenden PCR die verdaute DNA amplifiziert wird. Die PCR-Bedingungen sind dabei so gewählt, dass überwiegend Fragmente einer Größe von 200-1100 bp entstehen. Nach der PCR erfolgt eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe von magnetischen Beads. Die gereinigten PCR-Produkte werden durch einen DNaseI-Verdau fragmentiert und durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase mit einem Biotin-Labeling versehen. Dieses dient später der Detektion der auf den Array hybridisierten DNA-Fragmente mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff. Die Fluoreszenzintensitäten für jedes einzelne Feld werden mit Hilfe eines hochauflösenden Scanners detektiert.

Durchführung

Die Mikroarray-Analyse umfasst im Wesentlichen die folgenden Arbeitsschritte: die Probenvorbereitung und die Hybridisierung auf den Array, das Scannen des Arrays, die

bioinformatische Auswertung der Rohdaten sowie die Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Relevanz für das klinische Erscheinungsbild des Patienten.

Die Probenvorbereitung für den SNP6.0-Array erfolgte größtenteils entsprechend den Herstellerangaben. Davon abweichend wurden für den Restriktionsverdau *Fast Digest* Enzyme der Firma Fermentas verwendet, um die Zeit der Probenvorbereitung zu verkürzen. Der Verdau wurde mit folgendem Ansatz für 15 min. bei 37°C durchgeführt:

| Reagenzien | Menge [μ l] |
|---------------------------------------|------------------|
| A. dest. | 12,5 |
| Fast Digest Buffer (10x) | 2 |
| FD <i>Nsp I/Sty I</i> (10 U/ μ l) | 0,5 |
| DNA (50 ng/ μ l) | 5 |

Im Anschluss wurde eine Hitzeinaktivierung bei 65°C für 5 min. durchgeführt.

Die Arbeitsschritte für die Hybridisierung der Proben auf die Arrays und das Scannen der Fluoreszenzintensitäten wurden von der Array-Core-Facility am IZKF des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt.

Die bioinformatische Verarbeitung der Rohdaten erfolgte mit der Affymetrix Genotyping Console 4.0 Software unter Verwendung der Annotation Files Version NA30 (hg18/NCBI36) und eines eigenen Kollektivs von 90 Referenzproben (s. 4.3.1.1). Als Grenzwerte der Qualitätsparameter für die Kopienzahlanalyse wurden MAPD <0,3 und *waviness sd* <0,1 festgelegt. Zur Visualisierung und Interpretation der Ergebnisse wurde die Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) v. 1.1 Software verwendet (s. 4.3.1.2).

Für die Auswertung und Interpretation wurden in der Regel nur CNVs mit einer Größe von mindestens 100 kb sowie einem durchschnittlichen Markerabstand von weniger als 5 kb berücksichtigt. Unter Verwendung dieser Parameter wird beim gegebenen Auflösungsvermögen des SNP6.0-Array das Auftreten falsch positiver Ergebnisse größtenteils vermieden. Kleinere aberrante Bereiche in interessanten Zielregionen wurden zusätzlich durch die Verwendung spezieller „Cytoregions-Files“, in denen Kandidatengene und –regionen (s. Anhang Tab. 6.24 und 6.25) hinterlegt wurden, unabhängig von den o. g. Parametern analysiert (s. 4.3.1.2). Die Bewertung der Pathogenität einer CNV wurde anhand des o. a. Schemas durchgeführt.

3.2.11.2 Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array

Als Alternative zum Genome-Wide Human SNP-Array 6.0 wurde ein weiterer Mikroarray der Firma Affymetrix im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array bietet theoretisch mit 2,7 Millionen Oligo-Markern, darunter 400.000 SNP-Markern, eine wesentlich höhere Auflösung als der SNP 6.0 Array. Die Marker sind im Gegensatz zum SNP 6.0 nicht gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt, sondern konzentrieren sich auf Regionen, die Gene enthalten. Durch diese Verteilung und die insgesamt höhere Auflösung soll eine genauere Kartierung der Bruchpunkte sowie der Nachweis kleinerer intragenischer Imbalancen ermöglicht werden. Weitere Vorteile dieses Array-Systems im Vergleich zum SNP 6.0 sind ein kürzerer und vereinfachter Workflow sowie die Möglichkeit der Verwendung einer voranalysierten Referenzdatei. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der kostspieligen und aufwändigen Analyse eigener Kontrollproben.

Die Probenvorbereitung unterscheidet sich grundsätzlich von der beim SNP 6.0. Anstelle von Restriktionsverdau, Adaptor-Ligation und PCR wird eine *Whole Genome Amplification* (WGA) mit 100 ng genomischer DNA durchgeführt. Anschließend wird die DNA mit magnetischen Beads aufgereinigt, fragmentiert und mit einem Biotin-Labeling versehen, welches der späteren Detektion der auf den Array hybridisierten DNA-Fragmente mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff dient.

Durchführung:

Die Probenvorbereitung für den Cytogenetics Array erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Zur Optimierung der Qualität der Analysen wurden verschiedene Verfahren der DNA-Isolation und –Aufreinigung angewandt: Die DNA-Isolation wurde durch Aussalzen sowie mit dem QIAamp DNA Mini Kit und Maxi Kit (QIAGEN), die DNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DNA Mini Kit sowie einer Ethanol- und einer Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt.

Die Arbeitsschritte für die Hybridisierung der Proben auf die Arrays und das Scannen der Fluoreszenzintensitäten wurden von der Array-Core-Facility am IZKF des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt.

Die bioinformatische Analyse der Proben wurde mit der Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) v. 1.1 Software durchgeführt (s. 4.3.1.2). Die Verarbeitung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung der Annotation Files Versionen NA29, NA30 und NA30.1

(hg18/NCBI36). Als Referenz wurde eine von Affymetrix zur Verfügung gestellte Datei mit voranalysierten Daten von 450 HapMap-Kontrollen verwendet.

Als Grenzwerte der Qualitätsparameter für die Kopienzahlanalyse wurden $\text{MAPD} < 0,27$, $\text{waviness segment count} < 50$ und $\text{waviness sd} < 0,1$ festgelegt. Zur Visualisierung und Interpretation der Ergebnisse wurde ebenfalls die ChAS-Software verwendet.

3.2.12 Quantitative Real-Time PCR

Zur Bestätigung von Deletionen oder Duplikationen, die mittels Array-Analysen nachgewiesen werden, kann eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) an genomischer DNA durchgeführt werden. Bei der Real-Time PCR erfolgt parallel zur Amplifikation des Zielfragments eine Quantifizierung des entstandenen PCR-Produkts. Diese erlaubt schließlich Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an genomischer DNA für das jeweilige Zielfragment. Durch eine gleichzeitige Amplifikation und vergleichende Quantifizierung eines oder mehrerer Referenzgene mit bekannter Kopienzahl und eines oder mehrerer Zielgene innerhalb einer Zielregion kann deren Kopienzahl ermittelt werden. Zur Detektion der PCR-Produkte können verschiedene Methoden angewandt werden, dazu gehören die Verwendung von direkt fluoreszenz-markierten Taqman-Sonden sowie die Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green, der in die neu synthetisierten DNA-Stränge interkaliert. Mit steigender Menge an PCR-Produkt nimmt die Stärke des detektierbaren Fluoreszenzsignals zu. Ein Vorteil bei der Verwendung von Sonden ist ihre Spezifität gegenüber dem Zielfragment, während SYBR-Green unspezifisch in alle vorhandenen DNA-Fragmente interkaliert. Der Nachteil liegt in der kostspieligen Herstellung der Sonden, während die Verwendung von SYBR-Green im Vergleich relativ preiswert ist. Aufgrund der Notwendigkeit der i. d. R. nur einmaligen Analyse vieler verschiedener Zielfragmente bei der Bestätigung der Array-Ergebnisse wird aus Gründen der Kostenersparnis in der vorliegenden Arbeit ausschließlich SYBR-Green für die Real-Time PCR verwendet.

Zur relativen Quantifizierung und zur Sicherstellung einer vergleichbaren PCR-Effizienz für Referenz- und Zielgene innerhalb eines Ansatzes wird für jedes Fragment eine Standardreihe mit DNAs bekannter Konzentration angesetzt. Aus der zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessenen Fluoreszenzintensität der verschiedenen DNA-Verdünnungen im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Menge wird eine Standardkurve erstellt. Anhand dieser Standardkurve

kann nun abhängig von der zum selben Zeitpunkt in der Patienten-Probe gemessenen Fluoreszenzintensität eine Quantifizierung der PCR-Produkte für Referenz- und Zielgene erfolgen. Der Nachweis von Deletionen/Duplikationen erfolgt im Anschluss durch eine Verrechnung der Quantität der PCR-Produkte für die Zielgene gegen das Referenzgen.

Durchführung

Zur Durchführung der qPCR wurde der Power-SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zur relativen Quantifizierung wurde eine Standardreihe aus drei DNA-Verdünnungen hergestellt (50 ng/μl, 5 ng/μl, 0,5 ng/μl). Für die Verdünnungen der Standardreihe wurde jeweils ein Doppelansatz und für die Patientenproben jeweils zwei Doppelansätze durchgeführt. Die Doppelansätze mit 20 μl Volumen wurden nach folgendem Schema in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt:

| Reagenz | Menge [μl] |
|------------------------------------------------|------------|
| Power-SYBR Green Master Mix | 10 |
| Primer-Mix (F+R; je 10 μM) | 2 |
| RNase freies H ₂ O | 6 |
| DNA (10 ng/μl) bzw. Standard-Verdünnung (s.o.) | 2 |

Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert, gevortext und erneut abzentrifugiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurden die Doppelansätze jeweils auf zwei Wells einer 96-well-Platte aufgeteilt. Die qPCR wurde mit dem StepOnePlus Gerät der Firma Applied Biosystems mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

95°C 10' / (95°C 15'' / 60°C 1') x 40

Für die relative Quantifizierung und die Bestimmung der Kopienzahl für die Zielfragmente wurde die StepOneTM-Software v2.2.1 (Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzen der für die qPCR zur Bestätigung der Array-Ergebnisse verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 6.11 aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Mutationsanalysen

Zum Nachweis von Punktmutationen wurden die Gene *ZFP57* und *HMGA2* sowie die CpG-Insel 2 des Gens *GRB10* (*GRB10-CPGI2*) mittels direkter Sequenzierung analysiert. Die genomischen Sequenzen sowie Angaben zu den kodierenden Regionen der Gene *ZFP57* und *HMGA2* wurden aus der NCBI-Datenbank übernommen und basieren auf dem Wissensstand von 2009. Die genomische Sequenz der *GRB10-CPGI2* wurde aus der UCSC-Datenbank entnommen.

4.1.1 Mutationsanalyse des Gens *ZFP57*

Das Gen *ZFP57*, das für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodiert, ist in der chromosomalen Region 6p22.1 lokalisiert und umfasst sechs Exons. Durch die Arbeitsgruppe von Mackay et al. wurden 2008 Mutationen in *ZFP57* als Ursache für Hypomethylierungen an multiplen geprägten Loci bei Patienten mit TNDM identifiziert. Um zu überprüfen, ob *ZFP57*-Mutationen auch ursächlich für die Hypomethylierung in der ICR1 bei den SRS-Patienten sein könnten, wurde *ZFP57* bei 30 Patienten mit dieser Epimutation auf Punktmutationen untersucht.

Dazu wurden die sechs Exons von *ZFP57* mittels direkter Sequenzierung analysiert, um spezifische Änderungen der Basenabfolge nachzuweisen. Die Sequenzierung des *ZFP57*-Gens wurde in Zusammenarbeit mit Frau Magdalena Gogiel durchgeführt. Die für die PCR und die Sequenzierung verwendeten Primersequenzen sowie die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.1 und 6.14 im Anhang aufgeführt. Die Positionsangaben der detektierten Varianten beziehen sich auf die Sequenz gi:19572781.

In den 30 SRS-Patienten wurde neben sechs bekannten Polymorphismen bei einem Patienten Homozygotie für eine bisher nicht beschriebene Variante in Exon 6 nachgewiesen (Spengler et al., 2009).

4.1.1.1 Bekannte SNPs des Gens *ZFP57*

Bei der Sequenzierung von *ZFP57* wurden sechs bereits in Datenbanken beschriebene SNPs nachgewiesen. Die Häufigkeiten der bei den Sequenzierungen der 30 SRS-Patienten gefundenen Genotypen für die verschiedenen SNPs entsprachen weitestgehend den Literaturangaben aus Kontrollkollektiven (s. Tab. 4.1).

| Exon | SNP | Literaturangaben Genotyp-Häufigkeit | Eigene SRS-Patienten Genotyp-Häufigkeit (n=30) |
|------|----------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1 | rs2747432 C>G | k.A. | C/C 0,700 (21/30) C/G 0,267 (8/30) G/G 0,034 (1/30) |
| 2 | rs55693745 T>C | T/T 0,917 T/C 0,083 | T/T 0,934 (28/30) T/C 0,067 (2/30) |
| | rs2535238 G>T | G/G 0,562 G/T 0,384 T/T 0,054 | G/G 0,700 (21/30) G/T 0,267 (8/30) T/T 0,034 (1/30) |
| | rs2747421 G>C | G/G 0,517 G/C 0,417 C/C 0,067 | G/G 0,634 (19/30) G/C 0,334 (10/30) C/C 0,034 (1/30) |
| 6 | rs2535241 A>T | A/A 0,967 A/T 0,017 | A/A 0,867 (26/30) A/T 0,134 (4/30) |
| | rs61730327 T>C | C/T 0,028 T/T 0,972 | C/T 0,034 (1/30) T/T 0,967 (29/30) |

Tab. 4.1 : Häufigkeiten der detektierten SNPs des Gens *ZFP57*.

4.1.1.2 Unbekannte Variante g.124723C>T

Bei einem der 30 sequenzierten SRS-Patienten wurde Homozygotie für eine bisher nicht in Datenbanken hinterlegte Variante in Exon 6 des *ZFP57*-Gens nachgewiesen. Die Transition g.124723C>T führt zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin zu Glutamin (p.R125Q) innerhalb einer nicht konservierten Region von *ZFP57*. Die Variante konnte bei den Eltern des Patienten in heterozygoter Form ebenfalls detektiert werden (s. Abb. 4.1).

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz dieses Austauschs für das SRS wurden 80 normalwüchsige Kontrollpersonen untersucht. Dazu wurde am PCR-Produkt des Fragments 6.2 ein Restriktionsverdau mit *Taq* I und anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Anhand des Fragmentmusters nach dem Verdau konnte Heterozygotie für die Variante in Exon 6 in zwei von 80 Kontrollpersonen (2,5 %) nachgewiesen werden.

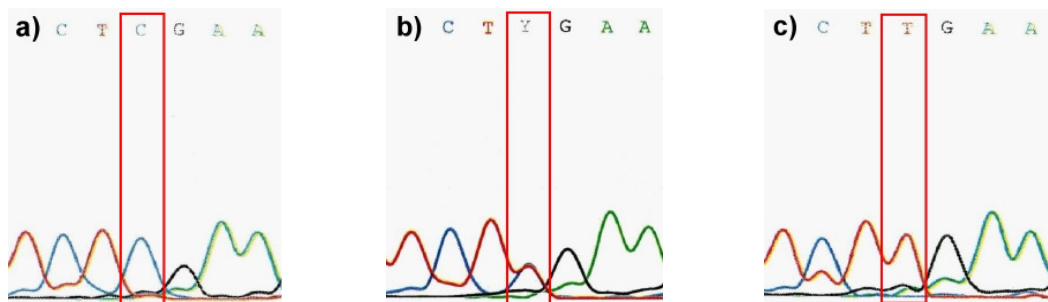


Abb. 4.1: Darstellung der Variante g.124723C>T: Sequenzierung mit Sinn-Primer **a)** des Wildtyp-Genotyps C/C **b)** des heterozygoten Genotyps C/T **c)** des homozygoten Genotyps T/T.

4.1.2 Mutationsanalyse des Gens *HMGA2*

Bei einem SRS-Patienten war im Rahmen einer vorangegangenen Studie (Spengler, 2008; Spengler et al., 2010) eine Mikrodeletion in der chromosomalen Region 12q14 identifiziert worden. In der Literatur wurden bereits ähnliche Mikrodeletionen in dieser Region bei weiteren Patienten mit SRS-ähnlichem Phänotyp beschrieben (zur Übersicht: Lynch et al., 2011). Innerhalb des deletierten Bereichs war unter anderem das Gen *HMGA2* lokalisiert.

Mutationen in diesem Gen wurden ebenfalls bei Mäusen mit Wachstumsretardierung identifiziert (Ashar et al., 1995), so dass anzunehmen ist, dass dieser Faktor eine Rolle bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen spielt.

Um zu überprüfen, inwieweit Punktmutationen in *HMGA2* eine Rolle für die Ätiologie des SRS spielen, wurde die kodierende Sequenz der Exons 1-5 dieses Gens bei 20 idiopathischen SRS-Patienten mittels direkter Sequenzierung analysiert. Die für die PCR und die Sequenzierung verwendeten Primersequenzen sowie die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.2 und 6.15 im Anhang aufgeführt.

Bei der Sequenzierung von *HMGA2* wurden im gewählten Kollektiv weder bekannte Polymorphismen noch unbekannt Varianten nachgewiesen (Spengler et al., 2010).

4.1.3 Mutationsanalyse der *GRB10*-CPGI2

Eine Beteiligung des Faktors GRB10 an der Ätiologie des SRS wird immer wieder diskutiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass paternale Deletionen in der *Grb10* DMR (*GRB10*-CPGI2) bei Mäusen zu einer Maternalisierung des Expressionsmusters der durch diese DMR kontrollierten Gene und infolgedessen zu einer prä- und postnatalen Wachstumsretardierung führen (Shiura et al., 2009).

Zum Nachweis von Deletionen oder Punktmutationen wurde aufgrund dessen die *GRB10*-CPGI2 von 20 SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung sowie 20 idiopathischen SRS-Patienten mittels direkter Sequenzierung analysiert. Die für die PCR und die Sequenzierung verwendeten Primersequenzen sowie die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.3 und 6.16 im Anhang aufgeführt. Die Positionsangaben der detektierten Varianten beziehen sich auf die Sequenz gi:6560937.

In vier der 40 sequenzierten SRS-Patienten (10 %) wurde Heterozygotie für dieselben drei bisher nicht in Datenbanken hinterlegten Varianten nachgewiesen. Zur Überprüfung der Varianten wurde die Region bei 31 normalwüchsigen Kontrollpersonen direkt sequenziert. Weiterhin wurde zur Bestätigung und Frequenzbestimmung für eine der Varianten ein Restriktionsverdau an Patienten- sowie weiteren 42 Kontrollproben durchgeführt.

4.1.3.1 Nachweis unbekannter Varianten in der *GRB10*-CPGI2

Bei drei idiopathischen SRS-Patienten sowie einem Patienten mit ICR1-Hypomethylierung wurden dieselben drei bisher nicht in Datenbanken beschriebenen Varianten identifiziert (s. Abb. 4.2). Diese lagen bei allen vier Patienten in heterozygoter Ausprägung vor. Eine der Varianten (g.42102G>C) liegt in einem evolutionär konservierten Bereich der *GRB10*-CPGI2. Da bei allen vier Patienten dieselben drei Varianten beobachtet werden konnten, kann von einer gekoppelten Vererbung ausgegangen werden.

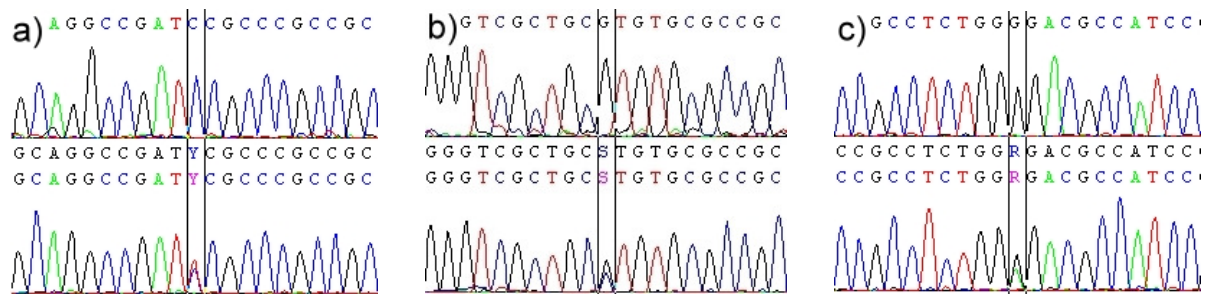


Abb. 4.2: Darstellung der bei der Sequenzierung der *GRB10*-CPGI2 gefundenen unbekanntenen Varianten **a)** g.41986C>T, **b)** g.42102G>C, **c)** g.42325G>A (oben ist jeweils die Wildtyp-Sequenz dargestellt und unten Heterozygotie für die Variante).

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz dieser Austausche für das SRS wurden insgesamt 73 normalwüchsige Kontrollpersonen untersucht. Von diesen wurden 31 Proben mittels direkter Sequenzierung analysiert, wobei keine der o. g. Varianten nachgewiesen werden konnte. Die übrigen 42 Kontrollproben wurden zur Identifizierung der Variante g.42325G>A mittels Restriktionsverdau des Fragments 2 mit dem Enzym *BsmF* I und anschließender Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Anhand des Fragmentmusters nach dem Verdau konnte die Variante bei den Patienten bestätigt und bei zwei Kontrollpersonen ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung der Fragmente 1 und 2 bestätigte das heterozygote Vorliegen der Variante g.42325G>A sowie der beiden anderen Varianten bei den beiden Kontrollproben. Insgesamt wurden die drei unbekanntenen Varianten mit einer Frequenz von 2,7 % (2 von 73) im Kontrollkollektiv und 10 % (4 von 40) im Patientenkollektiv nachgewiesen.

4.2 Nachweis von (Epi)mutationen bei SRS-Patienten

4.2.1 Nachweis von ICR1-Hypomethylierungen mittels MS-MLPA an Mundschleimhaut-DNA

Die MS-MLPA ist mittlerweile eine Standardmethode zum Nachweis einer Hypomethylierung der ICR1 in 11p15, die bei ca. 40 % der SRS-Patienten beobachtet werden kann. Diese Epimutation liegt wahrscheinlich aufgrund einer postzygotischen Entstehung meist als Mosaik bei den Patienten vor. In der Routinediagnostik wird in der Regel DNA aus Lymphozyten für die MS-MLPA-Analyse verwendet. Es ist daher vorstellbar, dass Mosaik, die andere Gewebe bzw. andere Zellsysteme betreffen, möglicherweise der routinediagnostischen Detektion entgehen.

Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine MS-MLPA an DNA aus Mundschleimhautabstrichen von 37 idiopathischen SRS-Patienten durchgeführt. Weiterhin wurde zur Überprüfung inwieweit eine initial in Lymphozyten nachgewiesene ICR1-Hypomethylierung in Mundschleimhaut ebenfalls nachweisbar ist außerdem Mundschleimhaut-DNA von 16 Epimutationsträgern untersucht. Soweit verfügbar wurden Proben von beiden Wangenseiten analysiert, um Mosaik der beiden Körperseiten zu detektieren. Als Referenzen für die Berechnung der MS-MLPA-Ergebnisse wurden DNA-Proben aus Mundschleimhaut von vier normalwüchsigen Kontrollpersonen verwendet.

Zur Analyse des Methylierungszustandes der ICR1 wurden Methylierungsindizes (MIs) berechnet, indem der Mittelwert der methylierungs-spezifischen Sonden für die Region durch den Mittelwert der Dosis-spezifischen Sonden dividiert wurde. Bei einer normalen Kontrollperson ergibt sich aus dieser Berechnung ein MI von ungefähr 1, bei einer Hypomethylierung schwankt der MI je nach Ausprägung des Mosaiks um einen Wert von 0,5. Nach Durchführung der MS-MLPA konnten die Ergebnisse von 21 der insgesamt 53 untersuchten Proben aufgrund zu schlechter DNA-Qualität bzw. zu geringer DNA-Menge nicht ausgewertet werden. Bei den übrigen acht Patienten mit zuvor in Lymphozyten nachgewiesener ICR1-Hypomethylierung konnte die Epimutation in der Mundschleimhaut bestätigt werden (s. Abb. 4.3). Dabei wurden geringe Unterschiede im Grad der Hypomethylierung zwischen den Proben der beiden Wangenseiten sowie der Lymphozyten-DNA festgestellt (s. Tab. 6.21 im Anhang).

4.2.2 Etablierung einer MS-PCR für den *GRB10*-Locus in 7p12

Bei 7-10% der SRS-Patienten kann eine upd(7)mat nachgewiesen werden: Neben vollständigen UPDs, die das gesamte Chromosom 7 betreffen, werden bei einigen Patienten auch segmentale UPDs des langen Arms von Chromosom 7 beobachtet, die immer mindestens die Kandidatenregion mit dem geprägten *MEST*-Locus in 7q32 einschließen. In der Routinediagnostik wurde bisher eine MS-PCR für den *MEST*-Locus zum Nachweis einer upd(7)mat sowie isolierter Methylierungsveränderungen am *MEST*-Locus angewandt. Zur Bestätigung auffälliger Ergebnisse und zur Unterscheidung segmentaler von vollständigen UPDs wurde eine Mikrosatelliten-Analyse durchgeführt.

Innerhalb der Region 7p12 befindet sich der geprägte *GRB10*-Locus, der ebenfalls eine Kandidatenregion für das SRS darstellt. Die parallele Durchführung einer MS-PCR für die beiden o. g. geprägten Loci sollte eine Unterscheidung zwischen vollständiger und segmentaler upd(7)mat ermöglichen. Zusätzlich erlaubt sie den Nachweis isolierter Methylierungsveränderungen am *GRB10*-Locus.

Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei MS-PCRs für den *GRB10*-Locus in Anlehnung an ein Protokoll von Mackay *et al.* (2008) etabliert. Die MS-PCRs wurden an bisulfit-behandelter genomischer DNA mit spezifischen Primern für die beiden elterlichen Allele durchgeführt. Bei Vorhandensein beider elterlicher Allele sollten bei der MS-PCR „GRB10_1“ zwei unterschiedlich große Produkte von 185 bp beim maternal methylierten Allel und 190 bp beim paternal unmethylierten Allel entstehen; bei der MS-PCR „GRB10_2“ sollte das maternal methylierte Allel eine Größe von 264 bp und das paternal unmethylierte Allel eine Größe von 284 bp haben. Die Analyse der entstandenen Fluoreszenz-markierten Fragmente wurde mit dem Sequenzierer AB3130 durchgeführt.

Die für die PCRs verwendeten Primersequenzen sowie die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.5 und 6.18 im Anhang aufgeführt.

Das Verfahren wurde an fünf unauffälligen Kontrollproben sowie vier SRS-Patienten mit vollständiger upd(7)mat und einem Patienten mit segmentaler upd(7q)mat validiert. Alle Proben wurden initial mittels MS-PCR für den *MEST*-Locus untersucht, auffällige Befunde wurden mittels Mikrosatellitenanalyse bestätigt. Bei der MS-PCR am *MEST*-Locus sollten bei Vorhandensein beider elterlicher Allele zwei unterschiedlich große Produkte von 104 bp beim paternal unmethylierten Allel und 187 bp beim maternal methylierten Allel entstehen.

Erwartungsgemäß wurde bei allen Patienten mit vollständiger upd(7)mat sowohl bei der MS-PCR für den *MEST*- als auch bei beiden MS-PCRs für den *GRB10*-Locus nur das maternal methylierte Allel detektiert (s. Abb. 4.4c). Bei dem Patienten mit segmentaler upd(7q)mat konnten dagegen wie bei den Kontrollproben am *GRB10*-Locus beide elterlichen Allele nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4b), während beim *MEST*-Locus nur das maternal methylierte Allel bei 187 bp sowie ein Artefakt-Peak bei 105 bp dargestellt werden konnte. Bei den fünf unauffälligen Kontrollproben konnte eine in etwa gleich starke Amplifikation beider elterlicher Allele nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4a).

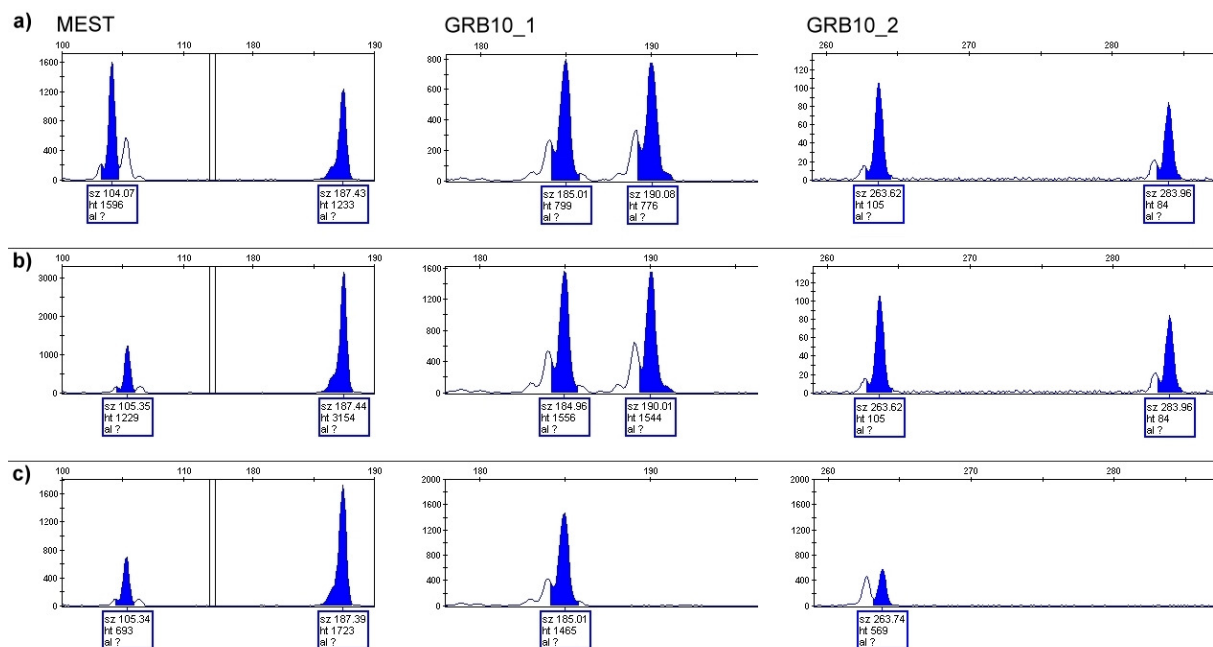


Abb. 4.4: Darstellung der Fragmentanalyse nach den MS-PCRs für den *MEST*- und *GRB10*-Locus bei **a)** einer Kontrollprobe **b)** einem Patienten mit segmentaler upd(7q)mat und **c)** einem Patienten mit vollständiger upd(7)mat.

Im Verlauf der routinediagnostischen Anwendung der MS-PCR GRB10_1 wurde eine isolierte Hypermethylierung bei einem SRS-Patienten identifiziert (s. 4.4.1). Daraufhin wurden weitere 30 idiopathische Patienten auf isolierte Methylierungsstörungen am *GRB10*-Locus untersucht; es konnte jedoch bei keinem weiteren Patienten ein verändertes Methylierungsmuster beobachtet werden.

4.2.3 Etablierung von MS-SNuPE zum Nachweis von Epimutationen

Neben den für die verschiedenen Imprintingkrankungen bekannten, spezifischen (Epi)mutationen wurden in letzter Zeit bei einigen Patienten Methylierungsstörungen an multiplen geprägten Loci beschrieben (s. 2.3.3). Die derzeit in der Routinediagnostik bei Patienten mit klinischem Verdacht auf SRS verwendeten Nachweisverfahren beschränken sich auf die beiden DMRs auf Chromosom 7 (*MEST*, *GRB10*) sowie die *H19* DMR und die *KCNQ1OT1* DMR auf Chromosom 11 und erlauben teilweise keine genaue Quantifizierung des Methylierungszustands (s. 3.2.8.1, 3.2.8.2 sowie 3.2.10.1). Neben Hypomethylierungen der *H19* DMR sind bei einzelnen SRS-Patienten auch isolierte Hypomethylierungen der *IGF2* DMR (*IGF2P0*) in der ICR1 in 11p15 berichtet (Bartholdi et al., 2009; Gronskov et al., 2011). Mit den derzeit in der Routinediagnostik verwendeten Verfahren werden diese jedoch nicht erfasst.

Zum Nachweis von MLMD bei den SRS-Patienten sowie zur routinemäßigen Testung der *IGF2* DMR wurde aufgrund dessen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein MS-SNuPE Assay etabliert, der sowohl die gleichzeitige Analyse verschiedener geprägter Loci als auch eine zuverlässige Quantifizierung des Methylierungsstatus ermöglichen sollte. Dazu wurden die DMRs der folgenden Loci ausgewählt: *H19* (11p15), *IGF2P0* (11p15), *KCNQ1OT1* (11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *MEG3* (14q32), *PLAGL1* (6q24) sowie *IGF2R* (6q25). Die für die Analyse der acht Loci verwendeten PCR- und PV-Primer sind in den Tabellen 6.9 und 6.10 im Anhang aufgeführt.

Zur Validierung des neu etablierten Assays wurden 14 Patientenproben sowie 4 Kontrollproben verwendet. Bei den Patienten waren im Vorfeld bereits mit anderen Methoden Methylierungsstörungen, UPDs oder Deletionen/Duplikationen identifiziert worden, die einen oder mehrere der o. g. geprägten Loci betrafen. Zusätzlich wurde eine Titrationsreihe mit verschiedenen Verdünnungen aus vollständig methylierter und unmethylierter DNA erstellt, um die Genauigkeit der Quantifizierung zu bestimmen.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden mit jeder Probe zwei unabhängige Bisulfitbehandlungen durchgeführt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Loci, Primerverlängerungsreaktionen (PVs) und Bisulfitbehandlungen sowie eine Vereinheitlichung der Auswertung zu erreichen, wurde eine Normierung der Rohdaten vorgenommen. Dazu wurden verschiedene Varianten der Berechnung getestet.

4.2.3.1 Etablierung der PCRs und der Primerverlängerungsreaktionen

Zur PCR-Amplifikation der Fragmente für die MS-SNuPE-Analyse der acht Loci wurden zehn verschiedene Multiplex-Ansätze getestet. Schließlich wurden die Fragmente zu zwei Multiplex-PCRs und einer Einzel-PCR kombiniert (s. Tab. 6.9 im Anhang).

Die Primer für die Primerverlängerungsreaktion wurden mit einem Längenunterschied von 4-6 bp gewählt, da so die beste Auftrennung der Fragmente bei der Kapillarelektrophorese mit dem Sequenzierer AB3130 gewährleistet werden konnte. Der kürzeste PV-Primer hatte dabei eine Länge von 25 bp, der längste von 65 bp. Die tatsächliche Laufweite der Produkte aus der Primerverlängerungsreaktion bei der Kapillarelektrophorese entsprach in der Regel nicht der erwarteten, um ein Nukleotid verlängerten Größe des PV-Primers. Diese Abweichung liegt in der unterschiedlichen Größe der an die ddNTPs gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe begründet. Mit zunehmender Größe der PV-Produkte verringerte sich der Einfluss des Farbstoffs und damit die Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlicher Laufweite. Bei Verwendung von F-Primern (Einbau von ddCTP oder ddTTP) betrug die Abweichung bis zu 15 bp, bei R-Primern (Einbau von ddATP oder ddGTP) war sie dagegen mit 2-6 bp deutlich geringer. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Verwendung von F-Primern die Entstehung unspezifischer Produkte in der PV begünstigt. Aufgrund dessen wurden schließlich nur noch R-Primer verwendet. Da durch einen MS-SNuPE Primer nur der Methylierungsstatus eines Einzel-CpGs analysiert werden kann, wurden für jeden Locus zwei verschiedene, wenn möglich nicht überlappende, PV-Primer ausgewählt. Diese wurden in zwei unabhängigen Primerverlängerungsreaktionen kombiniert, so dass diese je einen Primer für jeden der acht untersuchten Loci enthielten (s. Abb. 4.5). Um die unterschiedlich starke Effizienz der verschiedenen PV-Primer innerhalb eines Ansatzes auszugleichen, wurden diese titriert, um Intensitätsschwankungen bei der Fragmentanalyse zu vermeiden.

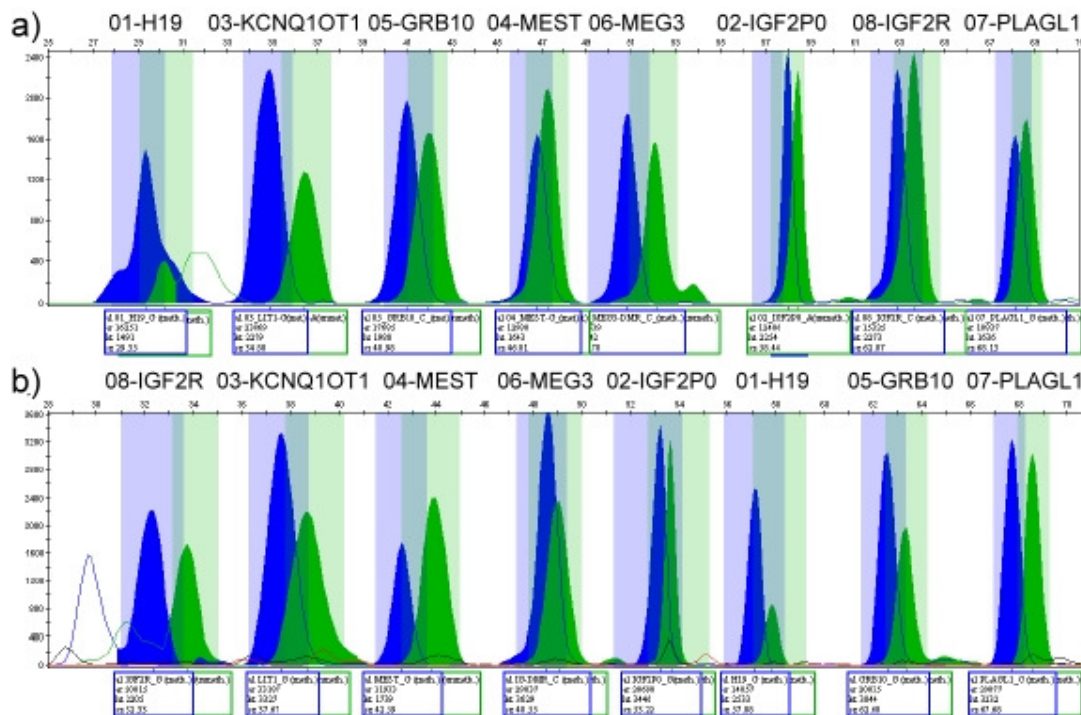


Abb. 4.5: Elektropherogramme der a) PV1 und b) PV2 der MS-SNuPE nach der Fragmentanalyse auf dem Sequenzierer AB3130 und der Auswertung mittels GeneMapper Software. Dargestellt sind die PV-Produkte beider Allele (blaue Peaks: methylierte Allele, grüne Peaks: unmethylierte Allele) für die acht Loci (01-08).

4.2.3.2 Berechnung und Normierung der Methylierungsindizes

Die Methylierungsindizes (MIs) wurden zunächst aus den Rohdaten über die Verrechnung der mit Hilfe der GeneMapper Software bestimmten Peakflächen des methylierten und unmethylierten Allels ermittelt (s. 3.2.9). Danach erfolgte eine Normierung der Daten durch verschiedene Methoden. Für die „Kontrollmethode“ wurden die normierten MIs berechnet, indem der Mittelwert aus den MIs von drei Kontrollproben gleich 0,5 gesetzt wurde und dann die MIs der Patienten durch diesen Wert geteilt wurden. Außerdem wurden zwei weitere Varianten zur Normierung der MIs getestet: eine „all-versus-all“-Berechnung, bei der die MIs der einzelnen Proben jeweils gegen den aus allen anderen Proben ermittelten Mittelwert normiert wurden sowie eine „patient-versus-patient“-Normierung, bei der keine Kontrollproben in die Berechnung einbezogen wurden, sondern nur gegen die Patientenproben normiert wurde. Alle drei Varianten zur Normierung der MIs lieferten nahezu identische Resultate (s. Abb. 6.2 im Anhang.).

4.2.3.3 Validierung des MS-SNuPE Assays an Patientenproben

Zur Validierung des MS-SNuPE Assays wurden die Proben von 14 Patienten und vier Kontrollpersonen untersucht. Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bisulfitbehandlungen sowie die als normal definierten MI-Ranges sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Bei allen Proben konnten die zuvor mit anderen Methoden identifizierten (Epi)mutationen mit dem neu etablierten MS-SNuPE Assay ebenfalls nachgewiesen werden:

| Initiale Diagnose | Chr. 6 | | | | Chr. 7 | | | | Chr. 11 | | | | | | Chr. 14 | |
|---------------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| | IGF2R | | PLAGL1 | | MEST | | GRB10 | | H19 | | IGF2P0 | | KCNQ1OT1 | | MEG3 | |
| | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 | B-1 | B-2 |
| Control 1 | 0,50 | 0,52 | 0,49 | 0,51 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,51 | 0,50 | 0,50 | 0,48 | 0,48 | 0,51 | 0,49 | 0,51 | 0,52 |
| Control 2 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,53 | 0,54 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,49 |
| Control 3 | 0,51 | 0,48 | 0,50 | 0,49 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 0,49 | 0,48 | 0,49 | 0,51 | 0,50 | 0,49 |
| Control 4 | 0,49 | 0,48 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,51 | 0,51 | 0,49 | 0,51 | 0,50 | 0,49 | 0,48 | 0,49 | 0,49 | 0,50 | 0,49 |
| MLMD-1 | 0,19 | 0,18 | 0,50 | 0,52 | 0,05 | 0,06 | 0,48 | 0,49 | 0,21 | 0,18 | 0,23 | 0,23 | 0,11 | 0,14 | 0,51 | 0,49 |
| MLMD-2 | 0,24 | 0,22 | 0,51 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,49 | 0,34 | 0,32 | 0,31 | 0,32 | 0,49 | 0,51 | 0,41 | 0,40 |
| upd(14)pat | 0,52 | 0,51 | 0,52 | 0,50 | 0,49 | 0,49 | 0,51 | 0,52 | 0,51 | 0,51 | 0,52 | 0,53 | 0,50 | 0,49 | 0,82 | 0,83 |
| upd(14)mat | 0,50 | 0,48 | 0,49 | 0,50 | 0,50 | 0,53 | 0,52 | 0,52 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,51 | 0,07 | 0,11 |
| IUGR | 0,81 | 0,81 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,52 | 0,50 | 0,50 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,52 | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,47 |
| upd(7)mat | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,50 | 1,22 | 1,34 | 0,87 | 0,85 | 0,50 | 0,51 | 0,51 | 0,52 | 0,49 | 0,50 | 0,47 | 0,48 |
| upd(7q)mat | 0,48 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 1,22 | 1,33 | 0,51 | 0,52 | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,50 | 0,51 | 0,51 | 0,48 | 0,48 |
| SRS H19 LOM-1 | 0,52 | 0,50 | 0,52 | 0,51 | 0,51 | 0,55 | 0,53 | 0,50 | 0,41 | 0,43 | 0,41 | 0,41 | 0,51 | 0,51 | 0,49 | 0,49 |
| SRS H19 LOM-2 | 0,44 | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,49 | 0,53 | 0,52 | 0,53 | 0,37 | 0,38 | 0,28 | 0,35 | 0,47 | 0,48 | 0,47 | 0,49 |
| SRS dup(11p15.5)mat | 0,51 | 0,49 | 0,50 | 0,52 | 0,49 | 0,54 | 0,50 | 0,51 | 0,46 | 0,46 | 0,40 | 0,42 | 0,56 | 0,57 | 0,49 | 0,49 |
| BWS dup(11p15.5)pat | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,49 | 0,53 | 0,52 | 0,52 | 0,54 | 0,55 | 0,58 | 0,61 | 0,42 | 0,43 | 0,47 | 0,48 |
| BWS KCNQ1OT1 LOM | 0,49 | 0,52 | 0,49 | 0,52 | 0,48 | 0,54 | 0,50 | 0,52 | 0,51 | 0,54 | 0,53 | 0,55 | 0,13 | 0,17 | 0,51 | 0,49 |
| BWS upd(11p15.5)pat | 0,50 | 0,51 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,55 | 0,49 | 0,51 | 0,56 | 0,56 | 0,63 | 0,63 | 0,41 | 0,42 | 0,50 | 0,51 |
| TNDM upd(6)pat | 0,13 | 0,13 | 0,06 | 0,06 | 0,51 | 0,54 | 0,51 | 0,52 | 0,50 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 0,49 | 0,49 |
| Normal MI ranges: | 0,44-0,55 | | 0,44-0,55 | | 0,44-0,55 | | 0,44-0,55 | | 0,47-0,54 | | 0,44-0,55 | | 0,44-0,55 | | 0,44-0,55 | |

Tab. 4.2: MS-SNuPE Ergebnisse der 14 Patienten sowie vier Kontrollen. Dargestellt sind die nach der „Kontrollmethode“ normierten Mittelwerte der MIs aus beiden Primerverlängerungsreaktionen für zwei unabhängige Bisulfitbehandlungen (B-1, B-2) (grün: LOM, rot: GOM).

„MLMD-1“ und „MLMD-2“:

Bei den Patienten MLMD-1 und MLMD-2, die beide einen SRS-Phänotyp aufweisen, wurde initial mittels MS-MLPA eine Hypomethylierung der *H19* DMR festgestellt. Beim Patienten MLMD-1 wurden außerdem mittels MS-MLPA bzw. MS-PCR Hypomethylierungen der DMRs der Loci *KCNQ1OT1*, *MEST* sowie *IGF2R* dargestellt. Der Patient MLMD-2 zeigte ein etwas anderes Methylierungsmuster: neben der *H19* DMR waren hier die *MEG3* sowie die *IGF2R* DMR hypomethyliert. Bei beiden MLMD-Patienten konnten alle Auffälligkeiten mit dem neuen MS-SNuPE Assay bestätigt werden. Zusätzlich wurde bei beiden eine Hypomethylierung der *IGF2* DMR (*IGF2P0*) identifiziert.

„upd(14)mat“/“upd(14)pat“/“upd(6)pat“:

Als Positivkontrollen für Methylierungsstörungen der *MEG3* DMR auf Chromosom 14q32 sowie der *IGF2R* DMR und der *PLAGL1* DMR auf Chromosom 6q25 bzw. 6q24 wurden Patienten mit zuvor mittels MS-PCR und Mikrosatellitenanalyse nachgewiesenen UPDs dieser Chromosomen verwendet. Die Ergebnisse des MS-SNuPE Assays stimmten auch hier mit den zuvor erhobenen Befunden überein: beim Patienten mit upd(14)mat sowie beim Patienten mit upd(6)pat konnte eine nahezu vollständige Hypomethylierung der untersuchten DMRs beobachtet werden, während beim Patienten mit upd(14)pat eine deutliche Hypermethylierung der *MEG3* DMR festgestellt werden konnte.

„IUGR“:

Bei diesem Patienten mit isolierter intrauteriner Wachstumsverzögerung wurde im Vorfeld mittels MS-PCR eine Hypermethylierung der *IGF2R* DMR nachgewiesen. Die MS-SNuPE-Analyse zeigte ebenfalls eine deutliche Hypermethylierung.

„upd(7)mat“/“upd(7q)mat“:

Um zu überprüfen, ob eine upd(7)mat mittels MS-SNuPE nachweisbar und von einer segmentalen upd(7q)mat unterscheidbar ist, wurden zwei SRS-Patienten mit zuvor mittels MS-PCR und Mikrosatelliten identifizierten UPDs als Validierungsproben verwendet. Beim Patienten mit vollständiger upd(7)mat war eine deutliche Hypermethylierung beider Chromosom 7-Loci (*MEST*, *GRB10*) erkennbar während beim Patienten mit upd(7q)mat erwartungsgemäß nur am *MEST*-Locus eine Hypermethylierung zu beobachten war.

SRS und BWS-Patienten:

Zur Validierung der MS-SNuPE Analyse für die DMRs der Loci *H19* und *KCNQ1OT1* sowie *IGF2* wurden einige Proben mit zuvor mittels MS-MLPA für die Region 11p15 nachgewiesenen Auffälligkeiten untersucht. Darunter waren zwei SRS-Patienten mit Hypomethylierung der *H19* DMR (SRS H19 LOM-1/2), ein SRS-Patient mit maternaler Duplikation der Region 11p15 (SRS dup(11p15.5)mat) sowie ein BWS-Patient mit Hypomethylierung der *KCNQ1OT1* DMR (BWS KCNQ1OT1 LOM), ein BWS-Patient mit paternaler UPD11 (BWS upd(11p15)pat) und ein BWS-Patient mit paternaler Duplikation der Region 11p15 (BWS dup(11p15.5)pat).

Bei den SRS-Patienten mit Hypomethylierung der *H19* DMR konnte diese mittels MS-SNuPE bestätigt werden. Bei beiden Patienten wurde außerdem eine Hypomethylierung der *IGF2* DMR festgestellt, die mit dem Methylierungszustand der *H19* DMR korrelierte. Diese Korrelation konnte ebenfalls bei den o. g. MLMD-Patienten beobachtet werden. Auch beim BWS-Patienten mit Hypomethylierung der *KCNQ1OT1* DMR konnte die Epimutation bestätigt werden.

Beim SRS-Patienten mit maternaler Duplikation ist eine verstärkte Amplifikation des unmethylierten Allels der *H19* DMR (und der *IGF2* DMR) sowie des methylierten Allels der *KCNQ1OT1* DMR zu erwarten, da erstere paternal methyliert und letztere maternal methyliert ist. Infolgedessen wurde nach der MS-SNuPE erwartungsgemäß eine relative Hypomethylierung der *H19* und der *IGF2* DMR sowie eine relative Hypermethylierung der *KCNQ1OT1* DMR nachgewiesen. Bei den BWS-Patienten mit paternaler Duplikation und UPD verhält sich das Methylierungsmuster entsprechend umgekehrt.

Der mit MS-SNuPE nachgewiesene unterschiedliche Grad der Hypomethylierung am *H19* Locus bei den verschiedenen SRS-Patienten korrelierte mit zuvor mittels MS-MLPA und MS-Pyrosequenzierung erhobenen Daten (s. Abb. 4.6). Die Ergebnisse der MS-Pyrosequenzierung wurden einer vorangegangenen Studie entnommen (Leisten, 2010).

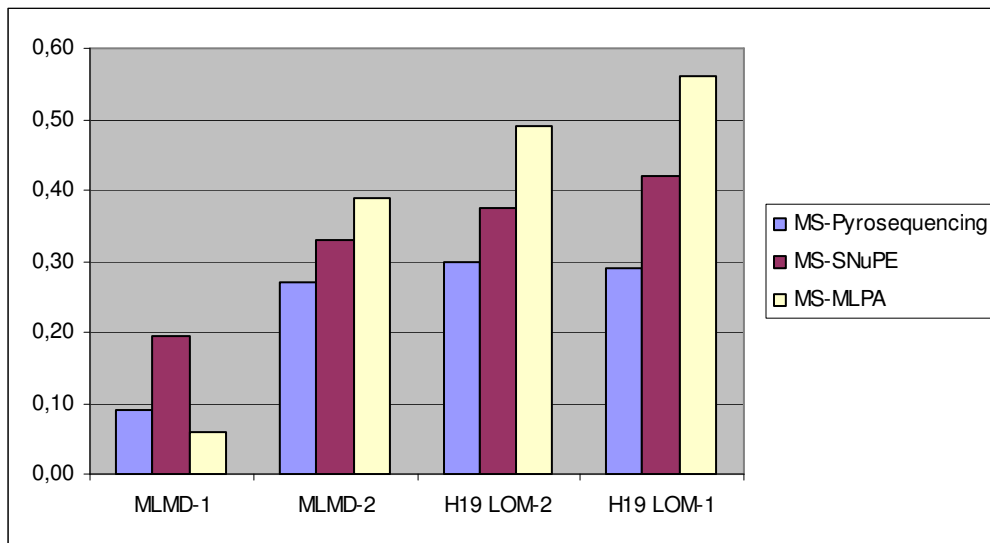


Abb. 4.6: Darstellung der mit MS-Pyrosequenzierung, MS-SNuPE sowie MS-MLPA ermittelten Methylierungsindizes am *H19*-Locus bei vier SRS-Patienten mit unterschiedlich starker Hypomethylierung der *H19* DMR. Für die MS-SNuPE ist der Mittelwert aus beiden Primerverlängerungsreaktionen dargestellt.

4.2.3.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des MS-SNuPE Assays wurden mit jeder Probe zwei unabhängige Bisulfitbehandlungen durchgeführt. Die nach Durchführung der MS-SNuPE errechneten und normierten MIs aus beiden PVs beider Bisulfitbehandlungen wiesen nur sehr geringe Schwankungen im einstelligen Prozentbereich zwischen den verschiedenen Ansätzen auf (s. Abb. 4.7, Tab. 4.2). Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch die für die *IGF2* DMR (*IGF2P0*) ermittelten normierten MIs. Die MIs für die übrigen Loci sind im Anhang in Abbildung 6.1 dargestellt.

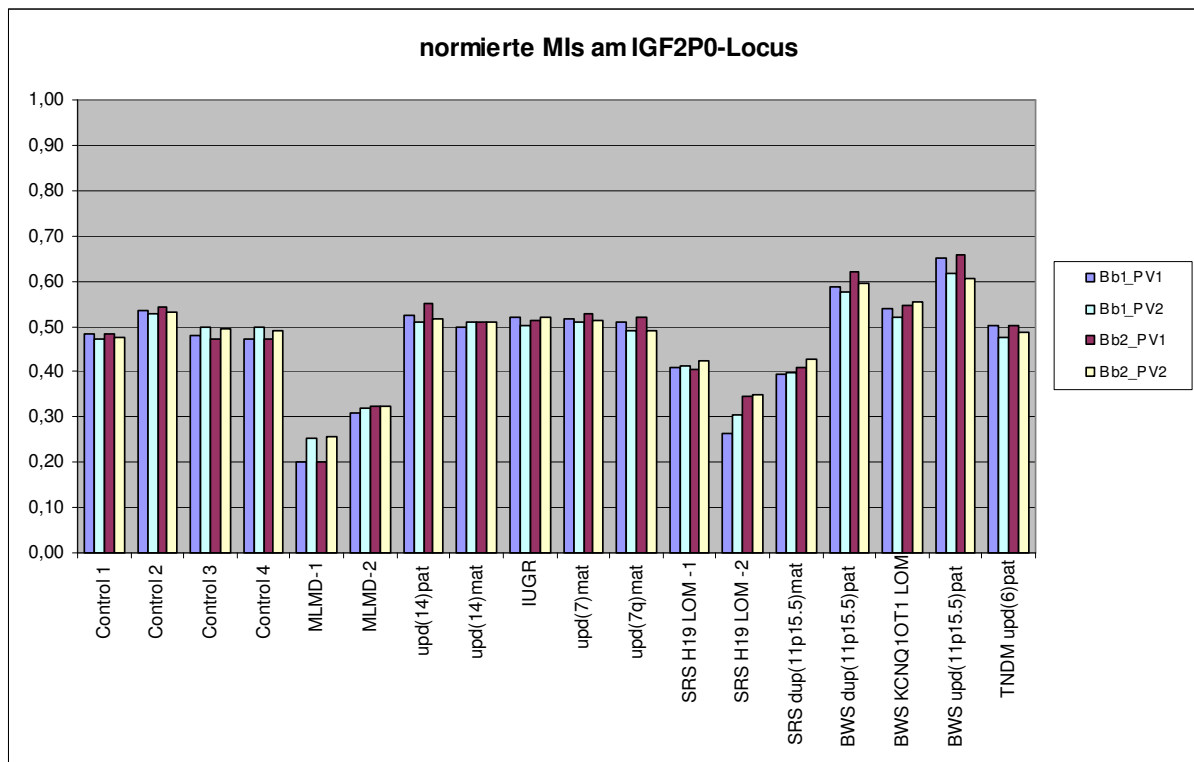


Abb. 4.7: Darstellung der normierten Methylierungsindizes beider Primerverlängerungsreaktionen (PV1/PV2) an DNA aus zwei unabhängigen Bisulfitbehandlungen (Bb1/Bb2) der 14 Patienten und vier Kontrollen am *IGF2P0*-Locus.

4.2.3.5 Titration mit vollmethylierter und unmethylierter DNA

Um die Sensibilität des MS-SNuPE Assays sowie die Genauigkeit bei der Quantifizierung der Methylierung zu testen, wurde eine Titrationsreihe mit unterschiedlichen Anteilen methylierter DNA analysiert. Dazu wurden Mischungen aus bereits Bisulfit-behandelter DNA von der Firma QIAGEN mit einem Anteil von 0 %, 25 %, 50 %, 75 % sowie 100 % methylierter DNA in die MS-SNuPE eingesetzt und die Methylierungsindizes bestimmt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden zwei unabhängige MS-SNuPE-Ansätze durchgeführt.

Entgegen der Erwartung konnte bei manchen Loci weder eine vollständige Hypomethylierung noch eine komplette Hypermethylierung bei 0 % bzw. 100 % Anteil methylierter DNA dargestellt werden. Außerdem traten bei den einzelnen Loci mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwankungen der MIs zwischen den beiden untersuchten CpGs auf.

Bei fast allen Loci konnte dennoch ein nahezu linearer Anstieg der Methylierungsindizes im Verhältnis zum prozentualen Anteil der methylierten DNA beobachtet werden. Abbildung 4.8 zeigt die für die *IGF2* DMR (*IGF2P0*) ermittelten MIs beider PVs aus beiden Ansätzen sowie die gemittelten MIs aus beiden MS-SNuPE-Ansätzen für alle Loci.

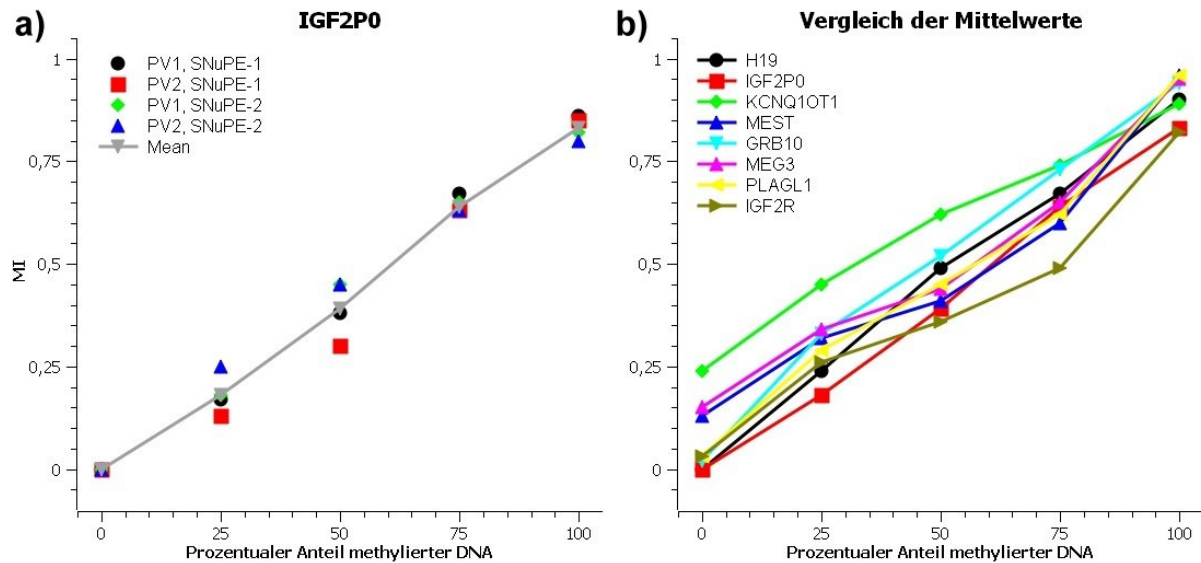


Abb. 4.8: Darstellung der nach Titration mit methylierter und unmethylierter DNA erhaltenen Titrationskurven: **a)** MIs beider Primerverlängerungsreaktionen aus zwei unabhängigen MS-SNuPE-Ansätzen für den *IGF2P0*-Locus, **b)** Mittelwerte der MIs aus beiden Primerverlängerungsreaktionen und beiden MS-SNuPE-Ansätzen für alle acht Loci.

4.3 Mikroarray-Analytik

Zum Nachweis submikroskopischer chromosomaler Imbalancen sowie von partiellen Isodisomien an geprägten Loci wurde eine Mikroarray-Analytik bei den SRS-Patienten durchgeführt. In einer vorangegangenen Studie (Spengler, 2008) wurden das Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Set sowie die Software „R“ (<http://www.r-project.org>) mit dem „aroma.affymetrix“-Package (Bengtsson et al., 2008) zum Nachweis von Kopienzahlveränderungen bei SRS-Patienten verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein höher auflösendes Arraysystem, der Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0, für die Analyse der SRS-Patienten etabliert werden. Kurze Zeit danach wurde von der Firma Affymetrix ein weiteres neues Arraysystem, der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array, eingeführt, der theoretisch eine noch höhere Auflösung bei gleichzeitiger Kosten- und Zeitersparnis bieten sollte. Auch dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und auf seine Anwendbarkeit in der Routine hin getestet.

Neben der Verwendung der beiden o. g. Arraysysteme wurde die zugehörige Analysesoftware, die Genotyping Console sowie die Chromosome Analysis Suite, für die Analyse der SRS-Patienten eingerichtet.

4.3.1 Software-Etablierung und Array-Auswertung

4.3.1.1 Genotyping Console

Zur Etablierung der Mikroarray-Analytik mit dem Affymetrix SNP6.0 Array wurde initial die „R“-Software mit dem „aroma.affymetrix“-Package verwendet. Da diese jedoch nur sehr begrenzte Möglichkeiten zur Visualisierung der Ergebnisse bietet, wurde zusätzlich die Genotyping Console (GTC) der Firma Affymetrix etabliert. Diese kann sowohl zur Verrechnung der nach dem Scannen der Arrays erhaltenen Rohdaten als auch zur Darstellung der Ergebnisse der Array-Analyse genutzt werden.

Zur Beurteilung der Qualität einer Analyse hinsichtlich der Streuung der Ergebnisse und des Hintergrundrauschens gibt die GTC zahlreiche Qualitätsparameter aus. Maßgeblich für nachfolgende Analysen der Kopienzahl ist in erster Linie der MAPD (*Median Absolute Pairwise Difference*)-Wert. Die MAPD ist ein Maß für die Variabilität innerhalb der

Patientenprobe relativ zu den Referenzproben. Diese Variabilität, die auch als „Laborfingerabdruck“ bezeichnet wird, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: intrinsische Variabilität im Ausgangsmaterial, unterschiedliche Chargen bei den Reagenzien für den Hybridisierungsmix, Eigenschaften des einzelnen Arrays oder des Scanners. Hohe MAPD-Werte führen zu einer ungenauen Bestimmung der Größe einer Imbalance sowie zu einer hohen Rate falsch positiver Ergebnisse (Affymetrix White Paper: Median of the Absolute Values of all Pairwise Differences and Quality Control on Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0; www.affymetrix.com).

Zur Bestimmung der Kopienzahl bei den Patientenproben wird zunächst eine Normierung der Rohdaten vorgenommen. Dazu sind Referenzproben notwendig, aus denen eine Referenzdatei erstellt werden muss. Von der Firma Affymetrix wird eine Referenzdatei, die aus den Array-Daten von 270 HapMap-Kontrollen erstellt wurde, zur Verfügung gestellt. Neben der Verwendung dieser Datei zur Normierung ist auch die Nutzung im eigenen Labor analysierter Kontrollen möglich. Hierzu wird von der Firma empfohlen, mindestens 44 Proben für die Erstellung der Referenzdatei zu verwenden, darunter mindestens je 20 weibliche und 20 männliche Proben. Die Verwendung eigener Kontrollen für die Verrechnung der Rohdaten bietet den Vorteil, dass die negativen Auswirkungen des o. g. „Laborfingerabdrucks“ soweit wie möglich vermieden werden und die Ergebnisse so weniger Streuung aufweisen.

Zunächst wurde für die Analyse der Patientenproben die von Affymetrix zur Verfügung gestellte Referenzdatei verwendet, da die Nutzung eines eigenen Kontrollkollektivs durch den Verbrauch von mindestens 44 Arrays ziemlich zeitaufwändig und kostenintensiv ist. Nach der Normierung der Rohdaten und Durchführung der Segmentierung zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse eine starke Streuung aufwiesen und aufgrund dessen eine zuverlässige Bestimmung der Kopienzahl oft unmöglich war, so dass viele falsch positive Resultate erzeugt wurden.

Aufgrund dessen wurde eine Referenzdatei aus eigenen Proben erstellt, darunter die Proben von 15 weiblichen und 15 männlichen unauffälligen Kontrollpersonen sowie weitere 60 der bisher im eigenen Labor analysierten Proben. Nach der Normierung lagen die MAPD-Werte bei fast allen Proben unterhalb von 0,3, wie es nach den Angaben der Firma bei Verwendung eigener Kontrollproben zu erwarten ist. Dies ermöglichte eine optimale Bestimmung der Kopienzahl bei einer genomweiten Auflösung von 100 kb.

Die aus den im eigenen Labor analysierten Proben erstellte Referenzdatei wurde daraufhin für die Analyse der Proben der SRS-Patienten verwendet.

4.3.1.2 Chromosome Analysis Suite

Im Zuge der Etablierung des Affymetrix Cytogenetics Array wurde eine weitere Software zur Array-Auswertung verwendet: die Chromosome Analysis Suite (ChAS). Diese kann neben der Analyse der Rohdaten und Visualisierung der Ergebnisse des Cytogenetics 2.7M Array auch für die Darstellung der Ergebnisse des SNP6.0 Array genutzt werden. Die Verrechnung der Rohdaten des SNP6.0 Array muss allerdings zuvor mit Hilfe der Genotyping Console erfolgt sein.

Im Gegensatz zum SNP6.0 Array sollte für die Analyse des Cytogenetics Array keine eigene Referenzdatei aus eigenen Kontrollproben notwendig sein, da dieser Array nicht so anfällig für die Auswirkungen laborspezifischer Parameter sein sollte (s. 4.3.5). Auch bei der ChAS-Software werden nach der Analyse der Cytogenetics Arrays zahlreiche Qualitätsparameter ermittelt, die Aufschluss über die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Analyse geben sollen. Dazu gehören für die Bestimmung der Kopienzahl der MAPD-Wert, der eine Aussage über das lokale Rauschen im Genom macht sowie die *waviness sd* und der *waviness segment count*, die das globale Rauschen angeben. Die MAPD-Werte sollten $<0,27$, die *waviness sd* $<0,1$ und der *waviness segment count* bei Verwendung der Annotation Files Version NA29 <100 sowie bei NA30 <50 sein.

Die ChAS bietet gegenüber der GTC zahlreiche Vorteile bei der Array-Auswertung, dazu gehören eine bessere Visualisierung der Ergebnisse, die Möglichkeit der Erstellung eigener Annotations-Dateien sowie eine vereinfachte Dokumentation der Ergebnisse.

Während mit der GTC für die Darstellung der Kopienzahlveränderungen bei unterschiedlichen Auflösungen, z. B. 100 kb oder 200 kb, immer eine zeitaufwändige neue Berechnung der Segmentierungs-Ergebnisse durchgeführt werden muss, kann bei der ChAS direkt zwischen verschiedenen Auflösungen umgeschaltet werden. Die Ergebnisse können in verschiedenen Fenstern dargestellt werden: es gibt eine Übersicht über alle Chromosomen mit graphischer Darstellung der detektierten Kopienzahlveränderungen, eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse sowie ein Fenster für die detaillierte Visualisierung einzelner Kopienzahlveränderungen (s. Abb. 4.9). Die Dokumentation der Ergebnisse wird durch die Möglichkeit des Exportierens der graphischen Resultate im „pdf“-Format sowie der Tabellen im „txt“-Format erleichtert.

In der Detailansicht können das Ergebnis der Segmentierung, die Kopienzahl, die zugrunde liegende \log_2 Ratio der einzelnen Marker, die LOH-Blöcke, die in der Imbalance enthaltenen Gene und OMIM-Einträge, die Markerabdeckung des Arrays, die physikalische Position auf dem Chromosom sowie die Nummer des Chromosoms und die Bande angezeigt werden (s. Abb. 4.9). Außerdem gibt es in der Software die Möglichkeit, Annotationen zu im eigenen Kollektiv beobachteten Varianten sowie bekannten krankheitsrelevanten Veränderungen zu hinterlegen. Diese können in einzelnen Dateien gesammelt und ebenfalls in der Detailansicht angezeigt werden. Zusätzlich kann bei der Analyse einer Patientenprobe innerhalb dieser Dateien gezielt nach Überlappungen gesucht werden.

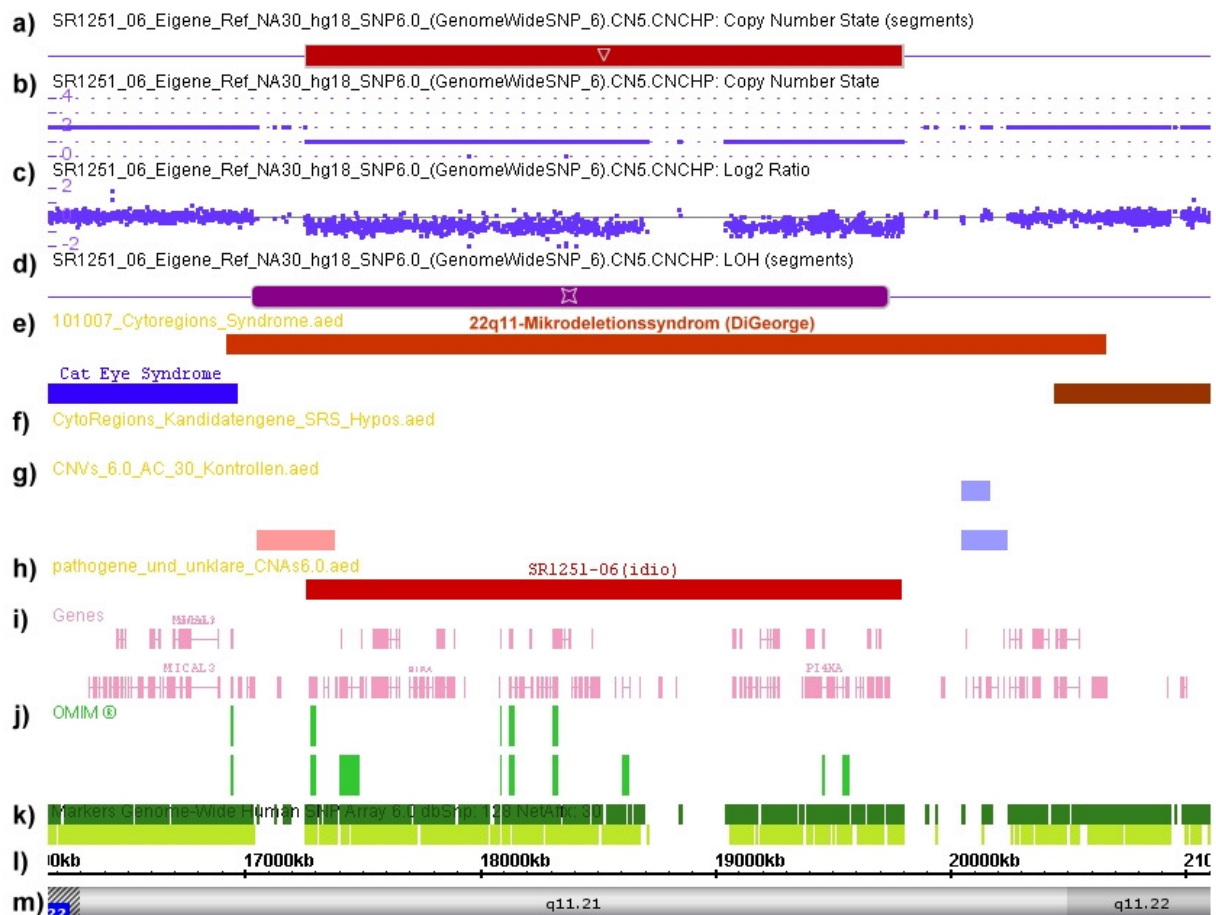


Abb. 4.9: Darstellung der Detailansicht in der ChAS Software: **a)** Segmentierungsergebnis (hier Deletion), **b)** Kopienzahl, **c)** \log_2 Ratio, **d)** LOH-Block, **e)** „Cytoregions“-Datei mit Syndromen, **f)** „Cytoregions“-Datei mit SRS-Kandidatengenen, **g)** CNVs aus eigenem Kontroll-Kollektiv, **h)** pathogene und unklare CNVs aus eigenen Kollektiven, **i)** Gene, **j)** OMIM-Einträge, **k)** Markerabdeckung, **l)** physikalische Position und **m)** Chromosomen-Nummer sowie -banden.

Aufgrund der Vorteile bei der Visualisierung der Ergebnisse sowie der Möglichkeit der Erstellung eigener Annotations-Dateien wurde die ChAS-Software nach der Etablierung und Analyse der Cytogenetics Arrays auch zur Auswertung der Ergebnisse der SNP6.0 Arrays bei den SRS-Patienten verwendet. Dazu wurden CNV-Dateien mit im eigenen Kontroll-Kollektiv sowie im Kollektiv aus der Routinediagnostik (häufig) beobachteten Varianten erstellt. Diese dienten im Folgenden der Bewertung der bei den SRS-Patienten identifizierten Imbalancen. Ergänzend dazu wurde eine Datei mit allen sicher pathogenen sowie allen bisher hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz unklaren Imbalancen angelegt, so dass bei der Analyse der SRS-Patienten über die Detailansicht ein direkter Vergleich mit diesen Kopienzahlveränderungen ermöglicht wurde.

Neben der Sammlung von CNVs aus verschiedenen Kollektiven erlaubt die ChAS-Software auch das Anlegen so genannter „Cytoregions“-Dateien, die bestimmte chromosomale Regionen und/oder Gene enthalten können. Zur Analyse der SRS-Patienten wurde mit Hilfe dieser Funktion eine Datei mit Kandidatengenen sowie eine Datei mit bekannten Mikrodeletions-/duplikations-Syndromen erstellt (s. Abb. 4.9). Als Kandidatengene wurden Gene, die erwiesenermaßen oder vermutlich mit Imprintingkrankungen assoziiert sind, ausgewählt. In die Liste mit bekannten Syndromen wurden alle Mikrodeletions-/duplikations-Syndrome eingetragen, die in der DECIPHER- und/oder der OMIM-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) hinterlegt sind. Die Listen mit den untersuchten Kandidatengenen sowie Syndromen sind im Anhang als Tabellen 6.24 und 6.25 beigefügt.

4.3.2 Etablierung des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der hochauflösende Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen bei den SRS-Patienten etabliert. Dazu wurden vier Validierungsproben von Patienten mit bekannten Auffälligkeiten verwendet. Diese waren im Vorfeld entweder durch Analysen mit dem Affymetrix 500k Array Set (s. Spengler, 2008) oder durch die MS-MLPA für die Region 11p15 und nachfolgende Mikrosatellitenanalysen identifiziert worden. Die Verrechnung der Rohdaten sowie die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit der GTC Software unter Verwendung der Annotation Files Version NA30 und der o. g. Referenzdatei aus im eigenen Labor analysierten Proben. Alle Auffälligkeiten konnten mit ähnlichen Bruchpunkten mit dem SNP6.0 Array ebenfalls nachgewiesen werden (s. Tab. 4.3)

| Patient | Methode Vorbefund | Imbalance | 500k Array | | SNP6.0 Array | |
|---------|-----------------------------|--------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | | | Bruch- punkte (hg18) | Größe [kb] | Bruch- punkte (hg18) | Größe [kb] |
| SR12 | 500k Array | dup(21q22) | 34464174- 34937058 | 473 | 34428299- 34942034 | 514 |
| SR29 | 500k Array | del(12q14) | 63602437- 64984411 | 1382 | 63640285- 64995755 | 1355 |
| IUGR33 | 500k Array | dup(14q13) | 33905552- 35210859 | 1045 | 33890171- 35012597 | 1104 |
| M4953 | MS-MLPA, Mikrosatelliten | dup(11p15.5) | - | - | 188509- 9053369 | 8865 |

Tab. 4.3 : Übersicht über die bei den Validierungsproben mit dem SNP6.0 Array nachgewiesenen Imbalancen.

4.3.3 Nachweis submikroskopischer Imbalancen bei den SRS-Patienten

Mit Hilfe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu etablierten SNP6.0 Arrays sollte eine genomweite Suche nach submikroskopischen chromosomalen Imbalancen bei 31 SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung sowie 42 idiopathischen Patienten durchgeführt werden. Für die Auswertung und Interpretation wurden dazu CNVs mit einer Größe von mindestens 100 kb sowie einem durchschnittlichen Markerabstand von weniger als 5 kb berücksichtigt. Außerdem sollte überprüft werden, ob bei einzelnen Patienten kleinere Mikrodeletionen/-duplikationen der ICRs in der Region 11p15.5 sowie in anderen möglicherweise für das SRS relevanten Regionen vorliegen. Dazu wurden interessante Zielregionen durch die Verwendung der „Cytoregions“-Dateien „Kandidatengene-SRS“ sowie „Syndrome“, in denen Kandidatengene und -regionen hinterlegt wurden, unabhängig von den o. g. Parametern mit einer Auflösung von 1 kb analysiert (s. Tab. 6.24 und 6.25).

Zum Vergleich des CNV-Musters bei einem eineiigen, für das SRS diskordanten Zwillingspärchen wurde ebenfalls eine SNP6.0 Array-Analyse durchgeführt (s. 4.3.3.4).

Die nachgewiesenen genomischen Imbalancen wurden anhand des unter 3.2.11 beschriebenen und in Abb. 3.2 dargestellten Logarithmus bewertet. Generell wurden CNVs, die bereits im eigenen oder in den in der DGV-Datenbank hinterlegten Kontrollkollektiven gefunden wurden, als apathogen eingestuft. Für alle bisher nicht in Kontrollpersonen beschriebenen Veränderungen wurde die elterliche Herkunft mittels Mikroarray-, Mikrosatelliten- und/oder qPCR-Analysen überprüft. Die Primersequenzen für die qPCR- und Mikrosatelliten-Analysen sind im Anhang in den Tabellen 6.11 und 6.12 aufgeführt. Familiäre CNVs werden in der Regel als apathogen gewertet, es sei denn der vererbende Elternteil weist einen ähnlichen Phänotyp auf wie der Patient. Um eine Klassifizierung familiärer CNVs zu ermöglichen, wurden die Daten zur Größe der Eltern mit einem klinischen Fragebogen abgefragt. Zum Vergleich der bei den SRS-Patienten gefundenen Imbalancen mit für bestimmte Mikrodeletions-/duplikationssyndrome bekannten Aberrationen sowie zur Suche nach Patienten mit SRS-Merkmalen wurde die DECIPHER-Datenbank verwendet. Da DECIPHER inzwischen ein aktuelleres Genome Build nutzt, musste dazu eine Konvertierung der Positionsangaben der bei den SRS-Patienten gefundenen Imbalancen von NCBI36/hg18 zu NCBI37/hg19 durchgeführt werden. Zusätzlich wurden die in den Imbalancen lokalisierten Gene mit Hilfe der UCSC-, OMIM- und Pubmed-Datenbank hinsichtlich ihrer Funktion und eines möglichen Zusammenhangs zum SRS überprüft.

4.3.3.1 Imbalancen bei den SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung

Zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen, die möglicherweise einen Hinweis auf die Ursache der ICR1-Hypomethylierung, die bei ca. 40 % der SRS-Patienten beobachtet werden kann, geben könnten, wurden 31 Patienten mit der Epimutation untersucht. Dabei wurden insgesamt 16 bisher nicht in Kontrollkollektiven beschriebene Kopienzahlvarianten identifiziert (s. Tab. 4.4). Die Größe der Veränderungen lag zwischen 100 kb und 1,5 Mb. Für 15 der 16 Imbalancen konnte die Vererbung von einem klinisch unauffälligen Elternteil nachgewiesen werden.

| Patient | Kopienzahl | Bande | Physikalische Position (hg18) | | Größe [kb] | Gene | Herkunft | Bewertung |
|----------|------------|-------|-------------------------------|-----------|------------|------|----------|-----------|
| | | | Min | Max | | | | |
| SR358/05 | 3 | 1p31 | 65627431 | 65728314 | 100 | 2 | paternal | fam. CNV |
| | 3 | 20q13 | 46926857 | 47109315 | 182 | 2 | paternal | fam. CNV |
| SR43/07 | 1 | 4q21 | 86649776 | 86778364 | 128 | 1 | maternal | fam. CNV |
| | 3 | 7q11 | 65358319 | 66359539 | 1.001 | 10 | maternal | fam. CNV |
| | 3 | 16q23 | 79758130 | 79893259 | 135 | 3 | paternal | fam. CNV |
| SR2796 | 1 | 13q13 | 36477480 | 36912102 | 434 | 3 | maternal | fam. CNV |
| SR3759 | 3 | 17q25 | 69337118 | 70188896 | 851 | 14 | paternal | unklar |
| | 3 | 18p11 | 341114 | 652371 | 311 | 5 | paternal | fam. CNV |
| SR5249 | 3 | 4q13 | 59888238 | 61452074 | 1.563 | 0 | paternal | fam. CNV |
| SR6446 | 3 | 6p21 | 34534862 | 34852582 | 317 | 4 | paternal | fam. CNV |
| SR8039 | 3 | 1p13 | 109329383 | 109536690 | 207 | 6 | paternal | fam. CNV |
| SR8181 | 3 | 8q24 | 131350706 | 132119024 | 768 | 3 | paternal | fam. CNV |
| SR8520 | 3 | 11p15 | 7720296 | 8007264 | 287 | 7 | maternal | fam. CNV |
| SR9271 | 3 | 17q25 | 69343532 | 70203523 | 860 | 14 | paternal | unklar |
| SR10125 | 1 | 15q15 | 38748662 | 38880072 | 131 | 5 | de-novo | unklar |
| SR10127 | 3 | 1p36 | 2684292 | 3198235 | 514 | 3 | maternal | fam. CNV |

Tab. 4.4 : Übersicht über die bei den SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung mit dem SNP6.0 Array nachgewiesenen Imbalancen.

Während ein Großteil der o. g. Imbalancen aufgrund ihrer Familiarität als apathogen eingestuft wurde, bleibt die klinische Relevanz der bei drei Patienten nachgewiesenen Veränderungen derzeit unklar:

Interessanterweise wurde bei zwei Patienten (SR3759, SR9271) eine Duplikation desselben Bereichs in 17q25 detektiert, die bisher nicht in Kontrollkollektiven beschrieben wurde. Innerhalb dieser Duplikation sind 14 Gene lokalisiert. Bei beiden Patienten konnte die Duplikation mittels Mikrosatelliten-Analyse bestätigt und eine paternale Herkunft der Imbalance nachgewiesen werden. In der DECIPHER-Datenbank waren zwar Patienten mit ähnlichen Duplikationen hinterlegt, jedoch wurden zu diesen keine klinischen Daten aufgeführt. Da die Duplikation bei zwei SRS-Patienten, jedoch bei keiner Kontrollperson gefunden wurde, wäre eine Assoziation mit dem SRS-Phänotyp möglich.

Beim Patienten SR10125 wurde eine 131 kb-Deletion in 15q15 identifiziert, von der fünf Gene betroffen sind. Mittels qPCR konnte eine de-novo Entstehung der Imbalance festgestellt werden. Weder ist für die betroffenen Gene ein funktioneller Zusammenhang zum SRS offensichtlich noch sind in der DECIPHER-Datenbank Patienten mit ähnlichen Veränderungen hinterlegt.

In den mit Hilfe der „Cytoregions“-Dateien näher untersuchten Kandidatengenen konnte bei einer Auflösung von 1 kb bei keinem der 31 Patienten eine Kopienzahlveränderung nachgewiesen werden.

4.3.3.2 Imbalancen bei idiopathischen SRS-Patienten

Alle idiopathischen SRS-Patienten wurden initial routinediagnostisch aufgrund des Vorliegens eines oder mehrerer SRS-Merkmale untersucht. Die für das SRS bekannten Veränderungen wie (Epi)mutationen in der Region 11p15 sowie eine upd(7)mat wurden dabei im Vorfeld ausgeschlossen. Da bei einzelnen idiopathischen SRS-Patienten bereits submikroskopische chromosomale Imbalancen berichtet wurden (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010), wurde zur Überprüfung der Relevanz solcher Imbalancen für das SRS sowie zur Identifizierung neuer Kandidatengene eine Mikroarray-Analyse durchgeführt.

Dabei wurden insgesamt 32 bisher nicht in Kontrollkollektiven beschriebene Kopienzahlvarianten in 25 der 42 untersuchten idiopathischen SRS-Patienten identifiziert (s. Tab.6.22 im Anhang). Die Größe der Veränderungen lag zwischen 106 kb und 9,2 Mb. Für 23 der 32 Imbalancen konnte ein familiäres Auftreten nachgewiesen werden. Während 19 dieser Aberrationen als seltene, familiäre CNVs und damit als apathogen eingestuft wurden, zeigten die vererbenden Elternteile bei zwei CNVs ebenfalls einen auffälligen Phänotyp. Eine weitere familiäre Imbalance wurde aufgrund einer Überlappung mit einem Mikrodeletionssyndrom mit variabler Penetranz ebenfalls als pathogen eingestuft. Von den Eltern eines Patienten mit einer familiären Imbalance lagen keine klinischen Daten vor. Außerdem stand bei einem Patienten nur eine DNA-Probe der Mutter zur Verfügung, so dass die Herkunft dieser Imbalance nicht ermittelt werden konnte. Für die übrigen acht Aberrationen wurde eine *de-novo* Entstehung bei den Patienten nachgewiesen.

Bei 9 der 42 untersuchten SRS-Patienten (21,4 %) wurden Imbalancen identifiziert, die aufgrund ihrer Größe, ihres Gengehalts, der Beschreibung weiterer Patienten mit SRS-Merkmalen und/oder einer Überlappung mit bekannten Mikrodeletions-/duplikationssyndromen als pathogen eingestuft wurden (s. 4.3.3.2.1). Weitere fünf der gefundenen Varianten wurden als CNVs mit unklarer klinischer Signifikanz klassifiziert, da sie weder in Kontrollkollektiven beschrieben wurden noch ein offensichtlicher Zusammenhang mit dem Phänotyp der Patienten erkennbar war (s. 4.3.3.2.2).

In den mit Hilfe der „Cytoregions“-Dateien näher untersuchten Kandidatengenen konnte bei einer Auflösung von 1 kb bei keinem der 42 Patienten eine weitere Kopienzahlveränderung nachgewiesen werden.

4.3.3.2.1 Pathogene Imbalancen

Bei neun der 42 idiopathischen Patienten (21,4 %) wurden Imbalancen nachgewiesen, die aufgrund ihrer Größe und ihres Gengehalts, der Beschreibung ähnlicher Veränderungen bei Patienten mit SRS-Merkmalen oder der Überlappung mit bekannten Syndromen als pathogen eingestuft wurden (s. Tab.4.5).

| Patient | CN | Bande | Physikalische Position (hg18) | | Größe (kb) | Gene | Herkunft | Score (%) |
|-----------|----|----------|-------------------------------|-----------|------------|------|----------------|-----------|
| | | | Min | Max | | | | |
| SR1251/06 | 1 | 22q11 | 17264837 | 19795835 | 2.530 | 56 | de-novo | 42,8 |
| SR5695 | 1 | 1q21 | 144643812 | 146297795 | 1.653 | 14 | nicht maternal | 50,0 |
| SR6820 | 3 | 22q13 | 36668860 | 37719685 | 1.050 | 25 | maternal | 85,7 |
| SR6882 | 1 | 15q26 | 94844379 | 100222647 | 5.378 | 26 | de-novo | 21,4 |
| SR7705 | 3 | Xq25-q27 | 129467388 | 138626069 | 9.158 | 55 | de-novo | 63,6 |
| SR8464 | 1 | 17p13 | 1459660 | 2259112 | 799 | 20 | de-novo | 57,1 |
| SR9116 | 1 | 1q21 | 144481983 | 146297795 | 1.816 | 15 | maternal | ND |
| SR10737 | 3 | 22q13 | 36668860 | 37719685 | 1.050 | 25 | maternal | ND |
| SR10177 | 1 | 17p13 | 1307036 | 1978951 | 672 | 17 | de-novo | 57,1 |

Tab. 4.5 : Übersicht über die bei den idiopathischen SRS-Patienten mit dem SNP6.0 Array nachgewiesenen als pathogen eingestuften Imbalancen (CN=Kopienzahl; ND=not determined).

Die Patienten wiesen eine sehr variable Ausprägung der typischen SRS-Merkmale auf, was nach Anwendung des Scoring-Systems nach Bartholdi et al. (2009) zu einer breiten Streuung innerhalb der Kohorte führte (s. Tab. 4.5). Eine detaillierte Übersicht über die klinischen Merkmale sowie die Scoring-Ergebnisse der u. a. Patienten ist in Tabelle 6.23 im Anhang aufgeführt.

SR1251/06 – del(22q11)

Beim Patienten SR1251/06 wurde eine heterozygote 22q11-Mikrodeletion innerhalb der DiGeorge-Syndrom-kritischen Region identifiziert (s. Abb. 4.10). Im deletierten Bereich von 2,53 Mb Größe waren 56 RefSeq-Gene lokalisiert. Durch eine qPCR-Analyse beim Patienten und seinen Eltern konnte die Imbalance bestätigt und ihre *de-novo* Entstehung gezeigt werden. Eine Wachstumsretardierung wie bei unserem Patienten wurde bei 16-26 % der Patienten mit dem 22q11-Mikrodeletionssyndrom berichtet (Bassett et al., 2005; Choi et al., 2005).

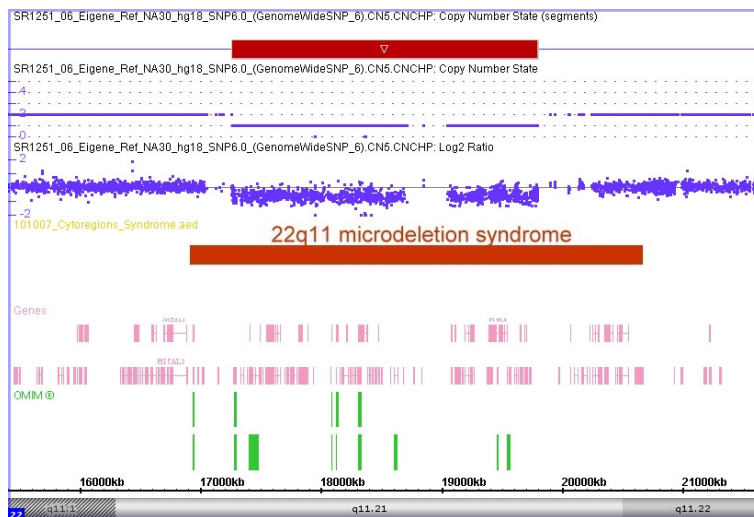


Abb. 4.10: Darstellung der 22q11-Mikrodeletion beim Patienten SR1251/06 in der Detailansicht in der ChAS Software.

SR5695 und SR9116 – del(1q21)

Bei den Patienten SR5695 und SR9116 wurden zwei größtenteils überlappende Deletionen im Bereich des distalen 1q21-Mikrodeletionssyndroms identifiziert (s. Abb. 4.11). Die Imbalancen hatten eine Größe von 1,65 Mb bzw. 1,81 Mb und betrafen 14 bzw. 15 RefSeq-Gene, wobei eine genaue Bruchpunktbestimmung durch eine unzureichende Markerabdeckung erschwert wurde (s. Abb. 4.11). Bei einigen Patienten mit der distalen 1q21-Mikrodeletion wurde eine Wachstumsretardierung berichtet (Brunetti-Pierri et al., 2008; Mefford et al., 2008).

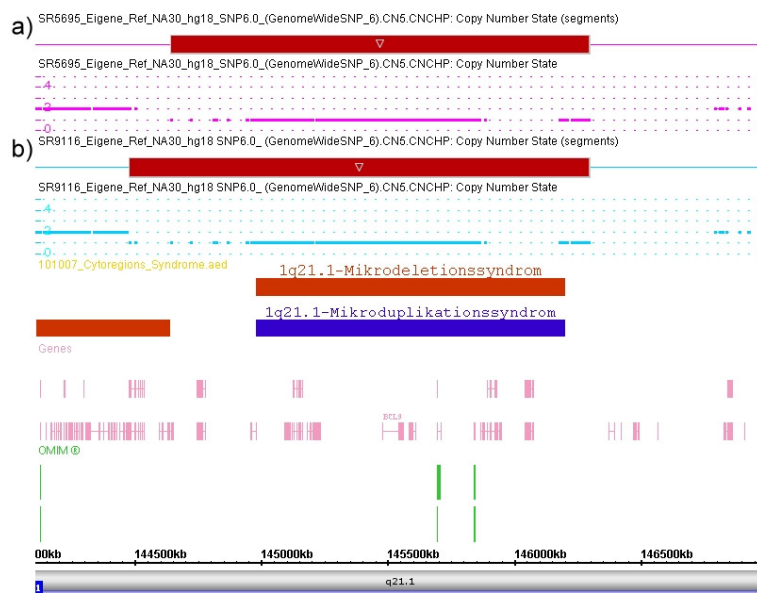


Abb. 4.11: Darstellung der 1q21-Mikrodeletion bei den Patienten **a)** SR5695 und **b)** SR9116 in der Detailansicht der ChAS Software.

Mittels qPCR konnte die Deletion bei SR5695 bestätigt und bei der Mutter des Patienten ausgeschlossen werden (s. Abb. 4.12), eine väterliche DNA-Probe stand nicht zur Verfügung. Bei SR9116 konnte die Deletion mittels qPCR bestätigt und bei der Mutter der Patientin ebenfalls nachgewiesen werden.

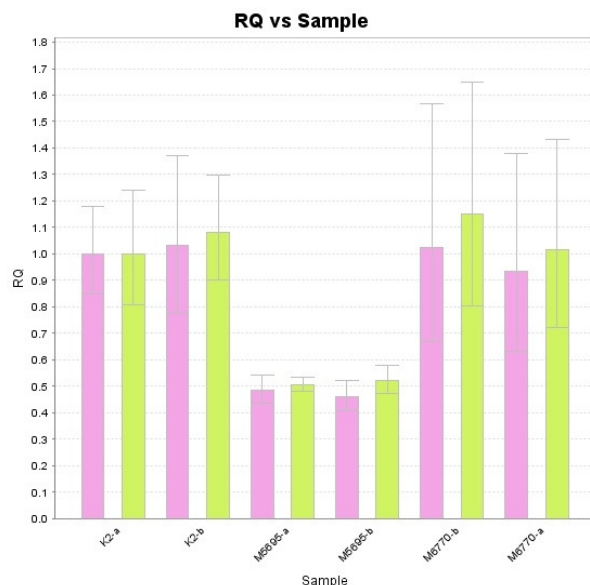


Abb. 4.12: Darstellung der qPCR-Ergebnisse für die 1q21-Mikrodeletion: Bestätigung der Deletion beim Patienten SR5695 sowie Ausschluss der Veränderung bei seiner Mutter M6770 (bei einer normalen Kopienzahl von 2 wird bei der Verrechnung von Referenz- und Zielgen ein Quotient von 1 erreicht).

SR6820, SR10737 und SR6819 – dup(22q13)

In einer Familie mit mehreren wachstumsretardierten Personen wurde eine familiäre 1,05 Mb Duplikation in 22q13 identifiziert. Die Aberration wurde bei den kleinwüchsigen Schwestern SR6820 und SR10737 sowie bei deren ebenfalls wachstumsretardierter Mutter (SR6819) nachgewiesen. Von der Duplikation waren 25 RefSeq-Gene betroffen.

SR6882 – del(15q26)

Bei der Patientin SR6882 wurde eine heterozygote 5,38 Mb Mikrodeletion identifiziert, die unter anderem das Gen *IGF1R* betraf. Mikrodeletionen und Punktmutationen, die zu einer Haploinsuffizienz des *IGF1R*-Gens führen, wurden bereits bei Patienten mit SRS-Merkmalen beschrieben (Ester et al., 2009; Veenma et al., 2010; Choi et al., 2011). Mittels Mikrosatellitenanalyse konnte die Deletion bestätigt und eine *de-novo* Entstehung bei der Patientin festgestellt werden. Eine daraufhin in einem externen Labor durchgeführte FISH zeigte ebenfalls die Deletion beim Kind, während bei den Eltern kein zugrunde liegender balancierter Umbau nachgewiesen werden konnte.

SR7705 – dup(Xq25-q27)

Bei der Patientin SR7705 wurde eine 9,16 Mb Duplikation in Xq25-q27 dargestellt, die 55 RefSeq-Gene betraf. Durch eine Mikrosatelliten-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Duplikation bei der Patientin *de-novo* entstanden ist. Aufgrund dessen sowie der Größe und der Anzahl der betroffenen Gene wurde diese Imbalance als pathogen eingestuft. In der DECIPHER-Datenbank waren keine Informationen zum Phänotyp von Patienten mit ähnlichen Aberrationen hinterlegt.

SR8464 und SR10177 – del(17p13)

Bei den Patienten SR8464 und SR10177 wurden zwei überlappende Deletionen mit einer Größe von 799 kb bzw. 672 kb identifiziert (s. Abb. 4.13). Diese waren innerhalb der bei Patienten mit Miller-Dieker-Syndrom (MDS) deletierten Region in 17p13 lokalisiert, enthielten jedoch nicht die typischerweise bei MDS-Patienten deletierten Gene *YWHAE* und *PAFAH1B1*. Im bei beiden Patienten deletierten Bereich von 519 kb sind 16 RefSeq-Gene lokalisiert. Sowohl in der DECIPHER-Datenbank als auch in der Literatur (Bruno et al., 2009) waren Patienten mit ähnlichen Deletionen und einer Wachstumsretardierung berichtet.

4.3.3.2.2 Imbalancen mit unklarer klinischer Signifikanz

Bei fünf der 42 idiopathischen SRS-Patienten (11,9%) wurden Imbalancen nachgewiesen, die bisher weder in Kontrollkollektiven noch bei Patienten mit SRS-ähnlichem Phänotyp beschrieben wurden (s. Tab. 4.6). Aufgrund dessen wurden diese Veränderungen als Imbalancen mit unklarer klinischer Signifikanz eingestuft.

| Patient | CN | Bande | Physikalische Position (hg18) | | Größe [kb] | Gene | Herkunft |
|----------|----|-------|-------------------------------|-----------|------------|------|----------|
| | | | Min | Max | | | |
| SR398/07 | 3 | 15q21 | 53403146 | 53580561 | 177 | 3 | de-novo |
| SR596/07 | 1 | 16q24 | 87899339 | 88134915 | 236 | 2 | de-novo |
| SR4178 | 1 | 1q21 | 144093480 | 144503409 | 410 | 17 | de-novo |
| SR6415 | 3 | 16p13 | 14846828 | 16203401 | 1.356 | 13 | paternal |
| SR9937 | 3 | 16p13 | 14742555 | 16202207 | 1.459 | 14 | maternal |

Tab. 4.6: Übersicht über die bei den idiopathischen SRS-Patienten mit dem SNP6.0 Array nachgewiesenen Imbalancen mit unklarer klinischer Relevanz (CN=Kopienzahl).

SR398/07 - dup(15q21)

Beim Patienten SR398/07 wurde neben zwei familiären CNVs eine 177 kb-Duplikation in 15q21 detektiert, die drei Gene enthielt. Mittels Mikrosatelliten-Analyse konnte eine *de-novo* Entstehung der Imbalance nachgewiesen werden. Für die betroffenen Gene ist keine Funktion in Wachstumsprozessen beschrieben. In der DECIPHER-Datenbank sind nur Patienten mit wesentlich größeren Duplikationen und/oder weiteren Imbalancen hinterlegt. Im eigenen Kollektiv konnte die Veränderung bei keinem weiteren Patienten gefunden werden.

SR596/07 – del(16q24)

Eine der zwei bei SR596/07 identifizierten Imbalancen war eine heterozygote *de-novo* 236 kb-Deletion in 16q24. Die Imbalance wurde mittels qPCR beim Patienten bestätigt und bei den Eltern ausgeschlossen.

Von der Aberration waren zwei Gene betroffen, für die eine Bedeutung für die Ätiologie des SRS nicht offensichtlich war. In der DECIPHER-Datenbank war ein Patient (249412) mit einer teilweise überlappenden 180 kb-Deletion hinterlegt, der einige SRS-Merkmale wie eine

prä- und postnatale Wachstumsretardierung sowie eine Klinodaktylie aufwies. Dieser Patient zeigte allerdings weitere Auffälligkeiten, wie eine Mikrozephalie sowie einen Herzfehler, die weder zu den typischen SRS-Merkmalen zählen noch beim Patienten SR596/07 beobachtet wurden.

SR4178 – del(1q21)

Bei dem Patienten SR4178 wurde neben zwei familiären CNVs eine heterozygote 410 kb-Deletion in 1q21 identifiziert, die den bei Patienten mit TAR-Syndrom deletierten Bereich einschloss. Eine Analyse der elterlichen Proben mittels Mikrosatelliten-Markern zeigte eine *de-novo* Entstehung der Deletion beim Patienten. Das typische klinische Bild bei Patienten mit TAR-Syndrom weist keine Ähnlichkeit mit dem SRS-Phänotyp auf.

SR6415 und SR9937 – dup(16p13)

Bei diesen beiden Patienten wurden überlappende Duplikationen mit einer Größe von 1,35 bzw. 1,45 Mb in 16p13 identifiziert. Während bei SR6415 durch eine Analyse elterlicher Proben mit dem SNP6.0-Array eine paternale Vererbung der Duplikation nachgewiesen werden konnte, wurde bei SR9937 mittels qPCR eine maternale Herkunft der Imbalance festgestellt. Für die betroffene chromosomale Region ist sowohl ein Mikrodeletions- als auch ein Mikroduplikationssyndrom beschrieben (zur Übersicht: Hannes et al., 2008). Die Duplikation wurde von Hannes et al. (2008) in fünf von 1682 unauffälligen Kontrollpersonen nachgewiesen (0,29 %). Im eigenen Kontrollkollektiv (n=100) konnte die Veränderung nicht nachgewiesen werden, während sie in zwei von 42 SRS-Patienten (4,7 %) identifiziert wurde.

4.3.3.3 Nachweis von Mikrodeletionen/-duplikationen in der geprägten Region 11p15.5

Bei einigen BWS- und/oder SRS-Patienten wurden Mikrodeletionen bzw. -duplikationen, die die ICRs in der geprägten Region 11p15.5 betrafen, beschrieben (Demars et al., 2011a, 2011b; Gronskov et al., 2011). Mit Hilfe der „Cytoregions“-Datei „Kandidatengene-SRS“ wurden die beiden ICRs in der Region 11p15.5 auf das Vorliegen von Deletionen/Duplikationen mit einer Größe ab 1 kb untersucht, die mit der MS-MLPA für die Region 11p15 aufgrund der Sonden-Abdeckung nicht erfasst werden können. Weder bei den 31 SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung noch bei den 42 idiopathischen Patienten konnte eine Mikrodeletion/-duplikation im analysierten Bereich nachgewiesen werden.

4.3.3.4 Vergleich der CNVs bei einem eineiigen Zwillingspärchen

Bei einer vergleichenden Studie zu CNVs bei konkordanten und diskordanten eineiigen Zwillingspärchen fanden Bruder et al. 2008 in beiden Gruppen unterschiedlich stark ausgeprägte somatische Mosaik für verschiedene CNVs bei beiden Zwillingen. Zum Nachweis unterschiedlicher CNV-Profile wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit DNA aus Lymphozyten sowie aus Fibroblastenkulturen von einem eineiigen, für das SRS diskordanten Zwillingspärchen (SR6247 und SR7231) mit dem SNP6.0 Array untersucht. Bei einer Auflösung von 100 kb sowie einem durchschnittlichen Markerabstand von weniger als 5 kb konnten die meisten CNVs in beiden Geweben bei beiden Zwillingen identifiziert werden (s. Abb. 4.15). Zwei CNVs auf Chromosom 14q11.2 konnten bei beiden Zwillingen nur in der DNA aus Lymphozyten nachgewiesen werden.

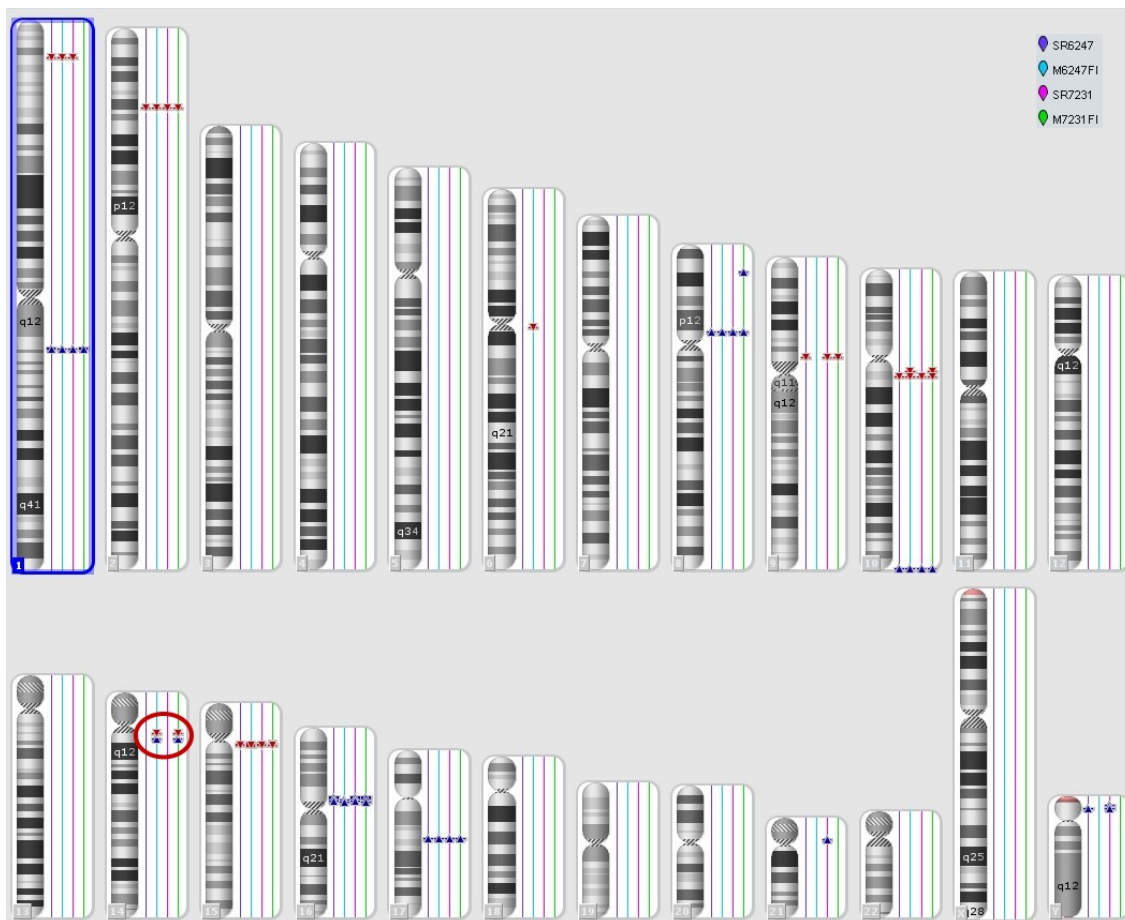


Abb. 4.15: Darstellung der Übersicht über alle Chromosomen mit den bei einer Auflösung von 100 kb in DNA aus Lymphozyten und Fibroblasten nachgewiesenen CNVs bei SR6247 und SR7231 (Deletionen sind in rot, Duplikationen in blau dargestellt).

4.3.4 Nachweis partieller Isodisomien an geprägten Loci bei den SRS-Patienten

Bei Patienten mit Imprintingkrankungen sind vollständige oder segmentale UPDs verschiedener Chromosomen beschrieben (zur Übersicht: Yamazawa et al., 2010). Eine Fehlregulation eines geprägten Faktors infolge einer UPD könnte bspw. entweder direkt oder über Wechselwirkungen in einem Netzwerk geprägter Gene zu Wachstumsstörungen führen wie sie bei den SRS-Patienten beobachtet werden.

Neben der Identifizierung von Kopienzahlveränderungen ermöglicht der SNP6.0 Array durch die Verwendung polymorpher SNP-Marker auch den Nachweis von homozygoten Regionen (loss of heterozygosity/LOH), wie sie z. B. bei uniparentalen Isodisomien vorliegen. Mit Hilfe der „Cytoregions“-Datei für die SRS-Kandidatenregionen wurden gezielt die geprägten Loci *H19* (11p15), *IGF2P0* (11p15), *KCNQ1OT1* (11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *MEG3* (14q32), *PLAGL1* (6q24) sowie *IGF2R* (6q25) auf das Vorliegen einer partiellen Isodisomie untersucht. Dazu wurden Homozygotieblöcke ab einer Größe von 1 Mb für die Analyse berücksichtigt.

Bei insgesamt vier Patienten konnte Homozygotie für einen der o. g. Loci detektiert werden (s. Tab. 4.7). Darunter waren drei idiopathische Patienten mit LOH am *IGF2R*, *H19* bzw. am *PLAGL1*-Locus sowie ein Patient mit ICR1-Hypomethylierung und LOH am *PLAGL1*-Locus. Die Größe aller nachgewiesenen LOH-Blöcke lag zwischen 1-1,5 Mb.

| Patient | Locus | Physikalische Position (hg18) | | Größe des LOH-Blocks [kb] |
|---------|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|
| | | Min | Max | |
| SR3006 | <i>H19</i> | 444979 | 1979475 | 1.534 |
| SR6820 | <i>IGF2R</i> | 159905845 | 161076221 | 1.170 |
| SR10127 | <i>PLAGL1</i> | 144084996 | 145409448 | 1.324 |
| SR10177 | <i>PLAGL1</i> | 144181543 | 145240995 | 1.059 |

Tab. 4.7: Übersicht über die bei den SRS-Patienten an geprägten Loci nachgewiesenen LOH-Blöcke.

4.3.5 Etablierung des Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array

Der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array wurde von der Firma Affymetrix zum Nachweis submikroskopischer genomischer Imbalancen entwickelt. Das neue Array-System sollte im Vergleich zum SNP6.0 einige Vorteile aufweisen. Dazu gehörten eine theoretisch höhere Auflösung mit verbesserter Abdeckung von RefSeq-Genen, ein verkürzter und vereinfachter Arbeitsablauf sowie die Möglichkeit der Verwendung einer von der Firma zur Verfügung gestellten Referenzdatei anstelle eigener Kontrollproben. Aufgrund dieser Vorteile, die bei einer verbesserten Analyse gleichzeitig Zeit und Kosten einsparen sollten, wurde der Cytogenetics Array im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Analyse der Proben der SRS-Patienten auf seine Anwendbarkeit getestet.

Dazu wurden fünf Validierungsproben von Patienten mit bekannten Auffälligkeiten verwendet. Diese waren im Vorfeld entweder durch Analysen mit dem SNP6.0 Array oder eine konventionelle Karyotypisierung identifiziert worden. Die Verrechnung der Rohdaten sowie die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit der ChAS Software zunächst unter Verwendung der Annotation Files Version NA29. Die Qualitätsparameter der analysierten Proben waren sehr gut (MAPD: 0,12-0,13, waviness segment count: 1-6). Alle Auffälligkeiten konnten mit ähnlichen Bruchpunkten mit dem Cytogenetics Array ebenfalls nachgewiesen werden (s. Tab. 4.8).

| Patient | Methode Vorbefund | Imbalance | SNP6.0 Array | | Cytogenetics Array | |
|---------|------------------------------------|------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | | | Bruchpunkte (hg18) | Größe [kb] | Bruchpunkte (hg18) | Größe [kb] |
| M6050 | SNP6.0 | del(17q21) | 41059584- 41569931 | 510 | 41058251- 41567166 | 509 |
| SR12 | SNP6.0 | dup(21q22) | 34428299- 34942034 | 514 | 34421642- 34945894 | 524 |
| SR29 | SNP6.0 | del(12q14) | 63640285- 64995755 | 1355 | 63754022- 64996418 | 1242 |
| M6840 | SNP6.0 | del(7p14) | 39851533- 40493133 | 642 | 39846726- 40489950 | 643 |
| M8027 | Konventionelle Karyotypisierung | del(10q23) | - | - | 82008188- 88620690 | 6612 |

Tab. 4.8: Übersicht über die bei den Validierungsproben mittels Cytogenetics Array nachgewiesenen Imbalancen.

Zusätzlich zu den fünf Validierungsproben wurden weitere 23 Patienten mit dem Cytogenetics Array analysiert. Die DNA für die Array-Analysen wurde bei 25 Patienten mittels Aussalzen isoliert, bei zwei Patienten mit dem QIAamp DNA Maxi Kit (QIAGEN) sowie bei einem weiteren Patienten mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Bei vier der insgesamt 28 Proben (14 %) war die Qualität der Ergebnisse nach der Verrechnung der Rohdaten ausreichend für eine Auflösung von 100 kb (*wav seg count* < 50), weitere 17 Proben (61 %) konnten nach einer Reduzierung der Auflösung auf 200 kb ausgewertet werden (*wav seg count* < 100); bei den übrigen sieben Proben (25 %) war eine Analyse aufgrund zu schlechter Qualitätsparameter nicht möglich (*wav seg count* > 100). Die starke Streuung der Werte für die einzelnen Marker bei diesen Proben erlaubte keine zuverlässige Bestimmung der Kopienzahl.

Allgemein fiel bei allen Proben eine Konzentrierung der falsch positiven Ergebnisse auf die perizentrischen und zentromerischen Regionen sowie auf die Geschlechtschromosomen auf. Diese Problematik wurde von Firmenseite durch die Herausgabe neuer Annotationsdateien behoben. Im Wesentlichen wurden die Marker in problematischen Regionen aus den Annotationsdateien gelöscht, so dass insgesamt nach der Weiterentwicklung der Versionen von NA29 über NA30 zu NA30.1 schließlich 23 % weniger Marker für die Analyse der Arrays zur Verfügung standen.

Bei den sieben Proben, die aufgrund zu schlechter Qualität überhaupt nicht analysiert werden konnten, wurden zahlreiche Versuche zur Verbesserung der Ergebnisse unternommen. Zunächst wurde der komplette Ansatz wiederholt, um Fehler bei der Probenvorbereitung oder Mängel am Array selbst auszuschließen. Dies führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Resultate. Eine photometrische Messung der DNA und eine Analyse auf dem Agarosegel erbrachten keine Hinweise auf eine Verunreinigung und/oder Degradierung der DNA. Dennoch wurden verschiedene Methoden zur DNA-Aufreinigung an den Proben getestet: eine Aufreinigung über Säulchen unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits bzw. Maxi Kits (QIAGEN), eine Isopropanol- und eine Ammoniumacetat-Fällung. Alle Versuche zur Verbesserung der Resultate blieben jedoch ohne Erfolg. Eine Korrelation zwischen der DNA-Qualität bzw. Methode der DNA-Isolation mit der Qualität der Resultate konnte nicht festgestellt werden. Die Ursache für die Problematik bei der Analyse einzelner Proben blieb daher unklar.

4.4 Einzelkasuistiken

4.4.1 Nachweis einer isolierten *GRB10*-Hypermethylierung sowie einer 20p13-Deletion bei SRS-Patient M7870

Zum Nachweis/Ausschluss einer upd(7)mat wurden bei dem vietnamesisch-stämmigen Patienten M7870 bei klinischem Verdacht auf SRS im Rahmen der routinediagnostischen Abklärung die MS-PCRs für den *MEST*- sowie den *GRB10*-Locus (*GRB10_1*) durchgeführt. Während bei der MS-PCR für den *MEST*-Locus beide elterlichen Allele darstellbar waren, konnte für den *GRB10*-Locus nur das Produkt für das maternale, methylierte Allel nachgewiesen werden. Als mögliche Ursachen für das Fehlen des paternalen Allels kamen der Ausfall der PCR für dieses Allel aufgrund eines SNPs in der Primer-Bindestelle sowie eine Deletion, eine isolierte Hypermethylierung oder eine partielle upd(7)mat in Frage. Eine Punktmutation in einer der Primer-Bindestellen für die *GRB10_1*-PCR konnte nach Durchführung der *GRB10_2*-PCR (s. 4.2.2) ausgeschlossen werden: Auch hier konnte nur das maternale, methylierte Allel dargestellt werden. Das Vorliegen einer partiellen upd(7)mat am *GRB10*-Locus wurde durch die Analyse von den Locus flankierenden Mikrosatelliten-Markern ausgeschlossen (s. Tab. 6.26 im Anhang). Um eine das *GRB10*-Gen betreffende Deletion im Bereich 7p12 auszuschließen, wurde die Probe des Patienten mit dem hochauflösenden Cytogenetics Array untersucht. Eine Mikrodeletion im Bereich des *GRB10*-Gens konnte damit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Da die Markerabdeckung des verwendeten Arrays im Bereich der *GRB10* DMR nicht ausreichend war, wurde zum Nachweis kleinerer Deletionen, die aufgrund dessen möglicherweise nicht erfasst wurden, eine MS-MLPA für diese Region durchgeführt. Dafür wurden selbst generierte Sonden für die Zielregionen zum P300-Reference-2 Kit der Firma MRC Holland hinzugefügt. Dieses enthält sowohl Kontrollsonden für die Bestimmung der Kopienzahl als auch Methylierungs-Kontrollsonden. Für die Analyse der Zielregionen wurden drei Sonden ausgewählt: zwei Sonden, die innerhalb der *GRB10* DMR lokalisiert sind, sowie eine Kontrollsonde innerhalb der *H19* DMR als interne Kontrolle. Alle Sonden enthielten eine Schnittstelle für das methylierungs-sensitive Restriktionsenzym *Hha* I, so dass neben der Bestimmung der Kopienzahl gleichzeitig auch eine Analyse des Methylierungszustands der Zielregionen möglich war. Die Sequenzen der Sonden sind in Tabelle 6.8 im Anhang aufgeführt. Als Referenzen für die Berechnung der MLPA-Ergebnisse wurden vier

unauffällige Kontrollproben verwendet. Zur Überprüfung der Validität der MS-MLPA wurden zusätzlich zu den vier Kontrollproben und der Probe von Patient M7870 außerdem die Proben eines Patienten mit unauffälligem MS-PCR-Ergebnis für die *GRB10* DMR sowie eines Patienten mit Hypomethylierung der *H19* DMR analysiert. Bei beiden Patienten konnten die zuvor ermittelten Ergebnisse bestätigt werden.

Abbildung 4.16 gibt eine Übersicht über die MS-MLPA-Ergebnisse beim Patienten M7870. Die Analyse der Kopienzahl ergab beim Patienten (grüne Balken) sowohl für die beiden *GRB10*-Sonden als auch die *H19*-Sonde ähnliche Werte wie bei den Kontrollproben (blaue Balken). Eine Deletion in der *GRB10* DMR konnte somit ausgeschlossen werden. Die Methylierungsanalyse ergab für die *H19*-Sonde eine Methylierung von 50%, wie sie im Normalfall bei Vorliegen eines methylierten und eines unmethylierten elterlichen Allels zu erwarten ist. Die Methylierungskontrollsonde zeigte erwartungsgemäß nach dem Restriktionsverdau mit *Hha* I kein Signal, so dass von einem erfolgreichen Verdau der unmethylierten DNA auszugehen war. Bei den beiden *GRB10*-Sonden konnte eine 100%ige Methylierung beobachtet werden, was einer Methylierung beider elterlichen Allele entspricht. Die Hypermethylierung der *GRB10* DMR wurde somit durch die MS-MLPA-Analyse bestätigt. Bei den Eltern des Patienten konnte mittels MS-PCR keine Hypermethylierung der *GRB10* DMR nachgewiesen werden.

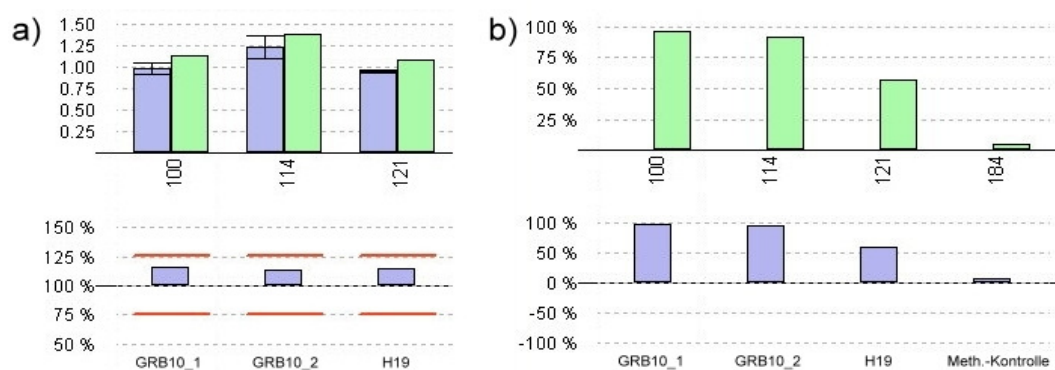


Abb. 4.16: Darstellung der MS-MLPA-Ergebnisse für die *GRB10* und die *H19* DMR beim Patienten M7870 zur Bestimmung a) der Kopienzahl und b) des Methylierungsstatus.

Zum Ausschluss von möglicherweise mit einer Hypermethylierung der *GRB10* DMR assoziierten Methylierungsstörungen an weiteren geprägten Loci wurde eine MS-SNuPE-Analyse durchgeführt. Dabei wurden unauffällige Methylierungsmuster für die untersuchten Loci dargestellt.

Bei der Array-Analyse wurde zusätzlich zur Analyse der *GRB10* DMR eine Auswertung bzgl. genomischer Imbalancen durchgeführt. Dabei konnte eine heterozygote 1,03 Mb-Deletion in 20p13 (chr20: 9,292-1,038,679) dargestellt werden (s. Abb. 4.17), von der 21 RefSeq-Gene betroffen waren. Durch eine Analyse elterlicher Proben mit demselben Arraysystem konnte eine *de-novo* Entstehung beim Patienten nachgewiesen werden.

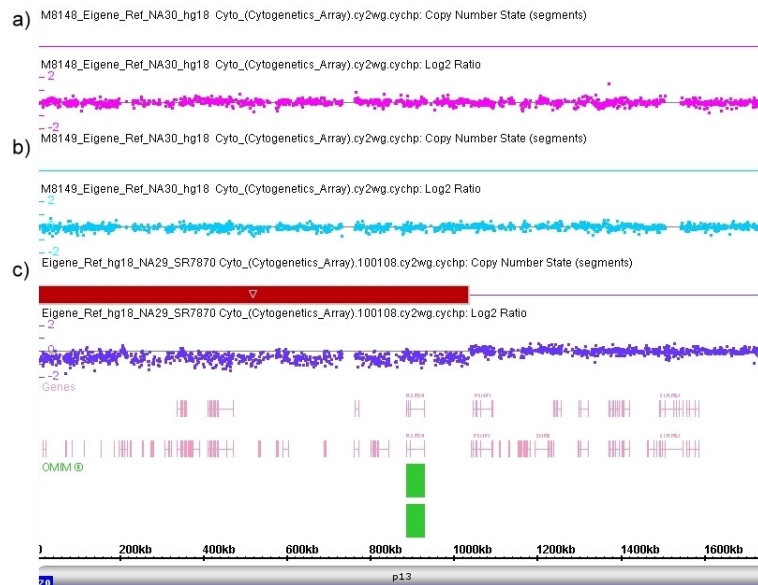


Abb. 4.17: Darstellung der chromosomalen Region 20p13 nach Analyse des Cytogenetics Array mit a) und b) normaler Kopienzahl bei den Eltern des Patienten und c) der 1,03 Mb-Deletion beim Patienten M7870.

Zur Bestätigung der Deletion in 20p13 wurde die Probe des Patienten zusätzlich mit dem Affymetrix SNP6.0 Array untersucht; dabei konnte die Imbalance ebenfalls dargestellt werden.

4.4.2 Nachweis einer paternalen Deletion des *MEST*-Locus in 7q32 bei SRS-Patient M9475

Beim Patienten M9475 wurde bei der routinediagnostischen Untersuchung auf upd(7)mat bei der MS-PCR für den *MEST*-Locus ein auffälliger Befund erhoben: hier ließ sich nur das maternale, methylierte Allel bei 187 bp nachweisen (Eggermann et al., 2011). Im Gegensatz dazu waren beim *GRB10*-Locus beide elterlichen Allele darstellbar. Da dieses Fragment-

Muster ebenfalls bei Patienten mit segmentaler upd(7q)mat beobachtet werden kann, wurde zur Bestätigung einer upd(7q)mat eine Analyse weniger, auf Chromosom 7 verteilter Mikrosatelliten-Marker durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch eine biparentale Vererbung für die meisten der verwendeten Marker, so dass das Vorliegen einer segmentalen upd(7q)mat nahezu ausgeschlossen werden konnte (s. Tab. 6.27 im Anhang). Im Anschluss wurde eine Analyse mit dem SNP6.0 Array durchgeführt. Dabei wurde eine heterozygote 3,7 Mb-Deletion in 7q32 (chr7:127,386,534-131,122,034) dargestellt (s. Abb. 4.18).

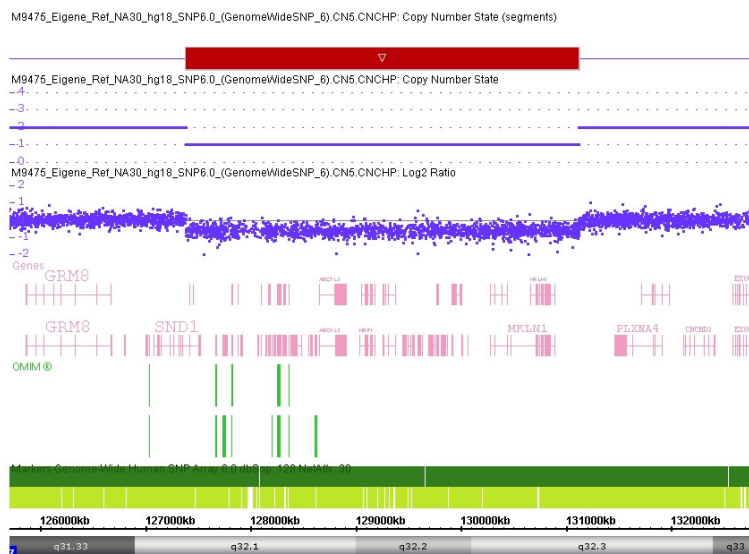


Abb. 4.18: Darstellung der 3,7 Mb-Deletion in 7q32 beim Patienten M9475 nach Analyse des SNP6.0 Arrays.

Zur Bestätigung der nachgewiesenen Imbalance und zur Überprüfung der elterlichen Herkunft wurden drei innerhalb des deletierten Bereichs lokalisierte Mikrosatelliten-Marker (D7S3039, D7S530, D7S649) analysiert (s. Tab. 6.27 im Anhang). Mit allen drei Markern konnte beim Patienten nur ein maternales Allel detektiert werden. Beim Vater konnte die Deletion durch die Darstellung einer Heterozygotie für zwei Marker (D7S530, D7S649) ausgeschlossen werden. Die Deletion der paternalen Kopie ist demnach beim Patienten *de novo* entstanden. Innerhalb der Deletion waren 55 Gene lokalisiert, darunter das SRS-Kandidatengen *MEST*. In der DECIPHER-Datenbank waren drei Patienten mit ähnlichen Deletionen hinterlegt, für die jedoch kein Phänotyp angegeben war. In der Literatur wurden bisher keine weiteren Fälle mit ähnlichen Imbalancen berichtet. Die Wachstumsparameter sowie einige kraniofaziale Merkmale beim Patienten M9475 wiesen in der neonatalen Phase auf Vorliegen eines SRS hin. Mit zunehmendem Alter traten jedoch weitere klinische Auffälligkeiten in den Vordergrund (Eggermann et al., 2011; in press).

Zum Ausschluss von möglicherweise mit einer Deletion der *MEST* DMR assoziierten Methylierungsstörungen an weiteren geprägten Loci wurde eine MS-SNuPE-Analyse durchgeführt. Dabei wurden unauffällige Methylierungsmuster für die untersuchten Loci festgestellt.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Pathophysiologie des SRS zu gewinnen. Dazu wurden einerseits Mutationsanalysen der Gene *ZFP57* und *HMGGA2* sowie der *GRB10*-CPGI2 durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene methylierungs-spezifische Verfahren wie MS-MLPA, MS-PCR und MS-SNuPE zum Nachweis bisher nicht identifizierter Epimutationen bei den SRS-Patienten etabliert und angewandt. Des Weiteren wurden genomweite Analysen mit DNA-Mikroarrays durchgeführt, um Hinweise auf neue Kandidatenregionen für das SRS zu erhalten.

5.1 Mutationsanalysen einzelner Gene und Regionen

5.1.1 Bedeutung von *ZFP57* für die Ätiologie des SRS

Durch die Arbeitsgruppe von Mackay et al. wurden 2008 genomische Mutationen im Transkriptionsfaktor *ZFP57* als Ursache für Hypomethylierungen an multiplen geprägten Loci bei Patienten mit TNDM identifiziert. Von der Hypomethylierung betroffen waren die Loci *PLAGL1*, *GRB10*, *PEG1/3* und/oder *KCNQ1OT1*. Aufgrund dieser Beobachtung wurde für *ZFP57* eine Rolle bei der Setzung und/oder Aufrechterhaltung von Methylierungssignalen während der frühen Embryonalentwicklung beim Menschen und eine Beteiligung an der Ätiologie von Imprintingkrankungen wie dem SRS postuliert (Hirasawa et al., 2008).

Um zu überprüfen, ob die ICR1-Hypomethylierung, die bei ca. 40 % der SRS-Patienten beobachtet werden kann, durch Mutationen in *ZFP57* verursacht wird, wurde das Gen bei 30 Patienten mit dieser Epimutation mittels direkter Sequenzierung auf Punktmutationen untersucht. Dabei wurde neben sechs bekannten Polymorphismen bei einem Patienten Homozygotie für die bisher nicht beschriebene Variante g.124723C>T (p.R125Q) in Exon 6 nachgewiesen (Spengler et al., 2009). Heterozygotie für diese Variante konnte sowohl bei den Eltern des Patienten als auch in zwei von 80 gesunden Kontrollpersonen (2,5 %) festgestellt werden. Eine pathogenetische Relevanz dieser Variante wurde aufgrund ihrer Häufigkeit in gesunden Kontrollpersonen und der mangelnden evolutionären Konservierung der von dem Austausch betroffenen Aminosäure ausgeschlossen. Zum Nachweis größerer, intragenischer Deletionen, die möglicherweise mittels Sequenzierung nicht detektierbar sind, wurde *ZFP57*

mit dem SNP6.0 Array auf Imbalancen ab 1 kb Größe untersucht (Markerabdeckung: 4 Oligos auf 4,7 kb). Dabei konnten keine Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen *ZFP57*-Mutationen und der ICR1-Hypomethylierung bei den SRS-Patienten ist daher unwahrscheinlich. Da bei den von Mackay et al. (2008) beschriebenen TNDM-Patienten ausschließlich maternal geprägte Loci betroffen waren, führen *ZFP57*-Mutationen möglicherweise bereits in der mütterlichen Keimbahn zu Imprintingdefekten. Die ICR1 ist jedoch auf dem paternalen Allel methyliert, so dass der bei den SRS-Patienten beobachteten Hypomethylierung möglicherweise ein anderer Entstehungsmechanismus zugrunde liegt. Auch bei BWS-Patienten mit einer Hypomethylierung der maternal methylierten *KCNQ1OT1* DMR konnten jedoch keine pathogenen Veränderungen in *ZFP57* nachgewiesen werden (Boonen et al., 2011). Da sowohl bei den untersuchten SRS- als auch den BWS-Patienten im Gegensatz zu den TNDM-Patienten isolierte Methylierungsstörungen am jeweils betroffenen Locus vorlagen, spielen *ZFP57*-Mutationen vermutlich nur bei Patienten mit Methylierungsstörungen mehrerer Loci eine Rolle.

5.1.2 Bedeutung von *HMGA2* für die Ätiologie des SRS

Erste Hinweise auf eine mögliche Relevanz von *HMGA2* für die Ätiologie des SRS lieferte der Nachweis von Mikrodeletionen in der Region 12q14 bei einigen Patienten mit SRS-Phänotyp (Spengler, 2008; Spengler et al., 2010; Lynch et al., 2011): Während bei allen Patienten, bei denen das Gen *HMGA2* von der Deletion betroffen war, eine Wachstumsretardierung beobachtet wurde, zeigten Patienten, bei denen die Deletion *HMGA2* nicht einschloss, ein normales Wachstum. Die Vermutung eines kausalen Zusammenhangs zwischen einer Haploinsuffizienz von *HMGA2* mit dem Kleinwuchs der Patienten wurde durch den Nachweis einer intragenischen Deletion in *HMGA2* bei einem Patienten mit idiopathischer Wachstumsretardierung untermauert (Buysse et al., 2009). Auch bei Mäusen mit Mutationen in *Hmga2* wurde eine Wachstumsretardierung beobachtet (Ashar et al., 1995), so dass eine Beteiligung dieses Faktors an Wachstums- und Entwicklungsprozessen anzunehmen ist.

Um zu überprüfen, inwieweit *HMGA2* eine Rolle für die Ätiologie des SRS spielt, wurde das Gen bei 20 idiopathischen SRS-Patienten mittels direkter Sequenzierung auf das Vorliegen

von Punktmutationen untersucht. Dabei konnten jedoch im gewählten Kollektiv weder bekannte Polymorphismen noch unbekannt Varianten nachgewiesen werden (Spengler et al., 2010). Zum Nachweis größerer, intragenischer Deletionen, die möglicherweise mittels Sequenzierung nicht detektierbar sind, wurde *HMGA2* mit dem SNP6.0 Array auf Imbalancen ab 1 kb Größe untersucht (Markerabdeckung: 67 Oligos auf 141,8 kb). Dabei konnten keine Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden. Als häufige Ursache für den Phänotyp idiopathischer SRS-Patienten kommen *HMGA2*-Mutationen somit nicht in Frage. Dennoch kann ein kausaler Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild einzelner Patienten aufgrund der o. g. Mikrodeletions-Fälle nicht ausgeschlossen werden.

5.1.3 Relevanz genomischer Mutationen der *GRB10*-CPGI2 für die Ätiologie des SRS

Aufgrund des Nachweises einer upd(7)mat bei 7-10% der SRS-Patienten sowie von Duplikationen der Region 7p11.2-p13 bei einzelnen Patienten wurde das geprägte Gen *GRB10*, das innerhalb dieser Region lokalisiert ist, als Kandidatengen für das SRS vorgeschlagen (zur Übersicht: Abu-Amero et al., 2008). Eine der bisher für das zytoplasmatische Adaptorprotein GRB10 *in-vivo* nachgewiesenen Funktionen ist die negative Regulation der IGF-Wachstumskaskade (Shiura et al., 2005; Wang et al., 2007). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass paternale Deletionen in der *Grb10* DMR (*GRB10*-CPGI2) bei Mäusen zu einer Maternalisierung des Expressionsmusters der durch diese DMR kontrollierten Gene führen. Die Überexpression des maternal exprimierten Faktors Grb10 resultierte in einer prä- und postnatalen Wachstumsretardierung bei den Mäusen (Shiura et al., 2009).

Zum Nachweis von Deletionen oder Punktmutationen wurde in der vorliegenden Arbeit die *GRB10*-CPGI2 von 20 SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung sowie 20 idiopathischen SRS-Patienten mittels direkter Sequenzierung analysiert. Dabei wurde bei drei idiopathischen SRS-Patienten sowie einem Patienten mit ICR1-Hypomethylierung Heterozygotie für dieselben drei bisher nicht in Datenbanken beschriebenen Varianten identifiziert. Eine dieser Varianten (g.42102G>C) lag in einem evolutionär konservierten Bereich der *GRB10*-CPGI2. Die drei Varianten konnten in zwei von 73 normalwüchsigen Kontrollpersonen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Frequenz der Varianten im Patientenkollektiv ist zwar mit 10 % (4/40) deutlich höher als die im Kontrollkollektiv nachgewiesene Häufigkeit von 2,7 %

(2/73), aufgrund der geringen Größe der untersuchten Kollektive ist dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant. Außerdem ist eher unwahrscheinlich, dass dieselben Varianten sowohl bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung als auch bei idiopathischen Patienten eine pathogenetische Bedeutung haben. Somit gibt es keinen Hinweis für eine Beteiligung von Punktmutationen oder Deletionen der *GRB10*-CPGI2 an der Ätiologie des SRS.

5.2 Nachweis von (Epi)mutationen bei SRS-Patienten

5.2.1 Ausschluss gewebespezifischer Mosaik der ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten und Mundschleimhaut

Bei etwa 40 % der SRS-Patienten kann eine Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 beobachtet werden. Diese Epimutation liegt wahrscheinlich aufgrund einer postzygotischen Entstehung meist als Mosaik bei den Patienten vor. Die Ergebnisse von Studien an einem eineiigen, für das SRS diskordanten Zwillingsspaar bestätigen das Vorliegen von (gewebespezifischen) Mosaiken bei den SRS-Patienten (Gicquel et al., 2005): Während bei beiden Zwillingen eine ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten vorlag, war die Epimutation in Hautfibroblasten nur beim betroffenen Zwilling nachweisbar. Derzeit wird in der Routinediagnostik in der Regel DNA aus Lymphozyten für die Analyse des Methylierungsstatus der ICR1 verwendet, so dass Mosaik, die andere Gewebe bzw. andere Zellsysteme betreffen, der Detektion entgehen.

Zum Nachweis gewebespezifischer Mosaik der ICR1-Hypomethylierung wurde daher in der vorliegenden Arbeit eine MS-MLPA an DNA aus Mundschleimhautzellen von 37 idiopathischen SRS-Patienten durchgeführt, bei denen die Epimutation in Lymphozyten nicht nachweisbar war. Zusätzlich wurde die Mundschleimhaut-DNA von 16 Patienten mit ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten untersucht, um festzustellen, ob die Epimutation in Mundschleimhaut ebenfalls nachweisbar ist und ob es Unterschiede in der Stärke der Hypomethylierung in den verschiedenen Geweben gibt. Soweit verfügbar wurden dazu Proben von beiden Wangenseiten analysiert, um Mosaik der beiden Körperseiten zu detektieren. Die MS-MLPA-Ergebnisse von fast 40 % der Proben waren aufgrund zu schlechter DNA-Qualität und/oder zu geringer DNA-Menge nicht auswertbar. Für die routinemäßige Anwendung in der MS-MLPA ist DNA aus Mundschleimhautabstrichen daher

nur sehr begrenzt geeignet. Bei den übrigen acht Patienten mit ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten konnte die Epimutation in der Mundschleimhaut bestätigt werden, wobei geringe Unterschiede im Grad der Hypomethylierung zwischen den Proben der beiden Wangenseiten sowie der Lymphozyten-DNA festgestellt werden konnten (Spengler et al., 2011). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis für das Vorliegen eines gewebespezifischen Mosaiks aufgrund einer postzygotischen Entstehung der Epimutation sein. Möglicherweise werden die Unterschiede in der Stärke der Hypomethylierung jedoch auch durch die o. g. Probleme mit der Qualität der aus Mundschleimhaut gewonnenen DNA vorgespiegelt. Bei den 25 SRS-Patienten ohne ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten konnte die Epimutation in DNA aus Mundschleimhaut ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Spengler et al., 2011). Diese negativen Befunde lassen sich einerseits durch die klinische Heterogenität des SRS erklären. Neben den Patienten mit klassischem SRS-Phänotyp gibt es auch solche mit sehr milde ausgeprägter Symptomatik, so dass die klinische Diagnosestellung schwierig ist. Die bei den SRS-Patienten beobachtete Wachstumsretardierung ist ein unspezifisches Symptom, das im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen auftreten kann. Daher wird bei einigen Patienten das Vorliegen eines SRS vermutet, bei denen jedoch eine andere Erkrankung vorliegt. Bei diesen sollte infolgedessen auch keine ICR1-Hypomethylierung nachweisbar sein. Eine weitere Erklärung ist der Einfluss anderer, bisher nicht identifizierter Faktoren auf die Ätiologie dieser SRS-Patienten. Außerdem kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass bei den Patienten ohne ICR1-Hypomethylierung in Lymphozyten und Mundschleimhaut die Epimutation in einem anderen, bisher nicht untersuchten, Gewebe vorliegt. Sehr wahrscheinlich ist diese Annahme jedoch nicht, da sowohl die positiven als auch die negativen Befunde bei allen Patienten in beiden Geweben bestätigt wurden, so dass davon auszugehen ist, dass eine Methylierungsstörung der ICR1 nicht auf einzelne Keimblätter beschränkt ist, sondern vielmehr entweder in allen Geweben vorliegt oder in keinem.

5.2.2 Analyse des *GRB10*-Locus mittels MS-PCR

Bei 7-10% der SRS-Patienten kann eine vollständige upd(7)mat bzw. eine segmentale upd(7q)mat nachgewiesen werden. Zum UPD-Nachweis sowie zur Detektion isolierter Methylierungsveränderungen wurde in der Vergangenheit eine MS-PCR für den *MEST*-Locus in 7q32 angewandt. Zur Bestätigung auffälliger Ergebnisse und zur Unterscheidung

segmentaler von vollständigen UPDs wurde eine Mikrosatelliten-Analyse durchgeführt. Der geprägte *GRB10*-Locus in 7p12 wird aufgrund der Identifizierung von Duplikationen dieser Region ebenfalls als Kandidatenregion für das SRS diskutiert. Die zusätzliche Durchführung einer MS-PCR für den *GRB10*-Locus sollte einerseits eine Unterscheidung zwischen vollständiger und segmentaler upd(7)mat und andererseits den Nachweis isolierter Methylierungsveränderungen am *GRB10*-Locus ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden dazu zwei MS-PCRs für den *GRB10*-Locus in Anlehnung an ein Protokoll von Mackay *et al.* (2008) etabliert und an fünf unauffälligen Kontrollproben sowie vier SRS-Patienten mit vollständiger und einem Patienten mit segmentaler upd(7q)mat validiert. Bei allen Patienten- sowie den Kontrollproben konnten die zuvor erhobenen Befunde mit den neu etablierten MS-PCRs bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden MS-PCRs für den *GRB10*-Locus eine geeignete Methode zum upd(7)mat-Nachweis bei den SRS-Patienten darstellen. Eine der beiden MS-PCRs wurde daraufhin in die Routinediagnostik implementiert, was kurze Zeit später zum Nachweis einer isolierten Hypermethylierung am *GRB10*-Locus bei einem SRS-Patienten führte (s. 5.5). Die Anwendung einer MS-PCR für den *GRB10*-Locus ist somit nicht nur zum upd(7)mat-Nachweis und zur Unterscheidung segmentaler von vollständigen UPDs sondern auch zur Identifizierung isolierter Methylierungsstörungen an diesem Locus bei SRS-Patienten sinnvoll.

5.2.3 Verwendung von MS-SNuPE zur Analyse multipler geprägter Loci

Neben den für die verschiedenen Imprintingkrankungen bekannten, spezifischen (Epi)mutationen wurden in letzter Zeit bei einigen Patienten Methylierungsstörungen an multiplen geprägten Loci beschrieben. Derzeit werden routinemäßig bei Patienten mit klinischem Verdacht auf SRS nur wenige geprägte Loci auf Methylierungsveränderungen untersucht. Mittels MS-PCRs werden die beiden DMRs auf Chromosom 7 (*MEST*, *GRB10*) analysiert. Diese erlauben jedoch keine Quantifizierung des Methylierungszustandes, so dass schwach ausgeprägte Mosaik möglicherweise der Detektion entgehen. Zum Nachweis von (Epi)mutationen, die die *H19* DMR sowie die *KCNQ1OT1* DMR in 11p15 betreffen, wird eine MS-MLPA durchgeführt. Diese erlaubt zwar bei ausreichender DNA-Qualität durchaus eine Quantifizierung, ist aber letztlich herstellungsbedingt auch auf die Analyse zweier Loci

beschränkt. Neben Hypomethylierungen der *H19* DMR sind bei einzelnen SRS-Patienten auch isolierte Hypomethylierungen der *IGF2* DMR (*IGF2P0*) in der ICR1 in 11p15 berichtet (Bartholdi et al., 2009; Gronskov et al., 2011). Mit den derzeit in der Routinediagnostik verwendeten Verfahren werden diese jedoch nicht erfasst.

Zum Nachweis von MLMD bei den SRS-Patienten sowie zur routinemäßigen Testung der *IGF2* DMR wurde aufgrund dessen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein MS-SNuPE Assay etabliert, der sowohl die gleichzeitige Analyse von acht verschiedenen geprägten Loci als auch eine zuverlässige Quantifizierung des Methylierungsstatus ermöglichen sollte. Sowohl für die Amplifikation der Zielfragmente als auch für die Primerverlängerungsreaktionen wurden verschiedene Primer-Kombinationen getestet, um die parallele Analyse der acht Loci zu optimieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass zwar eine variable Kombination der verschiedenen Primer möglich ist, Veränderungen am Ansatz sollten jedoch nur schrittweise erfolgen und die Ergebnisse kritisch beurteilt werden, da sich der Austausch einzelner Primer z. B. durch unspezifische Hybridisierungen an das falsche Zielfragment auf den gesamten Ansatz auswirken kann. Die Fragmente der acht Loci wurden schließlich zu zwei Multiplex-PCRs und einer Einzel-PCR kombiniert, um bei der PCR Zeit und Kosten zu sparen. Um einen zuverlässigen Nachweis von Methylierungsveränderungen zu gewährleisten, wurden außerdem für jeden Locus zwei nicht überlappende Primer für zwei verschiedene CpGs ausgewählt, die zu zwei unabhängigen Primerverlängerungsreaktionen kombiniert wurden.

Zur Validierung des neu etablierten Assays wurden 14 Patientenproben sowie vier Kontrollproben verwendet. Bei den Patienten waren im Vorfeld bereits mit anderen Methoden isolierte Methylierungsdefekte, UPDs oder Deletionen/Duplikationen identifiziert worden, die einen oder mehrere der mit dem neuen Assay analysierten geprägten Loci betrafen. Bei allen Proben konnten die zuvor mit anderen Methoden detektierten (Epi)mutationen mit dem neu etablierten MS-SNuPE Assay ebenfalls nachgewiesen werden. Neben den isolierten Methylierungsstörungen konnten auch die bei Patienten mit Duplikationen oder UPDs an den betroffenen Loci erwarteten Methylierungsveränderungen beobachtet werden. Eine Unterscheidung isolierter Methylierungsdefekte von Duplikationen/Deletionen oder UPDs ist jedoch mit dem MS-SNuPE Assay wie mit den meisten anderen methylierungs-spezifischen Analysemethoden nicht möglich und muss im Anschluss mit einer anderen Methode wie z.B. Mikrosatelliten-Analyse erfolgen. Der bei den verschiedenen SRS-Patienten mit MS-SNuPE nachgewiesene unterschiedliche Grad der Hypomethylierung am *H19*-Locus korrelierte mit

zuvor mittels MS-MLPA und MS-Pyrosequenzierung erhobenen Daten. Damit konnte gezeigt werden, dass eine genaue Quantifizierung unterschiedlicher Methylierungszustände mit MS-SNuPE möglich ist. Bei den Patienten mit H19-Hypomethylierung konnte eine Hypomethylierung der *IGF2* DMR mit ähnlichem Schweregrad beobachtet werden. Im Gegensatz zur MS-MLPA ermöglicht MS-SNuPE also zusätzlich zur Analyse der *H19* und der *KCNQ1OT1* DMR eine Analyse der *IGF2* DMR, so dass auch isolierte Methylierungsstörungen dieses Locus in 11p15 - wie sie bei manchen SRS-Patienten beschrieben wurden - nachgewiesen werden können. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des MS-SNuPE Assays wurden mit jeder Probe zwei Bisulfitbehandlungen durchgeführt. Die daraus errechneten und normierten Methylierungsindizes aus beiden Primerverlängerungsreaktionen wiesen nur sehr geringe Schwankungen im einstelligen Prozentbereich zwischen den verschiedenen Ansätzen auf, so dass von einer sehr guten Stabilität der Analyse und Reproduzierbarkeit der MS-SNuPE-Ergebnisse auszugehen ist. Um die Sensibilität des MS-SNuPE Assays für schwach ausgeprägte Mosaik sowie die Genauigkeit bei der Quantifizierung der Methylierung zu testen, wurde zusätzlich zur Untersuchung der o. g. Patientenproben eine Titrationsreihe mit unterschiedlichen Anteilen methylierter DNA analysiert. Hierbei wurde keine Normierung der Methylierungsindizes durchgeführt, sondern direkt die Rohdaten verglichen. Dabei konnte bei fast allen Loci ein nahezu linearer Anstieg der Methylierungsindizes im Verhältnis zum prozentualen Anteil der methylierten DNA beobachtet werden. Es konnte also gezeigt werden, dass der MS-SNuPE Assay eine geeignete Methode zur genauen Quantifizierung der Methylierung über eine große Streubreite von Methylierungszuständen und damit auch zum Nachweis schwach ausgeprägter Mosaik darstellt. Entgegen der Erwartung konnte aber bei manchen Loci weder eine vollständige Hypomethylierung noch eine komplette Hypermethylierung bei 0 % bzw. 100 % Anteil methylierter DNA dargestellt werden. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Entstehung eines geringfügigen Anteils von unspezifischen Produkten in der Primerverlängerungsreaktion einzelner Loci erklären. Dieser ist jedoch bei einem insgesamt linearen Anstieg der Titrationskurven vernachlässigbar, da bei der Analyse von Patientenproben im Gegensatz zur Analyse der Titrationsreihe eine Normierung der Proben erfolgt, so dass ein solcher systematischer Fehler bei der Ermittlung des Endergebnisses nicht mehr ins Gewicht fallen würde. Um die Notwendigkeit der Verwendung von Kontrollproben für den Nachweis von Methylierungsveränderungen bei den Patienten zu überprüfen, wurden verschiedene Berechnungsmethoden zur Normierung der

Methylierungsindizes getestet. Sowohl unter Verwendung der „Kontrollmethode“ als auch der „all-versus-all“- und der „patient-versus-patient“-Berechnung konnten alle Epimutationen bei den Patienten gleichermaßen korrekt identifiziert werden. Eine Verwendung von Kontrollproben ist somit nicht erforderlich, so dass Zeit und Kosten bei der Analyse gespart werden können.

Durch die o. g. Tests konnte gezeigt werden, dass der MS-SNuPE Assay eine zuverlässige Methode zum parallelen Nachweis und zur genauen Quantifizierung von Methylierungsstörungen an multiplen geprägten Loci darstellt. Diese kann - um zusätzlich Zeit und Kosten zu sparen - auch ohne die Verwendung von Kontrollproben erfolgen. Im Vergleich zur MS-MLPA und MS-PCR ist MS-SNuPE damit eine effizientere und sensitivere Methode sowohl zum Nachweis von MLMD als auch zur Detektion (schwach ausgeprägter Mosaik) isolierter Methylierungsdefekte.

5.3 Verwendung von DNA-Mikroarrays zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Arraysysteme der Firma Affymetrix, der Genome-Wide Human SNP Array 6.0 und der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array, zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen bei den SRS-Patienten etabliert und auf ihre Anwendbarkeit hin getestet.

Zur Etablierung der Mikroarray-Analytik mit dem SNP6.0 Array wurde initial die „R“-Software mit dem „aroma.affymetrix“-Package verwendet. Da diese jedoch nur sehr begrenzte Möglichkeiten zur Visualisierung der Ergebnisse bietet, wurde zusätzlich die Genotyping Console (GTC) der Firma Affymetrix etabliert. Zur Normierung der Rohdaten wurde zunächst eine von der Firma Affymetrix bereitgestellte Datei aus den Daten von 270 HapMap-Kontrollen verwendet. Dies führte jedoch zu einer starken Streuung der Ergebnisse, wodurch eine zuverlässige Bestimmung der Kopienzahl oft nicht mehr möglich war. Diese Streuung wird durch einen so genannten „Laborfingerabdruck“ verursacht, der aufgrund variabler laborspezifischer Parameter entsteht. Zur Vermeidung dieses Problems wurde im Folgenden eine Referenzdatei aus 90 im eigenen Labor analysierten Proben für die Mikroarray-Analyse verwendet. Dadurch konnte eine optimale Qualität der Resultate erhalten werden, die eine Auflösung von 100 kb ermöglichte. Die Nutzung im selben Labor analysierter Proben als Referenz ist daher bei der Anwendung des SNP6.0 Array für

hochauflösende Analysen unerlässlich. Zur Validierung des SNP6.0 Array wurden vier Proben von Patienten mit bekannten Auffälligkeiten verwendet. Unter Verwendung der Referenzdatei aus im eigenen Labor analysierten Proben konnten die Imbalancen bei allen Patienten mit ähnlichen Bruchpunkten bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass der SNP6.0 Array eine zuverlässige und genaue Methode zum Nachweis submikroskopischer chromosomaler Imbalancen ist.

Im Zuge der Etablierung des Cytogenetics Array wurde die Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software zur Array-Auswertung verwendet: Diese kann neben der Analyse der Rohdaten und Visualisierung der Ergebnisse des Cytogenetics 2.7M Array auch für die Darstellung der Ergebnisse des SNP6.0 Array genutzt werden. Gegenüber der GTC bietet diese Software zahlreiche Vorteile bei der Array-Auswertung, dazu gehören eine bessere Visualisierung der Ergebnisse, die Möglichkeit der Erstellung eigener Annotations-Dateien sowie eine vereinfachte Dokumentation der Ergebnisse. Aufgrund dessen wurde die ChAS im Folgenden nach einer Analyse der Rohdaten mit der GTC für die Visualisierung der Ergebnisse und die Auswertung der SNP6.0 Arrays bei den SRS-Patienten verwendet.

Kurze Zeit nach der Implementierung des SNP6.0 Arrays zur Analyse der SRS-Patienten wurde von der Firma Affymetrix ein neues Arraysystem zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen, der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array, eingeführt, der theoretisch eine noch höhere Auflösung bei gleichzeitiger Kosten- und Zeitersparnis bieten sollte. Aufgrund dessen wurde der Cytogenetics Array ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf seine Verwendbarkeit getestet und an fünf Patientenproben mit bekannten Auffälligkeiten validiert. Die Qualitätsparameter der analysierten Proben waren sehr gut und alle Auffälligkeiten konnten mit ähnlichen Bruchpunkten mit dem Cytogenetics Array bestätigt werden. Aufgrund dieser viel versprechenden Resultate wurde der Cytogenetics Array für die Analyse von 23 weiteren Patienten verwendet. Allerdings konnte nur bei 14 % der Proben eine ausreichende Qualität der Ergebnisse für eine Auflösung von 100 kb - wie sie beim SNP6.0 Array unter Verwendung eigener Referenzen bei allen Proben möglich war – erhalten werden. Während bei weiteren 61 % der Proben noch eine Auflösung von 200 kb für die Auswertung möglich war, konnten die übrigen sieben Proben (25 %) aufgrund zu schlechter Qualitätsparameter überhaupt nicht analysiert werden. Weder eine Wiederholung des kompletten Ansatzes noch diverse Versuche zur Aufreinigung der DNA mit verschiedenen Methoden führten zu einer Verbesserung der Resultate. Eine Korrelation zwischen der DNA-Qualität bzw. Methode der DNA-Isolation mit der Qualität der Resultate konnte nicht festgestellt werden. Neben dieser

Problematik fiel bei allen Proben eine Konzentrierung der falsch positiven Ergebnisse auf die perizentrischen und zentromerischen Regionen sowie auf die Geschlechtschromosomen auf. Dieses Problem konnte von der Firma schnell und einfach durch die Entfernung der Marker in den problematischen Regionen und die Herausgabe neuer Annotationsdateien behoben werden. Infolge dieser Optimierung standen schließlich 23 % weniger Marker - statt den ursprünglichen 2,7 Millionen nur noch 2,1 Millionen - zur Verfügung. Im Vergleich zum SNP6.0 Array mit 1,8 Millionen Markern war das ursprünglich beworbene theoretisch wesentlich höhere Auflösungsvermögen des Cytogenetics Array damit zwar nicht mehr gegeben, das Auftreten falsch positiver Resultate in den Problemregionen wurde jedoch konsequent verhindert. Aufgrund dieser Optimierung der Markerabdeckung und vor dem Hintergrund der o. g. Problematik des unerklärlichen Fehlschlagens der Analyse bei einzelnen Proben und den damit verbundenen zusätzlichen Kosten sowie dem Zeitaufwand für die erfolglose Wiederholung der Experimente ist der Cytogenetics Array trotz der von Firmenseite angepriesenen Vorteile gegenüber dem SNP6.0 Array als Methode zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen mit hoher Auflösung gänzlich ungeeignet. Inzwischen wurde der Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array aufgrund der o. g. unlösbaren Probleme von der Firma Affymetrix vom Markt genommen und durch ein anderes Produkt ersetzt, welches auf dem System des SNP6.0 Array basiert und zuverlässigere Analysen versprechen soll...

Einen positiven Aspekt der Einführung des Cytogenetics Array stellt jedoch die parallel eingeführte Analysesoftware, die ChAS, dar, die sich auch zur Visualisierung und Auswertung der Ergebnisse des SNP6.0 Array eignet und durch ihre Benutzerfreundlichkeit die Analyse dieses Arrays wesentlich erleichtert.

5.4 Häufigkeit und Relevanz submikroskopischer genomischer Imbalancen und partieller Isodisomien für das SRS

5.4.1 Bedeutung für die Ätiologie bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung

Bei ca. 40 % der SRS-Patienten kann eine Hypomethylierung der ICR1 in 11p15 nachgewiesen werden, die zu einer veränderten Expression der dort lokalisierten, geprägten Gene führt. Inwieweit es sich bei dieser Veränderung um einen primären oder einen

sekundären, durch eine bisher nicht identifizierte andere Veränderung hervorgerufenen, Effekt handelt, ist derzeit unklar. Beispielsweise könnten dem Imprintingdefekt Mutationen in *trans* wirkenden Faktoren, die an der Setzung und/oder Aufrechterhaltung von Methylierungssignalen beteiligt sind, zugrund liegen. Diese Theorie wird durch den Nachweis von *ZFP57*-Mutationen bei TNDM-Patienten mit maternalem Hypomethylierungs-Syndrom (Mackay et al., 2008) sowie von *NLRP2*-Mutationen bei einer Mutter von zwei BWS-Patienten mit ICR2-Hypomethylierung untermauert (Meyer et al., 2009). Denkbar wäre, dass die infolge einer genomischen Imbalance veränderte Dosis eines solchen in *trans* wirkenden Faktors zur bei den SRS-Patienten beobachteten ICR1-Hypomethylierung führt. Möglich wäre aber auch ein Zusammenhang zwischen den Methylierungsstörungen der ICR1 mit Veränderungen in *cis* wie Mikrodeletionen der CTCF-Bindestellen in der *H19* DMR, die bei BWS-Patienten mit ICR1-Hypermethylierung beschrieben wurden (Sparago et al., 2004; Prawitt et al., 2005) (s. 5.4.3).

Zum Nachweis submikroskopischer Imbalancen, die möglicherweise einen Hinweis auf die Ursache der ICR1-Hypomethylierung geben könnten, wurden 31 Patienten mit der Epimutation untersucht. Während ein Großteil der dabei gefundenen Imbalancen aufgrund ihrer Familiarität als apathogen eingestuft wurde, bleibt die klinische Relevanz der bei drei Patienten nachgewiesenen Veränderungen derzeit unklar.

Interessanterweise wurde bei zwei Patienten (**SR3759**, **SR9271**) eine paternale Duplikation desselben Bereichs in 17q25 detektiert, die bisher nicht in Kontrollkollektiven beschrieben wurde. Innerhalb dieser Duplikation sind 14 Gene lokalisiert, die jedoch keinen offensichtlichen Zusammenhang zur Ätiologie des SRS aufweisen. In der DECIPHER-Patientendatenbank sind neun Patienten mit derselben Aberration hinterlegt. Zu diesen ist jedoch entweder gar kein Phänotyp aufgeführt oder sie weisen keine SRS-Merkmale auf. Bei fünf dieser Patienten wurde eine Vererbung von einem klinisch unauffälligen Elternteil nachgewiesen. Da die Duplikation bei zwei SRS-Patienten, jedoch bei keiner Kontrollperson gefunden wurde, könnte eine Assoziation mit dem SRS-Phänotyp vorliegen.

Beim Patienten **SR10125** wurde eine *de-novo* 131 kb-Deletion in 15q15 identifiziert, von der fünf Gene betroffen sind. Für diese ist jedoch weder ein funktioneller Zusammenhang zum SRS offensichtlich noch sind in der DECIPHER-Datenbank Patienten mit ähnlichen Veränderungen hinterlegt. Daher bleibt die klinische Relevanz dieser Veränderung unklar.

Durch die Mikroarray-Analyse bei den 31 Patienten mit ICR1-Hypomethylierung konnten weder bei der genomweiten Suche nach Imbalancen ab einer Größe von 100 kb noch bei der

gezielten Analyse der bekannten Kandidatenregionen mit einer Auflösung von 1kb Hinweise auf die Beteiligung eines in *trans* wirkenden Faktors an den bei den Patienten beobachteten Methylierungsstörungen gefunden werden. Punktmutationen, wie sie bei den o. g. Patienten mit TNDM und BWS nachgewiesen wurden, können jedoch mit dem verwendeten Arraysystem nicht erfasst werden. Ein endgültiger Ausschluss der Beteiligung eines solchen Faktors an der Ätiologie des SRS ist daher mit den durchgeführten Array-Analysen nicht möglich.

5.4.2 Bedeutung für die Ätiologie bei idiopathischen Patienten

Derzeit kann bei ca. 40 % der SRS-Patienten eine (Epi)mutation in der Region 11p15 und bei weiteren 7-10 % eine upd(7)mat identifiziert werden, während bei den übrigen 50 % der Patienten keine dieser (epi)genetischen Veränderungen nachweisbar ist. Bei einzelnen Patienten mit SRS-Phänotyp wurden mikroskopisch sichtbare, strukturelle Umbauten verschiedener Chromosomen beschrieben (zur Übersicht: Abu-Amero et al., 2008). Kürzlich wurden in ersten Screening-Studien außerdem Patienten mit SRS-typischem Phänotyp identifiziert, die submikroskopische (< 3 Mb) Imbalancen trugen (Bruce et al., 2010; Spengler et al., 2010).

Daher wurden zum Nachweis dieser Veränderungen in der vorliegenden Arbeit 42 idiopathische Patienten mit klinischem Verdacht auf SRS mit dem hochauflösenden SNP6.0 Array untersucht. Neben zahlreichen häufigen CNVs und seltenen, benignen familiären Varianten wurden dabei in 9 der 42 Patienten (21,4 %) Kopienzahlveränderungen identifiziert, die aufgrund ihrer Größe und ihres Gengehalts, der Beschreibung ähnlicher Veränderungen bei Patienten mit SRS-Merkmalen und/oder der Überlappung mit bekannten Syndromen als pathogen eingestuft wurden.

Beim Patienten **SR1251/06** wurde eine heterozygote *de-novo* 22q11-Mikrodeletion innerhalb der DiGeorge-Syndrom-kritischen Region identifiziert. Bei dem Patienten wurden eine Wachstumsretardierung sowie mehrere weitere SRS-Merkmale jedoch keine typischen DiGeorge-Symptome wie Herzfehler oder mentale Retardierung berichtet. Das klinische Spektrum bei Patienten mit 22q11-Mikrodeletion ist aber sehr variabel und reicht von sehr schweren Phänotypen bis hin zu klinisch unauffälligen Trägern. Eine Wachstumsretardierung wie bei unserem Patienten wurde bei 16-26 % der Patienten mit diesem

Mikrodeletionssyndrom berichtet (Bassett et al., 2005; Choi et al., 2005). Da Kleinwuchs eine häufige Beobachtung in 22q11-Mikrodeletionsträgern zu sein scheint und dieses Symptom ein unspezifisches Merkmal ist, das im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen auftritt, ist es nahe liegend, dass der SRS-ähnliche Phänotyp bei SR1251/06 durch die 22q11-Mikrodeletion verursacht wird.

Bei den Patienten **SR5695** und **SR9116** wurden zwei größtenteils überlappende Deletionen im Bereich des distalen 1q21-Mikrodeletionssyndroms identifiziert. Während die Deletion bei SR5695 *de-novo* entstanden ist, konnte sie bei der Mutter von SR9116 ebenfalls nachgewiesen werden. Das klinische Spektrum beim 1q21-Mikrodeletionssyndrom ist sehr variabel und schließt eine milde bis moderate Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie, Herzfehler sowie Dysmorphiezeichen ein (zur Übersicht: Brunetti-Pierri, 2008; Mefford et al., 2008). Außerdem wurden häufig Verhaltensauffälligkeiten wie die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Autismus und Depressionen beobachtet. Ein Kleinwuchs (<P10) wurde bei 47,6 % (10/21) der Patienten beschrieben (Mefford et al. 2008). Als Ursache für die Wachstumsretardierung bei den Patienten wird eine Haploinsuffizienz des *CHD1L*-Gens infolge der Deletion vermutet (Harvard et al., 2011). *CHD1L* spielt eine Rolle beim Chromatinremodelling, der Dekatenierung sowie in der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen (Deng 2009, Ahel 2009). In Zelllinien mit der 1q21-Deletion wurde ein ähnlicher Defekt im Chromatinremodelling aufgrund einer gestörten Dekatenierung wie bei Werner-Syndrom-Zellen beobachtet (Harvard 2011). Da das einzige gemeinsame Symptom beider Syndrome eine Wachstumsretardierung war, wurde ein Effekt der *CHD1L*-Haploinsuffizienz auf das Wachstum postuliert. Aufgrund der o. g. Studien und der Tatsache, dass die 1q21-Mikrodeletion in zwei unserer idiopathischen Patienten gefunden wurde, ist ein Zusammenhang zwischen dieser Veränderung und der klinischen Symptomatik dieser beiden Patienten wahrscheinlich. Beim Patienten SR5695 wurden außerdem zusätzlich zu den SRS-Merkmalen eine ADHS sowie eine Mitralklappeninsuffizienz berichtet, die zum klinischen Bild des 1q21-Mikrodeletionssyndroms passen. Sowohl eine *de-novo* Entstehung wie bei SR5695 als auch die Vererbung von klinisch unauffälligen Elternteilen - wie sie möglicherweise bei SR9116 vorliegt - wurde bereits beschrieben (Mefford et al., 2008).

In einer Familie wurde bei zwei wachstumsretardierten Schwestern (**SR6820**, **SR10737**) sowie deren kleinwüchsiger Mutter (**SR6819**) eine familiäre 1,05 Mb Duplikation in 22q13 identifiziert. Die normal großen Brüder der Mutter konnten bisher nicht molekulargenetisch untersucht werden, so dass derzeit unklar ist, ob die Veränderung in der Familie mit dem

Kleinwuchs segregiert oder möglicherweise nur eine benigne, familiäre Variante darstellt. Letzteres ist jedoch aufgrund der Größe und des Gengehalts der Veränderung weniger wahrscheinlich. In der Literatur ist nur ein Fall mit einer wesentlich größeren, überlappenden Duplikation beschrieben (Pramparo et al., 2008). Bei diesem Patienten lag ebenfalls eine pränatale Wachstumsretardierung vor, postnatal waren die Wachstumsparameter auf der 3. Perzentile. Aufgrund des Auftretens der Duplikation bei drei wachstumsretardierten Familienmitgliedern sowie der Größe und des Gengehalts ist von einer pathogenen Relevanz dieser Veränderung auszugehen.

Bei der Patientin **SR6882** wurde eine heterozygote *de-novo* 5,38 Mb Mikrodeletion identifiziert, die unter anderem das Gen *IGF1R* betraf. Mikrodeletionen und Punktmutationen, die zu einer Haploinsuffizienz des *IGF1R*-Gens führen, wurden bereits bei Patienten mit SRS-Merkmalen beschrieben (Ester et al., 2009; Veenma et al., 2010; Choi et al., 2011). Daher ist ein kausaler Zusammenhang dieser Veränderung mit dem Phänotyp von SR6882 anzunehmen.

Bei der Patientin **SR7705** wurde eine *de-novo* 9,16 Mb Duplikation in Xq25-q27 dargestellt, die 55 RefSeq-Gene betraf. Obwohl weder in der DECIPHER-Datenbank noch in der Literatur Patienten mit vergleichbaren Veränderungen hinterlegt sind, wurde die Duplikation aufgrund ihrer Größe und ihres Gengehalts sowie ihres *de-novo* Auftretens als pathogen eingestuft.

Bei den Patienten **SR8464** und **SR10177** wurden zwei überlappende Deletionen innerhalb der bei Patienten mit Miller-Dieker-Syndrom (MDS) deletierten Region in 17p13 identifiziert. Die typischerweise bei MDS-Patienten deletierten Gene *YWHAE* und *PFAFH1B1* waren bei unseren Patienten nicht von der Deletion betroffen; sie zeigten erwartungsgemäß keinen typischen MDS-Phänotyp. Im bei beiden Patienten deletierten Bereich von 519 kb waren 16 Gene lokalisiert, darunter das *RPA1*-Gen, das zum ATR-Signalweg für die DNA-Reparatur gehört. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Haploinsuffizienz von Faktoren, die am ATR-Signalweg beteiligt sind, und einer Mikrozephalie sowie Wachstumsretardierung wird u. a. bei Patienten mit MDS vermutet (O'Driscoll et al., 2007). Patienten mit ähnlichen Deletionen wie sie bei unseren Patienten gefunden wurden und prä- bzw. postnataler Wachstumsretardierung (Patienten 5, 6a und 6b) wurden von Bruno et al. (2009) beschrieben. In der DECIPHER-Datenbank sind ebenfalls Patienten mit teilweise überlappenden Deletionen und Wachstumsretardierung hinterlegt, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass die

17p13-Mikrodeletion von pathogenetischer Relevanz für den SRS-ähnlichen Phänotyp bei unseren beiden Patienten ist.

Neben den o. g. pathogenen Imbalancen wurden bei weiteren fünf der 42 Patienten (11,9 %) CNVs mit unklarer klinischer Signifikanz nachgewiesen, die weder in Kontrollkollektiven beschrieben wurden noch einen offensichtlichen Zusammenhang mit dem Phänotyp der Patienten aufwiesen.

Beim Patienten **SR398/07** wurde eine *de-novo* Duplikation in 15q21 detektiert, die drei Gene enthielt, darunter den Zellzyklusregulator *CCPG1*, für den eine pathogenetische Relevanz in Bezug auf die Wachstumsretardierung des Patienten denkbar wäre. Es wurden jedoch bisher weder für diesen Faktor noch für die andern beiden Gene Veränderungen im Zusammenhang mit einer Wachstumsstörung beschrieben. Weder in der DECIPHER-Datenbank noch im eigenen Kollektiv konnte diese Veränderung bei weiteren Patienten gefunden werden, so dass ihre Relevanz für das SRS derzeit unklar bleibt.

Bei **SR596/07** wurde eine heterozygote *de-novo* Deletion in 16q24 nachgewiesen. Von der Aberration sind zwei Gene betroffen, darunter der Transkriptionsregulator *ANKRD11*. Ein Einfluss einer veränderten Dosis eines an der Regulation der Genexpression beteiligten Faktors auf das Wachstum des Patienten ist vorstellbar. Allerdings ist kein direkter Zusammenhang mit der Ätiologie des SRS offensichtlich. In der DECIPHER-Datenbank ist ein Patient (249412) mit einer teilweise überlappenden 180 kb-Deletion hinterlegt, der einige SRS-Merkmale wie eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung sowie eine Klinodaktylie aufweist. Dieser Patient zeigte allerdings weitere Auffälligkeiten wie eine Mikrozephalie sowie einen Herzfehler, die weder beim Patienten SR596/07 beobachtet wurden noch zu den typischen SRS-Merkmalen zählen. Aufgrund dessen bleibt die klinische Signifikanz der o. g. Deletion unklar.

Beim Patienten **SR4178** wurde eine heterozygote *de-novo* Deletion in 1q21 identifiziert. Deletionen in dieser Region sind bei Patienten mit TAR-Syndrom beschrieben, scheinen aber nur in Verbindung mit einer bisher nicht identifizierten, zweiten modifizierenden Veränderung eine klinische Relevanz zu haben (Klopocki et al., 2007). Das typische klinische Bild bei Patienten mit TAR-Syndrom weist keine Ähnlichkeit mit dem SRS-Phänotyp auf. Eine Bedeutung dieser Imbalance für den SRS-Phänotyp kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da es kaum Studien mit klinischen Daten zu Patienten ohne TAR-Syndrom, die diese Mikrodeletion tragen, gibt.

Bei den Patienten **SR6415** und **SR9937** wurden überlappende Duplikationen paternaler bzw. maternaler Herkunft in 16p13 identifiziert. Für diese chromosomale Region ist sowohl ein Mikrodeletions- als auch ein Mikroduplikationssyndrom beschrieben (zur Übersicht: Hannes et al., 2008). Während für die Deletion ein Zusammenhang mit mentaler Retardierung und angeborenen Fehlbildungen vermutet wird, scheint die Duplikation eine seltene benigne Variante zu sein. Diese wurde in der o. g. Publikation in fünf von 1682 unauffälligen Kontrollpersonen nachgewiesen (0,29 %). Im Zusammenhang mit einer Wachstumsretardierung wurde die 16p13-Duplikation nicht berichtet. Im eigenen Kontrollkollektiv (n=100) konnte diese Veränderung jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, während sie in zwei von 42 SRS-Patienten (4,7 %) identifiziert wurde. Beim Vater von SR6415, der die Duplikation ebenfalls trägt, wurde ebenfalls eine Wachstumsretardierung berichtet; von der Mutter von SR9937 lagen keine klinischen Daten vor. Aufgrund des Nachweises der Duplikation bei drei wachstumsretardierten Personen könnte eine Assoziation dieser Imbalance mit einem SRS-ähnlichen Phänotyp vermutet werden.

Zusammenfassend wurden in einem erheblichen Anteil der idiopathischen SRS-Patienten (21,4 %) pathogene submikroskopische Imbalancen nachgewiesen. Bei weiteren 11,9 % der Patienten wurden CNVs mit derzeit unklarer klinischer Signifikanz identifiziert. Möglicherweise wird eine abschließende Bewertung dieser Imbalancen durch die Identifizierung weiterer Patienten mit ähnlichen Veränderungen ermöglicht. Die o. g. Ergebnisse zeigen, dass eine routinemäßige Testung der SRS-Patienten nach Ausschluss der häufigen (Epi)mutationen mittels Mikroarray-Analyse indiziert ist. Die Variabilität der im Rahmen dieser Studie erhobenen molekulargenetischen Befunde reflektiert das breite klinische Spektrum des SRS bzw. der phänotypischen Merkmale, die – möglicherweise irrtümlich – als SRS diagnostiziert werden. Aufgrund der geringen Spezifität der Symptome, insbesondere der Wachstumsretardierung, die als Begleitsymptom zahlreicher Erkrankungen beobachtet werden kann, ist eine sichere diagnostische Zuordnung der Patienten zum SRS sehr schwierig. Offensichtlich gibt es einige klinische Überlappungen mit verschiedenen Mikrodeletionssyndromen wie dem 22q11-, dem 1q21- und dem 17p13-Mikrodeletionssyndrom (und evtl. auch dem 16p13-Mikroduplikationssyndrom), die bei einer milden Verlaufsform dieser Syndrome zu einer irrtümlichen Zuordnung der Patienten zum SRS führen können. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass nur bei einem Teil der o. g. idiopathischen Patienten ein klinischer Score ermittelt wurde, der für eine

Einordnung als typische SRS-Patienten ausreichte. Vergleicht man den durchschnittlichen Score der idiopathischen Patienten mit dem der Patienten mit ICR1-Hypomethylierung (s. Tab. 6.23), die generell einen klassischeren SRS-Phänotyp aufweisen als die anderen Subgruppen, liegt der Mittelwert bei den idiopathischen Patienten mit fast 25 Prozentpunkten deutlich darunter. Verallgemeinern lässt sich die Aussage eines wenig typischen SRS-Phänotyps bei den idiopathischen Patienten jedoch nicht, da bei einer Patientin (SR6820) ein Score berechnet wurde, der im oberen Bereich der Streubreite des Scores bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung und klassischem SRS lag. Infolgedessen bleiben eine sichere Diagnosestellung der SRS- oder SRS-ähnlichen Patienten und eine Einordnung in molekulare Subgruppen alleine aufgrund der klinischen Merkmale unmöglich. Mit der Durchführung einer Mikroarray-Analyse nach Ausschluss der häufigen (Epi)mutationen kann jedoch in einem signifikanten Anteil der Patienten eine molekulargenetische Ursache für den klinischen Phänotyp gefunden werden. Die Anwendung dieser Methode ist somit nicht nur bei Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Ätiologie angezeigt, bei denen mittlerweile routinemäßig Array-Analysen durchgeführt werden.

5.4.3 Relevanz von Mikrodeletionen/-duplikationen in der geprägten Region 11p15.5

Bei einigen BWS- und/oder SRS-Patienten wurden Mikrodeletionen bzw. –duplikationen beschrieben, die die ICRs in der geprägten Region 11p15.5 betrafen (Sparago et al., 2004; Prawitt et al., 2005; Demars et al., 2011a, 2011b; Gronskov et al., 2011). Zum Nachweis von Kopienzahlveränderungen mit einer Größe ab 1 kb, die mit der MS-MLPA für die Region 11p15 aufgrund der Sonden-Abdeckung nicht erfasst werden können, wurde der SNP6.0 Array verwendet. Weder bei den 31 SRS-Patienten mit ICR1-Hypomethylierung noch bei den 42 idiopathischen Patienten konnte eine Mikrodeletion/-duplikation im analysierten Bereich nachgewiesen werden, so dass diese Veränderungen trotz des Nachweises bei einzelnen Patienten insgesamt für das SRS wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen. Nicht auszuschließen ist jedoch das Vorliegen von Deletionen die kleiner als 1 kb sind bzw. die durch eine unzureichende Markerabdeckung des SNP6.0 Arrays in bestimmten Bereichen der Region 11p15.5 möglicherweise der Detektion entgehen.

5.4.4 Bedeutung somatischer CNV-Mosaik für das SRS

Bei einer vergleichenden Studie zu CNVs bei konkordanten und diskordanten eineiigen Zwillingspärchen fanden Bruder et al. 2008 in beiden Gruppen unterschiedlich stark ausgeprägte somatische Mosaik für verschiedene CNVs bei beiden Zwillingen. Zum Nachweis unterschiedlicher CNV-Profile wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit DNA aus Lymphozyten sowie aus Fibroblasten-Kulturen von einem eineiigen, für das SRS diskordanten Zwillingspärchen (SR6247 und SR7231) mit dem SNP6.0 Array untersucht. Dabei wurde ein größtenteils übereinstimmendes CNV-Muster bei den beiden Zwillingen in beiden untersuchten Geweben festgestellt. Zwei CNVs auf Chromosom 14q11.2 wurden allerdings bei beiden Zwillingen nur in der DNA aus Lymphozyten detektiert. Hierbei scheint es sich also um ein gewebe-spezifisches CNV-Mosaik zu handeln wie es bereits in der Literatur bei eineiigen Zwillingen beschrieben wurde. Da dieses jedoch bei beiden Zwillingen gleichermaßen beobachtet werden konnte, ist ein kausaler Zusammenhang mit dem Phänotyp des betroffenen Zwilling nicht wahrscheinlich.

5.4.5 Bedeutung partieller Isodisomien an geprägten Loci bei den SRS-Patienten

Zum Nachweis partieller Isodisomien wurden die geprägten Loci *H19* (11p15), *IGF2P0* (11p15), *KCNQ1OT1* (11p15), *MEST* (7q32), *GRB10* (7p12), *MEG3* (14q32), *PLAGL1* (6q24) sowie *IGF2R* (6q25) mit Hilfe des SNP6.0 Arrays auf das Vorliegen von Homozygotie-Blöcken über einer Größe von 1 Mb untersucht. Dabei wurden bei vier Patienten LOH-Blöcke an verschiedenen geprägten Loci nachgewiesen. Aufgrund der geringen Häufigkeit des Auftretens dieser LOH-Blöcke sowie der fehlenden Rekurrenz der Beobachtungen ist ein kausaler Zusammenhang zum SRS-Phänotyp der Patienten aber unwahrscheinlich. Außerdem ist aufgrund der geringen Größe der Blöcke von 1-1,5 Mb nicht von einer partiellen Isodisomie auszugehen sondern vielmehr von einem zufällig gehäuftem Auftreten homozygoter SNPs in den betroffenen Bereichen wie es im gesamten Genom zu beobachten ist. Eine Relevanz partieller Isodisomien an geprägten Loci für das SRS ist damit eher unwahrscheinlich.

5.5 Bedeutung (epi)genetischer Veränderungen auf Chromosom 7 für das SRS

Seit der Identifizierung maternaler UPDs des Chromosoms 7 bei einigen SRS-Patienten wird eine Beteiligung Chromosom-7 codierter Faktoren an der Ätiologie der Erkrankung vermutet. Aufgrund des Nachweises segmentaler UPDs des langen Arms von Chromosom 7 sowie von Duplikationen auf dem kurzem Arm werden zwei Kandidatenregionen mit geprägten Genen für das SRS diskutiert: die Region 7q32 mit dem *MEST*-Locus sowie die Region 7p12 mit dem *GRB10*-Locus. Einen konkreten Beweis für eine Beteiligung eines dieser Faktoren an der Pathogenese des SRS gibt es jedoch bisher trotz zahlreicher Screening-Studien nicht (Mergenthaler et al., 2001; Arnaud et al., 2003; Monk et al., 2003; Schönherr et al., 2007a).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei einem SRS-Patienten (**M9475**) eine heterozygote *de-novo* 3,7 Mb-Deletion paternalen Herkunft in der Region 7q32 identifiziert, die unter anderem das Gen *MEST* betraf. *MEST* wird vom paternalen Allel exprimiert. Funktionell entspricht eine paternale Deletion also einer maternalen UPD, so dass bei dem Patienten ein ähnlicher Phänotyp wie bei Patienten mit upd(7)mat erwartet werden könnte. Tatsächlich wiesen die Wachstumsparameter sowie einige kraniofaziale Merkmale beim Patienten M9475 in der neonatalen Phase auf das Vorliegen eines SRS hin. Mit zunehmendem Alter traten jedoch weitere klinische Auffälligkeiten wie eine globale Entwicklungsverzögerung und eine schwere Hypotonie in den Vordergrund (Eggermann et al., 2011). Aufgrund der Größe der Deletion und der Anzahl der betroffenen Gene ist eine sichere Beurteilung, ob und in welchem Ausmaß sich die Haploinsuffizienz eines einzelnen dieser Faktoren auf den Phänotyp des Patienten auswirkt, letztlich nicht möglich. Inwieweit eine paternale Deletion des *MEST*-Gens zur Ausprägung eines SRS-Phänotyps führt, bleibt daher derzeit unklar.

Beim Patienten **M7870** wurde in der vorliegenden Arbeit eine isolierte Hypermethylierung des *GRB10*-Locus nachgewiesen. Diese Veränderung entspricht funktionell einer upd(7)mat, so dass ein Zusammenhang mit dem SRS plausibel wäre. Da zur Klinik des Patienten außer dem klinischen Verdacht auf SRS keine weiteren Angaben vorlagen, bleibt jedoch unklar, inwieweit die Veränderung tatsächlich zur Ausprägung von SRS-Merkmalen führt. Zusätzlich wurde bei dem Patienten außerdem eine heterozygote *de-novo* 1,03 Mb-Deletion in 20p13 dargestellt. Von der Deletion sind 21 Gene betroffen, von denen drei an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt sind: *TCF15*, *ZCCH3* und *CSNK2A1*. *TCF15* ist ein Transkriptionsfaktor, *ZCCH3* ein Zinkfingerprotein und *CSNK2A1* spielt eine Rolle beim WNT-Signalweg. Kürzlich wurde für das SRS-Kandidatengen *MEST* ebenfalls eine

regulatorische Funktion für diesen Signalweg beschrieben (Jung et al., 2011). Es ist also denkbar, dass eine Fehlregulation dieses Signalwegs eine Rolle bei der Ätiologie des SRS spielt. In der DECIPHER-Datenbank sind zwar Patienten mit teilweise überlappenden Deletionen beschrieben, die deletierten Bereiche sind jedoch entweder wesentlich kleiner oder größer als bei Patient M7870 oder bei den Patienten wurden zusätzliche chromosomale Imbalancen nachgewiesen. Eine Wachstumsretardierung wurde bei diesen Patienten nicht beobachtet. In der Literatur sind zwei Fälle mit Deletionen ähnlicher Größe berichtet (McGill et al., 2010), von denen ein Patient mit einer 1,2 Mb-Deletion ebenfalls eine Wachstumsretardierung aufweist. Da zum Patienten M7870 außer dem Verdacht auf SRS keine detaillierten klinischen Angaben zur Verfügung standen, war zum jetzigen Zeitpunkt ein weitergehender Vergleich mit anderen Patienten nicht möglich. Neben einem direkten pathogenetischen Einfluss der Deletion wäre auch ein kausaler Zusammenhang zwischen der Haploinsuffizienz eines von der Deletion betroffenen Faktors und der *GRB10*-Hypermethylierung denkbar, auch wenn er derzeit nicht offensichtlich ist. Welche der beiden bei M7870 nachgewiesenen (epi)genetischen Veränderungen letztlich zur Ausprägung der SRS-Merkmale geführt hat, bleibt derzeit unklar. Bei einem Screening von 30 weiteren idiopathischen Patienten wurde bei keinem weiteren Patienten eine isolierte Methylierungsstörung am *GRB10*-Locus gefunden. Daher ist anzunehmen, dass derartige Veränderungen eine eher untergeordnete Bedeutung für das SRS haben.

5.6 Ausblick

Mit dem Nachweis pathogener submikroskopischer Imbalancen bei 21,4 % der idiopathischen Patienten konnte gezeigt werden, dass derartige Veränderungen eine wichtige Rolle bei der Ätiologie von SRS- und SRS-ähnlichen Patienten spielen. Daher sollte zukünftig nach dem Ausschluss der bekannten (Epi)mutationen auf den Chromosomen 7 und 11 bei diesen Patienten eine routinemäßige Testung auf submikroskopische Imbalancen mit einem hochauflösenden Arraysystem erfolgen. Da keine Korrelation zwischen der Schwere des SRS-Phänotyps und der zugrunde liegenden molekularen Veränderung möglich ist, sollte diese Untersuchung sowohl bei Patienten mit klassischem SRS-Phänotyp als auch bei untypischem klinischem Bild in Betracht gezogen werden. Eine routinemäßige Untersuchung weiterer idiopathischer SRS-Patienten könnte außerdem zur weiteren Abklärung der

pathogenetischen Bedeutung der bei 11,9 % der Patienten identifizierten CNVs mit derzeit unklarer Signifikanz dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der genomweiten Suche nach CNVs ab einer Größe von 100 kb auch eine Analyse bestimmter Zielregionen mit SRS-Kandidatengen mit einer Auflösung von 1 kb durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine pathogenen Veränderungen nachgewiesen werden. Mit der Mikroarray-Analyse wird zwar theoretisch die Identifizierung von Kopienzahlveränderungen ab einer Größe von 1 kb ermöglicht, die tatsächliche Markerabdeckung ist jedoch in verschiedenen Regionen im Genom variabel, so dass bei geringer Markerdichte in den Zielregionen möglicherweise nicht alle Kopienzahlveränderungen erfasst werden. Außerdem können kleinere Deletionen (< 1 kb) sowie Punktmutationen generell nicht nachgewiesen werden. Es ist daher denkbar, dass bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten SRS-Patienten Veränderungen vorliegen, die mit dieser Methode nicht nachweisbar sind. Der Einsatz der neuen Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien (next generation sequencing, NGS) sollte zukünftig auch die Identifizierung kleinerer Deletion oder Punktmutationen in bekannten Kandidatenregionen sowie die Detektion neuer SRS-Kandidatengene ermöglichen.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein MS-SNuPE Assay zum parallelen Nachweis und zur genauen Quantifizierung von Methylierungsstörungen an acht geprägten Loci etabliert. Mit Hilfe dieses Assays können sowohl Patienten mit MLMD als auch solche mit schwach ausgeprägten Mosaiken von Methylierungsdefekten identifiziert werden. Daher bietet sich einerseits ein Screening von Patienten mit ICR1-Hypomethylierung auf weitere Methylierungsdefekte an anderen Loci an, die bei 9,5 % der Patienten mit dieser Epimutation nachweisbar sind (Azzi et al., 2009). Da mit dem neuen MS-SNuPE Assay außerdem eine sensitivere Methode zum Nachweis schwach ausgeprägter Mosaik zur Verfügung steht, sollten des weiteren idiopathische SRS-Patienten, bei denen eine ICR1-Hypomethylierung mittels MLPA bereits ausgeschlossen wurde, mit dem neuen Ansatz erneut hinsichtlich dieser Epimutation untersucht werden. Außerdem könnte bei diesen Patienten eine isolierte Hypomethylierung der *IGF2* DMR vorliegen, die mit den bisher verwendeten Analysemethoden ebenfalls nicht detektiert werden konnte. Auch das Vorliegen von MLMD ohne Beteiligung des *H19*- oder *IGF2*-Locus wäre im Zusammenhang mit einem SRS-ähnlichen Phänotyp denkbar.

Bei zwei Patienten (M9475; M7870) wurden in der vorliegenden Arbeit (epi)genetische Veränderungen auf Chromosom 7 gefunden, die die Theorie einer Beteiligung der

Chromosom-7 codierten Faktoren *MEST* und *GRB10* an der Ätiologie des SRS unterstützt. Da die bei M9475 identifizierte, paternale Deletion in 7q32 jedoch neben *MEST* noch weitere 54 Gene betraf, kann die klinische Relevanz dieser Deletion für das SRS nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Möglicherweise führt die routinemäßige Anwendung der Array-Analyse sowie die Durchführung von NGS-Ansätzen bei den SRS-Patienten zum Nachweis weiterer, kleinerer Deletionen oder Punktmutationen des *MEST*-Locus, die zusätzliche Hinweise auf eine ätiologische Bedeutung dieses Faktors für das SRS liefern könnten.

Die Anwendung der in der vorliegenden Arbeit neu etablierten MS-PCR für den *GRB10*-Locus führte zum Nachweis einer isolierten Hypermethylierung bei einem Patienten. Durch die routinemäßige Anwendung dieser MS-PCR könnten zukünftig weitere Patienten mit isolierten Methylierungsstörungen dieser DMR identifiziert werden, wodurch die Vermutung einer ätiologischen Bedeutung dieses Faktors für das SRS untermauert werden könnte. Funktionelle Analysen könnten beim Patienten M7870 zeigen, ob die Hypermethylierung tatsächlich zu einer Überexpression von *GRB10* führt und inwieweit diese möglicherweise einen Einfluss auf die Expression weiterer Gene über die Interaktion in einem Netzwerk geprägter Faktoren ausübt.

6. Anhang

Tab. 6.1: Primersequenzen für die Sequenzierung von *ZFP57*.

| Fragment | Produkt (bp) | Fragmentgröße (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|------------------|--------------|--------------------|-------------------|---------------------------|
| Exon 1 | 250 | 51 | ZFP57_Ex1F | gagtggggacaacatccaac |
| | | | ZFP57_Ex1R | accctctcatctgggtcaag |
| Exon 2 Exon 3 | 561 | 397 33 | ZFP57_Ex2_3F | ggaccccacctctctctagc |
| | | | ZFP57_Ex2_3R | ccctccctcttgctgatatg |
| Exon 4 | 222 | 33 | ZFP57_Ex4F | tgtccagggaaccagatgt |
| | | | ZFP57_Ex4R | tcttgagtctctctgttctcc |
| Exon 5 | 205 | 129 | ZFP57_Ex5F | ccctgcttggcaattcttac |
| | | | ZFP57_Ex5R | caggaggttagcctgtgtgcc |
| Exon 6.1 | 696 | 1281 | ZFP57_Ex6.1F | ggaaaactaaacacaaagaaagagc |
| | | | ZFP57_Ex6.1R | gatgtgaaccatgcaccagt |
| Exon 6.2 | 700 | | ZFP57_Ex6.2F | gccataggaccctcagtctt |
| | | | ZFP57_Ex6.2R | tgtgttattcttctcattcactgt |
| Exon 6.3 | 239 | | ZFP57_Ex6.3F | acagaggggtccagtgatgg |
| | | | ZFP57_Ex6.3R | tggatggaaccaggagtgt |

Tab. 6.2: Primersequenzen für die Sequenzierung von *HMGA2*.

| Fragment | Produkt (bp) | Fragmentgröße (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|----------|--------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Exon 1 | 523 | 111 | HMGA2_1F2 | catctcccgaagggtgctgg |
| | | | HMGA2_1R2 | gatcccggtcgcttccagtc |
| Exon 2 | 396 | 87 | HMGA2_2F | tcctctttgaacccttgcag |
| | | | HMGA2_2R | cagttgggacaaattcctgg |
| Exon 3 | 477 | 51 | HMGA2_3F | acagggggtgtcttttaggg |
| | | | HMGA2_3R | cctggagcctagtggtagga |
| Exon 4 | 339 | 33 | HMGA2_4F | actttcctctttcctttgcag |
| | | | HMGA2_4R | ttttgggaggttttcatggt |
| Exon 5 | 230 | 48 | HMGA2_5F | ggttacctctgcactgttggc |
| | | | HMGA2_5R | gtggaaagaccatggcaatac |
| Exon 4b | 699 | 469 | HMGA2B_4F | ccatcgtgcctggtctaaaa |
| | | | HMGA2B_4R | cccatctgaagctgggaat |

Tab. 6.3: Primersequenzen für die Sequenzierung von *GRB10-CPGI2*.

| Fragment | Produkt (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|----------|--------------|-------------------|----------------------|
| 1 | 662 | GRB10_Seq1F | agaaaaagccggtgcagtag |
| | | GRB10_Seq1R | tttcgtgctagcgcgttc |
| 2 | 583 | GRB10_Seq2F | cccacctgagtacctggaga |
| | | GRB10_Seq2R | cttcagggttccatgaga |
| 3 | 460 | GRB10_Seq3F | tactcagcctccgaggact |
| | | GRB10_Seq3R | ccttctggttcttctctg |

Tab. 6.4: Primersequenzen für die MS-PCR am *MEST*-Locus nach Moore et al. (2003).

| Fragmente | Produkte (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|------------|---------------|-------------------|-------------------------|
| PUF MMF | 104 | UPD7_PUF | tggttgtgggttttgggttttgg |
| | | UPD7_MMF | ggttgtagttgttcggcgcg |
| | 187 | UPD7_R_comF | ttcccaccrcacactcacct |

Tab. 6.5: Primersequenzen für die MS-PCRs am *GRB10*-Locus nach Mackay et al. (2008).

| Fragmente | Produkte (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|
| GRB10_1_met GRB10_1_unmet | 185 | GRB10_1_met | cggtaggcgggtaggggggtcgcgc |
| | 190 | GRB10_1_unmet | gtgagtttggtaggtggtagggggttgtgtg |
| | | GRB10_1_fam | ccycccyctctccaaatactcaataaaactcc |
| GRB10_2_met GRB10_2_unmet | 264 | GRB10_2_met | cgcgcgttaggcgaacgcgtagtagc |
| | 284 | GRB10_2_unmet | ttgattgggggtttggggttattgtgtg |
| | | GRB10_2_fam | taatcctaaaattcctattatactccaaaacc |

Tab. 6.6: Primersequenzen für die MS-PCR am *MEG3*-Locus nach Temple et al. (2007).

| Fragmente | Produkte (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|----------------------------------|---------------|-------------------|-------------------------------------|
| GTL2b- met GTL2b- unmet | 193 | GTL2b-met | cgcgtttgggtcgttggtttggcggcg |
| | 221 | GTL2b-unmet | gtgtagatggtggagagtagaggggagtgtg |
| | | GTL2b-fam | ctccaacaacaaaacccaaaatcaaacaaactctc |

Tab. 6.7: Primersequenzen für die MS-PCR am *PLAGL1*-Locus nach Mackay et al. (2005).

| Fragmente | Produkte (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|--------------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|
| MS-PCR6-RM MS-PCR6-RU | 175 | MS-PCR6-RM | ttcggggaagcgtttcgcgcgtaagggtt |
| | | MS-PCR6-RU | ggttatgatggtgatttggggaagtgtttg |
| | 188 | MS-PCR6-F | cacracatctaccatttatcatcaacc |

Tab. 6.8: Sequenzen der Sonden für die Analyse der *GRB10* DMR (*GRB10-CPGI2*) mittels MS-MLPA (*Hha* I Schnittstelle: fettgedruckt; Stuffersequenz: unterstrichen; Primersequenz: in Großbuchstaben).

| Sonde | Produkt (bp) | Oligo-bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|---------|--------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| GRB10_1 | 100 | GRB10_LPO1 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA cgccaggcgaac cgct agcacgaaaagc |
| | | GRB10_RPO1 | gggccaacgcccctctggggacgccatc TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC |
| GRB10_2 | 114 | GRB10_LPO2 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA gaggacgacggagcag cgccc ggtcctggagcaciaa |
| | | GRB10_RPO2 | caggaatcccaggaccaaacccatgtgacgcggcca TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC |
| H19DMR | 121 | H19DMR-LPO1 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA <u>gaaaccgctgaaaccg</u> atgagggctctgggatgtggaagggctggc |
| | | H19DMR-RPO1 | cgcg ccttcggcaaacctctgtcccacatgc TCTAGATTGGATCTTGCTGGCGC |

Tab. 6.9: Primersequenzen und Zusammensetzung der (Multiplex-)PCRs für die MS-SNuPE (*Primer mit 5'-Tag (kursiv)).

| Fragmente | Produkte (bp) | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Position des PCR-Produkts (hg18) | pmol/Reaktion |
|------------------|---------------|-------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| PCR Mix 1 | | | | | |
| MEST | 170 | MEST_SNuPE_F* | <i>gatctygttggttagttttgtaygggtg</i> | chr7:129,919,303-129,919,451 | 5 |
| | | MEST_SNuPE_R* | <i>caggaaacagctatgaccaaccaccccctcrttcccacc</i> | | |
| MEG3 | 246 | MEG3_SNuPE_F* | <i>cttgcttctggcacgagaagagggaatagtttgagattttt</i> | chr14:100,363,514-100,363,724 | 5 |
| | | MEG3_SNuPE_R* | <i>caggaaacagctatgactaacccctcactaaccttatcaca</i> | | |
| H19 | 492 | H19_SNuPE_F | <i>ttgtttggagtattttgatttgygagtat</i> | chr11:1,976,499-1,976,990 | 25 |
| | | H19_SNuPE_R | <i>caaatctcraatatcaaaaccrtaaaa</i> | | |
| PCR Mix 2 | | | | | |
| KCNQ1OT1 | 122 | KCNQ1OT1_SNuPE_F | <i>aattagtaggtgggggg</i> | chr11:2,677,752-2,677,873 | 100 |
| | | KCNQ1OT1_SNuPE_R | <i>ctaaaaactccataaaaatc</i> | | |
| IGF2P0 | 255 | IGF2P0_SNuPE_F | <i>tgaggatgggtttttgtttggtat</i> | chr11:2,125,904-2,126,158 | 2,5 |
| | | IGF2P0_SNuPE_R | <i>tcctcaatccacccaaaataat</i> | | |
| GRB10 | 303 | GRB10_SNuPE_F* | <i>cttgcttctggcacgagygygygttaggygaaygygttagtayg</i> | chr7:50,817,827-50,818,094 | 5 |
| | | GRB10_SNuPE_R* | <i>caggaaacagctatgactaatcctaaaattctattatactccaaaac</i> | | |
| PLAGL1 | 334 | PLAGL1_SNuPE_F* | <i>cttgcttctggcacgaggataaatgtagatgtygtggg</i> | chr6:144,371,150-144,371,448 | 2,5 |
| | | PLAGL1_SNuPE_R* | <i>caggaaacagctatgaccaaacractcraatctaccta</i> | | |
| PCR3 | | | | | |
| IGF2R | 608 | IGF2R_SNuPE_F* | <i>gatcgatctgttgaggtattygtttaggagat</i> | chr6:160,346,765-160,347,364 | 15 |
| | | IGF2R_SNuPE_R | <i>ccattctctcccctcccactacaaccttcc</i> | | |

Tab. 6.11: Primersequenzen für die qPCRs zur Bestätigung der Array-Ergebnisse.

| Patient | CNA | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|--------------------|------------|-------------------|-----------------------|
| SR1251_06 | del(22q11) | ARVCF_F | gagctgggacatgaggagag |
| | | ARVCF_R | tcaggggctcataggatgac |
| | | CLTCL1_F | actggagcatggaaggtgac |
| | | CLTCL1_R | aggctacctgagccgagat |
| | | MED15_F | caaggtctggctctgatggt |
| | | MED15_R | actggttgctcctgcact |
| SR596/07 | del(16q24) | ANKRD11_F | cacaccgactcaacagact |
| | | ANKRD11_R | tatggaggcgctatcctgag |
| | | SPG7_F | ccaagacccatgcctactgt |
| | | SPG7_R | ccaccaactggctaaggtgt |
| SR2745 | dup(7p22) | RAC1_F | gatggctgggacagtgactt |
| | | RAC1_R | tcccataagcccagattcac |
| SR3451 | dup(6p23) | C6orf114_F | cccaggctattgtctcctca |
| | | C6orf114_R | tgtgctgcagtatcaatggtc |
| SR5695 | del(1q21) | CHD1L_F | gccagaggaccttgagaatg |
| | | CHD1L_R | gcagtgcacaatgagagcat |
| | | BCL9_F | ggccatacccctaaagcact |
| | | BCL9_R | aaggagtcggcggaaatact |
| SR6446 | dup(6p21) | PACSIN1_neu_F | ggagggaaaccttagaggaca |
| | | PACSIN1_neu_R | gggggcaagtaggagctta |
| | | SNRPC_F | ggtcccaacgcttgctaata |
| | | SNRPC_R | gcaataaggccaaactcca |
| SR6846 | del(15q22) | ALDH1A2_F | tgtgctcagacttcacacga |
| | | ALDH1A2_R | gacatcttgaatccccaaa |
| | | 15-55972779_F | agaccttgctcagtctgga |
| | | 15-55972779_R | cccactgcctaatggatgtt |
| SR7875 | del(4q13) | 4-75259078_F | ttttgggtgcttgagaatc |
| | | 4-75259078_R | tggttcatgtctgtgga |
| | | 4-75309910_F | gatacccccaagagcaa |
| | | 4-75309910_R | gtcagcatttagggcaggaa |
| SR8464, SR10177 | del(17p13) | PRPF8_F | gagatgctcaggtccttgc |
| | | PRPF8_R | ctggcagatggattgcagta |
| | | TSR1_F | attcagagtctgcctcgaa |
| | | TSR1_R | ggctaaccagaagcaacagc |
| SR9937 | dup(16p13) | MPV17L_F | accaacgtgctgctttacg |
| | | MPV17L_R | agttgaagttggcgtggaag |
| | | ABCC6_F | ggcaggagagcaagattctg |
| | | ABCC6_R | tggacatctagggctgttc |
| SR8520 | dup(11p15) | OR5P2_F | aaccacagtgaggtgggaag |
| | | OR5P2_R | tggatccatcattgtgtca |
| SR10125 | del(15q15) | DNAJC17_F | cctcctggcttctctgctg |
| | | DNAJC17_R | gctcagtgtgtcagagagg |
| SR10127 | dup(1p36) | ACTRT2_F | ggaagcaccttttgagtgg |
| | | ACTRT2_R | gccatcttctacggttctc |
| | | PRDM16_F | gtcccacctgtgactttg |
| | | PRDM16_R | cactccacgtccgtcagta |

Tab. 6.12: Primersequenzen für die Mikrosatelliten-Analysen zur Bestätigung der Array-Ergebnisse.

| Patient | CNA | Primerbezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Produkt (bp) |
|-----------------------|---------------|----------------------|--------------------------|--------------|
| SR736/06, SR737/06 | del(2p24) | D2S2325_F | ttctattaaaaagctcttgtaaag | 170-202 |
| | | D2S2325_R | aaagtcagaggttgggag | |
| | | D2S352_F | gcaaagtcgttcaggtg | 186-206 |
| | | D2S352_R | ctacagggttcagcatcc | |
| | del(7q21) | D7S3039_F | agttcaaatagaggtccaaatca | 121-225 |
| | | D7S3039_R | ttctgaggttggtcactggca | |
| | | D7S530_F | tgcattttagtggagcacag | 106-118 |
| | | D7S530_R | caggcattgggaacttg | |
| D7S523_F | | ctgattcatagcagcacttg | 223-240 | |
| D7S523_R | | aaaacattccattaccactg | | |
| SR398/07 | dup(15q21) | D15S1049_F | cactccagcctaaggaacac | 168-186 |
| | | D15S1049_R | tgtaaagatggcttttattacc | |
| SR3759; SR9271 | dup(17q25) | D17S1602_F | agggagtccccttacc | 197-207 |
| | | D17S1602_R | aggggatatgatttcag | |
| | | D17S929_F | gcatgtcccagggttagtct | 217-229 |
| | | D17S929_R | ttgctgttgacaaagtcca | |
| SR4178 | del(1q21) | D1S2344_F | tcatgggactctccatca | 231-257 |
| | | D1S2344_R | aaatactcaggaaatggccta | |
| | | D1S442_F | ggacttagcctcgaatgaga | 230-236 |
| | | D1S442_R | gtgtcacacaactggttgg | |
| SR6882 | del(15q26) | D15S1034_F | tcaaacacgttgggac | 224-234 |
| | | D15S1034_R | agaagcaatgccttgg | |
| | | D15S120_F | tttgtgatggtctttataggcata | 150-174 |
| | | D15S120_R | ggctcaaagtgttgcactg | |
| SR7705 | dup(Xq25-q27) | DXS994_F | ctgtcctaccctgtactgtcac | 210-218 |
| | | DXS994_R | tattgtcctactgggcatagag | |
| | | DXS1211_F | ccctccaatctggcagaa | 159-175 |
| | | DXS1211_R | aagacctgggttggcct | |

Tab. 6.13: Verwendete Primer für die Mikrosatelliten-Analyse von Chromosom 7.

| Primerbezeichnung | Entfernung von pter (Mb) | Sequenz (5' → 3') | Produkt (bp) |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| D7S493_F | 21,805,090 | ggaagtcccagccatagtt | 194-224 |
| D7S493_R | | gaaagcacttacctactgaggattt | |
| D7S460_F | 34,193,143 | aataccccaaggggtgtaa | 180-188 |
| D7S460_R | | cattgatgaacagtcaagca | |
| D7S2251_F | 36,188,503 | cggaaagtgggcattt | 152-170 |
| D7S2251_R | | gtagtgagagcccctga | |
| D7S2469_F | 41,089,984 | attcaatatctcctcatgggtg | 150-172 |
| D7S2469_R | | atcgacatcctggtgtgtg | |
| D7S2422_F | 51,105,523 | gtccacattccttgggta | 195-227 |
| D7S2422_R | | aagtgagggccttcaaac | |
| D7S2446_F | 103,901,084 | tttgagtcttcacagcagttg | 185-210 |
| D7S2446_R | | gggaggttgattccacagt | |
| D7S3039_F | 127,685,881 | agttcaaatagaggccaatca | 121-225 |
| D7S3039_R | | ttctgaggtgtgtcactggca | |
| D7S530_F | 128,989,656 | tgcattttagtggagcacag | 106-118 |
| D7S530_R | | caggcattgggaactttg | |
| D7S649_F | 130,508,181 | atthgatccccagca | 275-281 |
| D7S649_R | | gctttattatgtctgttatga | |
| D7S2452_F | 133,423,774 | tccagcatgagttgagaag | 187-203 |
| D7S2452_R | | ggcattgaagttatcgtga | |
| D7S636_F | 150,599,237 | ggagtgactgggcaggaa | 130-168 |
| D7S636_R | | agcttgtgtggggttca | |
| D7S483_F | 152,098,118 | agtggtcattagccttggcaaatc | 166-188 |
| D7S483_R | | aaccagagttgtaagccatgaaagt | |

Tab. 6.14: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung von *ZFP57* (Q: Verwendung der Q-Solution von QIAGEN).

| Fragment | Primer | PCR-Programm |
|----------|------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Exon 1 | ZFP57_Ex1F ZFP57_Ex1R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 57°C 1' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' (Q) |
| Exon 2_3 | ZFP57_Ex2_3F ZFP57_Ex2_3R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 61°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 4 | ZFP57_Ex4F ZFP57_Ex4R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 58°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 5 | ZFP57_Ex5F ZFP57_Ex5R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 59°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 6.1 | ZFP57_Ex6.1F ZFP57_Ex6.1R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 57°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 6.2 | ZFP57_Ex6.2F ZFP57_Ex6.2R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 58°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 6.3 | ZFP57_Ex6.3F ZFP57_Ex6.3R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 57°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |

Tab. 6.15: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung von *HMGA2*.

| Fragment | Primer | PCR-Programm |
|----------|------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Exon 1 | HMGA2_1F2 HMGA2_1R2 | 94°C 5' / (94°C 30'' / 55°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 2 | HMGA2_2F HMGA2_2R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 55°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 3 | HMGA2_3F HMGA2_3R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 59°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 4 | HMGA2_4F HMGA2_4R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 53°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 5 | HMGA2_5F HMGA2_5R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 60°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| Exon 4b | HMGA2b_4F HMGA2b_4R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 57°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |

Tab. 6.16: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung von *GRB10-CPGI2*.

| Fragment | Primer | PCR-Programm |
|----------|----------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1 | GRB10_Seq1F GRB10_Seq1R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 55°C 1' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| 2 | GRB10_Seq2F GRB10_Seq2R | 94°C 5' / (94°C 30'' / 55°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| 3 | GRB10_Seq3F GRB10_Seq3R | 95°C 15' / (94°C 30'' / 59°C 30'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 7' |

Tab. 6.17: PCR-Bedingungen für die MS-PCR am *MEST*-Locus nach Moore et al. (2003).

| Fragmente | Primer | PCR-Programm |
|------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| PUF MMF | UPD7_PUF UPD7_MMF UPD7_R_comF | 95°C 15' / (95°C 45'' / 58°C 45'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |

Tab. 6.18: PCR-Bedingungen für die MS-PCRs am *GRB10*-Locus nach Mackay et al. (2008).

| Fragmente | Primer | PCR-Programm |
|------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| GRB10_1_met GRB10_1_unmet | GRB10_1_met GRB10_1_unmet GRB10_1_fam | 95°C 15' / (95°C 45'' / 58°C 45'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |
| GRB10_2_met GRB10_2_unmet | GRB10_2_met GRB10_2_unmet GRB10_2_fam | 95°C 15' / (95°C 45'' / 58°C 45'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |

Tab. 6.19: PCR-Bedingungen für die MS-PCR am *MEG3*-Locus nach Temple et al. (2007).

| Fragmente | Primer | PCR-Programm |
|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| GTL2b- met GTL2b- unmet | GTL2b-met GTL2b-unmet GTL2b-fam | 95°C 15' / (95°C 45'' / 58°C 45'' / 72°C 1') x 35 / 72°C 10' |

Tab. 6.20: PCR-Bedingungen für die MS-PCR *PLAGL1*-Locus nach Mackay et al. (2005).

| Fragmente | Primer | PCR-Programm |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| MS-PCR6- RM MS-PCR6- RU | MS-PCR6-RM MS-PCR6-RU MS-PCR6-F | 95°C 15' / (95°C 30'' / 60°C 1' / 72°C 1') x 35 / 72°C 5' |

Tab. 6.21: Methylierungsindizes der *H19* DMR nach MS-MLPA an DNA aus Mundschleimhautabstrichen der linken und rechten Wange sowie aus Lymphozyten (* nur ein Wangenabstrich vorhanden, hypo = Patienten mit ICR1-Hypomethylierung, idio = idiopathische SRS-Patienten).

| Patient | MI linke Wange | MI rechte Wange | MI Blut |
|-------------|----------------|-----------------|---------|
| Hypo | | | |
| SR358/05 | - | 0,57 | 0,36 |
| SR527/06 | 0,56 | 0,57 | 0,72 |
| SR755/06 | 0,47 | 0,29 | 0,51 |
| SR43/07 | 0,45 | 0,63 | 0,68 |
| SR5174 | 0,64 | 0,82 | 0,53 |
| SR7250 | 0,63 | 0,75 | 0,44 |
| SR8039 | 0,64 | 0,72 | 0,54 |
| SR8181 | - | 0,71 | 0,56 |
| Idio | | | |
| SR644/06 | 1,00 | 0,94 | 1,02 |
| SR650/06 | 0,98 | - | 0,99 |
| SR1251/06 | 1,04* | | 1,04 |
| SR398/07 | 0,99 | 0,92 | 1,04 |
| SR596/07 | 0,82 | 0,84 | 0,91 |
| SR2552 | 1,02 | 1,11 | 1,05 |
| SR2745 | 1,00 | - | 1,03 |
| SR3006 | 0,94 | 0,91 | 0,97 |
| SR3251 | 1,16* | | 1,00 |
| SR3613 | 0,78* | | 0,98 |
| SR4205 | 1,05 | 1,00 | 1,02 |
| SR5138 | 0,88* | | 0,92 |
| SR5695 | 1,30 | - | 1,01 |
| SR5866 | 0,86 | 1,04 | 0,95 |
| SR6092 | 1,02* | | 1,09 |
| SR6208 | 1,14 | 1,00 | 1,09 |
| SR6415 | 1,11 | - | 1,00 |
| SR6443 | 0,89* | | 0,86 |
| SR7092 | 1,04 | 1,06 | 0,78 |
| SR7142 | 1,04 | 1,00 | 0,91 |
| SR7883 | 1,09 | 0,93 | 0,99 |
| SR8059 | 0,88 | 1,04 | 0,95 |
| SR8639 | 1,16 | 1,11 | 1,00 |
| SR8699 | 0,98* | | 0,92 |

Tab. 6.22: Übersicht über die bei den idiopathischen SRS-Patienten mit dem SNP6.0 Array nachgewiesenen Imbalancen (CN = Kopienzahl, ND = not determined).

| Patient | CN | Bande | Physikalische Position (hg18) | | Größe [kb] | Gene | Herkunft | Bestätigung | Bewertung |
|-----------------------|----|--------------|-------------------------------|-----------|------------|------|-------------|-------------|-----------|
| | | | Min | Max | | | | | |
| SR650/06 | 3 | 14q24 | 68995811 | 69162721 | 166 | 4 | paternal | ND | fam. CNV |
| | 3 | 16p12 | 21686939 | 22338860 | 651 | 10 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR672/06 | 1 | 15q13 | 28563273 | 30299500 | 1.736 | 9 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR680/06 | 1 | 18q22 | 61918107 | 62642311 | 724 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR736/06; SR737/06 | 1 | 2p24 | 14408652 | 14882108 | 473 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| | 1 | 7q21 | 81032849 | 81645018 | 612 | 2 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR1251/06 | 1 | 22q11 | 17264837 | 19795835 | 2.530 | 56 | de-novo | qPCR | pathogen |
| SR398/07 | 3 | 6q27 | 169325835 | 169555568 | 230 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| | 3 | 8q21 | 87330817 | 87437050 | 106 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| | 3 | 15q21 | 53403146 | 53580561 | 177 | 3 | de-novo | STRs | unklar |
| SR596/07 | 3 | 12q21 | 80626244 | 81380699 | 754 | 3 | paternal | ND | fam. CNV |
| | 1 | 16q24 | 87899339 | 88134915 | 236 | 2 | de-novo | qPCR | unklar |
| SR2745 | 3 | 7p22 | 6345608 | 6456912 | 111 | 3 | paternal | ND | fam. CNV |
| SR3451 | 3 | 6p23 | 13527708 | 13681797 | 154 | 2 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR4178 | 1 | 1q21 | 144093480 | 144503409 | 410 | 17 | de-novo | STRs | unklar |
| | 3 | 7p11 | 57279554 | 57896936 | 617 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| | 3 | 14q21 | 46117768 | 46413466 | 296 | 2 | paternal | ND | fam. CNV |
| SR5695 | 1 | 1q21 | 144643812 | 146297795 | 1.653 | 14 | n. maternal | qPCR | pathogen |
| SR6415 | 3 | 16p13 | 14846828 | 16203401 | 1.356 | 13 | paternal | ND | unklar |
| SR6443 | 1 | 11p15 | 1554705 | 1900779 | 346 | 15 | paternal | ND | fam. CNV |
| | 1 | 11q22 | 98795610 | 98916985 | 121 | 1 | paternal | ND | fam. CNV |
| SR6820 | 3 | 22q13 | 36668860 | 37719685 | 1.050 | 25 | maternal | ND | pathogen |
| SR6835 | 1 | 15q26 | 98233096 | 98354762 | 122 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR6846 | 1 | 15q22 | 55972779 | 56098572 | 126 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR6882 | 1 | 15q26 | 94844379 | 100222647 | 5.378 | 26 | de-novo | STRs | pathogen |
| SR7705 | 3 | Xq25 -q27 | 129467388 | 138626069 | 9.158 | 55 | de-novo | STRs | pathogen |
| SR7875 | 1 | 4q13 | 75232304 | 75340507 | 108 | 1 | maternal | ND | fam. CNV |
| SR8464 | 1 | 17p13 | 1459660 | 2259112 | 799 | 20 | de-novo | qPCR | pathogen |
| SR9116 | 1 | 1q21 | 144481983 | 146297795 | 1.816 | 15 | maternal | aCGH | pathogen |
| SR9937 | 3 | 16p13 | 14742555 | 16202207 | 1.459 | 14 | maternal | qPCR | unklar |
| SR10737 | 3 | 22q13 | 36668860 | 37719685 | 1.050 | 25 | maternal | ND | pathogen |
| SR10177 | 3 | 2q31 | 175298489 | 175449723 | 151 | 2 | maternal | ND | fam. CNV |
| | 1 | 17p13 | 1307036 | 1978951 | 672 | 17 | de-novo | qPCR | pathogen |

Tab. 6.23: Übersicht über die klinischen Merkmale bei Patienten mit ICR1-Hypomethylierung, idiopathischen Patienten sowie einzelnen Patienten mit pathogenen Imbalancen (# = nur von 27/31 Patienten lagen klinische Daten vor; § = nur von 40/42 Patienten lagen klinische Daten vor; ND = not determined; *nach Bartholdi et al., 2009).

| Klinische Merkmale | ICR1 hypo (n=27 [#]) | Idiopathische SRS (n=40 [§]) | M6882 del(15q26) | M1251/06 del(22q11) | M7705 dup(Xq25-q27) | M8464 del(17p13.3) | M10177 del(17p13.3) | M5695 del(1q21) | M6820 dup(22q13)mat |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| Geburtsmaße | | | | | | | | | |
| Gewicht ≤ P10 | 88.9% (24/27) | 60.5% (23/38) | - | - | ND | - | + | + | + |
| Länge ≤ P10 | 92.6% (25/27) | 67.6% (25/37) | + | + | ND | + | + | - | + |
| Relative Makrozephalie | 77.8% (21/27) | 25.8% (8/31) | - | - | ND | + | - | - | - |
| Postnatale Entwicklung | | | | | | | | | |
| Größe ≤ P3 | 96% (24/25) | 68.4% (26/38) | + | + | + | + | + | + | + |
| Kopfumfang ≥ P3 und ≤ P97 | 80% (20/25) | 69% (20/29) | - | + | + | + | + | - | + |
| Normale cognitive Entwicklung | 59.3% (16/27) | 59% (23/39) | + | (-) | (-) | + | + | - | + |
| Asymmetrie | | | | | | | | | |
| Gesicht/Körper/Extremitäten | 66.7% (18/27) | 27.5% (11/40) | - | - | + | - | - | - | + |
| Faziale Merkmale | | | | | | | | | |
| Dreieckige Gesichtsform | 85.2% (23/27) | 62.5% (25/40) | - | + | + | + | + | + | + |
| Prominente Stirn | 81.5% (22/27) | 47.5% (19/40) | - | - | + | + | + | + | + |
| Sonstige*: z.B. schmales Kinn, herabgezogene Mundwinkel, Ohranomalien | ND | ND | - | + | - | + | + | + | + |
| Sonstige Merkmale | | | | | | | | | |
| Klinodaktylie V | 63% (17/27) | 35.9% (14/39) | - | + | - | - | - | + | + |
| Sonstige*: z.B. Syndaktylie der Zehen, Leistenhernien, Pigmentveränderungen | ND | ND | - | - | - | - | - | + | - |
| Score | 53.8 – 92.9% (7/13-13/14) | 21.4 – 85.7% (3/14-12/14) | 21.4% (3/14) | 42.8% (6/14) | 63.6% (7/11) | 57.1% (8/14) | 57.1% (8/14) | 50% (7/14) | 85.7% (12/14) |
| Score-Mittelwert (eigene Kollektive) | 71.8% | 47.1% | - | - | - | - | - | - | - |
| Score-Mittelwert (Bartholdi et al., 2009) | 84.7% (13/15; n=29) | 58% (9/15; n=58) | - | - | - | - | - | - | - |

Tab. 6.24: Übersicht über die in der „Cytoregions“-Datei „Kandidatengene SRS“ enthaltenen Regionen.

| CytoRegion | Chromosom | Physikalische Position (hg18) | |
|-------------|-----------|-------------------------------|-----------|
| | | Min | Max |
| DNMT3A | 2 | 25309348 | 25418963 |
| HYMAI | 6 | 144365727 | 144371560 |
| IGF2R | 6 | 160310120 | 160447573 |
| PLAGL1 | 6 | 144303129 | 144427428 |
| ZFP57 | 6 | 29748148 | 29752910 |
| COPG2 | 7 | 129933315 | 130004138 |
| CPA4 | 7 | 129720209 | 129751255 |
| DDC | 7 | 50493627 | 50600648 |
| DLX5 | 7 | 96487637 | 96492079 |
| GRB10 | 7 | 50625253 | 50828653 |
| KLF14 | 7 | 130068017 | 130069400 |
| MEST | 7 | 129913281 | 129933367 |
| MESTIT1 | 7 | 129914133 | 129918249 |
| PEG10 | 7 | 94123572 | 94136942 |
| PPP1R9A | 7 | 94374884 | 94763663 |
| SGCE | 7 | 94052471 | 94123457 |
| TFPI2 | 7 | 93353680 | 93358001 |
| DNMT2 | 10 | 17224987 | 17283687 |
| 11p15 | 11 | 1750335 | 3086219 |
| CDKN1C | 11 | 2861023 | 2863571 |
| H19 | 11 | 1972981 | 1975641 |
| ICR1/H19DMR | 11 | 1974588 | 1982147 |
| ICR2 | 11 | 2676842 | 2678041 |
| IGF2 | 11 | 2106922 | 2127409 |
| INS | 11 | 2137584 | 2139015 |
| KCNQ1 | 11 | 2422796 | 2826916 |
| KCNQ1 | 11 | 2422796 | 2826916 |
| KCNQ1OT1 | 11 | 2618343 | 2677804 |
| SLC22A18 | 11 | 2877526 | 2903052 |
| HMGA2 | 12 | 64504506 | 64646338 |
| IGF1R | 15 | 97010283 | 97325282 |
| MBD2 | 18 | 49934572 | 50005156 |
| DNMT1 | 19 | 10105022 | 10166755 |
| MBD3 | 19 | 1527677 | 1543652 |
| NLRP2 | 19 | 60169582 | 60204317 |
| NLRP7 | 19 | 60126688 | 60150685 |
| PEG3 | 19 | 62013256 | 62043906 |
| ZIM2 | 19 | 61977740 | 62043909 |
| DNMT3B | 20 | 30813851 | 30860823 |
| DNMT3L | 21 | 44490650 | 44506527 |

Tab. 6.25: Übersicht über die in der „Cytoregions“-Datei „Syndrome“ enthaltenen Regionen.

| CytoRegion | Chr. | Physikalische Position (hg18) | | Größe (kb) |
|--------------------------------------------|------|-------------------------------|-----------|------------|
| | | Min | Max | |
| 1p36-Deletionssyndrom | 1 | 1 | 5308621 | 5309 |
| 1q21.1-Mikrodeletionssyndrom | 1 | 144979554 | 146204124 | 1225 |
| 1q21.1-Mikrodeletionssyndrom (TAR-Syndrom) | 1 | 144112610 | 144639480 | 527 |
| 1q21.1-Mikroduplikationssyndrom | 1 | 144979554 | 146204124 | 1225 |
| 1q41-Mikrodeletionssyndrom | 1 | 212100001 | 222100000 | 10000 |
| 1q43-q44-Deletionssyndrom | 1 | 237900000 | 245200000 | 7300 |
| NDUFS2 | 1 | 159435728 | 159450808 | 15 |
| 2p15-p16.1-Mikrodeletionssyndrom | 2 | 57595300 | 61591838 | 3997 |
| 2q33.1-Mikrodeletionssyndrom | 2 | 196633334 | 204915185 | 8282 |
| 2q37 Monosomie | 2 | 239619630 | 242951149 | 3332 |
| 3q29-Mikrodeletionssyndrom | 3 | 197156626 | 198982266 | 1826 |
| 3q29-Mikroduplikationssyndrom | 3 | 197156626 | 198982266 | 1826 |
| 4q21-Deletionssyndrom | 4 | 82228875 | 83601083 | 1372 |
| Wolf-Hirschhorn-Syndrom | 4 | 1 | 2043468 | 2043 |
| 5p13-Duplikationssyndrom | 5 | 36487985 | 37556112 | 1068 |
| Cri du Chat Syndrom | 5 | 1 | 11776854 | 11777 |
| Sotos Syndrom | 5 | 175063008 | 177389151 | 2326 |
| 7q11.23-Mikroduplikationssyndrom | 7 | 71970679 | 74254837 | 2284 |
| Williams-Beuren-Syndrom | 7 | 71970679 | 74254837 | 2284 |
| 8p23.1-Mikrodeletionssyndrom | 8 | 8156705 | 11803128 | 3646 |
| 8q21.3-q22.1-Mikrodeletionssyndrom | 8 | 87200001 | 99100000 | 11900 |
| 9q22.3-Mikrodeletionssyndrom | 9 | 93000001 | 101600000 | 8600 |
| 9q_subtelomeric_deletion_syndrome | 9 | 139725237 | 139850397 | 125 |
| Potocki-Shaffer Syndrom | 11 | 43941853 | 46021136 | 2079 |
| WAGR Syndrom | 11 | 31760085 | 32467564 | 707 |
| 12q14-Mikrodeletionssyndrom | 12 | 63358186 | 66931792 | 3574 |
| 15q11-q13-Duplikationssyndrom | 15 | 20428073 | 30488774 | 10061 |
| 15q13.3-Mikrodeletionssyndrom | 15 | 28557287 | 30488774 | 1931 |
| 15q24-Mikrodeletionssyndrom | 15 | 72164227 | 73949332 | 1785 |
| 15q26 overgrowth syndrome | 15 | 97175493 | 100338915 | 3163 |
| Prader-Willi-/Angelman-Syndrom | 15 | 20428073 | 26230781 | 5803 |
| 16p11.2-Mikroduplikationssyndrom | 16 | 29408699 | 30110073 | 701 |
| 16p11.2-p12.2-Mikrodeletionssyndrom | 16 | 21521457 | 28949693 | 7428 |
| 16p13.11-Mikrodeletionssyndrom | 16 | 15411955 | 16191749 | 780 |
| 16p13.11-Mikroduplikationssyndrom | 16 | 15411955 | 16191749 | 780 |
| 17p13.3-Duplikationssyndrom | 17 | 1 | 2492179 | 2492 |
| 17q12-Mikrodeletion | 17 | 28800001 | 35400000 | 6600 |
| 17q21.3-Duplikationssyndrom | 17 | 40988249 | 41565982 | 578 |
| 17q21.3-Mikrodeletionssyndrom | 17 | 40988249 | 41565982 | 578 |
| 17q23.1-q23.2-Deletionssyndrom | 17 | 54800000 | 57600000 | 2800 |
| Miller-Dieker-Syndrom | 17 | 1 | 2492179 | 2492 |
| NF1-Mikrodeletionssyndrom | 17 | 26186948 | 27242780 | 1056 |
| Potocki-Lupski Syndrom | 17 | 16646746 | 20422653 | 3776 |
| Smith-Magenis-Syndrom | 17 | 16646746 | 20422653 | 3776 |

| CytoRegion | Chr. | Physikalische Position (hg18) | | Größe (kb) |
|-----------------------------------------------|------|-------------------------------|-----------|------------|
| | | Min | Max | |
| 19p13.11-Deletionssyndrom | 19 | 39000000 | 40000000 | 1000 |
| 20q13.13-q13.2-Mikrodeletion | 20 | 45800001 | 54400000 | 8600 |
| 22q11-Mikrodeletionssyndrom (DiGeorge) | 22 | 16926349 | 20666469 | 3740 |
| 22q11-Mikroduplikationssyndrom | 22 | 16926349 | 20666469 | 3740 |
| 22q11.2-Distal deletion syndrome | 22 | 20445848 | 22026229 | 1580 |
| 22q13-Mikrodeletionssyndrom (Phelan-McDermid) | 22 | 49392382 | 49534710 | 142 |
| Cat Eye Syndrome | 22 | 1 | 16971860 | 16972 |
| Pelizaeus-Merzbacher Syndrom | X | 102528707 | 103018423 | 490 |
| Xp11.23-p11.22-Duplikationssyndrom | X | 48100000 | 52600000 | 4500 |
| Xp11.3-Deletionssyndrom | X | 45351160 | 46620356 | 1269 |

Tab. 6.26: Auflistung der verwendeten Marker und Informativität zur upd(7)mat-Analyse beim Patienten M7870 und seinen Eltern.

| Marker | Lokalisation (Mb) (hg18) | M8148 Vater | M8149 Mutter | M7870 Patient | Ergebnis |
|---------|--------------------------|-------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| D7S493 | 21,805,090 | 199-207 | 193 | 193-207 | biparental |
| D7S460 | 34,193,143 | 174-182 | 174-182 | 174 | nicht informativ |
| D7S2251 | 36,188,503 | 154-166 | 160-164 | 154-160 | biparental |
| D7S2469 | 41,089,984 | 173 | 169-189 | 173-189 | biparental |
| GRB10 | 50,625,254-50,767,544 | o.B. | o.B. | MS-PCR | nur ein maternales Allel |
| D7S2422 | 51,105,523 | 214-224 | 214-226 | 214-226 | ein eindeutig maternales Allel |
| D7S2446 | 103,901,084 | 188 | 188 | 188 | nicht informativ |
| D7S2452 | 133,423,774 | 196-198 | 194-200 | 194-198 | biparental |
| D7S636 | 150,599,237 | 152-156 | 134-142 | 134-156 | biparental |
| D7S483 | 152,098,118 | 176-180 | 178 | 176-178 | biparental |

Tab. 6.27: Auflistung der verwendeten Marker und Informativität zur upd(7)mat-Analyse beim Patienten M9475 und seinen Eltern.

| Marker | Lokalisation (Mb) (hg18) | M9473 Vater | M9474 Mutter | M9475 Patient | Ergebnis |
|---------|--------------------------|-------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| D7S493 | 21,805,090 | 200-212 | 194-212 | 200-212 | ein eindeutig paternales Allel |
| D7S460 | 34,193,143 | 178-182 | 178-186 | 178-186 | ein eindeutig maternales Allel |
| D7S2446 | 103,901,084 | 199-201 | 187-199 | 187-201 | biparental |
| D7S3039 | 127,685,881 | 268 | 244-260 | 260 | nur ein maternales Allel |
| D7S530 | 128,989,656 | 122-128 | 122-126 | 122 | nur ein maternales Allel |
| MEST | 129,918,409-129,933,367 | ND | ND | MS-PCR | nur ein maternales Allel |
| D7S649 | 130,508,181 | 294-298 | 300 | 300 | nur ein maternales Allel |
| D7S2452 | 133,423,774 | 193 | 193-196 | 193-196 | ein eindeutig maternales Allel |
| D7S636 | 150,599,237 | 140-142 | 147-153 | 140-153 | biparental |
| D7S483 | 152,098,118 | 179 | 165-179 | 179 | nicht informativ |

Abb. 6.1: Darstellung der mit der „Kontrollmethode“ normalisierten Methylierungsindizes aus der MS-SNuPE mit je zwei Primerverlängerungsreaktionen nach zwei unabhängigen Bisulfidbehandlungen für alle acht Loci.

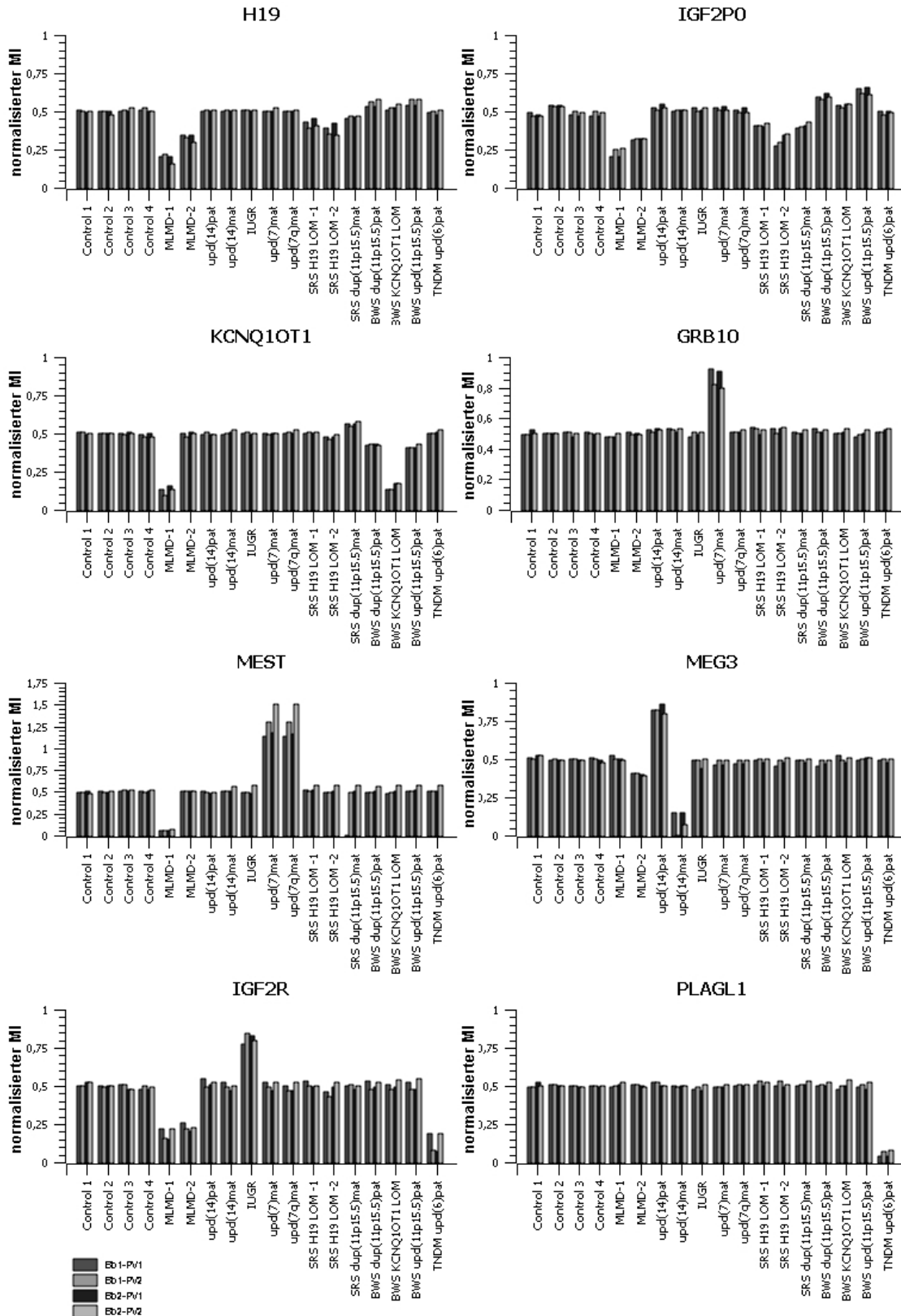
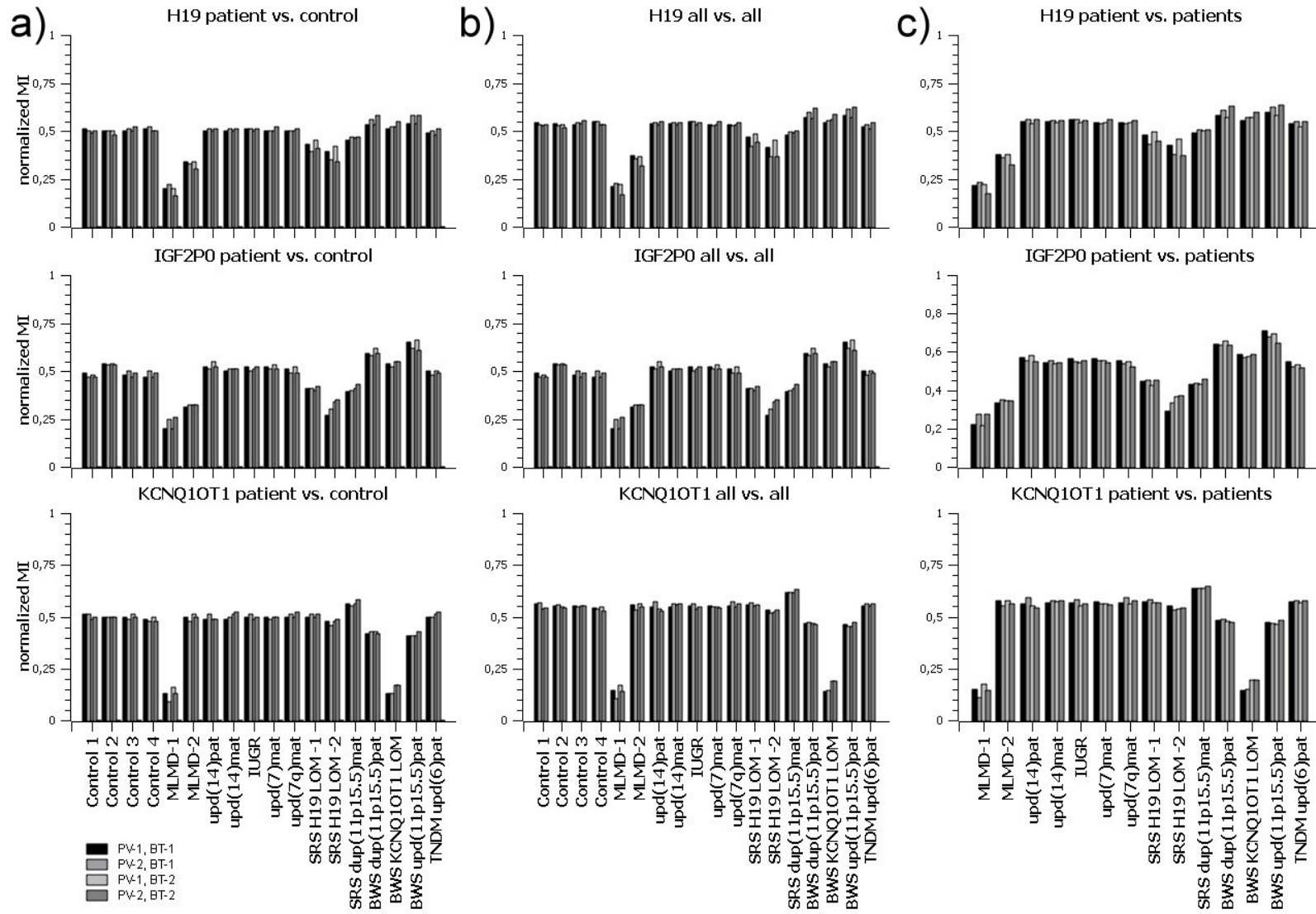


Abb. 6.2: Darstellung der normierten Methylierungsindizes nach der MS-SNuPE für die Loci *H19*, *IGF2P0* und *KCNQ10T1*:
a) Berechnung nach der „Kontrollmethode“, **b)** „all-versus-all“-Berechnung und **c)** „patient-versus-patient“-Berechnung.



7. Literaturliste

7.1 In dieser Arbeit zitierte Internetseiten und öffentliche Datenbanken

Affymetrix: www.affymetrix.com

BiQ Analyzer: <http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/BiConverter/index.php>

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER): <http://decipher.sanger.ac.uk/>

Database of Genomic Variants (DGV): <http://projects.tcag.ca/variation/>

MRC Holland: <http://www.mlpa.com>

NCBI-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Primer 3: <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

Pubmed-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

R-Software: <http://www.r-project.org>

UCSC-Datenbank: <http://genome.ucsc.edu>

7.2 In dieser Arbeit zitierte Publikationen

Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE. The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2008; **45**: 193-9.

Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science.* 2009; **325**: 1240-3.

Akagi T, Usuda M, Matsuda T, Ko MS, Niwa H, Asano M, Koide H, Yokota T. Identification of Zfp-57 as a downstream molecule of STAT3 and Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; **331**: 23-30.

Arima T, Kamikihara T, Hayashida T et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res.* 2005; **33**: 2650-2660.

Arnaud P, Monk D, Hitchins M, Gordon E, Dean W, Beechey CV, Peters J, Craigen W, Preece M, Stanier P, Moore GE, Kelsey G. Conserved methylation imprints in the human and mouse GRB10 genes with divergent allelic expression suggests differential reading of the same mark. *Hum Mol Genet.* 2003; **12**: 1005-19.

Ashar HR, Schoenberg F, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995; **82**: 57-65.

Asmus F, Zimprich A, Tezenas Du Montcel S, Kabus C, Deuschl G, Kupsch A, Ziemann U, Castro M, Kühn AA, Strom TM, Vidailhet M, Bhatia KP, Dürr A, Wood NW, Brice A, Gasser T. Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype. *Ann Neurol*. 2002; **52**: 489-92.

Azzi S, Rossignol S, Steunou V, Sas T, Thibaud N, Danton N, Le Jule M, Heinrichs C, Cabrol S, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. Multilocus analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 4724-4733.

Baple EL, Poole RL, Mansour S, et al.: An atypical case of hypomethylation at multiple imprinted loci. *Eur J Hum Genet*. 2011; **19**: 360-2.

Bartholdi D, Krajewska-Walasek M, Ounap K, Gaspar H, Chrzanowska KH, Ilyana H, Kayserili H, Lurie IW, Schinzel A, Baumer A. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet*. 2009; **46**: 192-7.

Bassett AS, Chow EW, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005; **138**: 307-13.

Begemann M, Spengler S, Kanber D, Haake A, Baudis M, Leisten I, Binder G, Markus S, Rupprecht T, Segerer H, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Siebert R, Buiting K, Eggermann T. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet*. 2011; **80**: 83-8.

Bengtsson H, Irizarry R, Carvalho B, Speed TP. Estimation and assessment of raw copy numbers at the single locus level. *Bioinformatics* 2008; **24**: 759-767.

Binder G, Seidel AK, Martin DD, Schweizer R, Schwarze CP, Wollmann HA, Eggermann T, Ranke MB. The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; **93**: 1402-7.

Blagitko N, Mergenthaler S, Schulz U, Wollmann HA, Craigen W, Eggermann T, Ropers HH, Kalscheuer VM. Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. *Hum Mol Genet*. 2000; **9**: 1587-95.

Blik J, Terhal P, van den Bogaard MJ, Maas S, Hamel B, Salieb-Beugelaar G, Simon M, Letteboer T, van der Smagt J, Kroes H, Mannens M. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet*. 2006; **78**: 604-14.

Bliek J, Alders M, Maas SM et al. Lessons from BWS twins: complex maternal and paternal hypomethylation and a common source of haematopoietic stem cells. *Eur J Hum Genet.* 2009a; **17**: 1625-1634.

Bliek J, Verde G, Callaway J et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009b; **17**: 611-619.

Bonaldi A, Mazzeu JF, Costa SS, Honjo RS, Bertola DR, Albano LM, Furquim IM, Kim CA, Vianna-Morgante AM. Microduplication of the ICR2 domain at chromosome 11p15 and familial Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011. doi: 10.1002/ajmg.a.34023. [Epub ahead of print]

Boonen SE, Hahnemann JM, Mackay D, Tommerup N, Brøndum-Nielsen K, Tümer Z, Grønsvkov K. No evidence for pathogenic variants or maternal effect of ZFP57 as the cause of Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2011. doi: 10.1038/ejhg.2011.140. [Epub ahead of print]

Bruce S, Hannula-Jouppi K, Peltonen J, Kere J, Lipsanen-Nyman M. Clinically distinct epigenetic subgroups in Silver-Russell syndrome: the degree of H19 hypomethylation associates with phenotype severity and genital and skeletal anomalies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; **94**: 579-87.

Bruce S, Hannula-Jouppi K, Puoskari M, Fransson I, Simola KO, Lipsanen-Nyman M, Kere J. Submicroscopic genomic alterations in Silver-Russell syndrome and Silver-Russell-like patients. *J Med Genet.* 2010; **47**: 816-22.

Bruder CE, Piotrowski A, Gijbbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Ståhl T, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet.* 2008; **82**: 763-71.

Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008; **40**: 1466-71.

Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP, Kooy RF, Van der Aa N, Reyniers E, Vandeweyer G, Stolte-Dijkstra I, Dijkhuizen T, Yeung A, Delatycki M, Borgström B, Thelin L, Cardoso C, van Bon B, Pfundt R, de Vries BB, Wallin A, Amor DJ, James PA, Slater HR, Schoumans J. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet.* 2010; **47**: 299-311.

Butler MG, Fogo AB, Fuchs DA, Collings FS, Dev VG, Phillips JA. Brief clinical report and review: Two patients with ring chromosome 15 syndrome. *Am J Med Genet* 1988; **29**: 149–54.

Buysse K, Reardon W, Mehta L, Costa T, Fagerstrom C, Kingsbury DJ, Anadiotis G, McGillivray BC, Hellemans J, de Leeuw N, de Vries BB, Speleman F, Menten B, Mortier G. The 12q14 microdeletion syndrome: additional patients and further evidence that HMGA2 is an important genetic determinant for human height. *Eur J Med Genet*. 2009; **52**: 101-7.

Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*. 2007; **13**: 313-6.

Charalambous M, Smith FM, Bennett WR, Crew TE, Mackenzie F, Ward A. Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**: 8292-7.

Choi JH, Shin YL, Kim GH, Seo EJ, Kim Y, Park IS, Yoo HW. Endocrine manifestations of chromosome 22q11.2 microdeletion syndrome. *Horm Res*. 2005; **63**: 294-9.

Choi JH, Kang M, Kim GH, Hong M, Jin HY, Lee BH, Park JY, Lee SM, Seo EJ, Yoo HW. Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; **96**: E130-4.

Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002; **417**: 945-948.

Dechiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; **345**: 78-80.

Demars J, Le Bouc Y, El-Osta A, Gicquel C. Epigenetic and genetic mechanisms of abnormal 11p15 genomic imprinting in Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Curr Med Chem*. 2011a; **18**: 1740-50.

Demars J, Rossignol S, Netchine I, Syin Lee K, Shmela M, Faivre L, Weill J, Odent S, Azzi S, Callier P, Lucas J, Dubourg C, Andrieux J, Le Bouc Y, El-Osta A, Gicquel C. New insights into the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: Contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Hum Mutat*. 2011b. doi: 10.1002/humu.21558. [Epub ahead of print].

Deng W. PARylation: strengthening the connection between cancer and pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2009; **5**: 349-50.

Eggermann T, Wollmann HA, Kuner R, Eggermann K, Enders H, Kaiser P, Ranke MB. Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet*. 1997; **100**: 415-9.

- Eggermann T, Meyer E, Obermann C, Heil I, Schüler H, Ranke MB, Eggermann K, Wollmann HA. Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? *J Med Genet.* 2005a; **42**: e26.
- Eggermann T, Prager S, Binder G, Ranke MB, Wollmann HA. Genetik des Silver-Russell-Syndroms. *Monatsschrift Kinderheilkd* 2005b; **153**: 264–72.
- Eggermann T, Prager S, Binder G, Ranke MB, Wollmann HA. Silver-Russell-Syndrom und Beckwith-Wiedemann-Syndrom: Zwei klinisch gegensätzliche Syndrome der gleichen genetischen Region. *medgen* 2006; **18**, 254-59.
- Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, Buiting K, Ranke MB, Wollmann HA, Binder G. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification increases the detection rate for 11p15 epigenetic alterations in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet.* 2008a; **73**: 79-84.
- Eggermann T, Schönherr N, Jäger S, Spaich C, Ranke MB, Wollmann HA, Binder G. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet.* 2008b; **74**: 486-9.
- Eggermann T. Endocrine Involvement in Developmental Syndromes. *Endocr Dev.* Basel, Karger, 2009, vol 14, pp 10–19
- Eggermann T, Spengler S, Begemann M, Binder G, Buiting K, Albrecht B, Spranger S. Deletion of the paternal allele of the imprinted MEST/PEG1 region in a patient with Silver–Russell syndrome features. *Clin Genet.* 2011: im Druck
- Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D. Beckwith-Wiedemann syndrome: multiple molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Med.* 2006; **8**: 1-19.
- Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, Wit JM, Hokken-Koelega AC, Losekoot M. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; **94**: 4717-27.
- Gabory A, Ripoché MA, Le Digarcher A, Watrin F, Ziyat A, Forné T, Jammes H, Ainscough JF, Surani MA, Journot L, Dandolo L. H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development.* 2009; **136**: 3413-21.
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet.* 2005; **37**: 1003-7.
- Gonzalvo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 2529-31.
- Gonzalvo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Methods.* 2002; **27**: 128-33.

- Gonzalzo ML, Liang G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation. *Nat Protoc.* 2007; **2**: 1931-6.
- Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer V, Asmus F, Gasser T, Meitinger T, Strom TM. The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. *Eur J Hum Genet.* 2003; **11**: 138-44.
- Grønskov K, Poole RL, Hahnemann JM, Thomson J, Tümer Z, Brøndum-Nielsen K, Murphy R, Ravn K, Melchior L, Dedic A, Dolmer B, Temple IK, Boonen SE, Mackay DJ. Deletions and rearrangements of the H19/IGF2 enhancer region in patients with Silver-Russell syndrome and growth retardation. *J Med Genet.* 2011; **48**: 308-11.
- Haig D, Graham C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell.* 1991; **64**: 1045-6.
- Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJ, Eichler EE, Vermeesch JR. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet.* 2009; **46**: 223-32.
- Hannula K, Lipsanen-Nyman M, Kontiokari T, Kere J. A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region. *Am J Hum Genet.* 2001; **68**: 247-53.
- Harvard C, Strong E, Mercier E, Colnaghi R, Alcantra D, Chow E, Martell S, Tyson C, Hrynychak M, McGillivray B, Hamilton S, Marles S, Mhanni A, Dawson A, Pavlidis P, Qiao Y, Holden JJ, Lewis SM, O'Driscoll M, Rajcan-Separovic E. Understanding the impact of 1q21.1 Copy Number Variant. *Orphanet J Rare Dis.* 2011; **6**: 54.
- Hirasawa R, Feil R. A KRAB domain zinc finger protein in imprinting and disease. *Dev Cell.* 2008; **15**: 487-8.
- Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, Moore GE. Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 2001; **38**: 810-819
- Horsthemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010; **154C**: 321-8.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science.* 2002; **298**: 601-4.
- Jacobsen P. A ring chromosome in the 13-15 group associated with microcephalic dwarfism, mental retardation and emotional immaturity. *Hereditas* 1966; **55**:188-91.
- Joyce CA, Sharp A, Walker JM, Bullman H, Temple IK. Duplication of 7p12.1-p13, including GRB10 and IGFBP1, in a mother and daughter with features of Silver-Russell syndrome. *Hum Genet.* 1999; **105**: 273-80.

Juan V, Crain C, Wilson C. Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**: 1221-7.

Jung H, Lee SK, Jho EH. Mest/Peg1 inhibits Wnt signalling through regulation of LRP6 glycosylation. *Biochem J.* 2011; **436**: 263-9.

Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007; **80**: 232-40.

Kobayashi S, Kohda T, Miyoshi N, Kuroiwa Y, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7. *Hum Mol Genet.* 1997; **6**: 781-6.

Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Méhes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet.* 1995; **4**: 583-7.

Kotzot D, Balmer D, Baumer A, Chrzanowska K, Hamel BC, Ilyina H, Krajewska-Walasek M, Lurie IW, Otten BJ, Schoenle E, Tariverdian G, Schinzel A. Maternal uniparental disomy 7--review and further delineation of the phenotype. *Eur J Pediatr.* 2000; **159**: 247-56.

Kotzot D. Maternal uniparental disomy 7 and Silver-Russell syndrome - clinical update and comparison with other subgroups. *Eur J Med Genet.* 2008; **51**: 444-51.

Leisten I. Entwicklung quantifizierender Verfahren zum Nachweis von humanen Epimutationen. Diplomarbeit Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen 2010.

Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell.* 2008; **15**: 547-57.

Lynch SA, Foulds N, Thuresson AC, Collins AL, Annerén G, Hedberg BO, Delaney CA, Iremonger J, Murray CM, Crolla JA, Costigan C, Lam W, Fitzpatrick DR, Regan R, Ennis S, Sharkey F. The 12q14 microdeletion syndrome: six new cases confirming the role of HMGA2 in growth. *Eur J Hum Genet.* 2011; **19**: 534-9.

Mackay DJG, Boonen SE, Clayton-Smith J et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet.* 2006; **120**: 262-269.

Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet.* 2008; **40**: 949-51.

- Madrigal I, Fernández-Burriel M, Rodríguez-Revenga L, Cabrera JC, Martí M, Mur A, Milà M. Xq26.2-q26.3 microduplication in two brothers with intellectual disabilities: clinical and molecular characterization. *J Hum Genet.* 2010 Dec; **55**: 822-6. Epub 2010 Sep 23.
- Meyer E, Lim D, Pasha S, Tee LJ, Rahman F, Yates JR, Woods CG, Reik W, Maher ER. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet.* 2009; **5**: e1000423.
- McCann JA, Zheng H, Islam A, Goodyer CG, Polychronakos C. Evidence against GRB10 as the gene responsible for Silver-Russell syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; **286**: 943-8.
- McGill AK, Pastore MT, Herman GE, Alliman S, Rosenfeld JA, Weaver DD. A tale of two deletions: a report of two novel 20p13 --> pter deletions. *Am J Med Genet A.* 2010; **152A**: 1000-7.
- Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers EM, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam RC, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simoncic I, Park SM, Mehta SG, Nik-Zainal S, Woods CG, Firth HV, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li KE, Casuga I, Broome A, Conrad B, Schwerzmann M, Räber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie JL, Tobias ES, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloo P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen MR, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King MC, Regan R, Skinner C, Stevenson RE, Antonarakis SE, Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwartz S, Sutcliffe JS, Walsh T, Knight SJ, Sebat J, Romano C, Schwartz CE, Veltman JA, de Vries BB, Vermeesch JR, Barber JC, Willatt L, Tassabehji M, Eichler EE. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med.* 2008; **359**: 1685-99.
- Lynch SA, Foulds N, Thuresson AC, Collins AL, Annerén G, Hedberg BO, Delaney CA, Iremonger J, Murray CM, Crolla JA, Costigan C, Lam W, Fitzpatrick DR, Regan R, Ennis S, Sharkey F. The 12q14 microdeletion syndrome: six new cases confirming the role of HMGGA2 in growth. *Eur J Hum Genet.* 2011; **19**: 534-9.
- Mari F, Hermanns P, Giovannucci-Uzielli ML, Galluzzi F, Scott D, Lee B, Renieri A, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Refinement of the 12q14 microdeletion syndrome: primordial dwarfism and developmental delay with or without osteopoikilosis. *Eur J Hum Genet.* 2009; **17**: 1141-7.
- Menten B, Buysse K, Zahir F, Hellemans J, Hamilton SJ, Costa T, Fagerstrom C, Anadiotis G, Kingsbury D, McGillivray BC, Marra MA, Friedman JM, Speleman F, Mortier G. Osteopoikilosis, short stature and mental retardation as key features of a new microdeletion syndrome on 12q14. *J Med Genet.* 2007; **44**: 264-8.
- Mergenthaler S, Hitchins MP, Blagitko-Dorfs N, Monk D, Wollmann HA, Ranke MB, Ropers HH, Apostolidou S, Stanier P, Preece MA, Eggermann T, Kalscheuer VM, Moore GE. Conflicting reports of imprinting status of human GRB10 in developing brain: how reliable

- are somatic cell hybrids for predicting allelic origin of expression? *Am J Hum Genet.* 2001; **68**: 543-5.
- Monk D, Bentley L, Hitchins M, Myler RA, Clayton-Smith J, Ismail S, Price SM, Preece MA, Stanier P, Moore GE. Chromosome 7p disruptions in Silver Russell syndrome: delineating an imprinted candidate gene region. *Hum Genet.* 2002; **111**: 376-87.
- Monk D, Smith R, Arnaud P, Preece MA, Stanier P, Beechey CV, Peters J, Kelsey G, Moore GE. Imprinted methylation profiles for proximal mouse chromosomes 11 and 7 as revealed by methylation-sensitive representational difference analysis. *Mamm Genome.* 2003; **14**: 805-16.
- Monk D, Arnaud P, Frost J, Hills FA, Stanier P, Feil R, Moore GE. Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**: 3066-74.
- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N. Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of IGF1R? *Am J Med Genet.* 2002; **113**: 173-7.
- Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, Azzi S, Rousseau A, Perin L, Houang M, Steunou V, Esteva B, Thibaud N, Demay MC, Danton F, Petriczko E, Bertrand AM, Heinrichs C, Carel JC, Loeuille GA, Pinto G, Jacquemont ML, Gicquel C, Cabrol S, Le Bouc Y. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; **92**: 3148-54.
- O'Driscoll M, Dobyns WB, van Hagen JM, Jeggo PA. Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am J Hum Genet.* 2007; **81**: 77-86.
- Pramparo T, de Gregori M, Gimelli S, Ciccone R, Frondizi D, Liehr T, Pellacani S, Masi G, Brovedani P, Zuffardi O, Guerrini R. A 7 Mb duplication at 22q13 in a girl with bipolar disorder and hippocampal malformation. *Am J Med Genet A.* 2008; **146A**: 1754-60.
- Prawitt D, Enklaar T, Gärtner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Lausch E, Schmidtke P, Reutzel D, Fees S, Lucito R, Korzon M, Brozek I, Limon J, Housman DE, Pelletier J, Zabel B. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**: 4085-90.
- Preece MA, Price SM, Davies V, Clough L, Stanier P, Trembath RC, Moore GE. Maternal uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 1997; **34**: 6-9.
- Price SM, Stanhope R, Garrett C, Preece MA, Trembath RC. The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet.* 1999; **36**: 837-42.
- Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002; **298**: 597-600.

- Reboul MP, Tandonnet O, Biteau N, Belet-de Putter C, Rebouissoux L, Moradkhani K, Vu PY, Saura R, Arveiler B, Lacombe D, Taine L, Iron A. Mosaic maternal uniparental isodisomy for chromosome 7q21-qter. *Clin Genet.* 2006; **70**: 207-13.
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol.* 1996; **149**: 775-9.
- Rossignol S, Steunou V, Chalas C et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet.* 2006; **43**: 902-907.
- Russell, A. A Syndrome of intrauterine dwarfism recognizable at birth with craniofacial dysostosis, disproportionate short arms and other anomalies. *Proc R Soc Med.* 1954; **47**: 1040-44
- Schneid H, Vazquez MP, Vacher C, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y. The Beckwith-Wiedemann syndrome phenotype and the risk of cancer. *Med Pediatr Oncol.* 1997; **28**: 411-5.
- Schönherr N, Meyer E, Binder G, Wollmann HA, Eggermann T. No evidence for additional imprinting defects in Silver-Russell syndrome patients with maternal uniparental disomy 7 or 11p15 epimutation. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007a; **20**: 1329-31.
- Schönherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann HA, Eggermann T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2007b; **44**: 59-63.
- Shiura H, Miyoshi N, Konishi A, Wakisaka-Saito N, Suzuki R, Muguruma K, Kohda T, Wakana S, Yokoyama M, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Meg1/Grb10 overexpression causes postnatal growth retardation and insulin resistance via negative modulation of the IGF1R and IR cascades. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; **329**: 909-16.
- Shiura H, Nakamura K, Hikichi T, Hino T, Oda K, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**: 1424-38.
- Silver HK, Kiyasu W, George J, Deamer WC. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 1953; **12**: 368-76
- Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 2004; **36**: 958-60.
- Spengler S. Microarray-Analytik von Silver-Russell-Syndrom-Patienten zur Erfassung genomischer Imbalancen. Diplomarbeit Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen 2008

Spengler S, Gogiel M, Schönherr N, Binder G, Eggermann T. Screening for genomic variants in ZFP57 in Silver-Russell syndrome patients with 11p15 epimutations. *Eur J Med Genet.* 2009; **52**: 415-6.

Spengler S, Schönherr N, Binder G, Wollmann HA, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Denecke B, Baudis M, Eggermann T. Submicroscopic chromosomal imbalances in idiopathic Silver-Russell syndrome (SRS): the SRS phenotype overlaps with the 12q14 microdeletion syndrome. *J Med Genet.* 2010; **47**: 356-60.

Spengler S, Begemann M, Binder G, Eggermann T. Testing of Buccal Swab DNA Does Not Increase the Detection Rate for Imprinting Control Region 1 Hypomethylation in Silver-Russell Syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011 May 25. [Epub ahead of print]

Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, Bartel-Friedrich S, Yatsenko SA, Lupski JR, Hansmann I. Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. *Am J Med Genet A.* 2005; **138**: 11-7.

Tümer Z, Harboe TL, Blennow E, Kalscheuer VM, Tommerup N, Brøndum-Nielsen K. Molecular cytogenetic characterization of ring chromosome 15 in three unrelated patients. *Am J Med Genet A.* 2004; **130A**: 340-4.

Turner CLS, Mackay DM, Callaway JLA et al. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *Eur J Med Genet.* 2010; **17**: 648-655

Veenma DC, Eussen HJ, Govaerts LC, de Kort SW, Odink RJ, Wouters CH, Hokken-Koelega AC, de Klein A. Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *J Med Genet.* 2010; **47**: 492-8.

Wakeling EL, Amero SA, Alders M, Bliet J, Forsythe E, Kumar S, Lim DH, MacDonald F, Mackay DJ, Maher ER, Moore GE, Poole RL, Price SM, Tangeraas T, Turner CL, Van Haelst MM, Willoughby C, Temple IK, Cobben JM. Epigenotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2010; **47**: 760-8.

Wakeling EL. Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child.* 2011 Feb 24. [Epub ahead of print]

Wang L, Balas B, Christ-Roberts CY, Kim RY, Ramos FJ, Kikani CK, Li C, Deng C, Reyna S, Musi N, Dong LQ, DeFronzo RA, Liu F. Peripheral disruption of the Grb10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo. *Mol Cell Biol.* 2007; **27**: 6497-505.

Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, Smith AC, Fei YL, Nishikawa J, Stockley TL, Best L, Chitayat D, Olney A, Ives E, Schneider A, Bestor TH, Li M, Sadowski P, Squire J. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet.* 2002; **11**: 1317-25.

Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet.* 2003; **12 Spec No 1**: R61-8.

Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet.* 2003; **4**: 359-68.

Wollmann HA, Kirchner T, Enders H, Preece MA, Ranke MB. Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients. *Eur J Pediatr.* 1995; **154**: 958-68.

Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010; **154C**: 329-34.

Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature.* 1995; **376**: 771-4.

7.3 Eigene Publikationen

2009:

Eggermann T, Gonzalez D, Spengler S, Arslan-Kirchner M, Binder G, Schönherr N. Broad clinical spectrum in Silver-Russell syndrome and consequences for genetic testing in growth retardation. *Pediatrics.* 2009; **123**: e929-31.

Jäger S, Schönherr N, Spengler S, Ranke MB, Wollmann HA, Binder G, Eggermann T. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) as member of an imprinted gene network does not harbor Silver-Russell specific variants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009; **22**: 555-9.

Spengler S, Gogiel M, Schönherr N, Binder G, Eggermann T. Screening for genomic variants in ZFP57 in Silver-Russell syndrome patients with 11p15 epimutations. *Eur J Med Genet.* 2009; **52**: 415-6.

2010:

Bachmann N, Spengler S, Binder G, Eggermann T. MBD3 mutations are not responsible for ICR1 hypomethylation in Silver-Russell syndrome. *Eur J Med Genet.* 2010; **53**: 23-4.

Eggermann T, Begemann M, Binder G, Spengler S. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; **5**: 19.

Eggermann T, Begemann M, Spengler S, Schröder C, Kordass U, Binder G. Genetic and epigenetic findings in Silver-Russell syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010; **8**: 86-93.

Eggermann T, Schönherr N, Spengler S, Jäger S, Denecke B, Binder G, Baudis M. Identification of a 21q22 duplication in a Silver-Russell syndrome patient further narrows down the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet A.* 2010; **152A**: 356-9.

Eggermann T, Spengler S, Bachmann N, Baudis M, Mau-Holzmann UA, Singer S, Rossier E. Chromosome 11p15 duplication in Silver-Russell syndrome due to a maternally inherited translocation t(11;15). *Am J Med Genet A*. 2010; **152A**:1484-7.

Spengler S, Schönherr N, Binder G, Wollmann HA, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Denecke B, Baudis M, Eggermann T. Submicroscopic chromosomal imbalances in idiopathic Silver-Russell syndrome (SRS): the SRS phenotype overlaps with the 12q14 microdeletion syndrome. *J Med Genet*. 2010; **47**: 356-60.

2011:

Begemann M, Spengler S, Kanber D, Haake A, Baudis M, Leisten I, Binder G, Markus S, Rupprecht T, Segerer H, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Siebert R, Buiting K, Eggermann T. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet*. 2011; **80**: 83-8.

Eggermann T, Spengler S, Begemann M, Binder G, Buiting K, Albrecht B, Spranger S. Deletion of the paternal allele of the imprinted MEST/PEG1 region in a patient with Silver-Russell syndrome features. *Clin Genet*. 2011: im Druck

Schwanitz G, Korsch E, Kremens-Korsch U, Ahlbory K, Gamerding U, Heidrich-Kaul C, Schubert R, Spengler S, Eggermann T. Mosaic tetrasomy 14pterq13.1: longitudinal study. *Eur J Med Genet*. 2011; **54**: e465-7.

Spengler S, Begemann M, Binder G, Eggermann T. Testing of Buccal Swab DNA Does Not Increase the Detection Rate for Imprinting Control Region 1 Hypomethylation in Silver-Russell Syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 May 25. [Epub ahead of print]

In Vorbereitung:

Begemann M, Leisten I, Binder G, Zerres K, Eggermann T, Spengler S. Use of multiplex methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. Eingereicht

Spengler S, Begemann M, Baudis M, Denecke B, Schulze B, Spaich C, Kroisel P, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Blümel, Zerres K, Ortiz Brüchle N, Eggermann T. Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in growth-retarded children with SRS features. In Vorbereitung

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

... Herrn Prof. Dr. rer. nat. T. Eggermann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die jederzeit optimale und sehr engagierte Betreuung sowie die konstruktive Unterstützung bei der Umsetzung eigener Ideen.

... Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Bohrmann vom Institut für Biologie II der RWTH Aachen für die freundliche Übernahme des Korreferats.

... Herrn Prof. Dr. med. K. Zerres für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen.

... Herrn Dr. rer. nat. B. Denecke und dem Team vom IZKF „BIOMAT.“ des Universitätsklinikums der RWTH Aachen für die Hybridisierung und das Scannen der Arrays.

... Herrn Dr. Michael Baudis vom Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich für die bioinformatische Auswertung der Mikroarrays mit der „R“-Software.

... den SRS-Patienten sowie ihren Familien für ihre Zustimmung zur Analyse ihres DNA-Materials zu Forschungszwecken und die Möglichkeit zur Verwendung der Daten in meiner Doktorarbeit.

... den auswärtigen Einsendern für die Bereitstellung des untersuchten Probenmaterials.

... den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für das angenehme Arbeitsklima und die jederzeit freundliche Unterstützung bei Problemen und Fragen. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei Herrn Dipl.-Biol. Matthias Begemann für die motivierende und inspirierende Teamarbeit insbesondere bei der Entwicklung des MS-SNuPE Assays, Frau TÄ Nadina Ortiz Brüchle für die moralische Unterstützung sowie Frau Christina Hensgens für die Unterstützung bei der Durchführung der Array-Analysen.

Danksagung

... meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da sind.

... meinen Freunden für ihre Zuversicht, die moralische Unterstützung und Motivation.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Netzwerk „Imprintingkrankungen“, 01GM0884) und die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|---------------|
| Name | Spengler |
| Vorname | Sabrina Maria |
| Geburtstag | 23.02.1983 |
| Geburtsort | Dorsten |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Qualifikationen

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 29.06.2002 | Abitur am St. Ursula Gymnasium in Dorsten |
| 01.10.03-30.09.05 | Grundstudium Diplom-Biologie an der Ruhr-Universität Bochum |
| 01.10.05-30.09.08 | Hauptstudium Diplom-Biologie an der RWTH Aachen |
| 01.02.08-30.09.08 | Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen mit dem Thema „Microarray-Analytik von Silver-Russell-Syndrom-Patienten zur Erfassung genomischer Imbalancen“ (Betreuer: Prof. Dr. T. Eggermann) Abschluss: Diplom-Biologin |
| seit 01.11.08 | Beginn der Promotion am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen mit dem Thema „Implementierung hochauflösender molekulargenetischer Methoden zur Klärung der Pathophysiologie des Silver-Russell-Syndroms“ (Betreuer: Prof. Dr. T. Eggermann) |

Berufstätigkeit

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01.11.08-30.06.09 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion |
| seit 01.07.09 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion |